



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G.Don de la provincia de Loja.

TRABAJO DE FIN DE TITULACION

AUTOR: Chamba Granda, Dalila Fernanda

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G.Don de la provincia de Loja”** cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, marzo de 2015

f.....

DECLARACION DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Dalila Fernanda Chamba Granda declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G.Don de la provincia de Loja”**, de la titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Formar parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad”

f) _____

Dalila Fernanda Chamba Granda

1104870959

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Jaime Oswaldo Chamba Chamba y Gloria Emperatriz Granda Esparza, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en un profesional de la patria. Ha sido un privilegio ser su hija, son los mejores padres.

A mis hermanos, Paulina y Jaimito por el apoyo incondicional que toda su vida me han brindado, por sus consejos y momentos de alegría que hemos compartido.

A mi sobrinita Karlita, que con sus travesuras siempre me ha hecho sonreír en momentos difíciles.

A toda mi familia que siempre ha estado pendiente de mí y guiándome por el buen camino.

A Dios y a la virgen por nunca abandonarme y darme confianza y fortaleza que he necesitado para ser cada día una mejor persona.

Dalila Fernanda Chamba Granda

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar todos los obstáculos y dificultades a lo largo de mi carrera.

Agradezco la confianza y el apoyo brindado por parte de mis padres, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado su amor, corrigiéndome mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mis hermanos por darme sus sabios consejos para seguir adelante, los quiero muchos.

A mis amigas de toda la universidad sobre todo a Magda, Made y Liz que siempre han estado conmigo en los buenos y malos momentos, por darme anécdotas maravillosas que nunca olvidaré siempre las tendré en mi corazón.

A mi director de Tesis, Ing. Eduardo Valarezo por transmitir sus conocimientos, por orientarme, por su manera de trabajar, su persistencia, su motivación y sobre todo su amistad han sido fundamentales para mi formación. A su manera ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración.

Dalila Fernanda

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. Extracción.....	7
1.1.2. Clasificación.....	7
1.1.3. Caracterización.....	8
1.1.3.1. <i>Cromatografías de gases</i>	9
1.1.4. Propiedades.....	12
1.1.5. Usos y aplicaciones.....	12
1.2. Actividad Biológica.....	14
1.2.1. Bacterias.....	15
1.2.1.1. <i>Bacterias Gram positivas</i>	15
1.2.1.2. <i>Bacterias Gram negativas</i>	15
1.2.2. Hongos.....	15
1.3. Actividad Antioxidante.....	16
1.4. Plantas medicinales.....	17
1.5. Flora Ecuatoriana.....	17
1.6. Familia <i>Chloranthaceae</i>	18
1.6.1. El género <i>Hedyosmum</i>	18

1.6.1.1. <i>Hedyosmum racemosum</i>	19
CAPITULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Metodología.....	22
2.1.1. Recolección de la materia vegetal.....	23
2.1.2. Determinación de la humedad relativa de la planta.....	24
2.1.3. Extracción del aceite esencial.....	25
2.1.3.1. Determinación del rendimiento.....	26
2.1.4. Determinación de las propiedades físicas.....	26
2.1.4.1. <i>Densidad relativa</i>	27
2.1.4.2. <i>Índice de refracción</i>	27
2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	28
2.1.5.1. <i>Cromatografía de gases</i>	29
2.1.5.1.1. <i>Preparación de la muestra</i>	29
2.1.5.1.2. <i>Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplado a espectrometría de masas</i>	30
2.1.5.1.3. <i>Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas</i>	31
2.1.5.1.4. <i>Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms, acoplada al detector de ionización de llama (FID)</i>	32
2.1.5.1.5. <i>Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID)</i>	33
2.1.5.1.6. <i>Identificación de los compuestos químicos</i>	34
2.1.6. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	35
2.1.6.1. <i>Cepas bacterianas y fúngicas</i>	36
2.1.6.2. <i>Actividad antimicrobiana</i>	37
2.1.6.2.1. <i>Método de microdilución en caldo</i>	37
2.1.6.2.2. <i>Preparación de la muestra</i>	37
2.1.6.2.3. <i>Preparación del cultivo bacteriano, "Cultivo Overnight"</i>	37
2.1.6.2.4. <i>Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano</i>	39
2.1.6.2.5. <i>Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI)</i>	39

2.1.6.3. Actividad antifúngica.....	41
2.1.6.3.1. Preparación de la muestra.....	41
2.1.6.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.....	41
2.1.6.3.3. Procedimiento.....	42
2.1.6.3.4. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.....	42
2.1.7. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	43
2.1.7.1. Preparación de la muestra de aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	44
2.1.7.2. Método ABTS ⁺	44
2.1.7.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS ⁺	45
2.1.7.2.2. Estándar Trolox y BHT para ABTS ⁺	45
2.1.7.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.....	46
2.1.7.3. Método DPPH.....	46
2.1.7.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.....	47
2.1.7.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.....	47
2.1.7.3.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.....	47
2.1.4.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS ⁺ y DPPH.....	48
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
3.1. Humedad relativa de <i>Hedyosmum racemosum</i>	51
3.2. Rendimiento de <i>Hedyosmum racemosum</i>	51
3.3. Propiedades físicas.....	53
3.3.1. Densidad relativa.....	53
3.3.2. Índice de refracción.....	54
3.4. Composición química del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	54
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	54
3.5. Actividad Biológica del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	64
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	64
3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.....	66
3.6. Actividad antioxidante.....	67
3.6.1. Método ABTS ⁺	67

3.6.1.1. <i>Lectura de las muestras de los estándares de referencia TROLOX y BHT</i>	68
3.6.1.2. <i>Lectura de las muestras del aceite esencial de Hedyosmum racemosum</i>	68
3.6.2. Método DPPH.....	69
3.6.2.1. <i>Lectura de las muestras de los estándares de referencia TROLOX y BHT</i>	69
3.6.2.2. <i>Lectura de las muestras del aceite esencial de Hedyosmum racemosum</i>	70
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXOS.....	78
Anexo 1. Determinación de Humedad relativa.....	79
Anexo 2. Determinación del porcentaje de rendimiento.....	80
Anexo 3. Determinación de la densidad relativa a 20°C.....	81
Anexo 4. Determinación del índice de refracción.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los aceites esenciales.....	8
Figura 2. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases	11
Figura 3. <i>Hedyosmum racemosum</i> con flores masculinas a) ficha de herbario PPN-UTPL, b) muestra recolectada.....	20
Figura 4. Esquema metodológico.....	22
Figura 5. Área de recolección de la especie <i>Hedyosmum racemosum</i> en la provincia de Loja.....	23
Figura 6. <i>Hedyosmum racemosum</i> con flores masculinas en el sitio de recolección.....	24
Figura 7. Proceso para extraer el aceite esencial de la materia vegetal.....	25
Figura 8. a) Recolección del aceite esencial b) frascos ámbar con aceite esencial previos hacer almacenados en refrigeración.....	26
Figura 9. Determinación de la densidad: a) Picnómetro vacío b) Picnómetro con agua c) Picnómetro con aceite.....	27
Figura 10. Lectura del índice de refracción.....	28
Figura 11. Esquema de corridas cromatográficas para la obtención del aceite esencial.....	29
Figura 12. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5ms.....	31
Figura 13. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.....	32
Figura 14. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5ms acoplada a un detector de ionización de llama (FID)	33
Figura 15. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	34
Figura 16. Dilución de aceite esencial y solvente.....	37
Figura 17. Caldos de cultivos para las diferentes cepas bacterianas.....	38
Figura 18. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite (µg/ml).....	40
Figura 19. Placas de microdilución selladas con parafilm previas a la incubación.....	41
Figura 20. Muestras de aceite diluido con Dimetil sulfóxido.....	41

Figura 21. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS scanning 333907.....	44
Figura 22. Muestras de aceite <i>Hedyosmm racemosum</i> analizadas mediante el método ABTS ⁺	47
Figura 23. Muestras de aceite <i>Hedyosmum racemosum</i> analizadas mediante el método DPPH.....	48
Figura 24. Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de inhibición.....	49
Figura 25. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial extraído de <i>hedyosmum racemosum</i> obtenidos en las columnas: a) DB-5ms y b) HP-INNOWAX.....	55
Figura 26. Compuestos mayoritarios en columna no polar.....	59
Figura 27. Compuestos mayoritarios en columna polar.....	60
Figura 28. Compuesto mayoritario estragole.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismo de prueba.....	36
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.....	38
Tabla 3. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.....	42
Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución en aceite.....	44
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.....	46
Tabla 6. Porcentaje de humedad relativa en la materia vegetal.....	51
Tabla 7. Rendimiento en % (v/p) del aceite esencial de <i>hedyosmum racemosum</i>	52
Tabla 8. Densidad media de aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	53
Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	54
Tabla 10. Composición química de <i>Hedyosmum racemosum</i> en las columnas: DB-5ms y HP-INNOWAX.....	57
Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) porcentaje de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.....	61
Tabla 12. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Hedyosmum racemosum</i>	65
Tabla 13. CMI del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i> frente a dos cepas fúngicas.	67
Tabla 14. Datos de método ABTS ⁺ para los estándares TROLOX y BHT.....	68
Tabla 15. Datos de método ABTS ⁺ para el aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i> ...	69
Tabla 16. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT.....	70
Tabla 17. Datos de método DPPH para aceite esencial de <i>hedyosmum racemosum</i>	70

RESUMEN

Hedyosmum racemosum es una planta dioica que crece en las elevaciones medias-altas, el aceite esencial de sus partes aéreas fue extraído por hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/EM y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH y ABTS⁺. También se determinaron las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 45 compuestos que representan el 98,87% del aceite. Los componentes mayoritarios fueron: α -Pinene (7,48%), α -Phellandrene (28,24%), Limonene (3,68%), (Z)- β -Ocimene (2,88%), Linalool (4,19%), Estragole (21,82%), Methyl Eugenol (5,38%), Germacrene-D (7,62%). La densidad del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* fue de 0,8978 (g/cm³) y el índice de refracción fue de 1,4911, el aceite no mostro actividad biológica frente a bacterias y hongos en estudio a las máximas concentraciones evaluadas (1000ug/mL). El aceite esencial de esta especie tampoco muestra actividad antioxidante a diversas concentraciones.

Palabras claves: *Hedyosmum racemosum*, Aceite esencial, Composición Química, Actividad biológica, Actividad antioxidante.

ABSTRACT

Hedyosmum racemosum is a dioecious plant, which growing wild on medium-high elevations. Essential oil was extracted from the aerial parts by hydrodistillation. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and the flame ionization detector (GC/FID). The biological activity was evaluated by the broth microdilution method and was expressed as minimum inhibitory concentrations (MICs). Antioxidant activity was determined by method of free radical DPPH and ABTS⁺. Physical properties of essential oil were also determined. Forty-five compounds were identified, representing 98,87% of the oil. Main compounds were α -pinene (7.48%), α -phellandrene (28.24%), limonene (3.68%), (Z)- β -ocimene (2.88%), linalool (4,19%), estragole (21.82%), Methyl Eugenol (5.38%), Germacrene-D (7.62%). Density of essential oil from *H. racemosum* was 0.8978 (g/cm³) and the refractive index was 1.4911. Essential oil not showed biological activity against bacteria and fungi at the highest concentration evaluated (1000ug/mL). Further, the essential oil did not show antioxidant activity at any concentrations tested.

Key words: *Hedyosmum racemosum*, Essential Oil, Chemical composition, biological activity, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* de la provincia de Zamora. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 se expone y analiza los resultados. Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de Región Sur del Ecuador y específicamente al proyecto “Evaluación de la flora aromática de la Provincia Zamora Chinchipe” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Proyectos de la Universidad Técnica de Loja. Con este estudio se aumenta el conocimiento de plantas nativas como *hedyosmum racemosum* extrayendo su aceite esencial para determinar sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: Farmacéutica, Cosmética y Alimenticia, proporcionando información que servirá al Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas, actividad biológica y antioxidante de los aceites esenciales de la región del sur del Ecuador, los mismos pueden ser usados como materia prima para las diferentes industrias o para la formulación de subproductos. El objetivo general es desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, y determinar los componentes químicos y las propiedades físicas presentes en la especie en estudio así como también determinar la actividad biológica y los objetivos específicos, también considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* y cálculo del rendimiento real; determinar las propiedades físicas y composición química las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *Hedyosmum racemosum* fueron desarrollados en su totalidad, para lo cual, se inició con la recolección del material vegetal, al cual luego de un tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial mediante arrastre con vapor, al aceite obtenido se le determino la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición química utilizando cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas CG/EM y acoplada un

detector de Ionización de llama CG/FID, La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5 cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)] y la actividad antioxidante mediante el método DPPH y ABTS⁺, que son dos métodos espectrofotométricos.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Briga, 1962). Estos aceites esenciales son componentes heterogéneos constituidos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sean por métodos químicos o físicos, como la destilación, refrigeración, centrifugación, etc (B. Pino, et al., 2009).

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas; la mayoría de ellos son volátiles y son responsables del olor del vegetal. Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes (Moreno, et al., 2009).

Sin embargo, la composición química de cada planta puede diferir considerablemente así sean de la misma familia, por esto es conveniente saber la composición exclusiva de cada especie, ya que pueden estar diferentes compuestos, pudiendo ser derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales o hasta por componentes difícilmente relacionables con las esencias, como alcaloides y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, sulfuros, aminas, etc. Es por eso que de cada especie es aconsejable hacer un estudio de los diferentes compuestos presentes en la esencia, determinando cual está en mayor o menor cantidad (Bandoni, 2002).

La mayor parte de los aceites esenciales son de olor agradable. El olor dependerá de los componentes que contengan el aceite, o la planta de la que se lo extrae. No todas las plantas poseen aceites esenciales, y muchas tienen una cantidad muy pequeña que hace imposible la extracción del mismo. De los millones de plantas existentes en el mundo se conocen aproximadamente 4000 distintos aceites esenciales (Pozo & Naranjo, 2006).

Los aceites esenciales se forman en las partes verdes de las plantas donde hay clorofila y de ahí son transportados a tejidos, principalmente a los brotes de la flor, estos son producidos por la planta para combatir gérmenes o infecciones, además los usan como mecanismo de defensa y para atraer animales para la polinización (Olaya & Méndez, 2003).

Los aceites esenciales son utilizados tanto en la industria de alimentos como en la industria farmacéutica cada vez más generalizado, debido en parte a la homogeneidad del aroma y a la minimización de las posibilidades de contaminación microbiana. También son productos naturales valiosos utilizados como materias primas en muchos campos, incluyendo perfumes, cosméticos, aromaterapia, fitoterapia, especias y nutrición (Buchbauer, 2000).

1.1.1. Extracción.

El aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum racemosum*, en estado fresco, se obtuvo por el método de destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles esto consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adición de la tensión del vapor que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial y finalmente se separan en un decantador o vaso florentino (Bandoni, 2002).

1.1.2. Clasificación.

La clasificación de aceites esenciales se basa en diferentes criterios: de acuerdo a su consistencia (esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas), de acuerdo a su origen (naturales, artificiales y sintéticos) y desde el punto de vista químico (esencias monoterpénicas, sequiterpénicas y fenilpropánicos) (Carhuapoma, 2006).

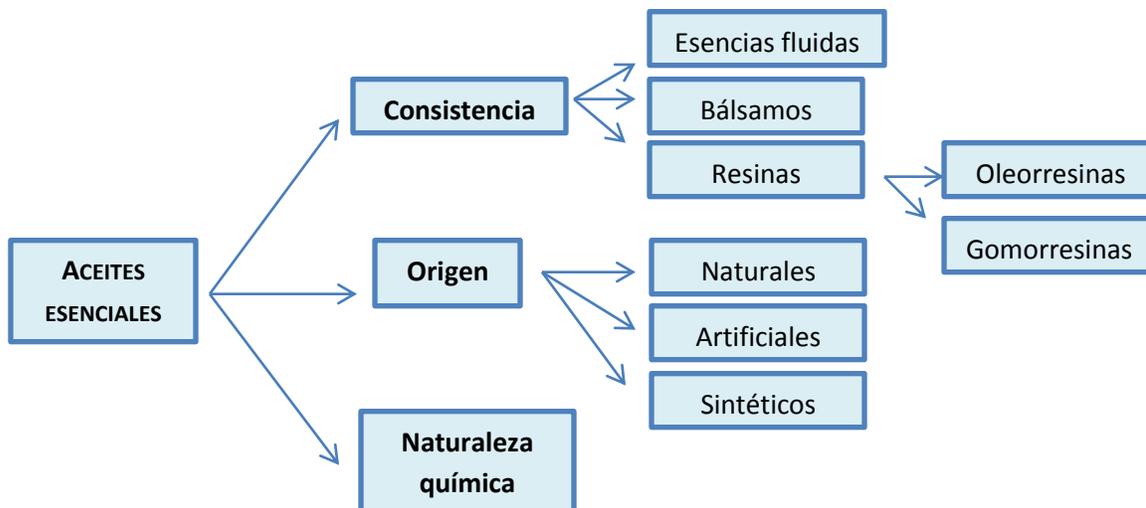


Figura. 1 Clasificación de los aceites esenciales
Fuente: Chamba, F.

1.1.3. Caracterización.

La caracterización física de los aceites esenciales es muy importante para determinar el rendimiento del aceite esencial de cada recolección usando la relación entre el volumen de aceite esencial obtenido y la masa de la muestra vegetal. También se determina el índice de refracción, densidad y propiedades sensoriales como olor, color y sabor.

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua. Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua (Cerpa, et al., 2007).

Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

- **No terpenoides.** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.

- **Terpenoides.** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.

Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Rios, et al., 2007).

La caracterización química de los aceites esenciales se llevó a cabo por la técnica cromatográfica de gases (CG). En el control de calidad, la CG se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir los mayoritarios o aquéllos que, sin ser mayoritarios, tengan una especial trascendencia para la calidad (Bandoni, 2002).

1.1.3.1. Cromatografía de gases.

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia del reparto entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna (Montoya & Páez, 2012).

En la actualidad la cromatografía de gases es una técnica analítica usada en muchos laboratorios universitarios, de investigación e industriales, debido a su alta resolución, sensibilidad y selectividad. Además de las aplicaciones típicamente analíticas, la cromatografía de gases puede utilizarse a escala preparativa para la obtención de compuestos de elevada pureza, así como también es posible la obtención de datos físico-químicos relativos a propiedades superficiales y termodinámica de procesos de adsorción, separación, y desarrollo de catalizadores (Montoya & Páez, 2012).

Un cromatógrafo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para: 1) proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil), 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye, 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria, 4) para mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura), 5) detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente. Los módulos del instrumento se muestran esquemáticamente en la (Figura 2) (Gomis Yagües, 2008).

El cromatógrafo de gases está constituido principalmente (Olguín & Rodríguez, 2004):

- Fase móvil (gas portador)
- Puerto de inyección
- Horno
- Columna
- Fase estacionaria
- Detector
- Sistema de registro de datos

Entre los detectores más utilizados caben mencionar el detector FID (ionización en llama) que por su alta versatilidad hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Entre los gases portadores, que deben ser químicamente inertes, se encuentran el helio, el nitrógeno y el hidrógeno. La elección de los gases esta con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. Con el suministro de gas se encuentran asociados los reguladores de presión, manómetros y medidores de caudal. Además, el sistema de gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua u otras impurezas (Rodríguez Chávez, 2014).

El gas portador se almacena en un cilindro apropiado conectado al equipo mediante un regulador de presión, la muestra (aceite) se introduce en el sistema mediante jeringas, utilizando los inyectores. El inyector está a una temperatura superior a la del punto de ebullición del disolvente de la muestra y normalmente, también superior al de los analitos; y es ahí donde se produce la necesaria volatilización. La muestra se diluye en el gas

portador y solo una fracción entra en la columna capilar en donde se realiza la separación; luego de pasar la columna, los analitos llegan a los detectores, donde se produce una señal eléctrica que es amplificada y enviada a un sistema de almacenamiento de datos para ser analizada (Montoya & Páez, 2012).

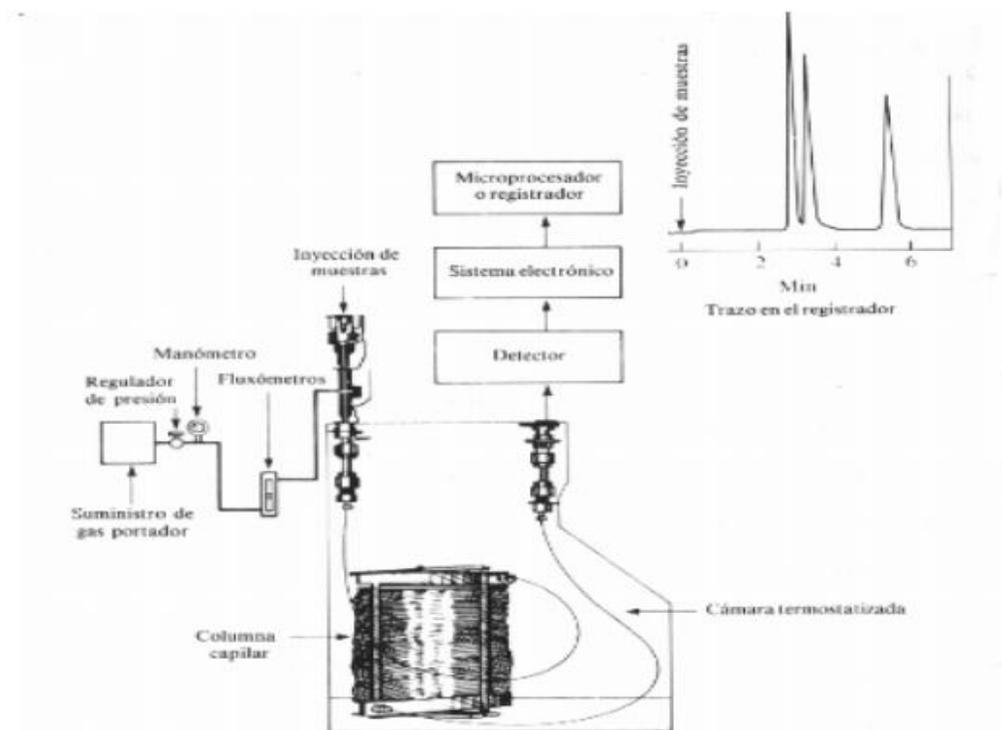


Figura 2. Diagrama de las partes básicas de un cromatógrafo de gases

Fuente: (Gomis Yagües, 2008)

En cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más extensamente utilizado y, por lo general, uno de los más aplicables. En un quemador, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente.

La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama. El detector de ionización de llama debido a que es un detector que responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es un detector sensible a la masa, más que un sistema sensible a la concentración (Gomis Yagües, 2008).

El reconocimiento de los compuestos individuales se realizó mediante la comparación de los patrones de fraccionamiento de masas disponibles en el Libro de Adams 2009 y la librería de compuestos NIST 2000. La composición relativa de los compuestos se estimó mediante el análisis de relación de área.

En el análisis cualitativo, la identificación de los componentes volátiles se la realizó comparando los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las dos columnas (apolar y polar) para los compuestos analizados frente a los IK reportados en la literatura. Los índices de retención experimentales se determinaron en relación a la serie homóloga de alcanos (C10 a C25). A su vez cada compuesto detectado posee su respectivo espectro de masas el cual fue comparado con los espectros que proporciona la base de datos del equipo biblioteca Wiley (TIP, 2002).

1.1.4. Propiedades.

Las propiedades que presentan los aceites esenciales son beneficiosas para el ser humano y por lo tanto son cotizados en el mundo cuando son de origen natural. Dependiendo de la procedencia del aceite, de la forma de extracción y de sus componentes serán las propiedades del mismo, sin embargo todos los aceites esenciales presentan ciertas propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo (Berger, 2007).

La gran mayoría de aceites esenciales tienen acción antiséptica, que se manifiesta frente a un gran número de bacterias patógenas e incluye ciertas cepas antibiorresistentes. Algunos aceites son también activos frente a hongos inferiores responsables de micosis e incluso frente a levaduras (Candida). Compuestos como el citral, geraniol, linalol o timol muestran un poder antiséptico muy superior al del fenol (Arteche, et al., 1998).

1.1.5. Usos y aplicaciones.

De los más de tres mil aceites esenciales analizados, se ha encontrado que más de doscientos tienen un alto valor comercial Pavas and Vega (2012) y se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria: alimentos, jabones, ambientadores, perfumes, cosméticos, licores, insecticidas, fármacos, etc.

Son empleados como aromatizantes y/o saborizantes, como ingredientes de algunos preparados farmacéuticos o son base de perfumes y productos cosméticos finos, desodorantes, lociones, jabones líquidos, pastas dentífricas. Algunos de los aceites esenciales poseen propiedades insecticidas y funguicidas y se utilizan en los preparados especiales. Gonzalez (2004) describe algunas aplicaciones industriales tales como:

Industria Alimentaria Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el cilantro, naranja y menta, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad podemos citar las esencias extraídas del naranjo, limón, mentas e hinojo, entre otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

Industria Farmacéutica Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros).

Industria de Cosméticos Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda, rosas y pachouli.

Industria de productos de uso veterinario Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. También requiere limoneno y mentol como insecticidas.

Desodorantes Industriales Actualmente se ha desarrollado el uso de esencias para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. La industria de las pinturas emplea limoneno como disolvente biodegradable. También se imparte olor a juguetes. En textiles, como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido. En papelería, para impregnar de fragancias cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales.

Industria tabacalera Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.

Biocidas e insecticidas Existen esencias con propiedades bactericidas, como el tomillo, clavo, salvia, mentas, orégano, pino, etc (Avalos García & Carril, 2011).

1.2. Actividad Biológica.

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido descrita por varios grupos de investigadores. Algunos aceites son activos contra bacterias pero no contra hongos y viceversa, mientras que otros estimulan el crecimiento de estos microorganismos (Hernández & Rodríguez, 2001).

Los aceites esenciales han demostrado capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram positiva y Gram negativa, resultando estas últimas más resistentes. Los terpenos que forman parte de los aceites esenciales son los que les confieren sus propiedades biológicas (Hernández & Rodríguez, 2001)

Estos poseen actividad antimicrobiana por si mismos, pero no siempre esta actividad concuerda con la del aceite esencial completo; lo que estaría sugiriendo que las mezclas complejas de estos terpenos podrían determinar relaciones sinérgicas o antagónicas entre estos. Se ha observado que los compuestos terpénicos aromáticos son los que poseen mayor actividad inhibitoria. La actividad antifungica de los aceites ha sido descrita tanto para hongos unicelulares como para hongos filamentosos. En las plantas las mezclas de monoterpenos y sesquiterpenos presentes en los aceites constituye una de las principales barreras de defensa contra los hongos patógenos (Hernández & Rodríguez, 2001).

Entre los organismos patógenos causantes de múltiples enfermedades infecciosas y que se evaluarán en la presente investigación se encuentran los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, así como bacterias Gram positivas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgares*, *Escherichia coli*, *Salmonella Tiphymurium*.

1.2.1. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos que poseen una amplia distribución en la naturaleza, según las características de su pared celular las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram-positivas y Gram-negativas; sus diferencias estructurales tienen implicaciones importantes en la taxonomía, en la clínica y en la terapéutica (Ruiz & Moreno, 2005)

1.2.1.1. Bacterias Gram positivas.

Se conoce como bacterias Gram Positivas al grupo de bacterias que no posee una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano, que tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie (Pahissa, 2009). Se distinguen especialmente por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Produce diversas enfermedades entre ellas tenemos: erisipelotricosis, la listeriosis y el ántrax (Díaz, et al., 2010).

1.2.1.2. Bacterias Gram negativas.

Se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre característico (Romero, 2007). Presenta doble membrana celular una externa y la otra citoplasmática, lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales supergrupos de bacterias (Largo, et al., 1973).

Muchas especies de bacterias Gram negativas causan enfermedades. Los cocos Gram-negativos causan la gonorrea, meningitis y síntomas respiratorios, entre otros (Casellas, 2011). Los bacilos Gram-negativos incluyen un gran número de especies. Algunos de ellos causan principalmente enfermedades respiratorias, enfermedades urinarias y enfermedades gastrointestinales (Del Pozo, et al., 2006).

1.2.2. Hongos.

Los hongos son microorganismos generalmente saprofitos para el hombre; es decir, beneficiosos. En algunas ocasiones estos microorganismos se vuelven oportunistas, cuando las defensas del huésped se encuentran disminuidas, ocasionando patologías denominadas micosis (Jover & García, 2006)

Las micosis superficiales son un grupo de enfermedades localizadas en la piel y anexos, causadas por dermatofitos, levaduras y mohos diferentes a dermatofitos; por su alta frecuencia, estas micosis son un serio problema de salud pública mundial (Manzano-Gayosso, 2008).

1.3 Actividad Antioxidante.

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones oxidativas en cadena. Los antioxidantes naturales constituyen un amplio grupo de compuestos que incluye principalmente compuestos polifenólicos y vitaminas (Barrero., et al., 2004).

Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales han mostrado acción antioxidante y anticancerígena, incluyendo terpenos fenólicos, como el caso del ácido carnosólico, carnosol, rosmarindifenol y rosmarinquinona del *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* entre otras hierbas aromáticas (García, et al., 2001).

Existen monoterpenos antioxidantes de acción anticancerígena como el limoneno y los pinenos, éstos inhiben la producción de colesterol y ayudan en la protección de la actividad de ciertas enzimas. (Vasconcellos A, 2000).

Para realizar la actividad antioxidante se utilizan varios métodos espectrofotométricos entre ellos los más usados son ABTS⁺ y DPPH.

El radical ABTS⁺ presenta una absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Esta propiedad da la posibilidad de evitar interferencias generadas por cromógenos del aceite esencial. La absorbancia característica de este radical que posee un color verde azulado, disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical. Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que presenten los aceites esenciales mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución de ABTS⁺ (Barrero. et al., 2004)

DPPH este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del aceite esencial. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando la muestra que se

añade posee capacidad antioxidante. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realizó, empleando soluciones patrón de Trolox y BHT. Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método (Conde., et al., 2012).

1.4. Plantas medicinales.

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran sustancias que ejercen acción farmacológica, estas sustancias activas son producto del metabolismo secundario de las plantas que resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos (Estrella, et al., 2005).

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales (Lizcano & Vergara, 2008).

Aunque los avances tecnológicos han ido desplazando cada vez más su uso por sustancias artificiales, hoy por hoy, los consumidores han percibido que los compuestos naturales son más inocuos y por ello los prefieren; de esta manera, se observa cómo crece su consumo y utilización, lo que ha dado paso a un desarrollo importante de la agroindustria de plantas aromáticas y medicinales a nivel mundial (Castañeda, et al., 2007).

1.5. Flora Ecuatoriana.

Ecuador posee gran cantidad de especies vegetales por kilómetro cuadrado, su flora es muy rica y variada debido a la diversidad de los medios ecológicos. Se han identificado 46 ecosistemas que entre los más importantes están: los bosques occidentales, manglares, bosques andinos, la Amazonía y Galápagos; es por esto que es considerado entre los 12 países megadiversos que contienen el 70% de la biodiversidad total del planeta (Patzelt, 2002).

La presencia de los Andes como factor altitudinal, ha dado al territorio ecuatoriano una fisonomía única existiendo diferentes climas y formas de vida; así como también en las profundidades de las cordilleras y que se extienden hacia el oriente y occidente existen condiciones vegetativas únicas, es por esto que el país no es completamente tropical o tórrido a pesar de estar situado en la zona ecuatorial (Patzelt, 2002).

Con el devenir del tiempo el conocimiento del uso de plantas ha evolucionado y ha sido transmitido durante generaciones en las poblaciones indígenas, mestizas y afroecuatorianas (Ríos, et al., 2008). En la Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador (De la Torre, et al., 2008) se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, el 75 % de especies medicinales son plantas nativas y el 5% son endémicas. Los usos medicinales de las plantas reportados en el país son numerosos, principalmente son utilizadas para aliviar diferentes sintomatologías como dolores de cabeza, estómago o músculos, fiebre, tos, hemorragias, además de otras afecciones como heridas, contravenenos, infecciones, entre otros (De la Torre et al., 2008).

1.6. La familia *Chloranthaceae*.

La familia *Chloranthaceae* está constituida por hierbas, arbustos o árboles aromáticos pequeños y cuenta con alrededor de 75 especies comprendidas en 4 géneros: *Chloranthus*, *Sarcandra*, *Ascarina* y *Hedyosmum*, presentes en áreas tropicales y subtropical (Caoa, et al., 2008; Kirchner, et al., 2010).

Las especies de esta familia son ampliamente utilizadas en medicina popular como antiespasmódica, antiséptica, medicamentos contra el cáncer, alivio del dolor y para el tratamiento de infecciones de la piel (Caoa et al., 2008)

1.6.1. El género *Hedyosmum*.

Las especies del género *Hedyosmum* son árboles o arbustos, rara vez plantas herbáceas, fuertemente aromáticas, tienen hojas opuestas, venas pinnadas, son dentadas, pecioladas y poseen numerosos caracteres taxonómicos. Son árboles dioicos, unos árboles con flores masculinas y con flores femeninas. Los frutos son pequeños, carnosos y de color blanco al madurar. Crecen en altitudes aproximadamente de 500 hasta 2800 m s.n.m., su hábitat es en las montañas encontrándose en regiones que están bajo la influencia frecuente de las nieblas o, en zonas más secas. La infusión de las hojas de varias especies de este género se consume en forma de té, o bien, como sustituto de

café. A algunas especies se les atribuyen propiedades medicinales contra variadas afecciones (Todzia, 1988). Existen 16 especies de *Hedyosmum* que se reportan en el Ecuador (Gulavisí, 2008).

El género *Hedyosmum* presentan un agradable aroma a acre que emanan las zonas expuestas de la planta. El nombre *Hedyosmum* deriva del griego hedy (placentero) y osmum (olor), refiriéndose a este olor el cual es asociado con la pimienta, el limón y el anís (Kubitzki, et al., 1993).

1.6.1.1. *Hedyosmum racemosum*.

Su **nombre científico** *Hedyosmum racemosum* su **autor** Ruiz & Pavón Don figura 3, pertenece a la familia Choranthaceae, sus nombres comunes son Sacha guayusa, Úntuntup (shuar chicham), guayusa, guayusa de monte, jicamilla grande (castellano), es una planta medicinal que trata los dolores estomacales, realizando infusiones de las hojas, también es utilizada como material en la construcción, se distribuye en Cañar, Carchi, Loja, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos, Zamora-Chinchipe (Biocomercio andino, 2014)

Taxonomía de Hedyosmum racemosum

Nombre Científico	<i>Hedyosmum racemosum</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Chloranthaceae
Género	<i>Hedyosmum</i>
Epíteto Específico	racemosum
Autor Epíteto Específico	(Ruiz & Pav.) G. Don
Determinador	Todzia, Carol A.
Fecha determinación	1986

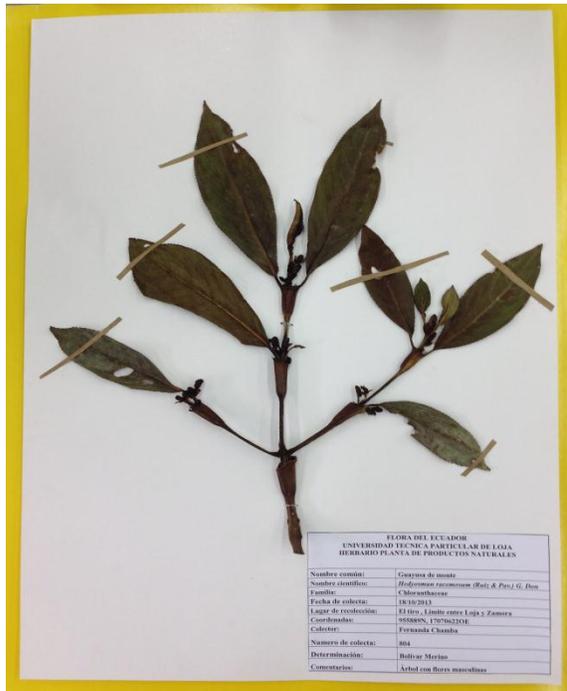


Figura 3: *Hedyosmum racemosum* con flores masculinas: a) ficha de herbario PPN-UTPL, b) muestra recolectada

Fuente Chamba, F.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología.

En la figura 4 se esquematiza el procedimiento de obtención del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, los mismos que se especifica los pasos para determinar la composición química, actividad biológica, actividad antioxidante y propiedades físicas.

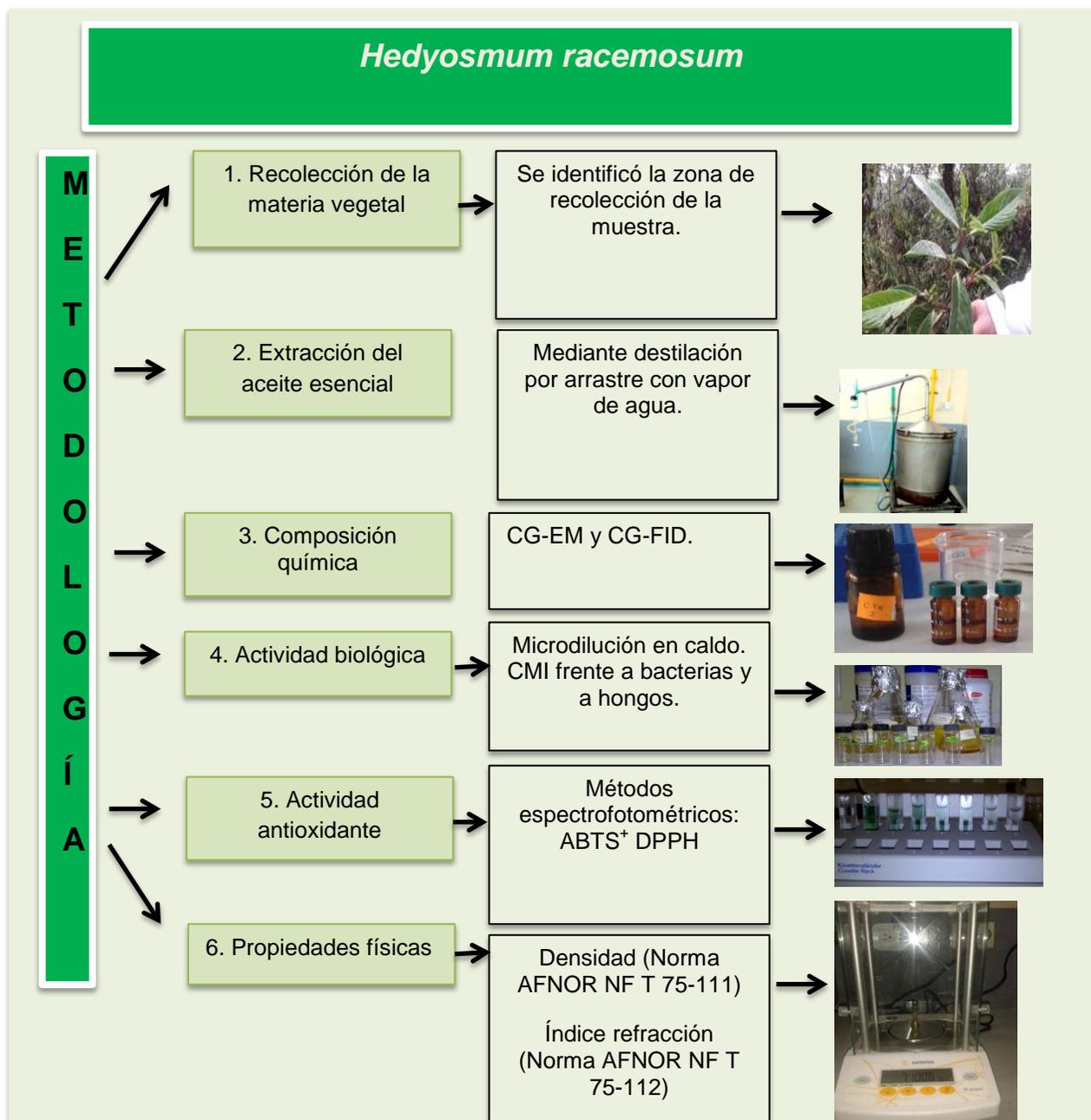


Figura 4. Esquema metodológico.

Fuente: Chamba, F.

2.1.1. Recolección del material vegetal.

Se recolectó el material vegetal en el sector “El Tiro” entre el límite de la provincia de Loja y Zamora a 2762 m s.n.m. con coordenadas 955889N, 17070622OE (Figura 5).

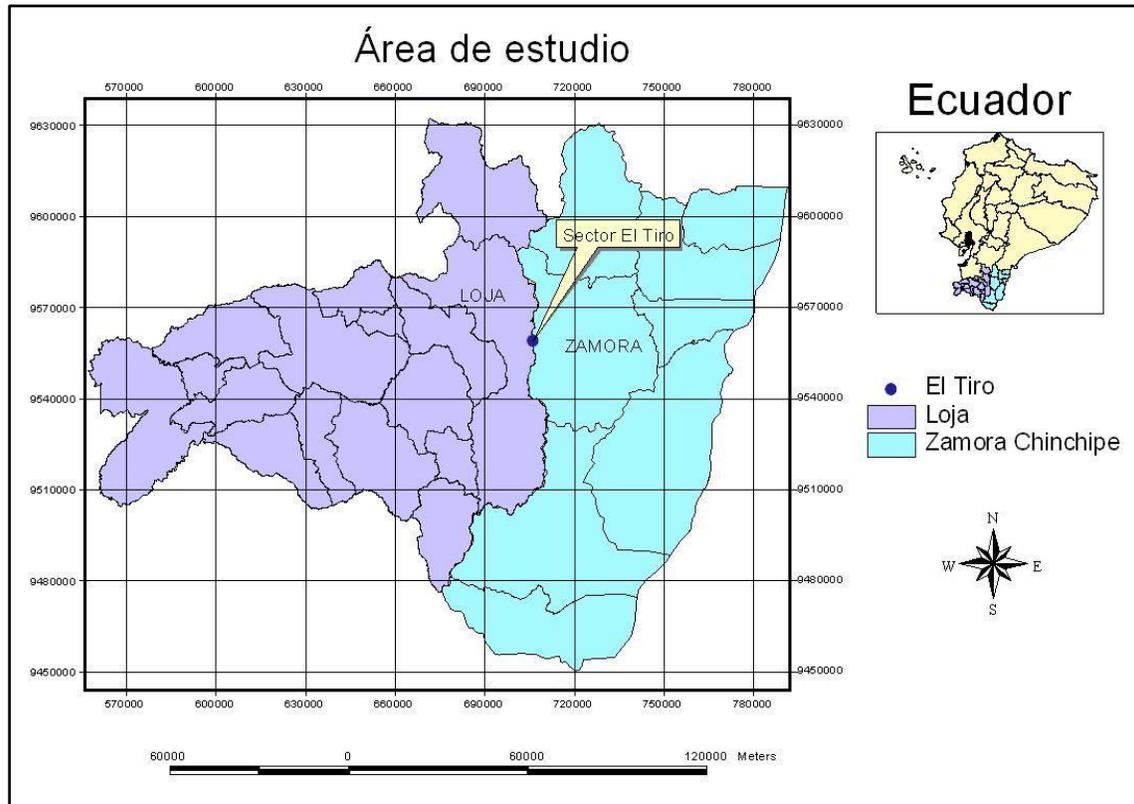


Figura 5. Área de recolección de la especie *Hedyosmum racemosum* en la provincia de Loja
Fuente: Chamba, F.

Las partes aéreas de *H. racemosum* se recolectaron en estado de floración Figura 6, la especie fue identificada por el Ing. Bolívar Merino¹ y una muestra botánica fue depositada en el Herbario del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, con voucher PPN-804.

¹ Investigador del Herbario de Loja perteneciente a la UTPL



Figura 6. *Hedyosmum racemosum* con flores masculinas en el sitio de recolección

Fuente: Chamba, F.

La recolección de la muestra vegetal se realizó en tres salidas de campo la primera se realizó el 30 de octubre, la segunda el 14 noviembre, la tercera 30 noviembre, posteriormente la muestra fue transportada a los laboratorios del Departamento de Química de la UTPL para su tratamiento post cosecha el mismo que consistió en seleccionar el material vegetal, eliminando cualquier impureza o partes deterioradas de la planta con el fin de evitar contaminaciones.

2.1.2. Determinación de la humedad relativa de la planta.

Se partió de las hojas de *H. racemosum*, las cuales se cortaron en pequeños pedazos con el fin de obtener una muestra más compacta y homogénea; posterior a ello se colocó aproximadamente 1 g de la materia vegetal en cápsulas de porcelana. Luego las cápsulas con el material vegetal fueron colocadas en la lámpara ULTRA X por 45 minutos y posteriormente fueron colocadas en el desecador por 5 minutos, se registró el peso y se expuso nuevamente el materia vegetal a la lámpara por 15 minutos con la finalidad de eliminar el agua presente en la especie estudiada, este proceso se realizó de 3 a 4 veces hasta que el peso se mantenga estable.

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en cada recolección con el objetivo de obtener resultados confiables.

Una vez finalizado todo el procedimiento se realizó los cálculos respectivos para determinar la Humedad (Anexo I).

2.1.3. Extracción del aceite esencial.

Luego de haber realizado el tratamiento post cosecha se procedió a la obtención del aceite esencial por medio de la destilación con arrastre de vapor, dicho proceso consistió en separar los componentes insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros no volátiles que se encuentran en la mezcla, en este caso del aceite esencial mediante vapor de agua seguida de la condensación.

La extracción del aceite se efectuó en un destilador modelo clevenger figura 7 que consta de un tanque de acero inoxidable en el que se colocó agua con el material vegetal troceado sobre una placa perforada. Al tapan el tanque de extracción se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante así como el sello de agua en los bordes del destilador; el recipiente se expuso a una fuente de calor ubicada en la parte inferior de tal forma que el vapor de agua generado circule a través de la material vegetal y, al salir del cuello del cisne se enfríe en el condensador en donde pasa al estado líquido. Este líquido es recibido en un florentino en el cual se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades. Este proceso se realizó por triplicado es decir por cada recolección, obteniéndose nueve muestras de aceite esencial.

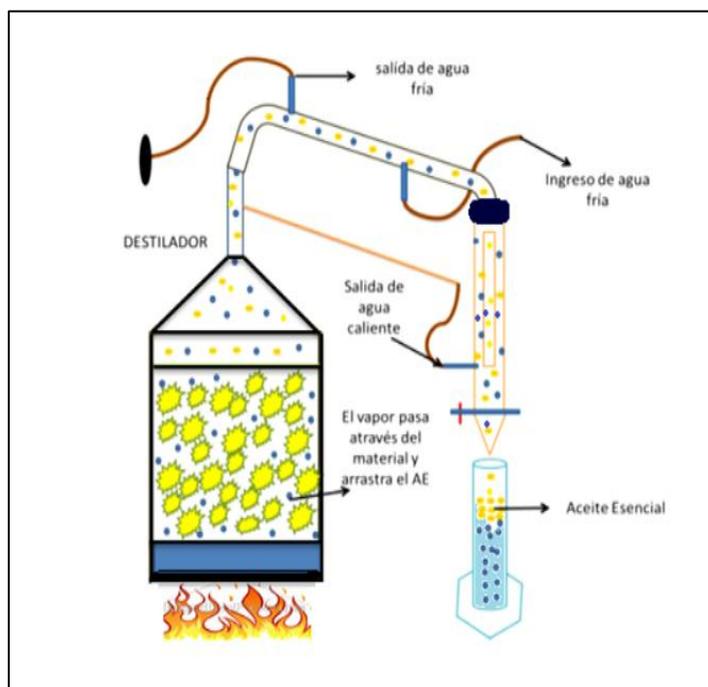


Figura 7. Proceso para extraer el aceite esencial de la materia vegetal
Fuente: (Arias, 2012).

El aceite esencial fue recogido en una probeta para medir su volumen (Figura 8 a), para luego ser envasado en recipientes de color ámbar con su respectivo código asignado. Para cada aceite se hizo constar las iniciales de la especie vegetal, el número de recolección, la fecha de recolección y el número de destilación (Figura 8 b) Finalmente las muestras fueron almacenadas en refrigeración a -4°C , con el fin de mantener el aceite en buenas condiciones.

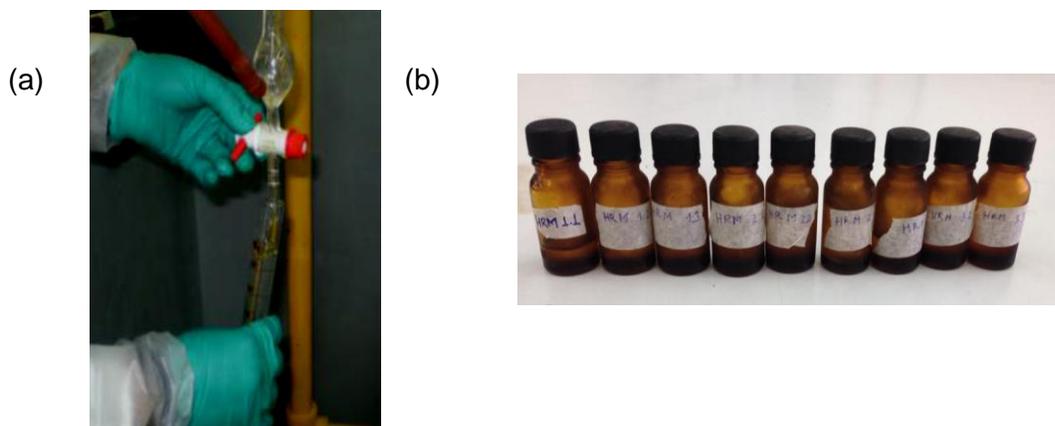


Figura 8. a) Recolección del aceite esencial. **b)** Frascos ámbar con aceite esencial previos a ser almacenados en refrigeración.

Fuente: Chamba, F.

2.1.3.1. Determinación del rendimiento.

El rendimiento del aceite esencial depende mucho del estado fenológico y las condiciones en la que la materia vegetal fue sometida a destilación. Para determinar el rendimiento se relacionó el volumen de aceite esencial obtenido en cada destilación a partir de la cantidad de materia vegetal utilizada (Anexo II).

2.1.4. Determinación de las propiedades físicas.

Las propiedades físicas que se determinaron son densidad relativa según la norma AFNOR NFT75-111 y el índice de refracción que se determinó según la norma AFNOR NF 75-112 25.

2.1.4.1. Densidad relativa.

La densidad se determinó según la norma AFNOR NFT75-111 (Anexo III), para este análisis se trabajó con las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección. Para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Se utilizó un picnómetro de 2mL, una balanza y un termómetro; el primer paso a seguir es obtener el peso inicial del picnómetro vacío, seguido se registra el peso del picnómetro con agua y finalmente con el aceite esencial (Figura 9: a, b y c); en el Anexo III se muestran la fórmula para determinar la densidad del aceite esencial.

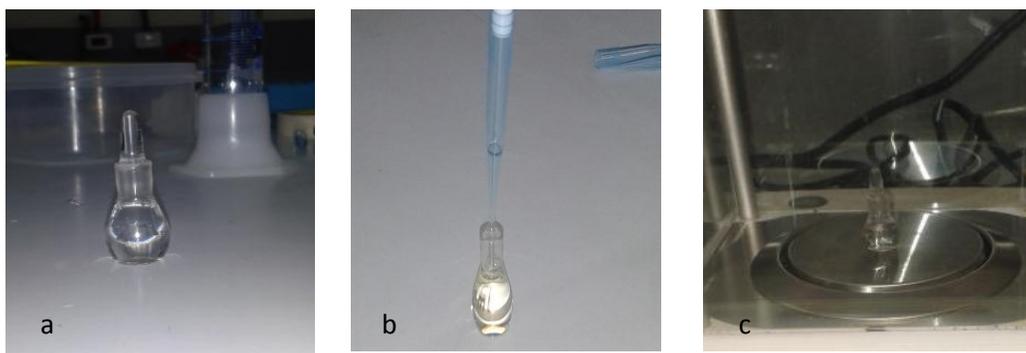


Figura 9. Determinación de la densidad: **a)** Picnómetro vacío **b)** Picnómetro con agua **c)** Picnómetro con aceite

Fuente: Chamba, F.

2.1.4.2. Índice de refracción.

El índice de refracción se determinó según la norma AFNOR NF 75-112 25 (ISO 280:1998), en el cual se utilizó el refractómetro ABBE, marca BOECO GERMANY, disponible en el laboratorio de Ingeniería de Procesos. Para ello se colocó una gota de aceite esencial y se procedió a la respectiva lectura

En el anexo IV se muestra la fórmula para determinar el índice de refracción. Se obtuvo un valor promedio a partir de las muestras obtenidas de la mezcla de los tres aceites por cada recolección Figura 10.

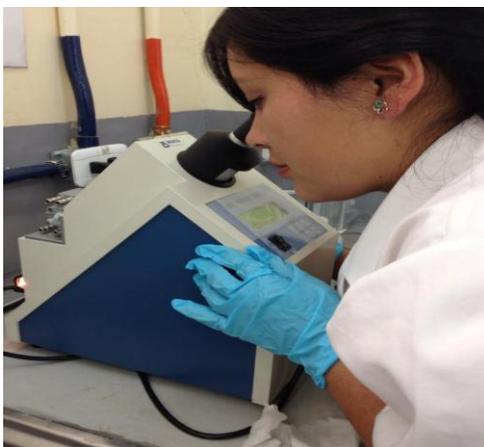


Figura 10. Lectura del índice de refracción.

Fuente: Chamba, F.

2.1.5. Determinación de la composición química del aceite esencial.

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa CG-EM y acoplada a un detector de ionización de llama CG-FID, dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB-5ms y una polar HP-INNOWAX, con el fin de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente. En la figura 11, se detalla en un esquema la secuencia de las corridas cromatográficas para la obtención de los diferentes cromatogramas e identificación química del aceite esencial de la materia vegetal.

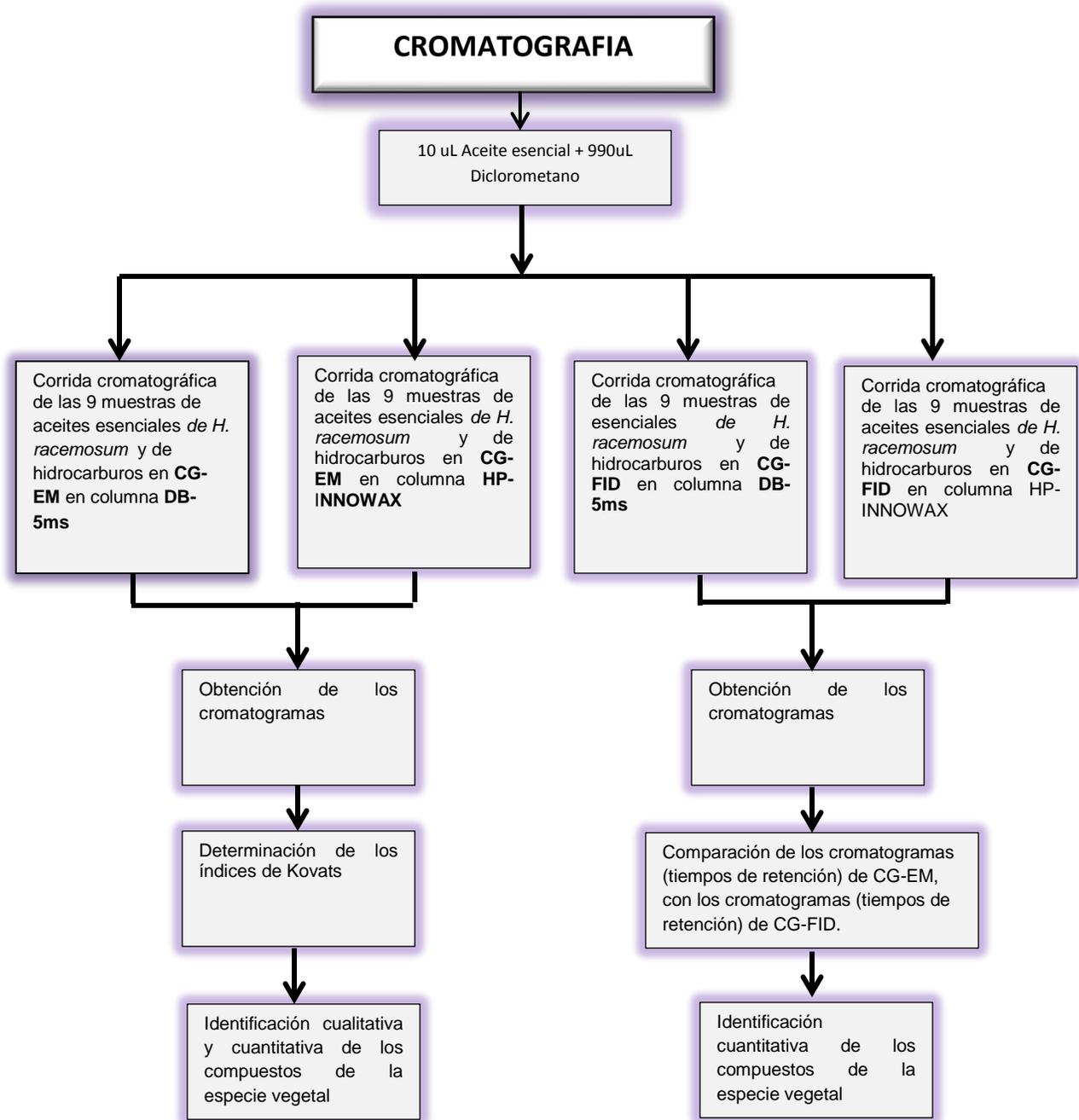


Figura 11. Esquema de las corridas cromatográficas para la obtención del aceite esencial

Fuente: Chamba, F.

2.1.5.1. Cromatografía de gases.

2.1.5.1.1. Preparación de la muestra.

Previo al análisis en el cromatógrafo se procedió a dar un tratamiento especial a las muestras que contienen el aceite en estudio, este se fundamenta básicamente en

deshidratar las muestras que puedan contener remanentes de agua que posiblemente se quedaron al momento de recolectar los aceite en los recipientes de color ámbar, todo esto con la finalidad de evitar cualquier tipo de obstrucción en la columna. Para ello se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) en cantidades equivalentes al agua introducida, este fue colocado en los frascos que contenían el aceite esencial, se dejó reposar por 30 minutos y se transvaso a nuevos recipientes para llevar seguidamente al cromatografo de gases.

Luego de ser extraída el agua se colocó 10 μL del aceite esencial de *H. racemosum* y 990 μL de diclorometano grado HPLC, obteniendo 9 disoluciones a una concentración del 1%, al mismo tiempo se procedió a rotular cada uno de los viales que contenían los aceites con la finalidad de evitar errores en las corridas cromatográficas. Además se realizó la inyección de hidrocarburos (C_{10} decano a C_{25} -pentacosano) comercialmente conocidos como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, los Hidrocarburos fueron inyectados tanto en la columna DB-5ms como en HP-INOWAX. El tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirven como base en la determinación de los índices de Kovats los mismos que son indispensables para la identificación de los compuestos químicos, los hidrocarburos fueron inyectados bajo los mismos parámetros que los aceites.

2.1.5.1.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplada a espectrometría de masas.

Las condiciones utilizadas para realizar correctamente la cromatografía son las que se exponen en la figura 12.

Los hidrocarburos y todas las muestras de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* fueron tratadas siguiendo los mismos parámetros anteriormente mencionados.

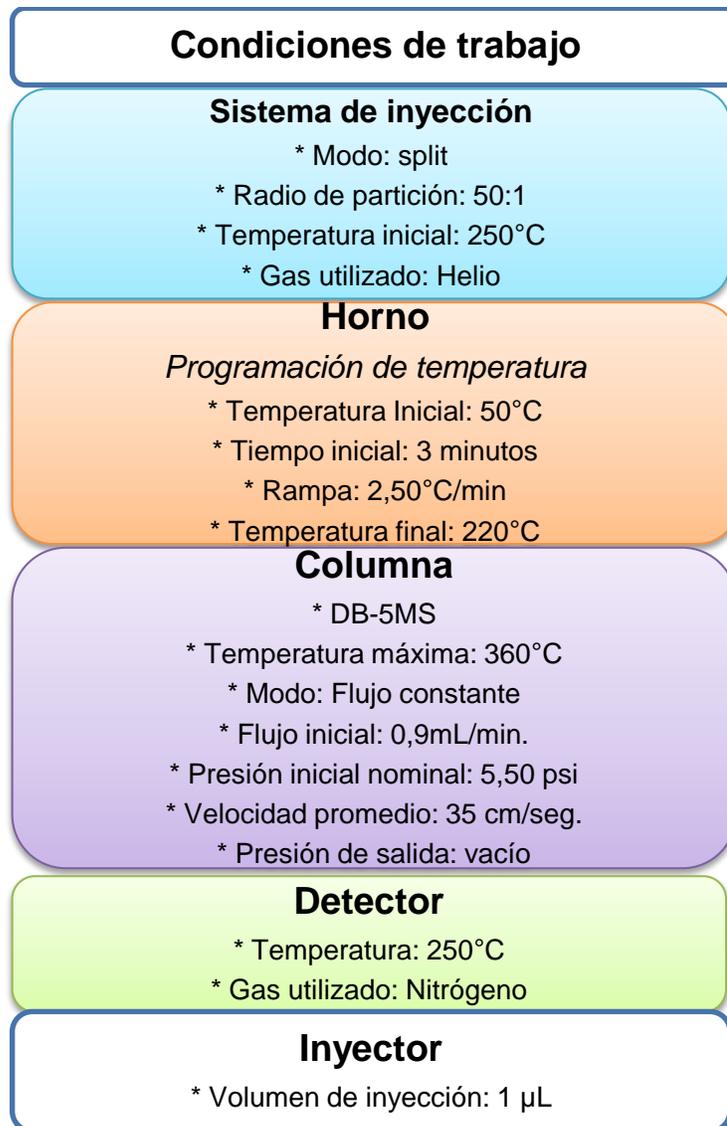


Figura 12. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5ms
Fuente: Chamba, F.

2.1.5.1.3. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.

En la figura 13, se muestran los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras y los hidrocarburos en la columna polar HP-INNOWAX.

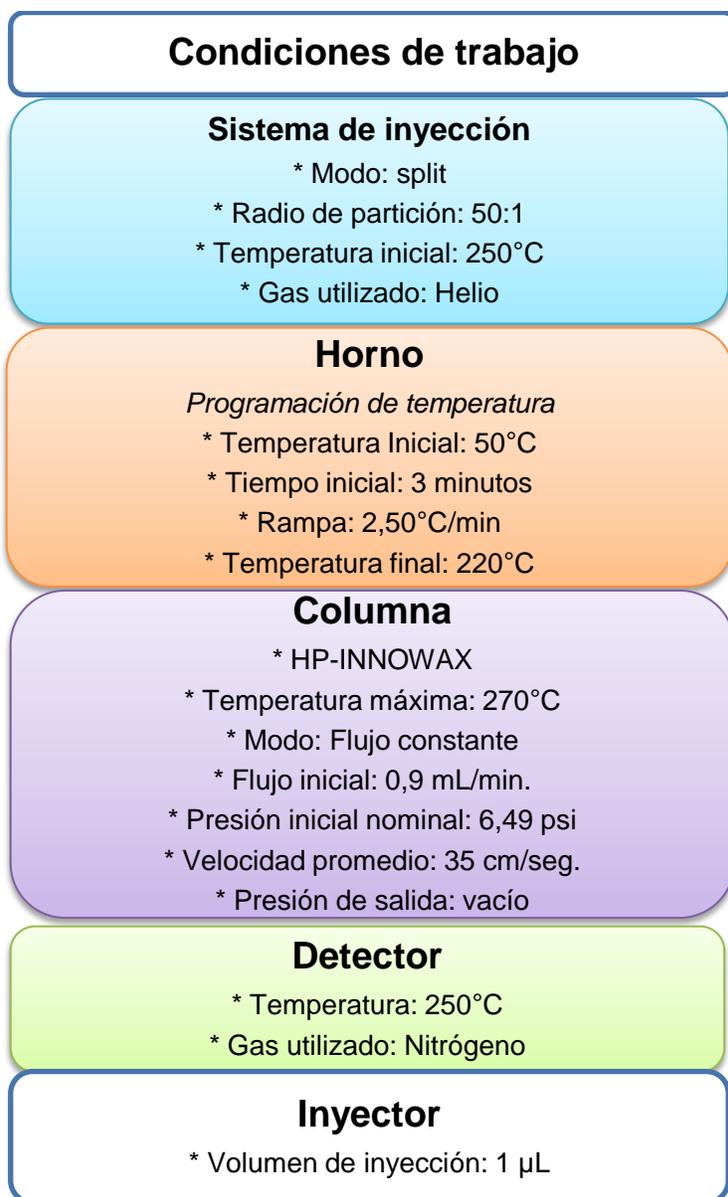


Figura 13. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.
Fuente: Chamba, F.

2.1.5.1.4. Corrida cromatográfica en la columna DB-5ms acoplada al detector de ionización en llama (FID).

El análisis de la composición química del aceite esencial de *H. racemosum* se complementó utilizando el detector de ionización de llama (FID).

En la corrida cromatográfica se inyectó los hidrocarburos y las nueve muestras del aceite esencial de *H. racemosum*. Las condiciones en las que se inyectaron las muestras y los hidrocarburos se exponen en la figura 14.

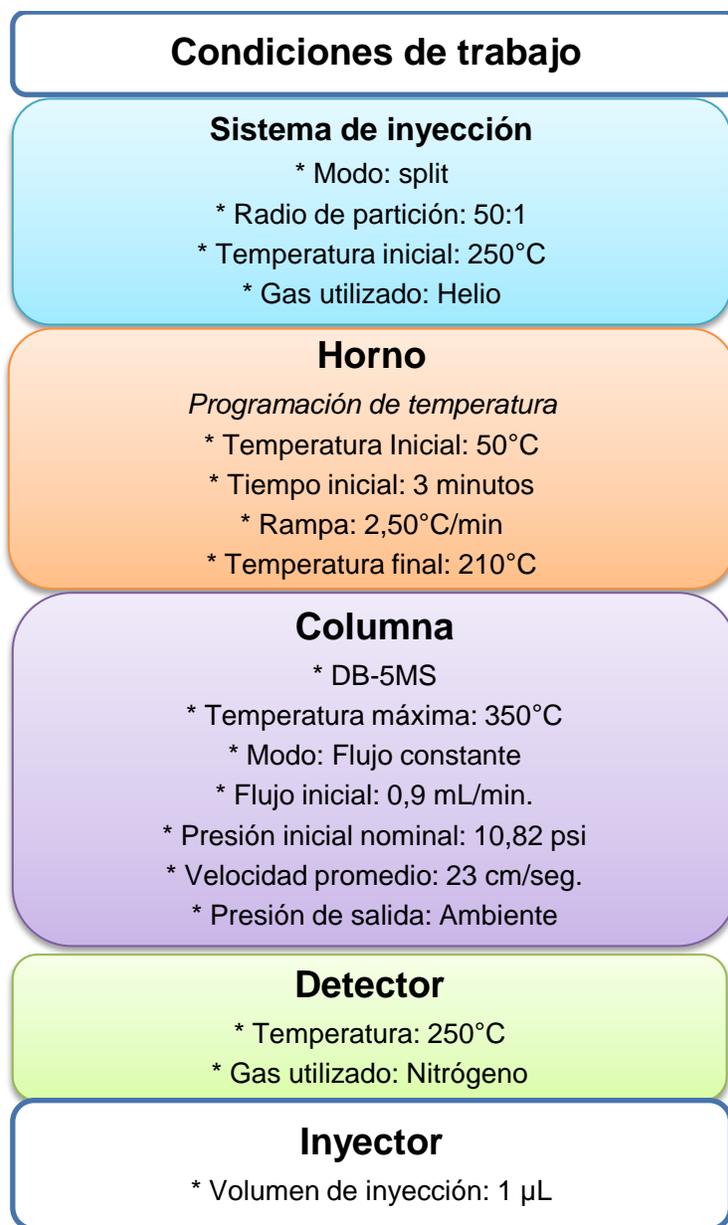


Figura 14. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5ms acoplada a un detector de ionización de llama (FID)

Fuente: Chamba, F.

2.1.5.1.5. *Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama (FID).*

En la figura 15, se expone los parámetros bajo los cuales fueron inyectados los hidrocarburos y las 9 muestras de aceite esencial de *Hedysmum racemosum*.

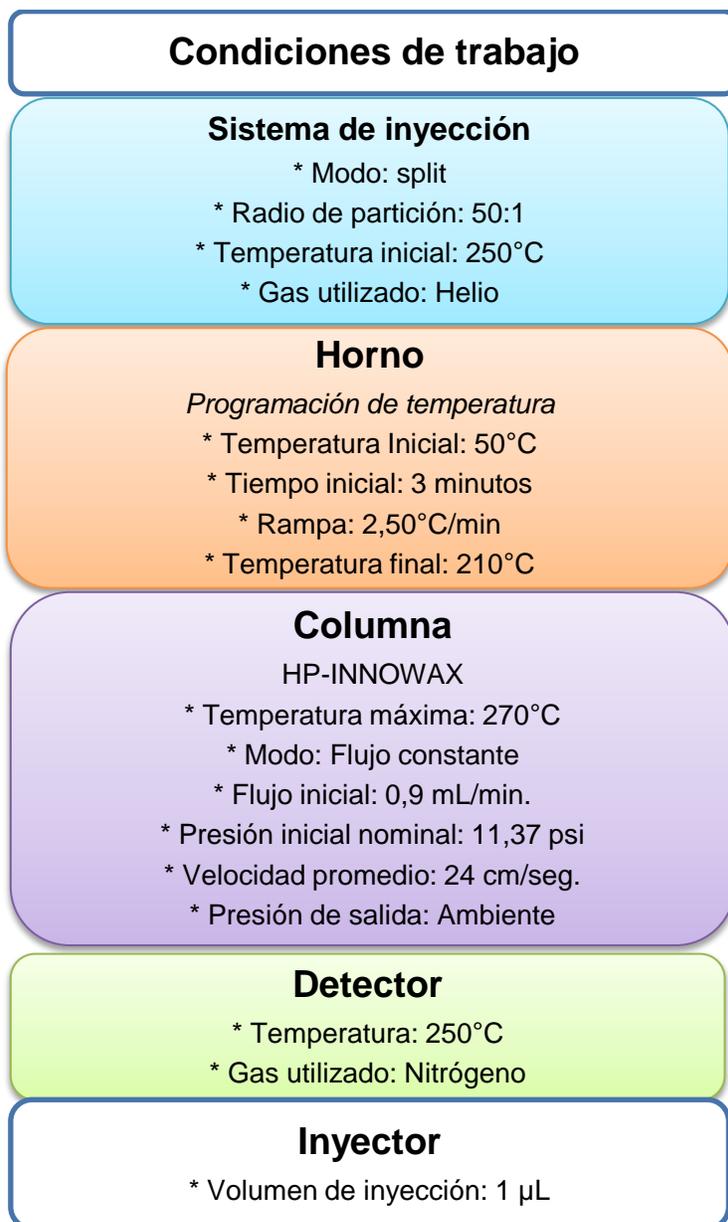


Figura 15. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP- INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID)

Fuente: Chamba, F.

2.1.5.1.6. Identificación de los compuestos químicos

Para que la identificación sea más precisa y confiable se procedió a integrar, lo cual nos permite tener una determinada cantidad de compuestos en cada una de las muestras a analizar, esto se realizó a través del sistema de integración propio del software del equipo para luego trabajar con los picos integrados.

Obtenido los cromatogramas se procedió a calcular los índices de Kovats (IK) de los picos integrados, para ello se comparó el tiempo retención de los hidrocarburos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial aplicando la siguiente formula:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats;

n: Número de átomos de carbono en el n-alcano;

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos;

t_{Rn}: Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado;

t_{RN}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como en la apolar, valores que se compararon con los reportados por Adams (Adams, 2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en artículos de revistas como Flavour and Fragrance; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído debe ser menor a 20 unidades. Además se tomó en cuenta parámetros como el número de CAS que presenta cada compuesto de tal modo que facilite la búsqueda y la identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

2.1.6. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

La actividad biológica de los aceites fue evaluada frente a cepas bacterianas y fúngicas mediante el método de microdilución en caldo. Este análisis se basó en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante diluciones a diferentes concentraciones, reportándose finalmente la Concentración mínima inhibitoria (CMI), del aceite esencial de *H. racemosum*.

2.1.6.1. Cepas bacterianas y fúngicas.

Para evaluar la actividad biológica se utilizaron 9 microorganismos patógenos; siete son cepas bacterianas y dos son cepas fúngicas. Las cepas utilizadas en esta prueba fueron de American Type Culture Collection (ATCC), son de referencia internacional y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudio (Martinez, et al., 1997).

En la tabla 1 se detallan los microorganismos de prueba. Se emplearon estos microorganismos debido a que tienen un gran impacto en la salud en el ser humano es decir son causantes de una gran mayoría de enfermedades.

Tabla 1. Microorganismo de prueba.

MICROORGANISMOS PATÓGENOS		
CEPAS BACTERIANAS		CEPAS FÚNGICAS
<i>Bacterias Gram-negativas</i>	<i>Bacterias Gram-positivas</i>	<i>Hongos esporulados</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 • <i>Salmonella</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185 • <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188

Fuente: American Type Culture Collection

2.1.6.2. Actividad Antibacteriana.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, se determinó utilizando el método de microdilución en caldo reportando los resultados como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); que se define como la concentración más baja que puede tener un antimicrobiano para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (Andrews, 2001).

2.1.6.2.1. Método de microdilución en caldo.

El procedimiento de microdilución en caldo, es un método que posee la ventaja de que se utilizan volúmenes mínimos de la muestra a analizar. Se utiliza una placa que contiene 96 pocillos, en los cuales se realizan diluciones seriadas. Previamente se debe preparar las muestras a utilizar.

2.1.6.2.2. Preparación de la muestra.

La muestra de aceite esencial que se va a emplear en este ensayo, debe estar diluida. Con fines de bioprospección se emplea una solución 20 μ L del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* en 980 μ L de Dimetil sulfóxido Figura 16.



Figura 16. Dilución de aceite esencial y solvente.
Fuente: Chamba, F.

2.1.6.2.3. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight”

Previo a la preparación del inóculo bacteriano, se prepararon los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana Figura 17. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizaron 30 μ L de cada cepa bacteriana, almacenadas en una reserva criogénica a -80°C . Luego de realizar la siembra de cada cepa se procedió a incubar los medios por 14 horas a 16°C , por esta razón el cultivo se denomina overnight.



Figura 17. Caldos de cultivos para las diferentes cepas bacterianas.

Fuente: Chamba, F.

Las condiciones necesarias y los medios de cultivo para el crecimiento de cada bacteria se detallan en la tabla 2

Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para las bacterias.

Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.		
Cepa bacteriana	Condiciones de incubación	Medio de cultivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo Muller Hinton</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC	<i>Temperatura: 37°C</i>	<i>Caldo triptisoya</i>

25922	<i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>Temperatura: 37°C</i>	<i>Caldo Nutritivo Oxoid</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Temperatura: 37°C</i>	<i>Caldo infusión cerebro-corazón</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Temperatura: 37°C</i>	<i>Caldo triptisoya</i>

Fuente: American Type Culture Collection.

2.1.6.2.4. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.

Del cultivo overnight incubado la noche anterior se tomaron 150 a 300 µL a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland.

De la suspensión anterior se tomaron 140 µL y se inoculó en un vial 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. De esta solución final se transfirieron 100 µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 µL, de forma que en cada pocillo la concentración final fue de 5×10^5 UFC/mL.

2.1.6.2.5. Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI).

La prueba se realizó en placas esterilizadas de 96 pocillos, mediante diluciones dobles seriadas; del caldo Mueller Hinton se transfirieron 180 µL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocaron 100 µL del mismo caldo. A continuación se colocaron 20 µL de la dilución de aceite esencial más Dimetil sulfóxido solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: el primero, 200 µL de caldo Mueller Hinton como control de esterilidad, el segundo, un control negativo con 180 µL de caldo Muller Hinton + 20 µL de DMSO y finalmente en el tercero un control positivo, que es una mezcla de 180 µL de caldo Muller Hinton + 20 µL de Gentamicina de 1 mg/mL para todas las bacterias, excepto para *E. faecalis* y *S. typhimurium* que se utilizó Gentamicina de 3 mg/mL (Ramirez & Castaño, 2009).

Para que el medio y la solución de aceite se homogenicen correctamente, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila y se tomaron 100 μ L de la solución homogenizada, luego se diluyó con 100 μ L del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desechan los 100 μ L sobrantes, así la concentración final de cada solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 1000 a 7,81 μ g/mL Figura 18. El mismo procedimiento fue aplicado con el control positivo, negativo y el control de esterilidad.

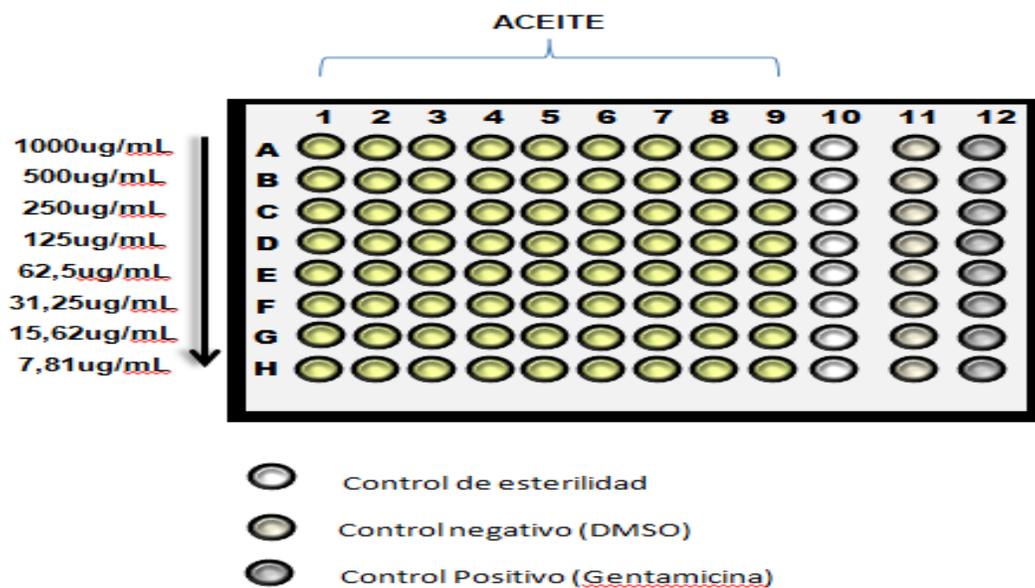


Figura 18. Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite (μ g/mL).
Fuente: Chamba, F.

Finalmente, ya preparada la placa de microdilución se procede a inocular todos los pocillos (excepto el pocillo que contiene el control de esterilidad) con 100 μ L de la suspensión con el inóculo bacteriano. Completando así un volumen final de 200 μ L con una población bacteriana de 5×10^5 UFC/mL, para el control de esterilidad se completó el volumen final con 100 μ L de caldo Muller Hinton. Al concluir con la inoculación las placas de microdilución se sellan con parafilm y se incuban a 37°C de 24 horas Figura 19.



Figura 19. Placas de microdilución selladas con parafilm previas a la incubación.

Fuente: Chamba, F.

2.1.6.3. Actividad antifúngica.

Básicamente el procedimiento es el mismo que se utilizó en la Concentración mínima inhibitoria antibacteriana, con unas leves variaciones que se describen en los siguientes ítems.

2.1.6.3.1. Preparación de la muestra.

Se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980 μL de Dimetil sulfóxido y 20 μL del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* Figura 20.



Figura 20. Muestras de aceite diluido con Dimetil sulfóxido.

Fuente: Chamba, F.

2.1.6.3.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.

La suspensión de los microorganismos fúngicos se realizó a partir de cepas almacenadas en reservas criogénicas que se mantienen a una temperatura de -80°C. Se transfirieron de las reservas fúngicas 14 µL a un tubo estéril con 7 mL de Caldo Sabouraud, de esta suspensión se tomaron 100 µL para completar un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo con una concentración de 5×10^4 esporas/mL.

Las condiciones mínimas necesarias para el crecimiento fúngico se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.

Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.		
Hongo	Condiciones	Medio de cultivo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185	Temperatura: 28°C Tiempo de incubación: 72– 96 horas.	Caldo Sabouraud
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188		

Fuente: American Type Culture Collection. (ATCC)

2.1.6.3.3. Procedimiento.

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo; en hongos esporulados es de 5×10^4 esporas/mL y los controles; el positivo que es una solución de 180 µL de caldo Sabouraud más 20 µL de Itraconazol de 1 mg/mL el control negativo que consta de 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de DMSO y finalmente Control de esterilidad, que contiene 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de aceite diluido. Cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, se sellan las cajas con parafilm y se incuban a 28°C por 96 horas.

2.1.6.3.4. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana y antifúngica e interpretación de los resultados.

Una vez retiradas las placas de microdilución de la incubadora, se observa minuciosamente cada caja utilizando luz reflejada; se comienza examinando el control de

esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación, ya que al existir contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

Por otro lado el control negativo nos indica que si habido un crecimiento adecuado, ya sea de las bacterias o los hongos en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de diámetro mayor a 2 mm.

Finalmente en el control positivo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en el cual se distingue turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

2.1.7 Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, se evaluó mediante dos métodos espectrofotométricos; los métodos empleados son ABTS⁺ Arnao, et al. (2001) y DPPH Brand-Williams, et al. (1995) para cada uno de ellos se realizaron modificaciones en el procedimiento relacionadas a las concentraciones de las muestras y el empleo de dos estándares de referencia “Trolox y Butilhidroxitolueno (BHT)” con la finalidad de comparar la actividad antioxidante de las muestras frente a ellos. La actividad antioxidante se determinó según la variación de la absorbancia de los reactivos ABTS y DPPH en la presencia del aceite a diferentes concentraciones, entre 1 y 0,005 mg/mL para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907 figura 21 Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515 nm respectivamente.



Figura 21. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907

Fuente: Chamba, F.

2.1.7.1. Preparación de las muestra del aceite esencial *Hedyosmum racemosum*

A partir del aceite esencial obtenido anteriormente por arrastre de vapor se preparó una solución de 1mg/mL en metanol, seguidamente se procedió a realizar diluciones del aceite esencial, hasta llegar a una concentración mínima final de 0,005 mg/mL.

Los volúmenes respectivos de cada dilución fueron los necesarios para analizar cada muestra por triplicado. En la tabla 4, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 5000 μ L.

Tabla 4. Volumen necesario para cada dilución en aceite.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (1000 ppm)	5000 μ L MeOH + 5 mg de aceite esencial
Concentración 2 (500 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 1
Concentración 3 (100 ppm)	4000 μ L MeOH + 1000 μ L de concentración 2
Concentración 4 (50 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 3
Concentración 5 (25 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 4
Concentración 6 (12,5 ppm)	2500 μ L MeOH + 2500 μ L de concentración 5
Concentración 7 (5 ppm)	3000 μ L MeOH + 2000 μ L de concentración 6

Concentración 8 (0 ppm)

5000 μ L MeOH

Fuente: Chamba, F.

2.1.7.2. Método ABTS⁺.

Se empleó la técnica desarrollada por Arnao et al. (2001) con modificaciones descritas por Thaipong, et al. (2006). El método se basa en la capacidad de diferentes compuestos para atrapar el radical catión ABTS⁺. Con este método se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Kuskoski, et al., 2005). El método ABTS+ [ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozálín-6 sulfónico)], consiste en formar un radical catiónico ABTS⁺ (verde- azulada) basándose en la acción oxidativa de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS⁺ (Barrero. et al., 2004). El radical ABTS⁺ presenta una absorbancia a una longitud de onda de 734 nm.

2.1.7.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

Para realizar la solución patrón se pesaron 40,6 mg de ABTS⁺ y 7,028mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), luego se aforó cada uno de los reactivos a 10 mL con agua destilada. Estos dos reactivos se mezclaron y se dejó reposar por 12 horas protegidos de la luz.

Transcurridas las 12 horas de reposo, posteriormente se tomó de esta solución una alícuota de 1mL añadida a 60mL de metanol hasta obtener una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ a 734nm. Si la lectura de la absorbancia es menor al resultado que se desea obtener se debe ir añadiendo más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a la esperada se debe añadir metanol. Previo a lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se procedió a encerar el equipo con metanol.

2.1.7.2.2. Estándar Trolox y BHT para ABTS⁺.

Para realizar la solución estándar se utilizó Trolox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico y el hidrotolueno butilado (BHT), los cuáles son los patrones de referencia utilizados para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (Conde. et al., 2012)

Se pesó 25 mg de Trolox y 22 mg de BHT se aforó a 100 mL de metanol. En la tabla 5, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada una fue de 5000 μ L. Se tomó 150 μ L de cada alícuota y 2850 μ L de la solución de trabajo

dejándolo reaccionar durante 2 horas en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se procedió a leer la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox y BHT.

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.

Volumen necesario para cada dilución Trolox y BHT	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (1000 μM)	5000 μL Trolox/BHT
Concentración 2 (800 μM)	1000 μL MeOH + 4000 μL de concentración 1
Concentración 3 (600 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 2
Concentración 4 (450 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 3
Concentración 5 (300 μM)	1670 μL MeOH + 3330 μL de concentración 4
Concentración 6 (150 μM)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 5
Concentración 7 (25 μM)	4170 μL MeOH + 830 μL de concentración 6
Concentración 8 (0 μM)	5000 μL MeOH

Fuente: Chamba, F.

2.1.7.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.

Para determinar si el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* posee capacidad antioxidante, se debe evaluar cada muestra con suma precisión, tanto para cada dilución que se realizó anteriormente del aceite esencial como para cada alícuota de Trolox y BHT

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se tomó 150 μL y se llevó a tubos de ensayo rotulados previamente, donde se le adicionó 2850 μL de la solución ABTS⁺ dando un volumen de 3 mL, se dejó reposar por dos horas en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de aceite esencial Figura 22.



Figura 22. Muestras del aceite *Hedyosmum racemosum*, analizadas mediante método ABTS⁺.

Fuente: Chamba, F.

2.1.7.3. Método DPPH.

Se realizó en base a la técnica desarrollada y descrita por Brand-Williams et al. (1995), con modificaciones de Thaipong et al.(2006). El método de DPPH es considerado como un método rápido, simple, preciso, económico, útil para medir la capacidad antioxidante de diferentes compuestos por la habilidad para atrapar el radical libre (Marinova & Batchvarov, 2011). La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realizó, empleando soluciones patrón de Trolox y BHT.

2.1.7.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.

La solución patrón se realizó pesando 24 mg de reactivo de DPPH y se aforó a 100 mL de metanol la misma fue almacenada a -4°C hasta su uso, de esta solución se tomó 10 mL y se adicionó 45 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustando hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$. Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución de trabajo.

2.1.7.3.2. Estándar Trolox y BHT para DPPH.

Como ya se mencionó previamente Trolox y BHT fueron utilizados como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial para ambos métodos.

2.1.7.3.3. Lectura de muestras diluidas del aceite esencial.

Al igual que al realizar la parte experimental del método de ABTS⁺, en este método también se utilizó las mismas soluciones del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* diluidas a diferentes concentraciones tabla 4 y las diferentes concentraciones de los estándares Trolox y BHT tabla 5.

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. De cada muestra se transfirió 150 µL a un vial color ámbar ya que debe estar protegido de la luz. Este vial contiene también 2850 µL de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, estos viales se dejan reposar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se lee la absorbancia de cada muestra a 515 nm Figura 23.



Figura 23. Muestras del aceite *Hedyosmum racemosum*, analizadas mediante el método DPPH

Fuente: Chamba, F.

2.1.7.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS⁺ y DPPH⁺.

Las absorbancias determinadas mediante el método ABTS⁺ y DPPH⁺, de cada muestra de aceite esencial evaluada a diferentes concentraciones, permiten calcular el porcentaje de inhibición (% Inh) empleando la fórmula de la figura 24.

$$\% Dis. = \left\{ \left(\frac{Abs.blanco - Abs.muestra}{Abs.blanco} \right) * 100 \right\}$$

Figura 24. Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.

Fuente: (Conde. et al., 2012).

Abs. blanco= absorción de solución de trabajo

Abs. muestra= absorción de la muestra de la respectiva solución

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI_{50}) de la muestra. El CI_{50} de cada aceite se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. Porcentaje de inhibición (% Inh), obteniendo así, una ecuación para la curva y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para obtener la ecuación necesaria para calcular CI_{50} , se utilizó el programa OriginPro versión 8E.

En ambos métodos (ABTS⁺ y DPPH) se utilizó como estándar el Trolox y BHT, cuya capacidad antioxidante se evaluó en las mismas condiciones de trabajo de las muestras.

CAPITULO III
RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Humedad relativa de *Hedyosmum racemosum*.

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se expone en la tabla 6. En dicha tabla se presenta el valor de la media de cada uno de los porcentajes de humedad del material vegetal por recolección con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 6. Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

HUMEDAD				
Recolección	H(%)	\bar{X}	σ	CV
HRM1	60,55	61,02	0,51	0,01
HRM2	61,56			
HRM3	60,94			

HRM: *Hedyosmum racemosum* macho: **HRM1** Primera recolección; **HRM2:** Segunda recolección; **HRM 3** Tercera Recoleccion.
H(%): Humedad promedio por cada recolección; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones; σ : Desviación estándar; **CV:** Coeficiente de variación.

Fuente: Chamba, F.

La materia vegetal recolectada tuvo una humedad promedio de 61,02%, sin embargo se puede apreciar que en la segunda recolección hay una pequeña variación en la humedad de la materia vegetal. La variabilidad de este resultado se puede atribuir a las condiciones climáticas y el desarrollo de la planta al momento de la recolección (Margulis & Sagan, 2012).

Es importante destacar que factores ambientales como la humedad atmosférica alteran la capacidad de las plantas para controlar la pérdida de agua (Sciences & eLibraryPRO.).

3.2. Rendimiento de *Hedyosmum racemosum*.

El rendimiento se determinó estableciendo una relación entre el peso de la materia vegetal recolectada y el volumen de aceite esencial obtenido.

En la tabla 7 se detalla el rendimiento obtenido por cada destilación, así como su valor medio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 7. Rendimiento en %(v/p) del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

RENDIMIENTO				
Recolección	R(%)	\bar{X}	σ	CV
HRM1	0,29	0,30	0,05	0,17
HRM2	0,36			
HRM3	0,26			
<p>HRM: <i>Hedyosmum racemosum</i> Macho: HRM1 Primera recolección; HRM2: Segunda recolección; HRM 3 Tercera Recolección. R(%): Porcentaje de rendimiento de cada recolección; \bar{X}: promedio de todas las recolecciones; σ: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.</p>				

Fuente: Chamba, F.

De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto 0,36% se obtuvo a partir de 2,33 kg de materia vegetal con un volumen de 8,43 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,26% a partir de 1,66 Kg con 4,33 mL de aceite. Cabe mencionar que existen factores que influyen en el rendimiento del aceite esencial tales como el estado fenológico de la planta, las condiciones en las se realizó la destilación como por ejemplo la cantidad de materia vegetal, cantidad de agua, temperatura y presión (Sandoval, 1999).

Correa (2014) determinó que el rendimiento de *Hedyosmum racemosum* con flores femeninas obtuvo un promedio de 0,24% de los cuales el rendimiento más alto fue 0,26% se obtuvo a partir de 2 kg de materia vegetal con un volumen de 6 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,20% a partir de 1,9 Kg con 4 mL de aceite.

Así mismo, según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED (2011), el valor de rendimiento de *hedyosmum racemosum* es de 8,43 ml en 2,33 kg que se considera bajo, dado que valores menores a 5mL/kg los considera bajos, valores entre 5 mL/kg y 10 mL/kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/kg altos. Esta información es particularmente utilizada como un criterio más para la selección de especies aromáticas potencialmente comercializables. Sin embargo, la misma debe analizarse en conjunto con otras características del aceite esencial, como la originalidad del aroma, composición química y efectos farmacológicos (Bandoni, 2002).

3.3. Propiedades físicas.

Existen diversas propiedades físicas que van a caracterizar al aceite esencial, entre ellas tenemos densidad relativa e índice de refracción.

Cabe destacar que el aceite esencial de *H. racemosum* es un líquido viscoso translúcido que presenta un olor cítrico-dulce.

3.3.1 Densidad relativa.

La densidad relativa determinada por medio del método del picnómetro por diferencias de pesos.

La tabla 8 muestra la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizaron por cada recolección. El aceite esencial de mayor densidad fue 0,9012 g/cm³, y el de menor de 0,8913 g/cm³. La densidad promedio del aceite esencial obtenida de las tres recolecciones es de 0,8978 g/cm³.

Tabla 8. Densidad media del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

DENSIDAD		
Recolección	Densidad (g/cm ³)	\bar{X} (g/cm ³)
HRH1	0,8913	0,8978
HRH2	0,9012	
HRH3	0,9008	
— HRH: <i>Hedyosmum racemosum</i> Macho: HRH1 Primera recolección; — HRH2: Segunda Recoleccion; HRH 3 Tercera Recoleccion; — \bar{X} : promedio de todas las recolecciones.		

Fuente: Chamba, F.

Como se puede observar en la tabla 8, la densidad del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* a 20°C es menor a la del agua, como es de esperarse para la mayoría de aceites esenciales de plantas y especies, ya que están compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos (A. Pino, et al., 1996).

Hedyosmum racemosum con flores femeninas mostró un promedio de densidad de 0,9038 g/cm³. El aceite esencial de mayor densidad fue 0,9074 g/cm³, y el de menor de 0,8984 g/cm³ (Correa, 2014).

3.3.2. Índice de refracción.

Los índices de refracción se detallan en la tabla 9, estos valores corresponden a la media de las tres destilaciones obtenidas por cada recolección realizada. El valor más alto del índice de refracción fue la primera recolección 1,4925 el más bajo fue la tercera 1,4894.

Tabla 9. Índice de refracción del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*

INDICE DE REFRACCIÓN				
Recoleccion	Índice de refracción	\bar{X}	σ	CV
HRM1	1,4925	1,4911	0,002	0,001
HRM2	1,4915			
HRM3	1,4894			

HRM: *Hedyosmum racemosum* Macho: **HRM1** Primera recolección; **HRM2**: Segunda Recoleccion; **HRM 3** Tercera Recolección; \bar{X} : promedio de todas las recolecciones ; σ : Desviación estándar; **CV**: Coeficiente de variación.

Fuente: Chamba, F.

El promedio general de los índices de refracción de las muestras de aceite esencial fue 1,4911. El índice de refracción es una propiedad utilizada para controlar la pureza y calidad de los aceites tanto a nivel laboratorio como industria (Cano, et al., 2008).

El promedio del índice de refracción de *hedyosmum racemosum con flores femeninas* 1,4883 (Correa, 2014).

3.4. Composición Química del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

Se determinó la composición química del aceite de *H. racemosum* mediante cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) y al detector de ionización en llama (CG-FID), utilizando las columnas DB-5ms y HP-INNOWAX.

En la figura 25, se observan los perfiles cromatográficos del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* obtenidos en la columna DB-5ms y HP-INNOWAX mediante la técnica de CG-EM acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

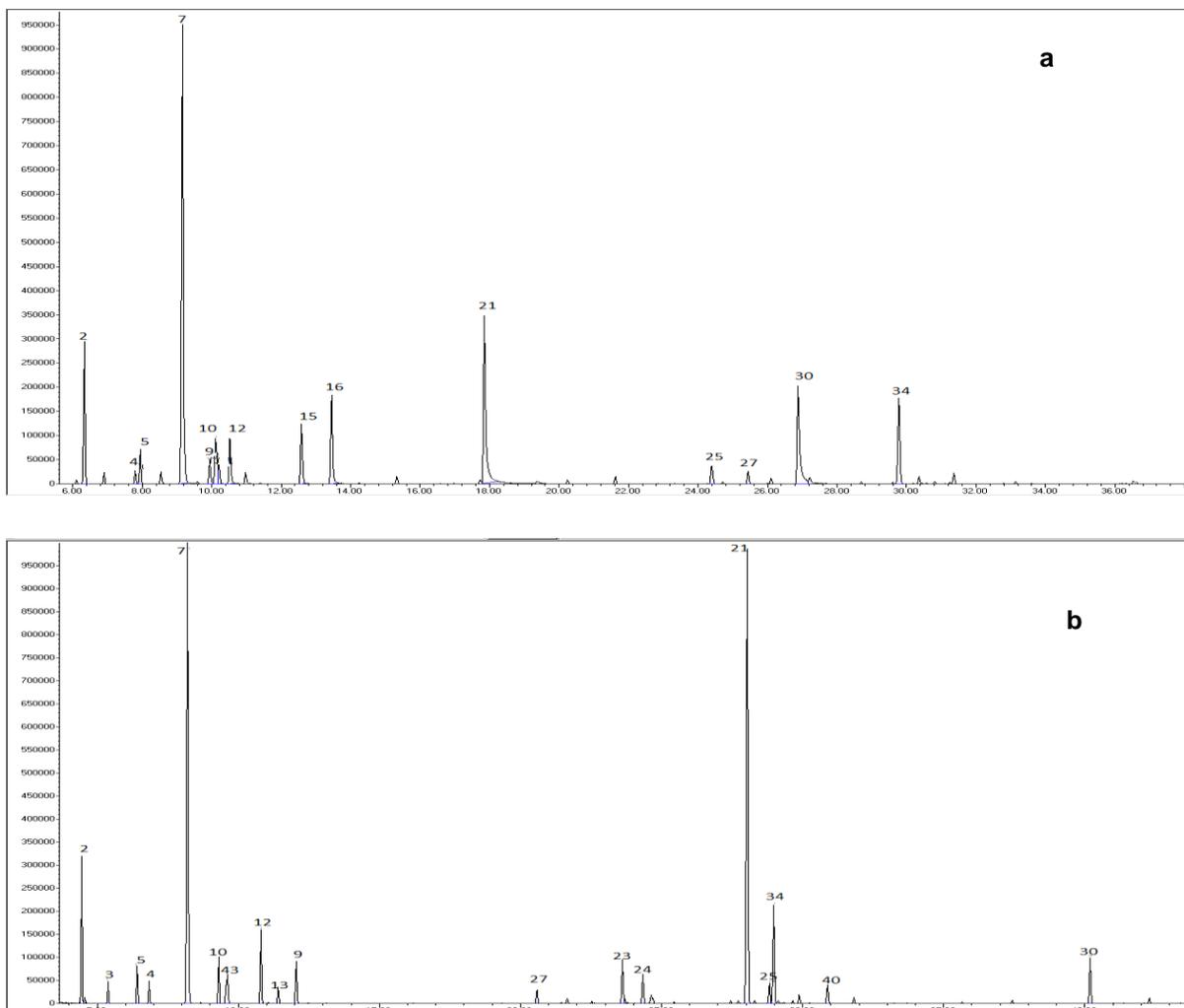


Figura 25. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial extraído *H. racemosum* obtenido en la columna: (a) DB-5ms y (b) HP-INNOWAX.

Fuente: Chamba, F.

Cada pico representa un compuesto de área proporcional a su concentración. Los cromatogramas obtenidos presentan picos muy próximos resultando en cierta forma compleja la identificación en su totalidad, de modo que para una identificación mucho más fiable de los compuestos presentes en las muestras se integraron los picos cromatográficos. En los cromatogramas figura 24, se observan los picos integrados y numerados considerados para su identificación.

En la tabla 10, se detallan los compuestos químicos identificados del aceite esencial de *H. racemosum* en las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX; los mismos que están organizados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5ms, resaltando los

compuestos que presentan mayores áreas. Cada compuesto presenta su respectivo índice de Kovats calculado y el índice reportado en la literatura; junto a la cantidad relativa que corresponde al porcentaje de participación de cada compuesto para la primera (HRH1), segunda (HRH2) y tercera recolección (HRH3) se reporta el área promedio por compuesto, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El porcentaje de cantidad relativa de los compuestos, reportada por cada recolección es el resultado del promedio de las áreas de cada compuesto identificado en los aceites obtenidos de las tres destilaciones realizadas por recolección.

Tabla 10. Composición Química de *Hedyosmum racemosum*

Nº	COMPUESTOS	DB5ms-EM								HPINOWAX - MS							
		IK^{cal}	IK^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.	IK^{cal}	IK^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.
				HRM1	HRM2	HRM3						HRM1	HRM2	HRM3			
1	α -Thujene	928	924 ^b	0,15	0,18	0,15	0,16	0,01	0,09	1038	1035 ^d	0,17	0,21	0,17	0,18	0,02	0,11
2	α -Pinene	933	932 ^b	5,93	7,35	9,17	7,48	1,62	0,22	1035	1032 ^c	5,68	7,11	8,29	7,03	1,31	0,19
3	Camphene	947	946 ^b	0,80	0,65	0,86	0,77	0,11	0,14	1066	1066 ^o	0,77	0,64	0,80	0,74	0,08	0,11
4	Sabinene	969	969 ^b	0,96	0,84	1,14	0,98	0,15	0,15	1114	1129 ^d	0,99	0,89	1,14	1,00	0,13	0,13
5	β -Pinene	973	974 ^b	1,80	2,03	2,58	2,14	0,40	0,19	1101	1118 ^c	1,73	1,99	2,40	2,04	0,34	0,16
6	Myrcene	988	988 ^b	0,53	0,62	0,62	0,59	0,05	0,09	1160	1160 ^f	0,57	0,34	0,65	0,52	0,16	0,31
7	α -Phellandrene	1003	1002 ^b	29,64	28,22	26,85	28,24	1,39	0,05	1158	1165 ^f	27,44	26,58	23,68	25,90	1,97	0,08
8	3- δ Carene	1013	1008 ^b	0,11	0,10	0,11	0,01	0,08	1141	1148 ^f	0,82
9	P- Cymene	1021	1020 ^b	1,56	1,24	1,25	1,35	0,18	0,14	1268	1280 ^g	1,63	1,31	1,30	1,41	0,19	0,13
10	Limonene	1025	1024 ^b	3,79	3,78	3,46	3,68	0,19	0,05	1194	1202 ^f	2,27	2,40	2,18	2,28	0,11	0,05
11	1,8-Cineole	1027	1026 ^b	1,78	1,65	1,52	1,65	0,13	0,08	1202	1213 ^f	1,44	1,38	1,22	1,35	0,11	0,08
12	(Z)- β -Ocimene	1034	1032 ^b	3,09	3,29	2,25	2,88	0,55	0,19	1235	1232 ^f	3,21	3,38	2,40	3,00	0,52	0,17
13	(E)- β -ocimene	1044	1044 ^b	0,68	0,93	0,37	0,66	0,28	0,43	1251	1254 ^h	0,81	1,05	0,51	0,79	0,27	0,34
14	γ -Terpinene	1054	1054 ^b	1242	1244 ^f	0,06
15	Terpinolene	1081	1086 ^b	2,28	1280	1290 ^f	2,23
16	Linalool	1101	1095 ^b	2,77	5,18	4,63	4,19	1,26	0,30	1559	1553 ⁱ	3,13	5,52	5,00	4,55	1,25	0,28
17	Crysanthenone	1118	1124 ^b	0,18	0,34	0,26	0,12	0,45
18	Camphor	1141	1141 ^b	0,53	0,70	0,41	0,54	0,15	0,27	1510	1532 ⁱ	0,51	0,66	0,40	0,52	0,13	0,25
19	Terpinen-4-ol	1177	1174 ^b	1606	1605 ^o	0,11	0,12	0,12	0,01	0,11
20	α -Terpineol	1193	1186 ^b	0,37	0,30	0,33	0,05	0,16	1704	1706 ^g	0,32	0,57	0,57	0,48	0,14	0,30
21	Estragole	1196	1195 ^b	23,93	18,58	22,95	21,82	2,85	0,13	1675	1675 ^j	25,85	19,94	24,72	23,50	3,14	0,13
22	Citronellol	1230	1223 ^b	0,20	0,07	0,13	0,09	0,67	1778	1772 ⁱ	0,48	0,56	0,67	0,57	0,09	0,16
23	Linalool acetate	1250	1254 ^b	0,17	0,22	0,24	0,21	0,03	0,16	1562	1565 ⁱ	0,22	0,24	0,28	0,25	0,03	0,12
24	Bornyl acetate	1280	1284 ^b	1,27	0,46	1,27	1,00	0,47	0,46	1578	1579 ^h	1,16	0,43	1,18	0,92	0,42	0,46
25	α -terpinyl acetate	1343	1346 ^b	1,35	1,54	2,10	1,66	0,39	0,24	1695	1706 ⁱ	1,37	1,55	2,13	1,68	0,39	0,23
26	Citronellyl Acetate	1350	1350 ^b	0,10	0,13	0,11	0,02	0,20	1666	1654 ^f	0,18	0,16	0,25	0,20	0,05	0,23
27	α -Copaene	1367	1374 ^b	1,13	0,92	0,61	0,89	0,26	0,29	1483	1497 ⁱ	1,02	0,87	0,62	0,84	0,20	0,24
28	β -Cubebene	1381	1387 ^b	0,22	0,10	0,10	0,14	0,07	0,47	1532	1544 ^e	0,17	0,08	0,10	0,12	0,05	0,39
29	β -Elemene	1383	1389 ^b	0,66	0,37	0,38	0,47	0,16	0,35	1585	1586 ^f	0,64	0,38	0,41	0,48	0,14	0,30
30	Methyl Eugenol	1402	1403 ^b	2,43	10,88	2,83	5,38	4,76	0,89	2025	2030 ^g	3,76	11,04	4,12	6,30	4,10	0,65
31	(E)- β -Caryophyllene	1409	1418 ^b	0,64	0,71	0,68	0,05	0,08	1587	1592 ^f	0,31	0,19	0,28	0,26	0,06	0,24
32	α -Humulene	1445	1452 ^b	0,22	0,15	0,14	0,17	0,04	0,26	1659	1660 ^f	0,19	0,13	0,14	0,15	0,03	0,21
33	γ -Muurolene	1467	1478 ^b	0,17	0,08	0,15	0,13	0,04	0,34	1682	1684 ^k	0,19	0,08	0,20	0,16	0,06	0,42
34	Germacrene-D	1471	1484 ^b	9,18	5,23	8,44	7,62	2,10	0,28	1700	1704 ^f	7,98	4,66	7,30	6,65	1,75	0,26

Nº	COMPUESTOS	DB5ms-EM								HPINOWAX - MS								
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.	IK ^{cal}	IK ^{ref}	% de Cantidad Relativa ^a			\bar{X}	σ	C.V.	
				HRM1	HRM2	HRM3						HRM1	HRM2	HRM3				
35	Bicyclogermacrene	1486	1494 ^b	0,85	0,43	0,66	0,65	0,21	0,32	1725	1727 ^f	0,69	0,36	0,55	0,54	0,17	0,32	
36	α -Amorphene	1488	1483 ^b	0,12	
37	α -Murolene	1491	1500 ^b	0,19	0,08	0,14	0,14	0,05	0,39	1718	1716 ^b	0,16	0,14	0,15	0,02	0,13	
38	Germacrene-A	1497	1508 ^b	0,28	0,14	0,14	0,19	0,08	0,42	
39	γ -Cadinene	1508	1513 ^b	0,24	0,10	0,11	0,15	0,08	0,52	
40	δ -Cadinene	1511	1522 ^b	1,13	0,73	0,72	0,86	0,24	0,27	1752	1748 ^b	1,41	0,86	0,98	1,08	0,29	0,27	
41	β -Eudesmol	1645	1649 ^b	0,48	0,25	0,13	0,28	0,18	0,63	2230	2257 ^f	0,50	0,24	0,27	0,34	0,14	0,41	
42	t-Muuroiol	1648	1640 ^b	0,26	0,14	0,20	0,09	0,44	2203	2209 ^g	0,17	
43	β -Phellandrene	1204	1210 ^l	1,41	1,31	1,19	1,31	0,11	0,09	
44	cis- α -Copaen-8-ol	2091	2078 ^m	0,35	0,25	0,14	0,25	0,10	0,41	
45	α -Cadinol	2235	2228 ^l	0,20	0,11	0,13	0,15	0,04	0,30	
*TOTAL IDENTIFICADO							98,87	*TOTAL IDENTIFICADO							97,81			
<p>a= % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB5MS y HP-INOWAX respectivamente</p> <p>*= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas HRM1: Aceites de la primera recolección HRM2: Aceites de la segunda recolección HRM3: Aceites de la tercera recolección</p> <p>\bar{X} = Promedio</p> <p>σ = desviación estándar</p> <p>CV = Coeficiente de variación</p> <p>IK^{cal} = Índice de kóvats calculado</p> <p>IK^{ref} = Índice de kóvats reportado en la literatura: ^bref. 1; ^cref. 2; ^dref. 3; ^eef. 4; ^fref. 5; ^gref. 6; ^href. 7; ⁱref. 8; ^jref. 9; ^kref. 10; ^lref. 11; ^mref. 12; ⁿref. 13; ^oref. 14. ver anexo(V)</p>																		

Fuente: Chamba, F.

En la figura 26 se puede observar los porcentajes de los ocho compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna DB-5ms.

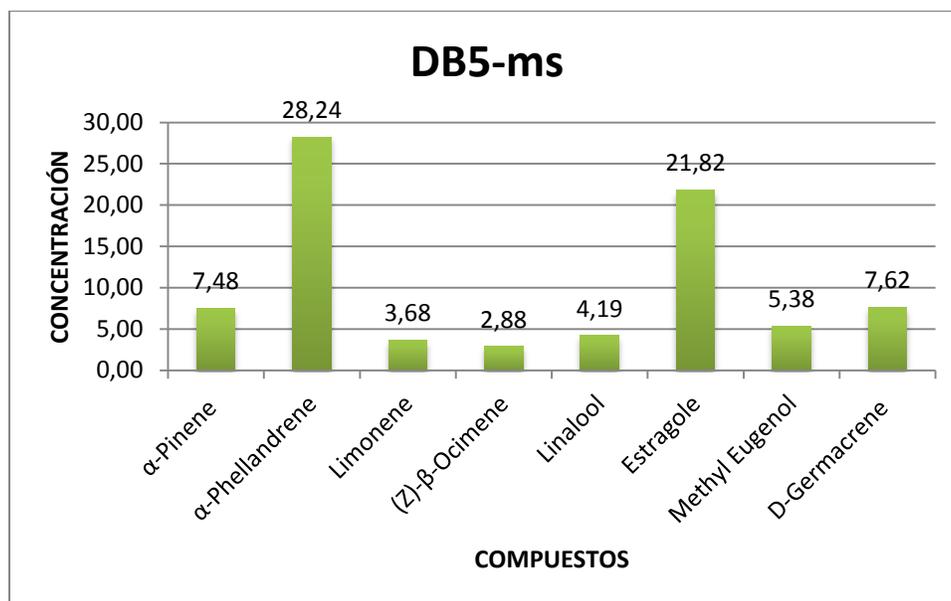


Figura 26. Compuestos mayoritarios en columna no polar.
Fuente: Chamba, F.

En la figura 27 se puede observar los porcentajes de los ocho compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna HP-INOWAX. Observando como tal que no existe diferencia relevante en cuanto a porcentajes de compuestos entre la columna DB5-ms y HP-INOWAX.

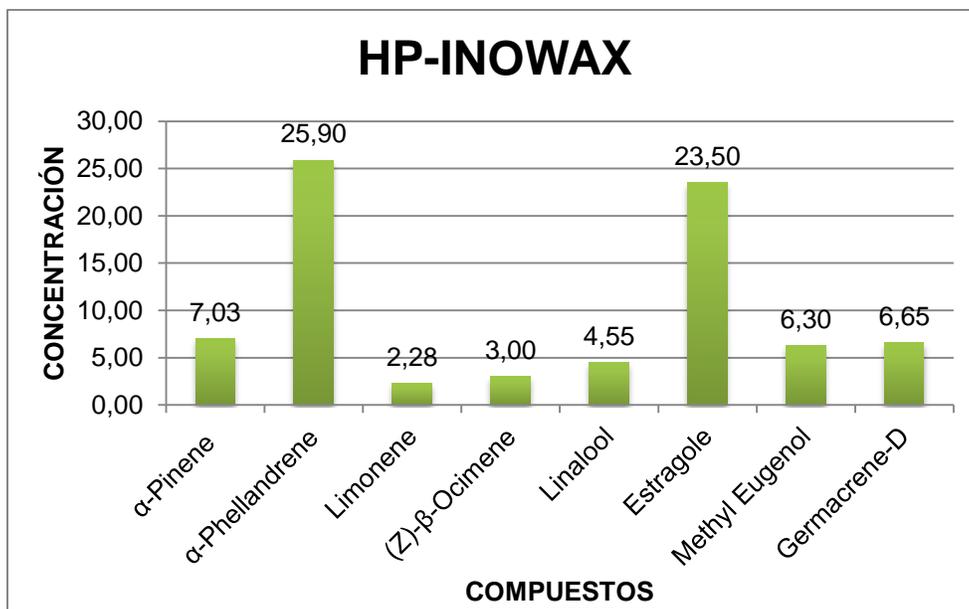


Figura 27. Compuestos mayoritarios en columna polar.
Fuente: Chamba, F.

El análisis cuantitativo se basó en la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos de los analitos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en EM, tanto el análisis cualitativo y cuantitativo confirmaron la presencia en el aceite esencial analizado de los compuestos expuestos en la tabla 11, en la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por recolección, el promedio y la desviación estándar.

Tabla 11. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.

Nº	COMPUESTOS	DB5MS										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ	
		HRH1		HRH2		HRH3						HRH1		HRH2		HRH3					
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
1	α -Thujene	0,15	0,22	0,18	0,23	0,15	0,22	0,16	0,22	0,01	0,01	0,17	0,21	0,21	0,23	0,17	0,21	0,18	0,22	0,02	0,01
2	α -Pinene	5,93	6,76	7,35	8,25	9,17	10,30	7,48	8,44	1,62	1,78	5,68	6,06	7,11	7,74	8,29	9,00	7,03	7,60	1,31	1,47
3	Camphene	0,80	0,96	0,65	0,78	0,86	1,02	0,77	0,92	0,11	0,12	0,77	0,88	0,64	0,73	0,80	0,90	0,74	0,84	0,08	0,09
4	Sabinene	0,96	1,20	0,84	1,06	1,14	1,38	0,98	1,21	0,15	0,16	1,73	2,05	0,89	1,01	1,14	1,27	1,25	1,44	0,43	0,54
5	β -Pinene	1,80	2,29	2,03	2,53	2,58	3,19	2,14	2,67	0,40	0,47	0,99	1,13	1,99	2,35	2,40	2,80	1,79	2,09	0,73	0,87
6	Myrcene	0,53	0,81	0,62	0,89	0,62	0,91	0,59	0,87	0,05	0,05	0,57	0,06	0,34	0,06	0,65	0,01	0,52	0,04	0,16	0,03
7	α -Phellandrene	29,64	30,26	28,22	29,37	26,85	27,46	28,24	29,03	1,39	1,43	27,44	28,80	26,58	28,12	23,68	25,31	25,90	27,41	1,97	1,85
8	3- δ Carene	0,11	0,12	0,10	0,15	0,11	0,13	0,01	0,03	0,82	0,94
9	P-Cymene	1,56	1,29	1,24	0,78	1,25	0,99	1,35	1,02	0,18	0,26	1,63	1,51	1,31	1,21	1,30	1,20	1,41	1,31	0,19	0,18
10	Limonene	3,79	3,13	3,78	4,13	3,46	3,32	3,68	3,53	0,19	0,53	2,27	2,66	2,40	2,80	2,18	2,51	2,28	2,65	0,11	0,14
11	1,8-Cineole	1,78	1,90	1,65	1,88	1,52	1,79	1,65	1,86	0,13	0,06	1,44	1,40	1,38	1,35	1,22	1,19	1,35	1,31	0,11	0,11
12	(Z)- β -Ocimene	3,09	3,59	3,29	3,85	2,25	2,65	2,88	3,36	0,55	0,63	3,21	3,84	3,38	4,01	2,40	2,86	3,00	3,57	0,52	0,62
13	(E)- β -ocimene	0,68	0,81	0,93	1,11	0,37	0,51	0,66	0,81	0,28	0,30	0,81	1,08	1,05	1,35	0,51	0,70	0,79	1,04	0,27	0,32
14	γ -Terpinene	0,06	0,10
15	Terpinolene	2,28	2,33	2,23	2,34
16	Linalool	2,77	3,29	5,18	6,04	4,63	5,36	4,19	4,90	1,26	1,43	3,13	3,79	5,52	6,47	5,00	5,86	4,55	5,38	1,25	1,41
17	Crysanthenone	0,18	0,23	0,34	0,35	0,26	0,29	0,12	0,09
18	Camphor	0,53	0,65	0,70	0,65	0,41	0,51	0,54	0,60	0,15	0,08	0,51	0,61	0,66	0,74	0,40	0,48	0,52	0,61	0,13	0,13
19	Terpinen-4-ol	0,11	0,18	0,12	0,20	0,12	0,19	0,01	0,02
20	α -Terpineol	0,37	0,42	0,30	0,20	0,33	0,31	0,05	0,16	0,32	0,01	0,57	0,01	0,57	0,21	0,48	0,07	0,14	0,12
21	Estragole	23,93	20,40	18,58	16,19	22,95	19,24	21,82	18,61	2,85	2,18	25,85	22,27	19,94	17,12	24,72	21,30	23,50	20,23	3,14	2,74
22	Citronellol	0,20	0,27	0,07	0,28	0,13	0,27	0,09	0,00	0,48	0,66	0,56	0,71	0,67	0,84	0,57	0,74	0,09	0,09
23	Lynalool acetate	0,17	0,23	0,22	0,35	0,24	0,22	0,21	0,27	0,03	0,07	0,22	0,27	0,24	0,29	0,28	0,30	0,25	0,29	0,03	0,02
24	Bornyl acetate	1,27	1,14	0,46	0,75	1,27	0,79	1,00	0,89	0,47	0,21	1,16	0,31	0,43	0,42	1,18	1,06	0,92	0,60	0,42	0,41
25	α -terpinyl acetate	1,35	1,19	1,54	1,01	2,10	1,72	1,66	1,31	0,39	0,37	1,37	1,21	1,55	1,31	2,13	1,78	1,68	1,43	0,39	0,31
26	Citonellyl Acetate	0,10	0,10	0,13	0,39	0,11	0,24	0,02	0,20	0,18	0,23	0,16	0,20	0,25	0,28	0,20	0,24	0,05	0,04
27	α -Copaene	1,13	1,05	0,92	0,87	0,61	0,49	0,89	0,80	0,26	0,29	1,02	0,99	0,87	0,81	0,62	0,58	0,84	0,80	0,20	0,20
28	β -Cubebene	0,22	0,28	0,10	0,16	0,10	0,30	0,14	0,25	0,07	0,07	0,17	0,26	0,08	0,14	0,10	0,16	0,12	0,18	0,05	0,06
29	β -Elemene	0,66	0,86	0,37	0,55	0,38	0,74	0,47	0,72	0,16	0,15	0,64	0,83	0,38	0,48	0,41	0,49	0,48	0,60	0,14	0,20
30	Methyl Eugenol	2,43	1,24	10,88	6,73	2,83	1,15	5,38	3,04	4,76	3,19	3,76	2,97	11,04	8,41	4,12	3,17	6,30	4,85	4,10	3,08
31	(E)- β -Caryophyllene	0,64	1,06	0,71	0,59	0,68	0,83	0,05	0,34	0,31	0,56	0,19	0,28	0,28	0,36	0,26	0,40	0,06	0,15
32	α -Humulene	0,22	0,32	0,15	0,71	0,14	0,23	0,17	0,42	0,04	0,25	0,19	0,28	0,13	0,21	0,14	0,22	0,15	0,24	0,03	0,04
33	γ -Murolene	0,17	0,28	0,08	0,19	0,15	0,28	0,13	0,25	0,04	0,05	0,19	0,31	0,08	0,20	0,20	0,30	0,16	0,27	0,06	0,06
34	Germaacrene - D	9,18	8,15	5,23	4,92	8,44	7,42	7,62	6,83	2,10	1,69	7,98	7,33	4,66	4,64	7,30	6,95	6,65	6,30	1,75	1,46

Nº	COMPUESTOS	DB5MS										HP-INNOWAX									
		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{X}		σ	
		HRH1		HRH2		HRH3						HRH1		HRH2		HRH3					
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
35	Bicyclogermacrene	0,85	0,62	0,43	0,59	0,66	0,79	0,65	0,67	0,21	0,11	0,69	0,74	0,36	0,41	0,55	0,59	0,54	0,58	0,17	0,16
36	α -Amorphene	0,12	0,78
37	α -Muuroleone	0,19	0,27	0,08	0,16	0,14	0,23	0,14	0,22	0,05	0,05	0,16	0,23	0,14	0,14	0,15	0,18	0,02	0,06
38	Germacrene- A	0,28	0,24	0,14	0,15	0,14	0,16	0,19	0,18	0,08	0,05
39	γ -Cadinene	0,24	0,13	0,10	0,63	0,11	0,67	0,15	0,48	0,08	0,30
40	δ -Cadinene	1,13	1,01	0,73	0,38	0,72	0,41	0,86	0,60	0,24	0,35	1,41	1,25	0,86	0,78	0,98	0,88	1,08	0,97	0,29	0,25
41	β -Eudesmol	0,48	0,71	0,25	0,08	0,16	0,35	0,30	0,38	0,16	0,32	0,50	0,58	0,24	0,32	0,27	0,34	0,34	0,41	0,14	0,14
42	t-Muurolol	0,26	0,31	0,14	0,52	0,20	0,41	0,09	0,14	0,17	0,23	0,17	0,23
43	β -Phellandrene	1,41	1,58	1,31	1,46	1,19	1,32	1,31	1,45	0,11	0,13
44	cis- α -Copaen-8-ol	0,35	0,42	0,25	0,30	0,14	0,20	0,25	0,30	0,10	0,11
45	α -Cadinol	0,20	0,30	0,11	0,19	0,13	0,21	0,15	0,23	0,04	0,06
*Total identificado								98,89	97,84	**Total identificado								97,98	97,31		
<p>Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5MS. HRM=<i>Hedyosmun racemosun</i> con flores masculinas. HRM1=Aceites de la primera recolección. HRM2: Aceites de la segunda recolección. HRM3: Aceites de la tercera recolección. *=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna DB-5MS-MASAS y DB-5MS-FID. **=Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID \bar{X}=Promedio σ= desviación estándar</p>																					

Fuente: Chamba, F.

En el aceite esencial extraído de las partes aéreas de especímenes de *H. racemosum* con flores masculinas fue analizado por CG-EM y CG-FID, se identificaron 45 compuestos, de los cuales 37 compuestos están presentes en ambas columnas; 41 en la columna DB-5ms con un porcentaje de identificación de 98,897% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 41 compuestos que representan el 97,98%.

No se han encontrado estudios referentes a la composición química del aceite esencial extraído a partir de las partes aéreas de la especie *H. racemosum* con flores masculinas. Sin embargo un sinnúmero de investigaciones tienen como objeto el estudio de la composición química del aceite esencial de varias especies del género.

Según Correa (2014) la especie *H. racemosum* a partir de flores femeninas identifico 8 compuestos mayoritarios entre los cuales tenemos: α -Pinene (5,43%), α -Phellandrene (26,47%), Limonene (3,36%), (Z)- β -Ocimene (4,25%), Linalool (3,51%), Estragole (16,97%), Methyl Eugenol (5,99%), D-Germacrene (10,34%). De lo que podemos determinar que entre especie masculina y femeninas sus compuesto mayoritarios son los mismos, con una pequeña diferencia entre su porcentaje.

La composición del aceite esencial de *H. racemosum* con flores masculinas fue significativamente diferente de otras especies del género *Hedyosmum*. Mundina, et al. (2000) describió la composición química de tres especies de Costa Rica entre ellas: *H. mexicanum* que contiene dos componentes abundantes: la sabineno (28%) y el furanodiene (20%). La especie *H. costaricensis* contiene germacreno-D (32%), (E, E) - α -farneseno (8%), β -cariofileno (6%) y β -bourbonene (6%) y (E) - β -o-cimene (2%). En la tercera especie, *H. bonplandianum* Kunth, los componentes predominantes son: sabineno (15%) y (E) - β -ocimeno (11%), el linalol (3,0%) y terpinol-4-ol (7%) y germacreno D (32%), α -bisaboleno (10%) y β -cariofileno (6,1%).

Esta diferencia entre especies, pueden darse debido a las condiciones en que se desarrolló la planta; así como en las condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima), produciendo cambios cualitativos y cuantitativos en el aceite (Sánchez, et al., 2009).

Uno de los compuestos mayoritarios fue Estragole (16,97%) figura 28, es un fenilpropeno, un compuesto orgánico natural. Su estructura química se compone de un benceno sustituido en

el anillo con un grupo metoxi y un grupo propenilo. Es un isómero de anetol, que difiere con respecto a la ubicación del doble enlace. Es un líquido incoloro, se usa en la industria de la perfumería y como aditivo alimentario. Es un potente carcinógeno (para hepatomas) y genotóxico natural, en ratones y ratas.

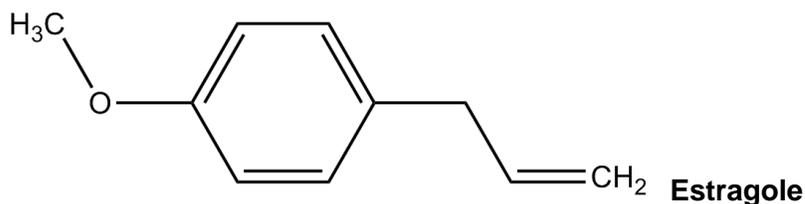


Figura 28. Compuesto mayoritario estragole
Fuente: Chamba, F.

3.5. Actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y la concentración de la droga en el organismo humano.

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la tabla 12 se observa la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 5 cepas bacterianas Gram-negativas y 2 cepas Gram-positivas.

Tabla 12. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de *Hedyosmum racemosum*

Concentración mínima inhibitoria de <i>Hedyosmum racemosum</i> µg/mL							
Gram-negativas						Gram-positivas	
Aceite esencial	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
HRM1	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM2	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM3	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM1: aceite esencial de la primerarecolección							
HRM2: aceite esencial de la segunda recolección							
HRM3: aceite esencial de la tercera recolección							

Fuente: Chamba, F.

En el control positivo la Gentamicina tuvo una concentración mínima inhibitoria de 0,39ug/ml, excepto para *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* con una concentración mínima inhibitoria de 1,95ug/ml

Como se puede observar el aceite de *Hedyosmum racemosum*, no tiene potencial como antibacteriano frente a ninguna cepa, ya que no inhibe el crecimiento a la concentración máxima utilizada (1000 µg/mL).

El objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria, es evaluar la susceptibilidad de un organismo bacteriano con cantidades mínimas de aceite esencial posterior a un tiempo de incubación de 18 – 24 horas.

Según Correa (2014), *Hedyosmum racemosum* con flores femeninas presento actividad biológica frente a a *klebsiella pneumoniae* (250 µg/mL). La divergencia de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de los aceites esenciales entre los diferentes estudios puede explicarse por la diversidad de las técnicas utilizadas, estado fenológico de la planta, la variación en la composición química de los aceites de acuerdo con los géneros y las especies de las plantas o también se le puede atribuir a la estructura reproductiva de las mismas (Zapata, et al., 2010)

No existen estudios de actividad biológica de esta especie con la cual se pueda comparar, pero si estudios de especies del mismo género, como *H. brasiliense* que tiene actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *B. subtilis*,

con un valor de MIC de 0,312% y no presente actividad frente a bacterias gran negativas (Kirchnerl, et al., 2010).

Hedyosmum brasiliense reporta dos compuestos principales: α -terpineol y β -Thujene, se han descrito por ser importante para la actividad antioxidante y antimicrobiana de varias plantas y aceites esenciales (Pengelly, 2004). Además, α -terpineol también se utiliza en todo el mundo en fragancias finas, champús, así como en productos no cosméticos tales limpiadores domésticos y detergentes (Bathia, et al., 2008).

En la especie *Hedyosmum racemosum* presenta el compuesto α -terpineol pero en muy baja concentración. Algunos estudios indican que los aceites esenciales enteros tienen una mayor actividad antimicrobiana de los principales componentes mezclados (Mourey & Canillac, 2002). Este hallazgo sugiere que los componentes menores como spathulenol, β -eudesmol, y cis-ocymene, presente en *Hedyosmum racemosum*, podría afectar a las propiedades antimicrobianas (Jasicka-Misiak, et al., 2004).

Algunos autores sugieren que los componentes presentes en altas concentraciones no son necesariamente los responsables de gran parte de la actividad biológica, los componentes minoritarios pueden también contribuir a la actividad del aceite por efectos sinérgicos con otros componentes activos o también pueden anular la actividad por efectos antagónicos (Bathia et al., 2008).

La actividad biológica no solo depende del aceite esencial o de su concentración, sino también del microorganismo de prueba en sí mismo.

3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.

Para determinar si las muestras de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, presentan actividad inhibitoria frente a cepas fúngicas se utilizó dos tipos de hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185.

En la tabla 13 se indica los valores obtenidos de los ensayos de la concentración mínima inhibitoria antifúngica para cada recolección.

Tabla 13. CMI del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* frente a dos cepas fúngicas.

Concentración mínima inhibitoria de <i>Hedyosmum racemosum</i> µg/mL		
<i>Aceite esencial</i>	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185
HRM1	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM2	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM3	> 10000 µg/mL	> 10000 µg/mL
HRM1: aceite esencial de la primera recolección HRM2: aceite esencial de la segunda recolección HRM3: aceite esencial de la tercerarecolección		

Fuente: Chamba, F.

Todos los aceites esenciales obtenidos del material de las diferentes recolecciones no presentaron actividad frente a ninguno de los hongos utilizados para este análisis, es decir todos los aceites no presentaron una CMI a 1000 µg/mL que es la concentración más alta que se probó.

De acuerdo con la clasificación de la actividad antimicótica para aceites esenciales, por Holetz citado por Zapata et al. (2010) clasifica el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la siguiente manera, si la CMI es igual o menor a 100 µg/mL se considera buena, si la CMI está entre 100 – 500 µg/mL se considera como moderada y si la CMI está entre 500 – 1000 µg/mL se considera como débil (Zapata et al., 2010).

De esta especie en específico no existen estudios en base a los microorganismos fúngicos que han sido evaluados en esta investigación. La especie *H. brasiliense* además de presentar actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas, también pueden actuar sobre organismos fúngicos como *Candida albicans* y *C. parapsilosis* (valores de CIM que van desde 0,125 hasta 0,312%) (Kirchnerl et al., 2010).

3.6. Actividad Antioxidante.

3.6.1. Método ABTS⁺.

3.6.1.1. Lectura de las muestras de los estándares de referencia TROLOX y BHT.

Al evaluar la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, mediante el método de ABTS⁺ a diferentes concentraciones de los estándares de referencia como: Trolox y BHT con las que se trabajó en el equipo de espectrofotometría, arrojaron datos de absorbancia, los cuales se reemplazaron con la fórmula de porcentaje de inhibición que se encuentra en la figura 36, en el capítulo de metodología. Los resultados que se obtuvieron tras realizar estos cálculos se expresan en la tabla 14 que indica los valores de porcentaje de disminución respectivos para cada concentración.

Tabla 14. Datos del método ABTS⁺ para los estándares TROLOX y BHT.

DATOS ABTS+				
Concentración (ppm)	TROLOX		BHT	
	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,165	85,18	0,054	95,17
800	0,316	71,53	0,057	94,84
600	0,462	58,39	0,116	89,56
450	0,531	52,18	0,158	85,78
300	0,649	41,58	0,373	66,46
150	0,761	31,47	0,565	49,17
25	0,805	27,51	0,766	31,02
0	0,810	27,09	0,877	21,06
Absorbancia de solución de trabajo de 1,111				

Fuente: Chamba, F.

3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Se determinó la actividad antioxidante del aceite esencial *Hedyosmum racemosum* a partir de flores masculinas a diferentes concentraciones como se puede observar en la tabla 15. Determinando a la vez el porcentaje de disminución.

Tabla 15. Datos del método ABTS⁺ para aceite esencial *H. racemosum*.

ACEITTE <i>H. racemosum</i>		
Concentración (μM)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,734	33,90
500	0,885	20,37
100	0,913	17,79
50	0,925	16,77
25	0,944	15,00
12,5	0,956	13,95
5	0,964	13,23
0	0,973	12,42
Absorbancia de solución de trabajo de 1,111		

Fuente: Chamba, F.

El aceite esencial *Hedyosmum racemosum* analizado por el método ABTS⁺ no presento un porcentaje de disminución igual o mayor al 50%, su valor de disminución de radicales a la concentración de 1000 ppm fue de 33,90%.

3.6.2. Método DPPH.

3.6.2.1. Lectura de las muestras de los estándares de referencia TROLOX y BHT.

Los datos obtenidos mediante el método de radical DPPH[•], fueron analizados de la misma manera que los datos obtenidos por el método ABTS⁺, las concentraciones evaluadas en el espectrofotómetro arrojaron datos de absorbancia, con los cuales se determinó el porcentaje de disminución de los estándares de referencia como: TROLOX y BHT para cada concentración establecida. Para esto se utilizó la fórmula de la figura 36 que se encuentra en el capítulo de metodología.

En la tabla 16 se indican las concentraciones utilizadas, los valores de absorbancia para cada concentración y los porcentajes de disminución de DPPH calculados para cada concentración establecida.

Tabla 16. Datos del método DPPH para los estándares TROLOX y BHT.

DATOS DPPH				
Concentración (ppm)	TROLOX		BHT	
	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,489	55,55	0,163	85,18
800	0,570	48,21	0,203	81,58
600	0,731	33,58	0,324	70,52
450	0,782	28,94	0,448	59,27
300	0,843	23,33	0,588	46,55
150	0,890	19,06	0,755	31,39
25	0,930	15,48	0,887	19,36
0	0,932	15,27	0,904	17,85
Absorbancia de solución de trabajo de 1,100				

Fuente: Chamba, F.

3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.

Se determinó la actividad antioxidante del aceite esencial *Hedyosmum racemosum* a partir de flores masculinas a diferentes concentraciones como se puede observar en la tabla 17. Determinando a la vez el porcentaje de disminución.

Tabla 17. Datos del método DPPH para aceite esencial *H. racemosum*

ACEITTE <i>H. racemosum</i>		
Concentración (µM)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,822	25,27
500	0,877	20,27
100	0,903	17,91
50	0,912	17,09
25	0,921	16,24
12,5	0,932	15,27
5	0,942	14,36
0	0,960	12,73
Absorbancia de solución de trabajo de 1,100		

Fuente: Chamba, F.

El aceite esencial *Hedyosmum racemosum* analizado por el método DPPH no presentó un porcentaje de disminución igual o mayor al 50%, su valor de disminución de radicales a la concentración de 1000 ppm fue de 25,27%.

Como se puede observar los antioxidantes sintéticos BHT Y TROLOX en comparación con el aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* analizado presenta porcentajes de disminución de los radicales para ambos métodos muy alta superior al 50%.

Sin embargo para el aceite no fue posible calcular la IC50 ya que el porcentaje de disminución no llegó a un 50%, por lo tanto no presentó actividad antioxidante.

Hedyosmum brasiliense reporta dos compuestos principales: α -terpineol y β -Thujene, se han descrito por ser importante para la actividad antioxidante y antimicrobiana de varias plantas y aceites esenciales (Pengelly, 2004).

Se atribuyó esta actividad al Terpinen-4-ol, que es un alcohol no saturado con un doble enlace que lo califica como un potencial secuestrante de radicales libres y al Germacreno-D que es altamente reactivo y capturador de radicales libres, compuesto que está presente en el AE de *Minthostachys mollis* (Granados, et al., 2012)

Algunos autores sugieren que los componentes presentes en altas concentraciones no son necesariamente los responsables de gran parte de la actividad antioxidante, los componentes minoritarios pueden también contribuir a la actividad del aceite por efectos sinérgicos con otros componentes activos o también pueden anular la actividad por efectos antagónicos (Bathia et al., 2008).

CONCLUSIONES

- 1) La densidad obtenida en las recolecciones fue de 0,8978 g/cm³, 0,9012 g/cm³ y 0,9008 g/cm³ para la primera, segunda y tercera recolección respectivamente. La media resultado de los valores anteriormente mencionados fue de 0,8978 g/cm³.
- 2) Para el índice de refracción el valor más alto fue de la primera recolección con (1,4925), el más bajo fue de la tercera recolección (1,4894). El promedio final del índice de refracción de las muestras fue de 1,4911.
- 3) En la composición química del aceite esencial se identificaron 45 compuestos, de los cuales 37 compuestos están presentes en ambas columnas. En la columna DB-5ms se identificaron 41 compuestos con un porcentaje de identificación de 98,87%. En la columna HP-INNOWAX se identificaron 41 compuestos que representan el 97,81%.
- 4) Se determinaron 8 compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* con flores masculinas los cuales fueron α -Pinene (7,48%), α -Phellandrene (28,24%), Limonene (3,68%), (Z)- β -Ocimene (2,88%), Linalool (4,19%), Estragole (21,82%), Methyl Eugenol (5,38%), Germacrene-D (7,62%).
- 5) El aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* fue inactivo frente a bacterias y hongos en estudio, es decir no mostraron actividad con ninguno de los microorganismos en las concentraciones máximas evaluadas. La actividad biológica no solo depende del aceite esencial o de su concentración, sino también del microorganismo de prueba en sí mismo.
- 6) *Hedyosmum racemosum* no presento actividad antioxidante a las diversas concentraciones en estudio.

RECOMENDACIONES

- Al momento de recolectar la materia vegetal, verificar la abundancia de la población silvestre en esa zona. Para evitar la extinción.
- Eliminar todo tipo de restos vegetales de otras plantas o contaminantes de la muestra de materia vegetal al momento de destilar, para que así no interfiera con la correcta determinación química de cada especie.
- Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (2009). Identification of Essential oil components by chromatography/MS Spectrometry (4ta ed.).
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (vol. 1), 5-16.
- Arias, A. (2012). *Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de una especie Astaraceae (Chromolaneae laevigata) de la provincia de Loja* obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Journal Food Chemistry & Biodiversity*, 73, 239-244.
- Arteche, A., Vanaclocha, B., & Güenechea, J. (1998). Vademécum de prescripción Plantas medicinales. *Fitoterapia* 3.^a ed.
- ATCC. American Type Culture Collection Retrieved diciembre, 2014, from <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=2219>
- Avalos García, A., & Carril, P.-U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2, 3.
- Bandoni, A. (2002). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su Aprovechamiento Industrial Para la Producción de Aromas y Sabores*. Buenos Aires, Argentina.
- Barrero., A. F., Pino., M. H. d., Burón., P. A., Moral, J. Q. d., & Arteaga., J. F. (2004). *Nuevas fuentes de antioxidantes*. Universidad de Granada, Granada- España
- Bathia, S., Letizia, C., & Api, A. (2008). Fragrance material review on (-)- α -terpineol. *Food Chem Toxicol* 46, 280-285.
- Berger, R. (2007). Bioprocessing and Sustainability. *Flavours and Fragrances. Chemistry*.
- Biocomercio andino. (2014). Base de datos de flora comercializada en el Ecuador. Ecuador.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.
- Briga, J. (1962). Los aromáticos en la industria moderna. 2^a edición. Editorial Sintet.
- Buchbauer, G. (2000). The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumer and Flavorist*, 64-67.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). *Experimental y Salud Publica*, 25(3), 298-301.
- Caoa, C., Penga, Y., Shib, Q., Xiao, & (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 220-234.
- Carhuapoma, M. (2006). *ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE Luma chequen (Molina) A. Gray" arrayán.*, Universidad Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública, Volumen 30. N°6*, págs. 519-528.
- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Revista Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, XIII(33), 165-166.

- Cerpa, M., Mato, R., & Cocero, M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. Modelado y caracterización. *AIChE Journal*, 54(4), 909-917.
- Conde., C. G., Rueda., X. Y., & Patiño., G. S. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Facultad de Ciencias Básicas*, 12-23
- Correa, M. (2014). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Hedyosmum racemosum (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas*. Técnica Particular de Loja, Loja.
- CYTED. (2011). Formularios de evaluación científico tecnológica. *TECNOLOGÍA, PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y PARA EL DESARROLLO*
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Quito & Aarhus. (Herbario QCA & Herbario AAU)*, 105–114.
- Del Pozo, L., Silva, N., Valencia, A., Soto, J., Riveros, J., Sacsquispe, R., Calderón, R., & Suarez, V. (2006). Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* , Volumen 67. N° 4, págs. 318-326.
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. . *Revista cubana de higiene y epidemiología*, Volumen 48. N° 2, págs. 147-161.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). Biodiversidad y Recursos Genéticos. *Una guía para su uso y acceso en el Ecuador.*, Ediciones Abya Yala.
- García, B., García, G., Rojo, D., & Sánchez, G. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 20(3), 231.
- Gomis Yagües, V. (2008). Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial. *Tema 3. Cromatografía de gases*
- Gonzalez, A. (2004). *Obtención de los aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas*. Universidad Nacional de Colombia.
- Granados, C., Yáñez, X., & Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona, Colombia. Bistua*, 1 (vol. 10), p. 12-23.
- Gulavisí, L. (2008). Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del ministerio de salud pública. *MSP*, 1, 19-20.
- Gutiérrez, M., & Droquet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. 122.
- Hernández, L., & Rodríguez, J. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6, 44-47.
- Jasicka-Misiak, I., Lipok, J., Nowakowska, E., Wieczorek, P., Młynarz, P., & Kafarski, P. (2004). Antifungal activity of the carrot seed oil and its major sesquiterpene compounds. *Z Naturforsch C*, 59, 791-796.
- Jover, A., & García, M. (2006). Generalidades sobre los grupos terapéuticos para los auxiliares de farmacia. *Editorial MAD*, S. L. Sevilla.
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A., Biavatti, M., & Netz, D. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5), 692-699.

- Kirchnerl, K., Wisniewski JrII, A., Cruzl, A., Biavattilll, M., & Netz, D. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20.
- Kubitzki, K., Rohwer, J., & Bittrich, V. (1993). Flowering Plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=yjlzrzBRXNQC>
- Kuskoski, M., Asuero, A., & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4), 726-732.
- Largo, R., Dosno, J., & Pruyas, M. (1973). Neuropatía a proteus. *Revista Chilena de Pediatría*, 44(4), 354-358.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Manzano-Gayosso, P. (2008). Las micosis superficiales: su relevancia médica y socioeconómica. *Gaceta Médica de México*, 144(2)(123-124).
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. 11(1).
- Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11-24.
- Martinez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). . *Rev Cubana Plant Med [online]*. , 2(1), 12-14.
- Montoya, S., & Páez, C. (2012). *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. Obtencion de titulo de Tecnólogo Químico, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Moreno, s., Crescente, O., Ortiz, S., & Quintero, M. (2009). Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Rev. Ciencia y Tecnología de América*, 745-747.
- Mourey, A., & Canillac, N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Contr* 13, 289-292.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Ciccio, J., Ibañez, C., Adzet, T., Casanova, J., & Cañigüeral, S. (2000). Essential oil composition from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour Fragr J*, 15, 201-205.
- Olaya, J., & Méndez, J. (2003). Guía de plantas y productos medicinales.
- Olgúin, P., & Rodríguez, M. (2004). *Cromatografía de gases: Métodos en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona.
- Patzelt, E. (2002). Flora del Ecuador. *Editorial Cámara Ecuatoriana del Libro - Núcleo de Pichincha*.
- Pavas, G., & Vega, S. (2012). Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones. . *Cuadernos de Investigación*, 30.
- Pengelly, A. (2004). *Essential oils and resins*. In: Pengelly A. *The Constituents of Medicinal Plants* (Vol. 2). Cambridge: CABI
- Pino, A., Ortega, L., Rosado Pérez, A., Rodríguez, J., & Baluja, R. (1996). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1).
- Pino, B., Melendez, E., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada

- tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 301-304.
- Pozo, X., & Naranjo, B. (2006). *Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon Citratus (DC) stapf*. Ingeniero en Biotecnología., Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador: s.n.
- Ramirez, L., & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2, 42.
- Ríos, L., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., & Suárez, R. (2007). Extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *DYNA: revista de la Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín*, 74(151)(47-52.).
- Ríos, M., De la Cruz, R., & Mora, A. (2008). *Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador: Saberes y Prácticas* (Vol. IEPI). Quito.
- Rodríguez Chávez, J. (2014). *Estandarización y validación del método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC-MS) para el análisis de 4 benzodiazepinas y sus metabolitos en muestras biológicas de interés forense en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.*, Universidad Tecnología de Pereira.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. México: Médica Panamericana.
- Ruiz, V., & Moreno, S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Médica Panamericana*.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- Sandoval, J. (1999). Evaluación del Rendimiento en la Extracción de Aceite Esencial de la hoja de Orégano (*Lippigraveolens*), variando el tamaño de muestra y aplicando los Métodos de Arrastre con vapor e Hidrodestilación a nivel Laboratorio. pag.19.
- Sciences, P. S., & eLibraryPRO. La Transpiración-movimiento del agua a través de las plantas Retrieved 07 de noviembre de 2014, from <http://passel.unl.edu>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- TIP. (2002). La Biblioteca Electrónica de Ciencia y Tecnología, 2014
- Todzia, C. (1988). Chloranthaceae: *Hedyosmum*. *Flora Neotropica Monograph* 48.
- Vasconcellos A. (2000). *Alimentos funcionales. Consejos y beneficios para la salud*. Universidad Chapman, California.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur, L., & Messa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamérica de Micología* 2 (vol. 27), 101-103.

ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

PRINCIPIO:

La pérdida de peso de la muestra, debido a que es sometida a altas temperaturas en una estufa durante un tiempo determinado.

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gr de la muestra; seguidamente colocarla durante 45 minutos en la lámpara ULTRA X a 37 °C.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 5 minutos aproximadamente, hasta que la temperatura de la cápsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- Colocar la cápsula nuevamente en la estufa durante 15 minutos, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante.

CÁLCULO:

$$Hm = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m)} * 100$$

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

m₁: peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

m₂: peso de la cápsula + muestra seca (gr).

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para calcular el porcentaje de rendimiento (%R) de los aceites esenciales evaluados se correlacionó el volumen de aceite esencial obtenido por cada destilación, con la cantidad de material vegetal, mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{Peso (gr.)}} * 100$$

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P: Peso de la materia vegetal empleada en la destilación.

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

La presente norma está basada en la norma ISO 279-1981 publicada por la Organización Internacional de Normalización.

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

La presente norma especifica el método referido a la determinación de la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales.

REFERENCIAS:

- NF T 75-003 Aceites esenciales-Reglas generales para la preparación.
- NF T 75-110 Aceites esenciales-Preparación de la muestra previa al análisis.
-

PRINCIPIO:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

NOTA:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C , con una variación de 0.2°C a 0.1°C .
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C . Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.
- **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d_{20}^{20} : Densidad relativa a 20°C , referido al agua a 20°C .

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

PRINCIPIO:

Según el tipo de aparato que utilice, la medida directa del ángulo de refracción o la observación del límite de refracción total. El aceite se mantendrá dentro de las condiciones de iso-tropismo y de transparencia.

DEFINICIÓN:

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

APARATOS:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002 .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^\circ\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Resultados:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula.

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0.0004 (t' - t)$$

Dónde:

n_D^t = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t , o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

ANEXO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÍNDICES DE KÓVAST

^b ref. 1; ^c ref. 2; ^d ref. 3; ^e ef. 4; ^f ref. 5; ^g ref. 6; ^h ref. 7; ⁱ ref. 8; ^j ref.9; ^k ref. 10; ^l ref. 11; ^m ref. 12; ⁿ ref. 13; ^o ref.

1. Adams, R.(2009) Identification of Essencial oil componensts by chromatography/ MS Spectrometry. Vol. 4
2. Adams, R.P.; (2006) González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico, *Biochem. Syst. Ecol.*, 34, 205-211
3. Adams, R.P.; (2000) *Systematics of Juniperus section Juniperus based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)*, **Biochem. Syst. Ecol.**, 28, 515-528
4. Demirci, B., Hüsnü Can Başer, K., Yıldız, B. and Bahçecioğlu, Z. (2003), Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey . *Flavour Fragr. J.*, 18: 116–121. doi: 10.1002/ffj.1173
5. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
6. Tomi, F., Barzalona, M., Casanova, J., & Luro, F. (2008). Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (Commun)× *Citrus deliciosa* (Willow Leaf). *Flavour and fragrance journal*, 23(3), 152-163.
7. Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., & Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *Itálica* fruit maturation. *Food chemistry*, 112(3), 621-626.
8. Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A. F., Bighelli, A., Casanova, J., & Costa, J. (2007). Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour and fragrance journal*, 22(6), 479-487.

9. Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., & Valarezo, E. (2010). Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggersii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676-691.
10. Lassak, E. V., & Brophy, J. J. (2008). The Steam-Volatile Oil of Commercial "Almaciga" Resin (*Agathis philippinensis* Warb.) from the Philippines. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(6), 634-637.
11. Muñoz-Acevedo, A., Stashenko, E. E., Kouznetsov, V. V., & Martínez, J. R. (2011). Differentiation of leaf and flower extracts of basil (*Ocimum* sp.) varieties grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(4), 387-395.
12. Başer, K., Demirci, B., Tabanca, N., Özek, T., & Gören, N. (2001). Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., *T. balsamita* L., *T. chiliophyllum* (Fisch. & Mey.) Schultz Bip. var. *chiliophyllum* and *T. haradjani* (Rech. fil.) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone†. *Flavour and fragrance journal*, 16(3), 195-200.
13. Andreani, S., Barboni, T., Desjobert, J. M., Paolini, J., Costa, J., & Muselli, A. (2012). Essential oil composition and chemical variability of *Xanthium italicum* Moretti from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3), 227-236.
14. De Castro, O., Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Cennamo, P., & Gianguzzi, L. (2008). Composition of the essential oil of *Petagnaea gussonei* (Sprengel) Rauschert, a relict species from Sicily (Southern Italy). *Flavour and fragrance journal*, 23(3), 172-177