



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

## **ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO.

**Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper lanceifolium* de la provincia de Zamora.**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Palacio Jaramillo, Carlos Eduardo

**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

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

**De mi consideración:**

El presente trabajo de fin de titulación: “**Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper lanceifolium* de la provincia de Zamora Chinchipe**” realizado por Palacio Jaramillo Carlos Eduardo, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo del 2015

f.....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

“Yo Palacio Jaramillo Carlos Eduardo 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 *Piper lanceifolium* de la provincia de Zamora Chinchipe”**, de la titulación de Bioquímico y Farmacéutico, siendo el Ph D. 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: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Carlos Eduardo Palacio Jaramillo  
1104373723

## DEDICATORIA

*Mi tesis la dedico con toda mi creencia devoción y amor a Dios por estar a mi lado siempre, por darme valor y brindarme la fortaleza que tanto necesito, por haberme regalado a una familia tan maravillosa.*

*A mis padres que me dieron la oportunidad de tener una carrera para mi futuro, por el inmenso apoyo que me dieron, por haber confiado en mi, porque siempre me dieron aliento para seguir luchando a pesar de mis temores.*

*A mis hermanos que amo tanto, porque a pesar de nuestras diferencias siempre confiaron.*

*Carlos Eduardo Palacio Jaramillo*

## **AGRADECIMIENTO**

El agradecimiento más grande a Dios por acompañarme todos los días durante este largo trayecto de mi vida, ahora gracias a él culminó un escalón más en mi vida para empezar uno nuevo. A mis padres Eduardo y Rosa Iliana, ambos luchadores incansables, gracias al apoyo tan grande que desde mi niñez me brindaron hoy logro cumplir con uno de mis propósitos más grandes, por sus consejos tan valiosos y en tiempo y la paciencia brindada que definitivamente me han conducido por el camino correcto, por haberme animado constantemente a seguir adelante, gracias por educarme y formarme como un ser integral por lo cual me siento muy orgulloso y agradecido A mis hermanos Geovanny y Belén con los que hemos compartido tanta momentos felices alegrías tristezas bromas que ,me han permitido vivir como un ser feliz y orgulloso de mi familia. Al Ph.D. Eduardo Valarezo en calidad de Director de tesis por compartirme su experiencia y conocimientos, y por haberme brindado su confianza en mi para llevar a cabo la realización de este proyecto. A la Universidad Técnica Particular de Loja que gracias a su amplia misión de formación integral me permitió prepararme en tan digna institución.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN .....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHO .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>5</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
1.1. Aceites esenciales .....	6
1.1.1. Extracción.....	7
1.1.2. Clasificación.....	11
1.1.3. Cromatografía de gases.....	12
1.1.4. Propiedades.....	12
1.1.4.1. Estructura y composición química.....	12
1.1.4.2. Clasificación de componentes.....	13
1.1.4.3. Usos y aplicaciones.....	14
1.1.5. Actividad Biológica .....	15
1.1.6. Bacterias.....	15
1.1.7. Hongos.....	17
1.1.8. <i>Trichophytumrubrum</i> .....	17
1.1.9. Actividad Antioxidante .....	17
1.2. Plantas medicinales .....	17
1.2.1. Flora Ecuatoriana .....	18
1.3. El género <i>Piper</i> .....	19
1.3.1. <i>Piper lanceifolium</i> .....	19
1.3.2. Propiedades curativas.....	20

<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Metodología .....	23
2.1.1. Recolección del material vegetal. ....	23
2.1.2. Determinación de la humedad de la planta.....	24
2.1.3. Extracción del aceite esencial.....	25
2.1.4. Determinación de las propiedades físicas.....	26
2.1.5. Densidad .....	26
2.1.6. Índice de refracción .....	26
2.2. Determinación de la composición química del aceite esencial .....	27
2.2.1. Cromatografía de gases .....	27
2.2.2. Preparación de la muestra.....	27
2.2.3. Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas .....	29
2.2.4. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a masas.....	30
2.2.5. Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama. ....	31
2.2.6. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama. ....	32
2.3. Determinación de la actividad biológica. ....	33
2.3.1. Cepas bacterianas y fúngicas.....	33
2.3.2. Actividad antibacteriana.....	33
2.3.3. Preparación de la muestra.....	33
2.3.4. Preparación del cultivo microbiano“cultivo overnight”. ....	33
2.3.5. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano .....	34
2.3.6. Actividad Antifúngica .....	35
2.3.7. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos. ....	35
2.3.8. Procedimiento .....	36
2.3.9. Lectura de las placas de C.M.I e interpretación de resultados .....	36
2.4. Determinación de la actividad antioxidante .....	37
2.4.1. Método ABTS .....	37
2.4.1.1. Solución ABTS.....	37
2.4.1.2. Lectura de muestras ABTS .....	38
2.4.1.3. Curva estándar Trólox para ABTS .....	38
2.4.2. Método DPPH .....	38
2.4.2.1. Solución de DPPH .....	38

2.4.2.2. Lectura de muestras DPPH .....	39
2.4.2.3. Curva estándar Trólox para DPPH.....	39
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>41</b>
<b>3. RESULTADO Y ANÁLISIS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Humedad .....	42
3.2. Rendimiento.....	43
3.3. Propiedades físicas.....	43
3.3.1. Densidad relativa.....	43
3.3.2. Índice de refracción .....	44
3.3.3. Actividad óptica específica.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.4. Composición Química .....	45
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	45
3.5. Actividad Biológica .....	55
3.6. Actividad Antioxidante .....	55
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Compuesto terpenoide .....	13
<b>Figura 2.</b>	planta <i>Piper lanceifolium</i> .....	20
<b>Figura 3.</b>	Metodología utilizada para la investigación .....	23
<b>Figura 3.</b>	Mapa de la provincia de Zamora Chinchipe donde está la muestra de <i>Piper lanceifolium</i> .....	24
<b>Figura 4.</b>	Destilador.....	25
<b>Figura 6.</b>	Refractómetro ABBE .....	27
<b>Figura 7.</b>	Cromatografía .....	28
<b>Figura 8.</b>	Detalle de corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas .....	29
<b>Figura 9.</b>	Detalle de corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas .....	30
<b>Figura 10.</b>	Detalle de Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama. ....	31
<b>Figura 11.</b>	Detalle de corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama .....	32
<b>Figura 12.</b>	Modelo de Microplaca TC96 para hongos con las concentraciones del aceite( $\mu\text{g/mL}$ ). .....	36
<b>Figura 13.</b>	Espectrofotómetro .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de crecimiento de las bacterias utilizadas. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de Humedad de la materia vegetal. ....	42
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento en % (v/p) de la materia vegetal.....	43
<b>Tabla 4.</b> Densidad media del aceite esencial a 20°C.....	44
<b>Tabla 5.</b> Promedio de los Índices de Refracción de los aceite esenciales. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Actividad óptica específica.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 7.</b> (continuación) Composición química de <i>Piper lanceifolium</i> .....	47
<b>Tabla 8.</b> Comparación de porcentajes cuantitativos .....	51
<b>Tabla 9.</b> Actividad Biológica.....	55
<b>Tabla 10.</b> Relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la concentración del aceite .....	55
<b>Tabla 11.</b> Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de <i>Piper lanceifolium</i> .....	57

## RESUMEN.

El aceite esencial de las partes aéreas de *Piper lanceifolium* fue extraído por hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/ET y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de microdilución en caldo y la actividad antioxidante mediante ABTS y DPPH. También se determinaron las propiedades físicas del aceite. Se identificaron compuestos que representan el 93 % del aceite. Los componentes mayoritarios fueron safrole (41,23%), apiol (13,06%). La densidad del aceite esencial de *Piper lanceifolium* fue de 1,03 y el índice de refracción fue de 1,52., el aceite mostro buena actividad biológica frente a *Klebsiellapneumoniae*) con una CMI 500µg/mL).

**PALABRAS CLAVES:** *Piper lanceifolium* ., Aceite esencial, Composición Química, Actividad biológica

## ABSTRACT.

This research is considered very important because it shows the study of the essential oil of *Piper lanceifolium* that crese is a shrub in the warm zone, the essential oil of the aerial parts was extracted 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 antioxidant activity. Oil physical properties were also determined. Identified compounds that comprise 93% of the oil. The major components were safrole (41,23%), dill apiole (13,06%) The density of the essential oil of *Piper lanceifolium* was 1.03 and the refractive index was 1.52. The oil showed good biological activity against *Klebsiellapneumoniae* (LT2) especially before (CMI 500µg/mL).

KEYWORDS: *Piper lanceifolium*, Essential Oil, Chemical Composition, Biological Activity.

## INTRODUCCIÓN.

El presente estudio consiste en determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper lanceifolium* 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 la 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 sobre la existencia de los aceites esenciales sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: Farmacéutica, Cosmética y Alimenticia, la información es también incrementada en el Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas y 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 de 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 *Piper lanceifolium* 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 *Piper lanceifolium* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *Piper lanceifolium* 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  $5 \times 10^5$  cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonasaeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiellapneumoniae*(ATCC9997), *Proteusvulgaris* (ATCC 8427), *Escherichiacoli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcusfaecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración de  $5 \times 10^4$  esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophytonrubrum* (ATCC 28188) y *Trichophytonmentagrophytes* (ATCC 28185)] y la actividad antioxidante mediante el método DPPH y ABTS

## **CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO.**

## 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 (Mire 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. Los aceites esenciales se destacan como productos con un rápido desarrollo y múltiples posibilidades de aplicación en la agricultura (Pinto et al., 2010).

Sus características físicas se describen de la siguiente manera: 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 (la esencia de sastrás o de clavo constituyen excepciones). 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 graduación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua (Bruneton, 2001).

Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos semillas, corteza de los vegetales y a ciertos extractos de origen animal. Son intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. El principal método de aplicación de los aceites esenciales es a través de una dilución en agua caliente, para que así el vapor del agua mezclado con las esencias se absorban por medio del respiratorio. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan

exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible (Bruneton, 2001).

### 1.1.1. Extracción

- **Arrastre con vapor de agua**

Para realizar la destilación por arrastre con vapor se usan alambiques de características variables y adaptadas a cada tipo o caso específico. Su disposición general se puede ver a continuación:

Esquema del alambique para la extracción de aceites esenciales por arrastre con vapor de agua

La destilación por arrastre con vapor puede realizarse de tres formas distintas y son comúnmente conocidas como:

- ▶ La hidrodestilación simple o destilación con agua: consiste en sumergir directamente el material vegetal a tratar en agua, que a continuación se somete a ebullición. En éste método es máxima la acción del agua sobre el material, por ello se puede presentar hidrólisis y oxidaciones. Útil para materiales que tienden al apelmazamiento (flores pequeñas). Es aconsejable cargar el agua ya caliente para disminuir la hidrólisis y el tiempo de operación. Los vapores heterogéneos se condensan y el aceite esencial se separa por diferencia de densidad. Ej: Trementina
- ▶ Destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor: el vegetal no está en contacto con el agua; el vapor de agua se inyecta a través de la masa vegetal dispuesta sobre placas perforadas. El material debe tener tamaño uniforme para favorecer el paso del vapor. Trabaja cerca de los 100°C cuando lo hace a 1 atm de presión y el rendimiento es bueno siempre y cuando no se presenten apelmazamientos. Por cargarse el material a una temperatura menor a la de trabajo, se producen condensaciones sobre él y ésta humedad origina cierta dificultad en la operación, especialmente en el paso y distribución del vapor por la muestra. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales. Varias Farmacopeas la recomiendan como el método óptimo de obtención de esencias.

- ▶ La destilación con vapor seco o sobrecalentado: consiste en impulsar el vapor a través de la masa vegetal, colocada sobre columnas o cestos. El vapor tiende a recalentarse por la resistencia opuesta a su paso por el material y esto debe evitarse en lo posible, debido a que seca las membranas celulares e impide la salida del aceite. Las instalaciones son más costosas, pero presentan mayores producciones (Bruneton, 2001).

Para la comprensión de ésta operación, se hace la consideración del comportamiento en la destilación de un sistema de 2 fases formado por dos líquidos, x e y, completamente insolubles entre sí (agua y aceite esencial); cada líquido ejerce su propia tensión de vapor, independiente de la otra. Así, la Presión total ( $P_T$ ), se puede calcular de la siguiente forma:

$$P_T = P_x + P_y \text{ (a T)}$$

Dónde:

$P_x$  = Presión de vapor de X a T

$P_y$  = Presión de vapor de Y a T

El punto de ebullición de la mezcla será aquella temperatura en la que la presión total  $P_T$ , sea igual a la atmosférica.

Puesto que la presión ejercida por un gas (a una temperatura dada) es proporcional a la concentración de sus moléculas, la relación de las presiones de vapor de X e Y en el punto de ebullición de la mezcla será igual a la relación entre el número de moléculas de X y de Y que destilan de la mezcla. Así la composición del vapor se puede calcular de la siguiente forma:

$$\frac{N_x}{N_y} = \frac{P_x}{P_y} \text{ Ec. 1}$$

Dónde:

$N_X/N_Y$  : Relación molar de X e Y en el vapor

O bien:

$$\frac{W_X}{W_Y} = \frac{P_X \cdot M_X^2}{P_Y \cdot M_Y^2} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde:

$W_X/W_Y$  : Relación de pesos de X e Y en el vapor

$M_X$  : Peso molecular de X

$M_Y$  : Peso molecular de Y

De la ec. 2, se puede decir que en la destilación de una mezcla de dos líquidos no miscibles las cantidades relativas en peso de los dos líquidos que se recogen son directamente proporcional a las presiones de vapor de los líquidos a la temperatura de destilación y a sus pesos moleculares. Además, la mezcla destilará a una temperatura constante en tanto exista por lo menos algo de cada uno de los componentes.

- **Filtración:** Método algo más reciente. Sistema que no suele utilizarse mucho. Es parecido a la destilación , pero aquí el vapor se produce sobre el material vegetal para hacer que descienda y se filtre a través de éste (Valarezo, 2007). Después el vapor pasa por un tubo que atraviesa varios depósitos de temperaturas cada vez más frías, favoreciendo su condensación. El producto que se obtiene es parecido al de la destilación. Ventaja de este sistema: obtención, en menos tiempo, de extractos de materiales duros y compactos, como por ejemplo la madera (Bruneton, 2001).
- **Enfleurage:**(extracción con grasa en frío) es una forma de extracción con disolventes mediante el cual la planta, por lo general las partes florales, se estratifican en varias capas sobre grasa en frío. Con el tiempo y muchos acodos, la grasa absorbe muchas de las moléculas aromáticas. Este método se basa en el hecho de que las grasas absorben sustancias aromáticas con facilidad. Este procedimiento se utiliza para flores cuyo contenido en aceite esencial es tan bajo que, básicamente, se queda en el agua de destilación, o bien que tienen un aceite esencial sensible al calor. Este método se utiliza para esencias de flores tales como la mimosa, gardenia, violeta y otras como el nardo o el jazmín, que siguen

produciendo aceite esencial aún después de la recolección. Es una de las primeras formas de obtención de esencias utilizada por los egipcios para preparar ungüentos perfumados y diversos cosméticos (Reyes, 2012).

- **Maceración:** Si en casa se dispone de grandes cantidades de hierbas y plantas se puede realizar este tipo de extracciones de forma casera. El método consiste en llenar una tercera parte de un frasco de cristal limpio y esterilizado con flores o hierbas; el resto hay que completarlo con aceite denominado portador que ha de ser de buena calidad, ejemplo: almendra, pepitas de uva, etc. (el de almendras es el más común). Para que el aire no lo oxide y se eche a perder se cierra herméticamente el frasco y se guarda en un sitio oscuro y cálido durante el tiempo suficiente ( 21 días aprox.) para que la fragancia y otras propiedades de lo conservado pasen al aceite. Las flores o hierbas en conservación deben renovarse cuando adquiera una coloración oscura o marrón. Para mayor concentración se puede repetir el proceso varias veces (colar las flores o hierbas y echar la misma cantidad de éstas frescas en el líquido resultante del macerado anterior). Finalmente se filtra, y es en ese momento, cuando el extracto estará listo para usarse. Para que la esencia dure mucho tiempo han de seguirse los pasos recomendados anteriormente: frasco bien cerrado y en un lugar oscuro (Valarezo, 2007).
- **Extracción:** Método usado para obtener esencias de mayor concentración. En unos recipientes herméticos se introducen unas bandejas perforadas sobre las que se colocan las flores. Uno de los extremos se conecta a un depósito disolvente y el otro a un alambique. Se hace fluir el disolvente lentamente sobre las flores para que vaya emanando la esencia, ésta goteará sobre el alambique; el disolvente arrastra una sustancia semisólida que contiene las ceras naturales de las plantas y los aromas. Para eliminar la cera se agita la sustancia en alcohol y el resultado es un extracto de muy alta calidad (Allen, 2004).
- **Expresión:** Método que mediante presión, consigue aceites esenciales de las pieles de los frutos. Previamente se quita la pulpa y se procesa el fruto manualmente (con mucho cuidado). Después se exprime la corteza y se deja reposar el zumo o jugo obtenido para que sedimente, el aceite queda flotando en la superficie del líquido y así puede ser separado del resto con más facilidad (R.Q, 1970).

### 1.1.2. Clasificación.

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Shanahan, 2012).

✚ **Consistencia:** De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- **Esencias:** son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- **Bálsamos:** son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- **Resinas:** son productos amorfos sólidos o semisólidos de naturaleza química compleja. Pueden ser de origen fisiológico o fisiopatológico. Por ejemplo, la colofonia, obtenida por separación de la oleoresina trementina. Contiene ácido abiético y derivados(Ortuño, 2006).

✚ **Origen.** De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- **Naturales:** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas (I. M. Pepperberg, 2004).
- **Artificiales:** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol(Oliva).
- **Sintéticos:** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).

✚ **Naturaleza química:**

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%) pero mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas.

La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente.

El término quimiotipo alude a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico que sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo químico (dependen tanto de los genes como del ambiente)(Bruneton, 2001).

### **1.1.3. Cromatografía de gases.**

La composición química del aceite esencial *Piper lanceifolium* se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama (FID) con la fin de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo(Hartle, 2008).

Los análisis químicos se realizaron en el cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert; el equipo dispone de un sistema de datos “software MSD-Chemstation D.01.00 SP1” y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno(Adams, 2009).

### **1.1.4. Propiedades.**

#### **1.1.4.1. Estructura y composición química**

Actualmente se han identificado alrededor de 400 componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La mezcla compleja que integra los aceites esenciales pertenecen de manera casi exclusiva a grupos característicos distintos: el grupo de los terpenos, el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos originarios del ácido acético, los terpenos provenientes del ácido shikimico (aromáticos) y otros como los compuestos procedentes de la degradación de terpenos.

Los monoterpenos y sesquiterpenos son terpenos de 10 y 15 átomos de carbonos. De acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc. Algunos ejemplos de monoterpenos y sesquiterpenos son:

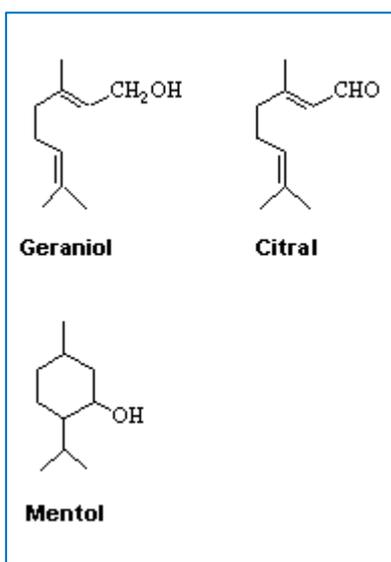
Monoterpenosacíclicos: linalol, nerol, geraniol.

Monoterpenosmonocíclicos: p-mentano, 1,4- Cineol, 1,8-Cineol, Ascaridol.

Monoterpenoidesbicíclicos: carano, cis-carano y trans-carano.

Sesquiterpenos: Farnesol, nerolidol.

Están formados principalmente por terpenoides volátiles formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etc (Pengelly, 1996).



**Figura 1.** Compuesto terpenoide

**Autor:** Pengelly, 1996

#### 1.1.4.2. Clasificación de componentes

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 comercialmente por sus propiedades

Los terpenos derivan, de unidades de isopreno (C5) unidas en cadena. 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.

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, thuyona)
- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- Éteres (1,8 - cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno)(Brewster R.Q, 1970).

#### **1.1.4.3. Usos y aplicaciones.**

De los más de tres mil aceites esenciales analizados, se ha encontrado que más de doscientos tienen un alto valor comercial 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 (Stashenko, 1998).

Los aceites esenciales son usados ampliamente en la aromaterapia y como agentes medicinales naturales. Los aceites esenciales poseen diversos beneficios para la salud, y han sido investigados cada vez más por la comunidad científica para el

tratamiento de distintas enfermedades, algunos ejemplos son el asma, el cáncer, el SIDA, entre otras enfermedades. La mayoría de los aceites esenciales poseen propiedades antibióticas. Para obtener un frasco de aceite esencial es necesaria una gran cantidad de plantas. En general, los aceites esenciales no deben ingerirse (Bruneton, 2001).

#### **1.1.5. Actividad Biológica**

Las propiedades antisépticas, desinfectes y antihelmínticas de los aceites esenciales se han aprovechado desde hace tiempo y especialmente en casos de infecciones bronquiales, urinarias y causadas por cortadas por cortes y quemaduras, varios monoterpenos muestran actividad antiséptica significativa (Deanna, 2002).

#### **1.1.6. Bacterias.**

Dado que el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente, su actividad antimicrobiana puede ser evaluada como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99,9% de la población del microorganismo (propiedades bactericida y fungicida). Además la actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser evaluada por el control de inhibición de la esporulación y producción de toxinas (Irene Maxine Pepperberg, 2008).

En ese sentido, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que debe atacar (Kalemba y kunickad 2003; López-Malo 2005, Solorzano Santos y Miranda-novales 2011).

El modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter se debe a que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares que lo llevan a desnaturalizar las proteínas y destruir la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas de citoplasma, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo, respecto a sus componentes, ellos también pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Ortuño, 2006).

Delaquis 2002 y Holley y Patey 2005 mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. En el mismo sentido en una investigación realizada por Fisher y Philips(2008), ellos reportan que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que conduce a un colapso de potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP. Por otra parte la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que sugeriría que los aceites esenciales no solo puedan estar actuando en la pared celular, sino a demás pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos. Del mismo modo, Fisher y Philips (2008) refieren que el mentol tiene un efecto “antiplasmid” (secuencia extracromosómica de ADN que no puede ser compartida entre los patógenos) lo que hace interrumpir la eficiencia de la célula (Kant, 2010).

Por otro lado las bacterias Gram Negativas se han observado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales a diferencia de las Gram Positivas que aunque aún no se sabe exactamente la razón por la cual se da este hecho, Smith-Palmer (1998). Kalemba y Kunicka(2003) y Fisher y Philips (2008) reportan que la susceptibilidad de las bacterias Gram Negativas puede estar relacionada con la membrana externa que poseen este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana la hacen impermeable. Sin embargo Fisher y Philips (2008) mencionan que solo hay un retardo del efecto por lo que sugieren que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias, se requeriría de un mayor periodo de tiempo de exposición a los aceites esenciales en los sistemas modelo. No obstante esta sensibilidad de los diferentes tipos de bacterias solo se han observado al utilizar aceites esenciales en forma in vitro, pero no en alimentos. La acción de los aceites esenciales se relaciona a la ruptura de la pared celular e inhibición de la enzima bacteriana, conjuntamente se describe a *Staphylococcus aureus*, perteneciente al género *staphilococcus* se ha incluido tradicionalmente en la familia *Micrococaceae* junto a los generos *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*, de escasa importancia clínica (Ortuño, 2006).

Sin embargo, estudios recientes de genética han demostrado que los *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados y, tentativamente, el género *Staphylococcus* se ha incluido junto con los géneros *Gemella*, *Micrococcus* y *Salinicoccus* en la familia *Staphylococceae*, dentro del orden Bacillales, con los que comparte mayor similitud genética. El género *staplylococcus* incluye actualmente 42 especies diferentes. Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de piel y mucosa en

humanos y otras se encuentran sólo entre la flora de animales mamíferos y aves. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza, entre las especies que suelen colonizar al ser humano, las de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus epidermidis*, *saprophyticus* y *aureus*, siendo esta última, la más importante dentro de todo el género en patología infecciosa (infecciones producidas por *Staphylococcus*) (A, 2009).

### 1.1.7. Hongos

Los aceites esenciales también presentan actividad antifúngica descrita tanto para hongos unicelulares como para los filamentosos (Oliva).

### 1.1.8. *Trichophyton rubrum*

Los estudios epidemiológicos relativos a infecciones por dermatofitos se han realizado en muchos países y las diferencias en la incidencia y los agentes etiológicos han sido reportados en diferentes lugares geográficos. En los últimos años se ha visto a nivel mundial un incremento en la frecuencia de casos de dermatofitosis conocidas como “tineas” o “tiñas”, de todas las especies de dermatofitos, las cosmopolitas *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* y en especial, *Trichophyton rubrum* son las responsables de la mayoría de las dermatofitosis. *T. rubrum* es un hongo aislado con frecuencia como agente causal de dermatofitosis, así mismo es importante mencionar que otro agente etiológico causante de micosis superficial, *T. mentagrophytes* (Angulo, 2008).

### 1.1.9. Actividad Antioxidante

**Antioxidantes:** Sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir o retardar, en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y procesos que llevan a enranciamientos naturales provocados por la acción del aire, luz o indicios metálicos.

## 1.2. Plantas medicinales

Las plantas medicinales son aquellas que elaboran sus propios productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo (Yovel, Franz, Stilz, & Schnitzler,

2008). Su utilidad primordial a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes (Muñoz, 1996).

### **1.2.1. Flora Ecuatoriana**

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido a que el conocimiento médico ancestral es inmenso (Avila-Flores & Medellín, 2004). Se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en el Ecuador, las familias que tuvieron un mayor número de especies fueron Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae (Del la torre, 2008).

Entre las familias con mayor número de especies productoras de sustancias aromáticas tenemos la Asteraceae o Compositae la que está constituida por hierbas, arbustos, árboles (Freire, 2004).

Dentro del Ecuador encontramos diferentes regiones son:

- Región occidental o costa
- Región interandina o callejón interandino
- Región oriental o amazónica
- Región insular o Archipiélago de Galápagos

Dentro de estas regiones naturales existen diferentes sistemas ecológicos y formaciones vegetales propias. Cabe mencionar como ecosistemas claramente diferenciados en manglares de la costa, la selva tropical húmeda del noroccidente, las áreas desérticas de la península de Santa Elena, las sabanas de la cuenca del Guayas, los bosques subandinos y andinos, los valles interandinos de clima templado, los páramos andinos y las cúspides nevadas. Por sus características únicas y específicas se destaca la Hylea amazónica y el Ecuador insular o Galápagos (Bat Conservation International, 2008).

La flora ecuatoriana es muy rica y variada debido a la diversidad de los medios ecológicos. En Ecuador existen alrededor de 22.000 especies vegetales diferentes. La presencia de los andes como factor altitudinal, ha dado al territorio ecuatoriano una fisonomía muy variada. Desde el nivel del mar hasta las crestas andinas existen varias

fajas o pisos altitudinales con climas y formas de vida diferentes; así mismo en las quebradas profundas que nacen en las cordilleras y que se extienden hacia el oriente y hacia el occidente se descubren condiciones vegetativas únicas. Es por eso que a pesar de estar situado en plena zona ecuatorial, nuestro país no es completamente tropical o tórrido sino que presenta la más amplia variedad de climas según la localización orográfica o topográfica (Maldonado, 2004).

El decrecimiento térmico en el Ecuador está calculado en un grado por cada 200 metros de altura. Entre un piso vegetativo y otro el cambio es gradual, no existe una línea demarcatoria definida que nos indique donde termina o donde comienza una determinada faja o piso altitudinal (Flores, 1997).

Es difícil establecer una correlación precisa entre la altitud y la temperatura, pero se puede hacer una división altitudinal tomando en cuenta otros factores, especialmente la distribución de la flora ya que corresponde a las condiciones de temperatura y suelo. Por las condiciones geográficas y geomorfológicas, el territorio ecuatoriano está bajo la influencia de las dos estaciones como invierno y verano. El invierno corresponde a la época de lluvias y el verano a la época seca (Palzelt, 1996).

### **1.3. El género *Piper***

El género *Piper* comprende más de 1.200 especies, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 300 especies), (Pinto et al., 2010) donde tiene especial importancia económica y comercial *Pipernigrum* L. (pimienta negra) y *Piperbette* L. Los patrones de distribución de las especies de *Piper* varía desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica. Existen numerosas especies que se encuentran restringidas a centros específicos de diversidad, como por ejemplo los Andes o Centro América, mientras que otras pueden encontrarse a través del Neotrópico o Paleotrópico (Tinoc, Metabolitos secundarios).

#### **1.3.1. *Piper lanceifolium***

## Taxonomía

Kingdom: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Piperales

Family: Piperaceae

Genus: *Piper*

Species: *Piper lanceifolium*



**Figura 2.** planta *Piper lanceifolium*

**Fuente:** Palacio, 2014

### 1.3.2. Propiedades curativas.

Según la literatura y algunos testimonios de personas, la hoja de la *Piper lanceifolium* se emplea en padecimientos como inflamación, infección de la matriz, para después del parto (para ayudar a la recién parida), como galactógeno y para acelerar el parto; dolor de estómago o espasmo, falta de apetito y estreñimiento. Su uso también se indica en enfermedades como asma, laringitis, reumatismo, en llagas, riñones, para la vista, purificar la sangre, en mordeduras de víbora, inflamaciones, dolores musculares, cólicos, para dar baños a los recién nacidos, para el pujo, contra las lombrices intestinales, el susto y para quemaduras (Flores, 1997).

Puede ser utilizada en tintura (por ejemplo para afecciones gastrointestinales o para todo tipo de dolor) o en emplastos (para inflamación o quemaduras en alguna parte del cuerpo). La tintura es una preparación en la cual se mezcla alcohol, agua y una porción de la planta; se prepara en un frasco de vidrio de preferencia color ámbar, en

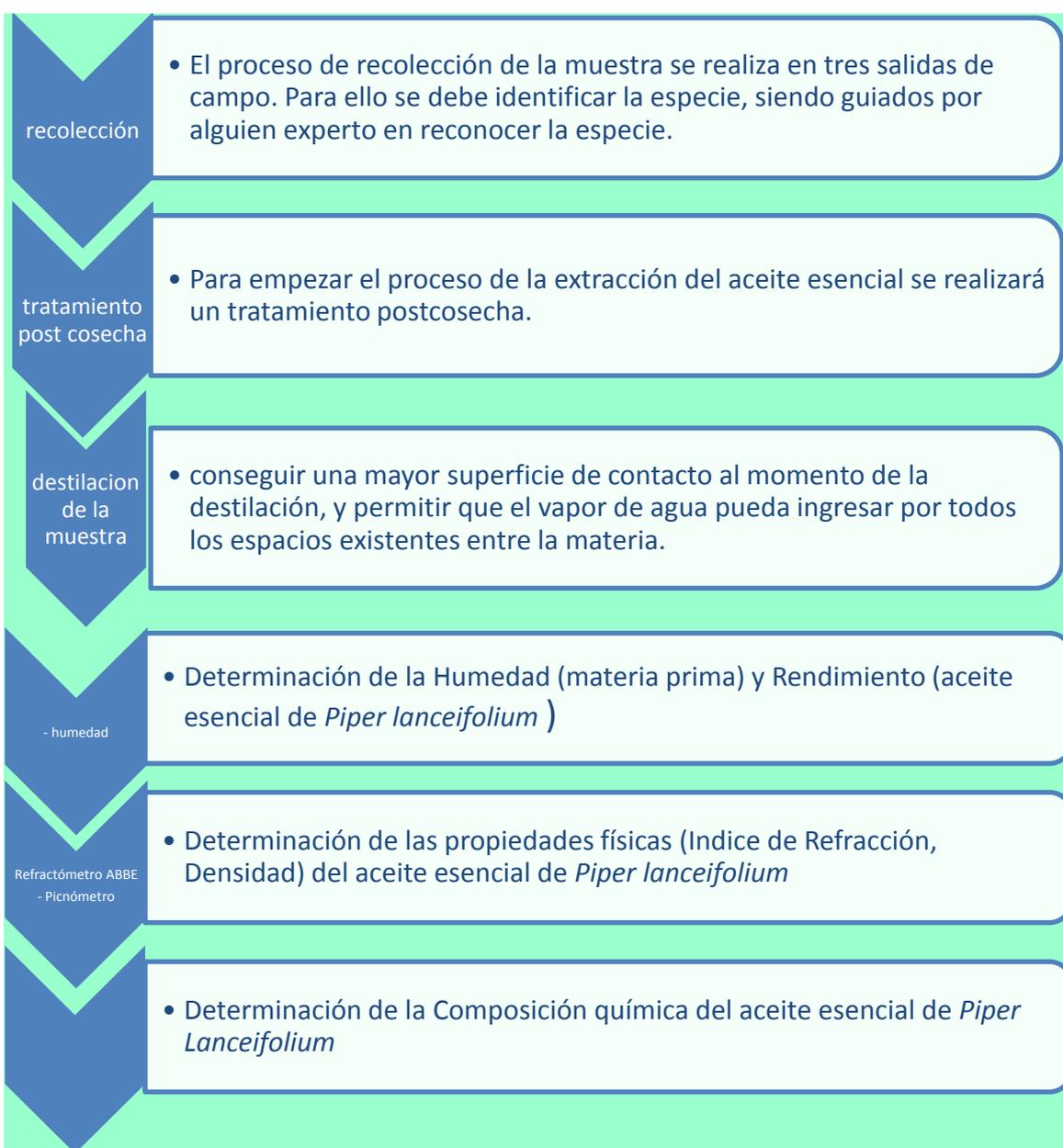
un litro de una mezcla formada por tres cuartas partes de alcohol y una cuarta parte de agua se colocan 600 gramos de hierba fresca y triturada (en este caso de hoja santa). El frasco se etiqueta con nombre y fecha de elaboración y se deja reposar durante dos semanas. Pasado el tiempo, se cuele y se deposita en otro frasco. Cabe mencionar que el alcohol que se debe utilizar debe ser de caña y evitar el alcohol etílico desnaturalizado, por ser muy tóxico. Normalmente la dosis es de 20 gotas diluidas en 1/4 de vaso de agua (Maldonado, 2004).

También puede ser utilizada en emplastos para dolores musculares o quemaduras. Un emplasto es una preparación en la cual, las hojas deben calentarse durante unos 3 minutos. Después se exprimen para poder eliminar el exceso de agua. Se aplican calientes sobre la zona afectada, cubriéndolas con una gasa o un lienzo para que puedan sostenerse durante determinado tiempo (Maldonado, 2004).

## **CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 2.1. Metodología

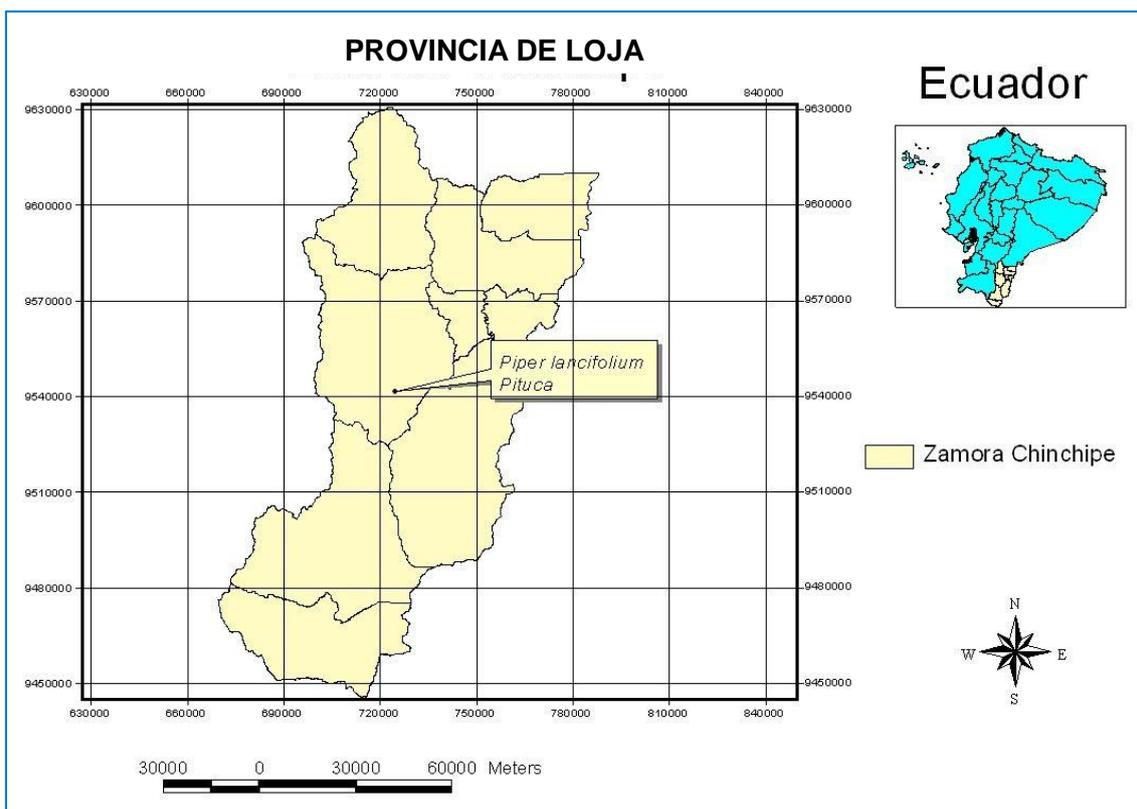
La presente investigación se desarrolla bajo la siguiente metodología de trabajo descrita a continuación, en la cual se explicara con gran claridad los diferentes procedimientos realizados para obtener los resultados esperados.



**Figura 3.** Metodología utilizada para la investigación  
**Fuente:** Palacio, 2014

### 2.1.1. Recolección del material vegetal.

Para la recolección del material vegetal se inspecciono las diferentes provincias del Ecuador con la respectiva variedad de climas priorizando a las zonas cálidas y también húmedas ya que este es el clima que facilita el desarrollo de *Piper lanceifolium*



**Figura 4.** Mapa de la provincia de Zamora Chinchipe donde está la muestra de *Piper lanceifolium*

**Fuente:** Palacio, 2014

### 2.1.2. Determinación de la humedad de la planta.

Primeramente procedemos a pesar la cantidad de muestra correctamente seleccionada, luego la dejamos ser procesada en el equipo durante 45 min, luego la pesamos de nuevo y observamos la variación del peso debido a la deshidratación de la materia vegetal, luego la colocamos nuevamente durante 15 min y nuevamente la pesamos, así lo hacemos hasta notar que no exista variación en el peso de la muestra en el caso de la materia de *piper lanceifolium* lo realizados por un periodo de 45 minutos divididos en 3 periodos de 15 min (ver Anexo I).

### 2.1.3. Extracción del aceite esencial.

El aceite esencial de *Piper lanceifolium* fue extraído de las partes aéreas de la materia vegetal que se encontraban en su estado fresco por el método de destilación por arrastre con vapor durante 3 horas. El tiempo de destilación señalado además del estado en el que se destiló el material fueron determinados basándose en ensayos preliminares.

La extracción del aceite esencial se efectuó en un destilador que consta de un tanque de acero inoxidable en el que se colocó aproximadamente 18 litros de agua incluyendo el material vegetal troceado sobre una placa perforada. Al tapar el tanque de extracción se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante, conjuntamente el sello de agua en los bordes del destilador; el recipiente se expuso a una fuente de calor de tal forma que el vapor de agua generado, circule a través de la materia vegetal y al salir del cuello de cisne se enfríe en el condensador en donde su estado cambia al líquido que posteriormente es recibido en un florentino en el cual se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades.



**Figura 5.** Destilador.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos,2014

Se destilaron nueve muestras, cada muestra previamente se pesó y se separó aproximadamente 2,5 kg de la materia vegetal en cada destilación .Se determinó la

humedad de cada una de las muestras obteniendo una pequeña cantidad de estas; el porcentaje de humedad relativa de cada destilación y de cada recolección fue promediada respectivamente.

La determinación del rendimiento.- (ver anexo 2) se determinó para cada destilación de modo que se reportó el promedio del porcentaje de rendimiento por cada recolección.

#### **2.1.4. Determinación de las propiedades físicas**

Dentro de las propiedades a determinar esta:

#### **2.1.5. Densidad**

La determinación de la densidad relativa de los aceites esenciales se desarrolló a la temperatura de 20 °C empleando la norma AFNOR NF T 75-111 (ver anexo 3), para ello se utilizó como principales materiales: un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un baño termostático. La densidad se obtuvo de la mezcla de los aceites de las tres destilaciones realizadas por cada recolección, para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### **2.1.6. Índice de refracción**

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 temperatura de referencia es de 20 °C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura (Norma AFNOR NF T 75-112)

El índice de refracción de los aceites esenciales se determinó según la norma AFNOR NF T 75-112 (ver anexo 4), empleando un refractómetro ABBE.



**Figura 6.** Refractómetro ABBE

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos, 2014

Los valores del índice de refracción que se han obtenido por cada recolección son resultado del promedio de los valores calculados de los aceites de las tres destilaciones realizadas en cada recolección, calculando finalmente el promedio general, la desviación estándar y coeficiente de variación

## **2.2. Determinación de la composición química del aceite esencial**

### **2.2.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases (EM) es una de las técnicas cromatografías, existentes para analizar compuestos que tienen un nivel suficiente de volatilidad. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama (FID) con la finalidad de conseguir el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.

### **2.2.2. Preparación de la muestra**

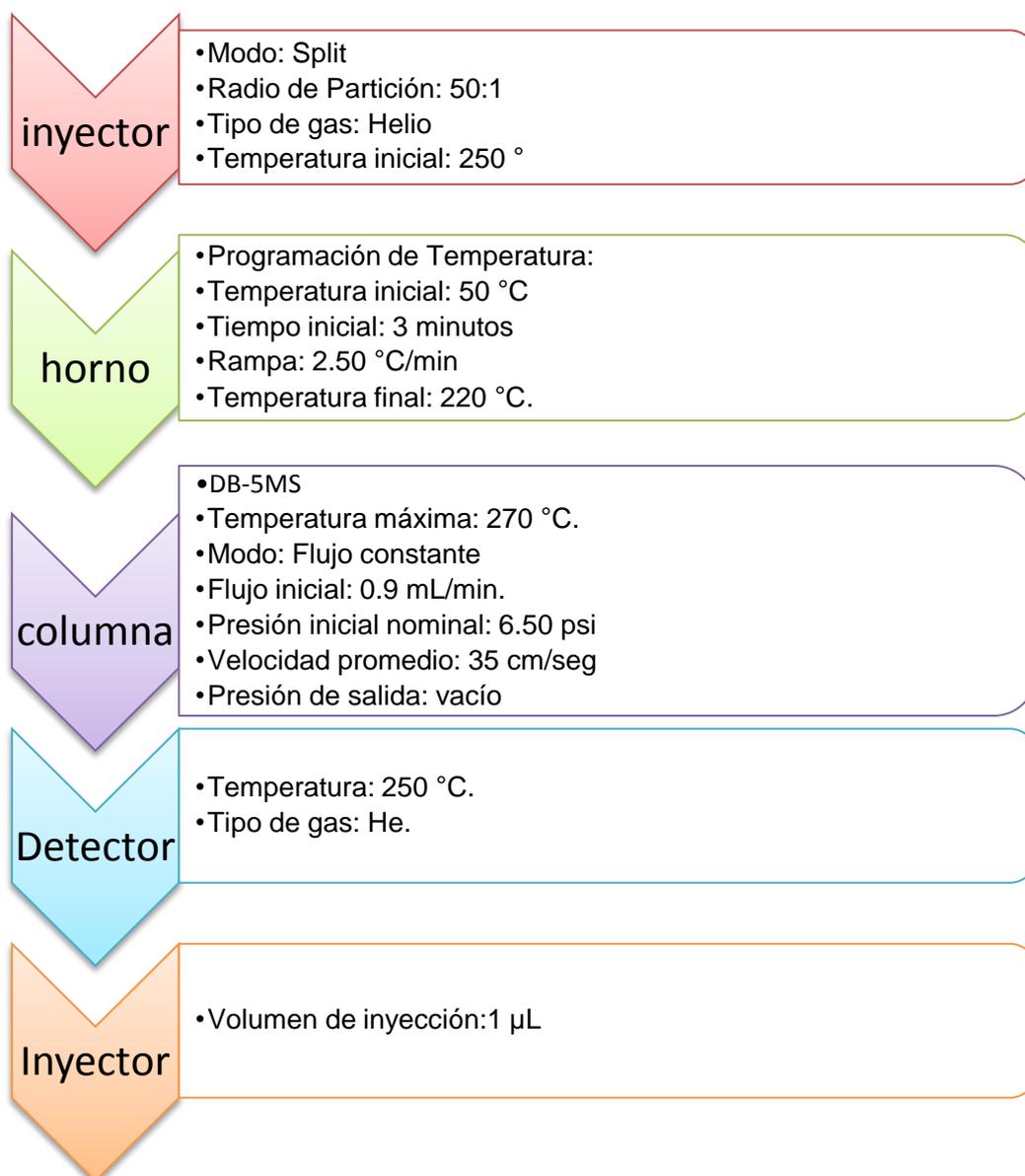
Cada muestra de análisis se preparó en un vial de cromatografía, colocó 990  $\mu\text{L}$  de diclorometano y 10  $\mu\text{L}$  del aceite, para obtener una disolución de aceite esencial al 1% . Antes de inyectar las muestras se lavó la jeringa con diclorometano con la finalidad de purificarla de residuos de la muestra anterior.



**Figura 7.** Cromatógrafo  
**Fuente:** Palacio, 2014

### 2.2.3. Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas

Se cromatografiaron una mezcla de hidrocarburos de C<sub>10</sub> (decano) a C<sub>25</sub> (pentacosano), conocidos en el mercado como TPH-6RPM de CHEM SERVICE empleando para esta finalidad diferentes condiciones operacionales que serán descritas a continuación



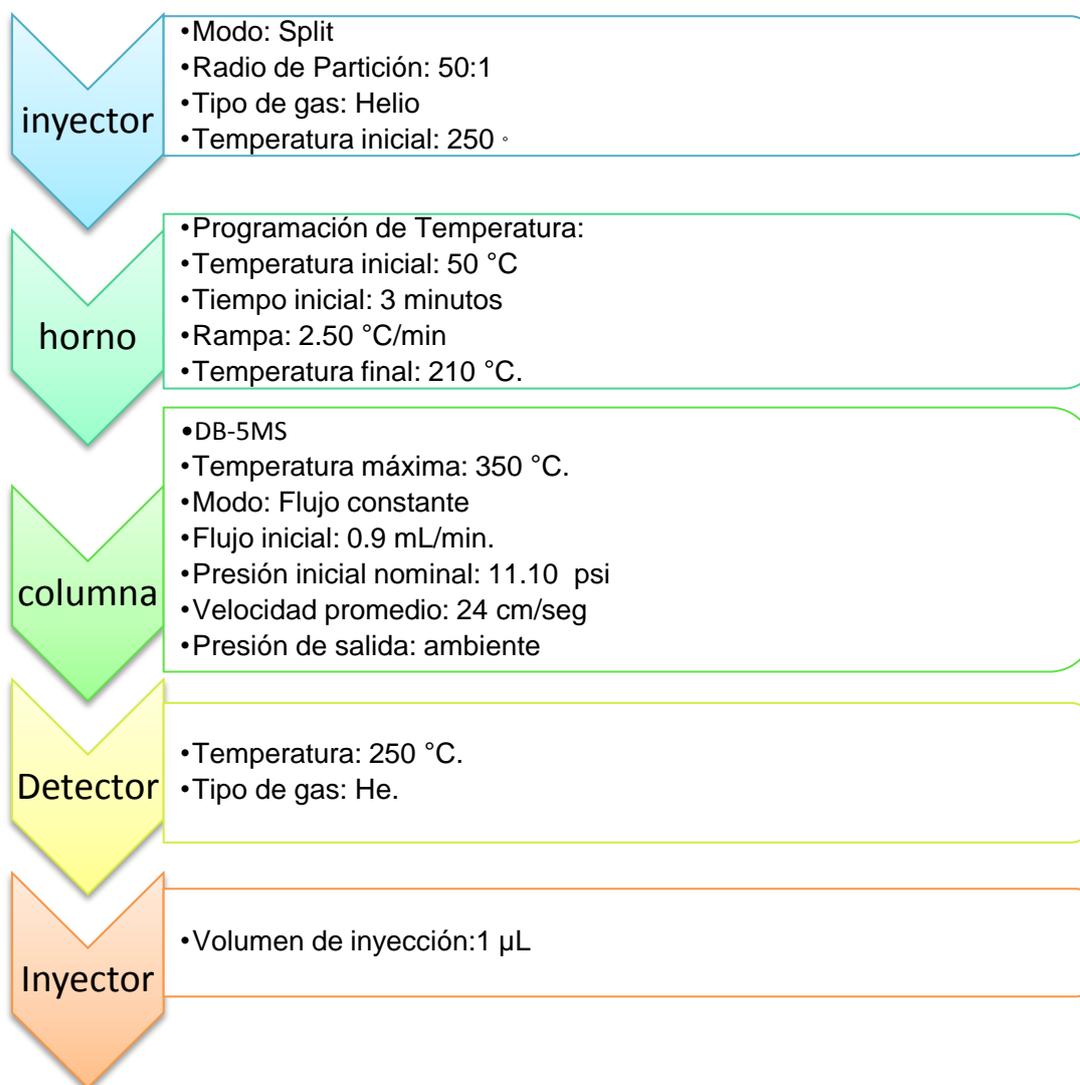
**Figura 8.** Detalle de corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas

**Fuente:** El Autor

Se inyectó las nueve muestras de aceite esencial con los mismos parámetros

operacionales que se inyectaron los hidrocarburos.

#### 2.2.4. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a masas



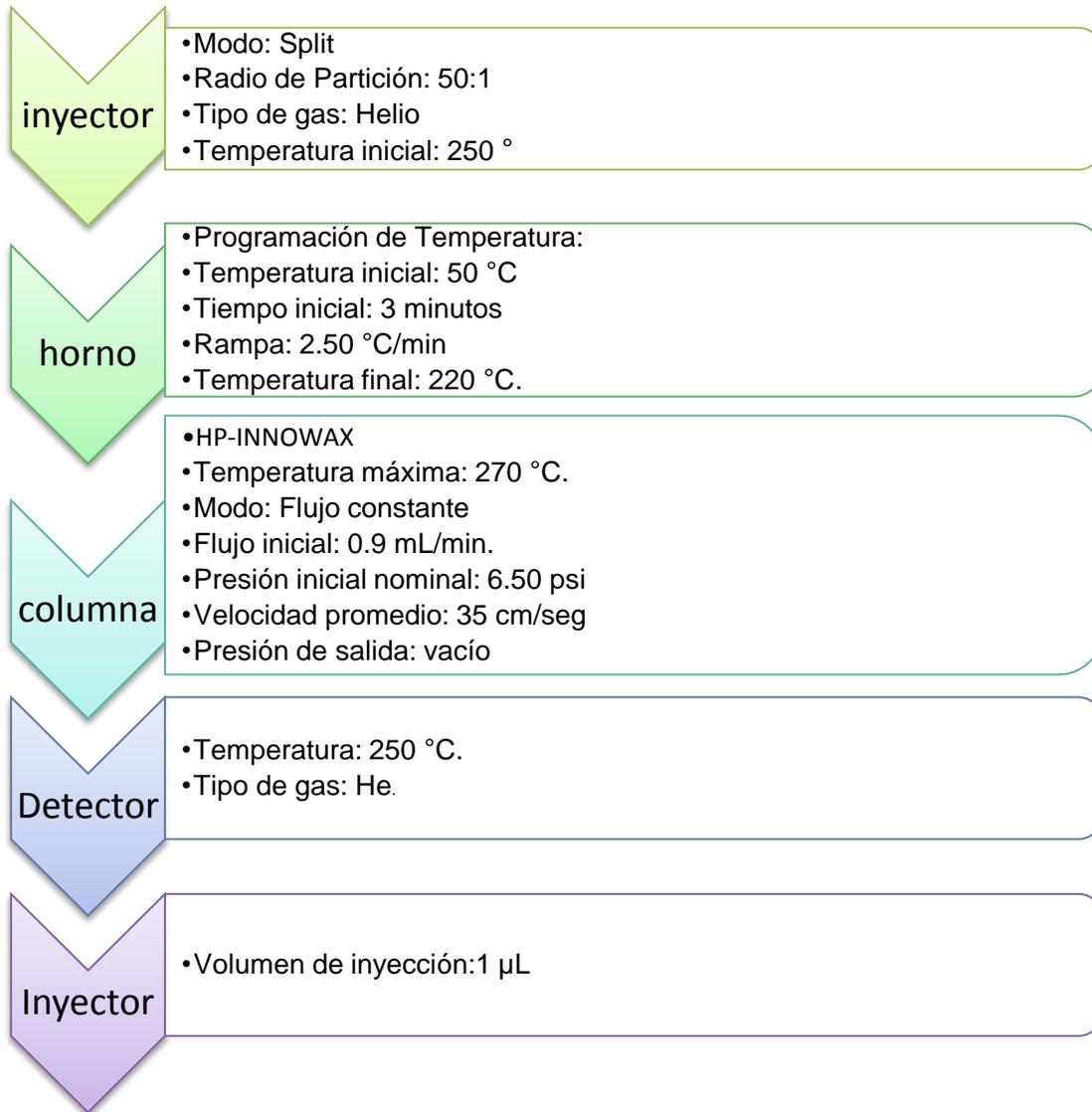
**Figura 9.** Detalle de corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas

**Fuente:** Palacio, 2014

Las condiciones operacionales con las cuales se inyectó la mezcla de hidrocarburos en esta corrida se exponen a continuación. Junto con los hidrocarburos se cromatografía las nueve muestras de aceite esencial, empleando los parámetros descritos posteriormente.

### 2.2.5. Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama.

En esta corrida cromatográfica se inyectó hidrocarburos y tres muestras del aceite de *Piper lanceifolium* cada una de las muestras correspondió a la mezcla de los aceites obtenidos por cada recolección. Las condiciones operacionales bajo las cuales se inyectaron los hidrocarburos y las muestras en este gráfico

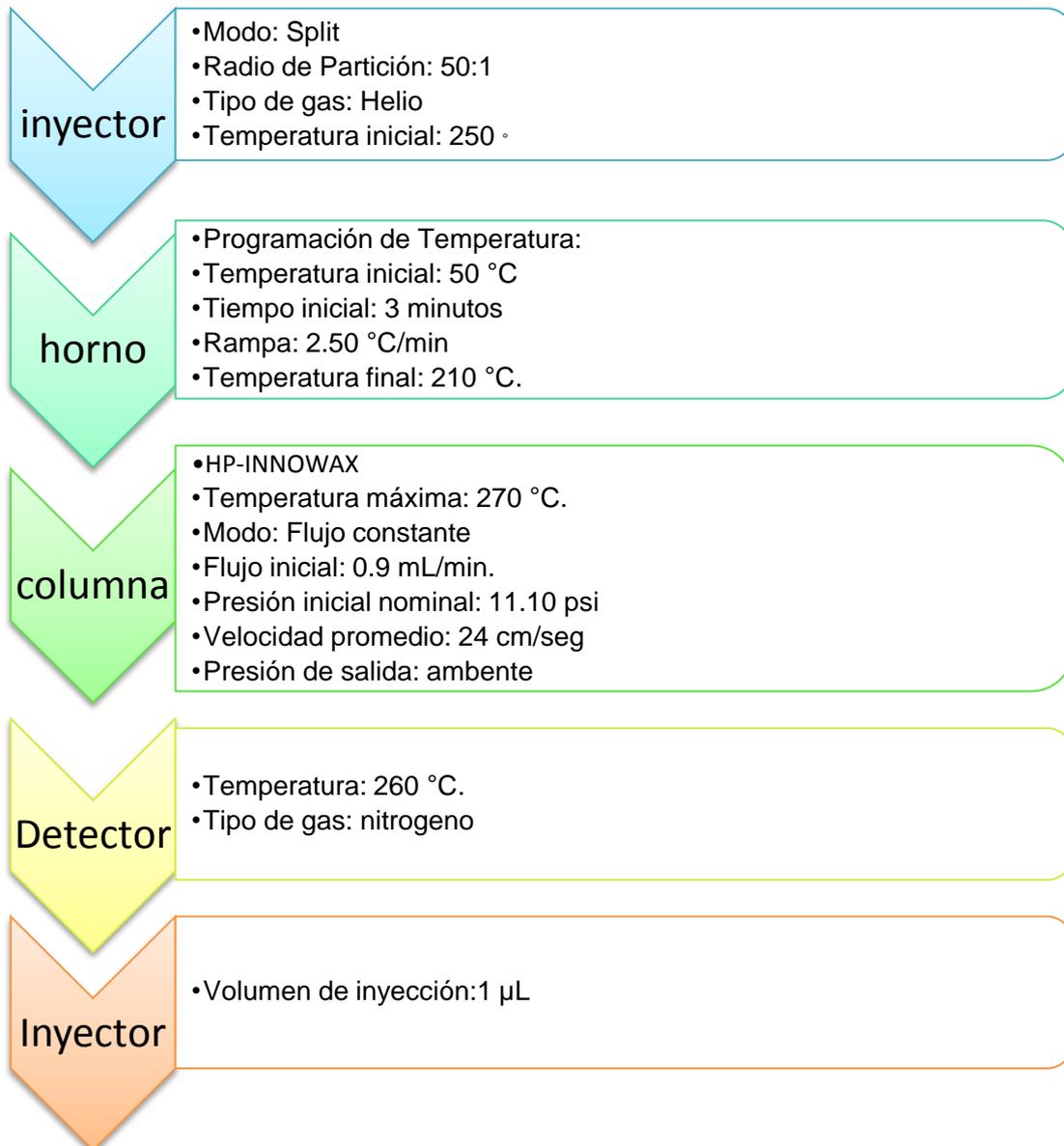


**Figura 10.** Detalle de Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama.

**Fuente:** Palacio, 2014

### 2.2.6. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama.

En la corrida cromatográfica se inyectaron los hidrocarburos y las nueve muestras de aceite esencial de *Piper lanceifolium* . A continuación se indican los parámetros operacionales.



**Figura 11.** Detalle de corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama

**Fuente:** Palacio, 2014

### **2.3. Determinación de la actividad biológica.**

#### **2.3.1. Cepas bacterianas y fúngicas**

En la prueba antibacteriana se emplearon 7 cepas bacterianas ATCC (American Type Culture Collection): 2 Gram Positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y 5 Gram Negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2.

En la prueba antifúngica se utilizaron 2 cepas de hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

#### **2.3.2. Actividad antibacteriana**

Para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper lanceifolium* se determinó la C.M.I. (Concentración Mínima Inhibitoria) utilizando el método de microdilución en caldo.

#### **2.3.3. Preparación de la muestra**

Se preparó una solución de aceite, para lo cual se tomó 980  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido) y 20  $\mu\text{L}$  del aceite esencial.

#### **2.3.4. Preparación del cultivo microbiano “cultivo overnight”.**

Para la siembra se transfirió 30  $\mu\text{L}$  de cada cepa bacteriana, almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una reserva criogénica, a caldos de cultivo específicos para el desarrollo de cada bacteria de acuerdo a las condiciones detalladas a continuación.

**Tabla 1.** Condiciones de crecimiento de las bacterias utilizadas.

BACTERIAS	MEDIO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Enterococcusfaecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro- Corazón	37 °C por 14-16 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Escherichiacoli</i>	Caldo Tripticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Proteusvulgaris</i>	Caldo MuellerHinton	37 °C por 14-16 h
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 h

**Fuente:** American Type Culture Collection, 2007

### 2.3.5. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano

Del cultivo microbiano (overnight) incubado durante la noche, se transfirió 150-300 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; para llevar a cabo adecuadamente este paso, se comparó visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0,5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste.

De la suspensión en solución salina se tomó 140 µL y se inoculó en 6,86 mL de Caldo MuellerHinton, ajustando a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. De la suspensión resultante 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  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### Procedimiento

La prueba se realizó en microplacas con 96 pocillos, utilizando el procedimiento de dilución doble seriada: se transfirió 180 µL de caldo MuellerHinton a cada pocillo de la primera fila, seguido se colocó 100 µL a los pocillos restantes, posteriormente se transfirió 20 µL de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto los últimos pocillos, los cuales se emplearon como control positivo (180 µL caldo + 20 µL de Gentamicina de 1 mg/mL para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcusfaecalis* para la cual se empleó Ampicilina de 8 mg/mL) y negativo (180

$\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  DMSO), de manera que para cada aceite evaluado se sembró por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  aceite diluido).

Se mezcló el medio con el aceite y se procedió a realizar diluciones seriadas; se pipeteó de 15 a 20 veces la solución del primer pocillo del cual luego se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se diluyó con 100  $\mu\text{L}$  del pocillo siguiente, se repitió este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas, así la concentración final de la solución de aceite fue de 1000 a 7,81  $\mu\text{g/ml}$ . El mismo procedimiento fue aplicado para los controles: positivo, negativo y de esterilidad.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos excepto en los controles de esterilidad; completando así un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37 °C de 18-24 h.

### **2.3.6. Actividad Antifúngica**

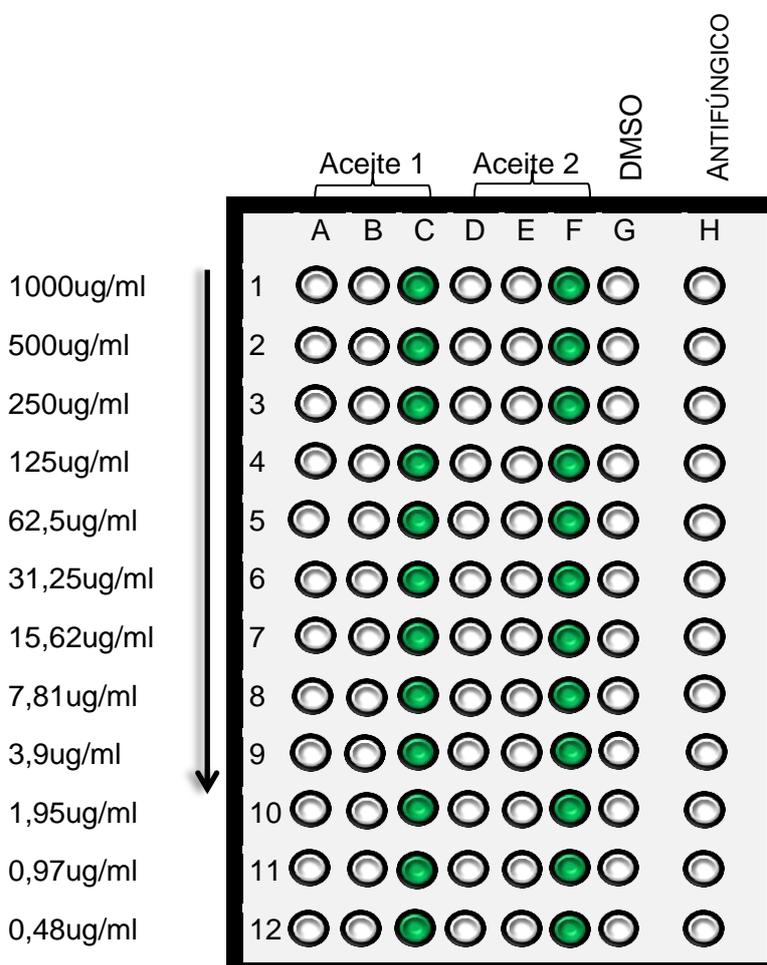
Al igual que lo descrito para las pruebas bacterianas en el numeral 3.4.2.1.1, se preparo una solución de aceite diluido, con 980  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido) y 20  $\mu\text{L}$  del aceite esencial

### **2.3.7. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.**

De los hongos esporulados empleados en la prueba: *Trichophytonmentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophytonrubrum* ATCC 28188, almacenados en una reserva criogénica a -80°C, se tomó 49  $\mu\text{L}$  y 68  $\mu\text{L}$  respectivamente, cada volumen se transfirió a tubos que contenían 7 mL de caldo de Sabouraud, esto hasta ajustar la población a  $1 \times 10^5$

### 2.3.8. Procedimiento

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada ocupado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo, en hongos esporulados es  $5 \times 10^4$  esporas/ml; la concentración final de aceite va de 1000 a 0,48  $\mu\text{g/ml}$ , las diluciones se realizan hasta obtener 12 diluciones consecutivas y al final se colocaron los 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del inóculo fúngico. Cada aceite evaluado se siembra por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  aceite diluido), existe un control positivo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  de Itraconazol de 1 mg/ml), un control negativo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  DMSO) (figura 14). Se incuban las placas a 28 °C y se monitorea el desarrollo hasta las 96 horas



**Figura 12.** Modelo de Microplaca TC96 para hongos con las concentraciones del aceite( $\mu\text{g/mL}$ ).

**Fuente** Palacio, 2014

### 2.3.9. Lectura de las placas de C.M.I e interpretación de resultados

Una vez retiradas las placas de C.M.I., de la incubadora, se examinó el control de esterilidad utilizando luz reflejada y luz transmitida ya que a veces la contaminación suele ser casi imperceptible, en caso de que la placa de control de pureza se muestre contaminada, la prueba de C.M.I. no puede ser interpretada y debe repetírsela.

Se debe revisar el desarrollo en la celdilla de control positivo el cual se presentara como turbidez o un punto de crecimiento > 2 mm lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de C.M.I. Luego se debe revisar el pozo de control negativo el mismo que debe ser claro y sin turbidez. Se lee el punto final C.M.I. como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.

## **2.4. Determinación de la actividad antioxidante**

Para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper lanceifolium* , se utilizaron dos métodos espectrofotométricos:

El método TEAC (TroloxEquivalentAntioxidantCapacity ) o también llamado ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3- etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>), el cual está basado en la captación de los antioxidantes por el radical catión ABTS<sup>+</sup>, generado en el medio de reacción, usando como patrón el ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trólox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Este radical catión ABTS<sup>+</sup> posee una coloración verde-azulada con un promedio de absorción entre 415nm y 820nm. (Granados Conde et al. 2012)

El segundo método se basa en la reducción del radical DPPH'(2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del AE. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trólox. (Granados Conde et al. 2012). Previamente se prepararon 5 mL de solución a diferentes concentraciones, desde 5 a 200ppm del aceite esencial.

### **2.4.1. Método ABTS**

#### **2.4.1.1. Solución ABTS**

Se pesó 0,1015g de ABTS y 0,01757g de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ), cada sustancia se colocó en balones de aforo de 25 ml y se aforaron con agua destilada respectivamente, luego se mezcló los reactivos y se dejó reaccionar por 12 horas (proteger de la luz), a esta solución se le llama solución patrón.

Para preparar la solución de trabajo se toma 2,5mL de la solución patrón y 150 ml de Metanol a esta mezcla se le mide la absorbancia a 734nm ajustando hasta obtener una lectura de  $1,1 \pm 0,02$

#### **2.4.1.2. Lectura de muestras ABTS**

A partir de la solución concentrada de 200 ppm se preparó soluciones diluidas a diferentes concentraciones entre 100, 50, 25, 12.5, 5 y 0 ppm. De cada una de las soluciones preparadas se tomó 150 $\mu$ L del aceite diluido y se colocó en tubos de ensayo donde se le adicionó 2850 $\mu$ L de la solución de trabajo ABTS, se dejó reposar por dos horas en obscuridad y se midió la absorbancia a 734nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **2.4.1.3. Curva estándar Trólox para ABTS**

Se pesa 0.025g de Trólox, se coloca en un balón de aforo de 100mL y se afora con metanol, de esta solución se toma alícuotas de 0.25, 1.5, 3, 4.5, 6 y 8mL y se adiciona metanol hasta completar 10mL.

Luego para la reacción se tomó 150 $\mu$ L de cada alícuota y 2850 $\mu$ L de la solución de trabajo, se dejó 2 horas en oscuridad y luego se procedió a leer la absorbancia a 734nm. Se realizó por triplicado.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente ecuación.

$$\%Inh = \left[ 1 - \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{referencia}} \right] \times 100 \quad (1)$$

### **2.4.2. Método DPPH**

#### **2.4.2.1. Solución de DPPH**

Se pesó 0.024g de DPPH y colocó en un balón de aforo de 100mL y se aforó con metanol , a esta solución se le llama solución patrón, de la cual, se tomó 25 ml y se adicionó 107mL de MeOH para formar la solución de trabajo, a la cual se le midió la absorbancia a 515nm ajustando hasta obtener una lectura de  $1,1 \pm 0,02$ .

#### **2.4.2.2. Lectura de muestras DPPH**

A partir de la solución concentrada de 200 ppm se prepara soluciones diluidas a diferentes concentraciones entre 100, 50, 25, 12,5, 5 y 0 ppm. De cada una de las soluciones preparadas se tomó 150 $\mu$ L del aceite diluido y se llevó a tubos de ensayo donde se le adicionó 2850 $\mu$ L de la solución de trabajo DPPH, se dejó reposar por 24 horas en obscuridad y se midió la absorbancia a 515nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (%Inh), con la ecuación (1).

#### **2.4.2.3. Curva estándar Trólox para DPPH**

Se pesa 0.025g de Trólox, se coloca en un balón de aforo de 100mL y se afora con metanol (MeOH), de esta solución se toma alícuotas de 0,25, 1,5, 3, 4,5, 6 y 8mL y se adiciona metanol hasta completar 10mL.

Luego para la reacción se tomó 150 $\mu$ L de cada alícuota y 2850 $\mu$ L de la solución de trabajo, se dejó 24 horas en oscuridad y luego se procedió a leer la absorbancia a 515nm. Se realizó por triplicado.

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de la muestra. El IC<sub>50</sub> de cada aceite se determinará realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. porcentaje de inhibición (% Inh), obteniendo así, una ecuación para la recta y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para ambos métodos (ABTS+ y DPPH) se usa como solución estándar Trólox, cuya capacidad antioxidante se evalúa en las mismas condiciones de trabajo de las muestras. Luego, los resultados de IC<sub>50</sub> de los aceites son expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trólox (TEAC:  $\mu$ mol de Trolox/g de AE).



**Figura 13.** Espectrofotómetro  
**Fuente:** Palacio, 2014

### **CAPÍTULO III RESULTADOS Y ANÁLISIS.**

### 3.1. Humedad

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se expone en la tabla 2. En dicha tabla se presenta el valor de la media de cada uno de los porcentajes de humedad del material vegetal por cada recolección con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 2.** Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

Recolección	Humedad relativa (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	C.V.
PLA 1	64,69		-	-
PLA 2	62,31	61,47	$\pm 2,71$	0.61
PLA 3	57,41		-	-

PLA: *Piper lanceifolium* 1 primera recolección ,2segunda recolección,3 tercera recolección  
 $\bar{X}$  : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,  
 $\sigma$  :Desviación estándar  
C.V.: Coeficiente de variación

**Fuente:** Palacio, 2014

Los porcentajes de humedad de la materia vegetal varían en las diferentes recolecciones. Es importante destacar que factores ambientales tales como la humedad atmosférica modifican la capacidad de las plantas para controlar la pérdida de agua, muestra de ello es la disminución de la transpiración al existir un aumento de la humedad atmosférica(Barceló, 2007), es decir cuando la atmosfera contiene más humedad se reduce la fuerza motriz para la transpiración; pero cuando existe una mayor humedad en la atmosfera se da una mayor fuerza motriz para producir la transpiración. Como se mencionó los cambios en el ambiente influyen en la humedad de las plantas considerando que los vientos fuertes, clima frío y lluvias esporádicas son característicos de zonas altas.

### 3.2. Rendimiento

El rendimiento del proceso de extracción del aceite esencial de *Piper lanceifolium* se detalla en la tabla 3, el porcentaje de rendimiento medio para cada recolección resulta de la media de las tres repeticiones. Se presenta un promedio general junto la desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 3.** Rendimiento en % (v/p) de la materia vegetal.

Recolección	Peso	volumen (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV
PLA1	6330	3,2		-	-
PLA 2	6900	3,7	0,052	$\pm 0,01$	0,21
PLA 3	6390	2,9		-	-

PLA 1: primera recolección,  $\bar{X}$ : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,  $\sigma$ : Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación

**Fuente:** : Palacio, 2014

De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto 6,93% se obtuvo a partir de 3 kg de materia vegetal con un volumen de 75,05 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 6,33% a

### 3.3. Propiedades físicas

Entre las características físicas determinadas para el aceite esencial de *Piper lanceifolium* tenemos su densidad e índice de refracción.

#### 3.3.1. Densidad relativa

La densidad reportada en la tabla 4 para los aceites de la primera, segunda y tercera recolección corresponde a la mezcla de los aceites obtenidos en las tres destilaciones por recolección.

**Tabla 4.** Densidad media del aceite esencial a 20°C.

Recolección	Densidad (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV
PLA1	1,0282		-	-
PLA 2	1,0269	1,0276	± 0.0010	0,0011
PLA 3	1,0285		-	-

PLA 1: primera recolección,  $\bar{X}$ : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,  $\sigma$ :Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación

**Fuente:** : Palacio, 2014

La densidad promedio del aceite esencial de *Piper lanceifolium* fue de 1,028. La mayoría de los aceites esenciales al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos tienen una densidad menor que la del agua (densidad menor que 1g/cm<sup>3</sup>), situación que se aplica al aceite analizado. La densidad es un parámetro fácil de obtener y permite distinguir un aceite esencial auténtico de esencias sintéticas comunes(Ortuño, 2006).

### 3.3.2. Índice de refracción

En la tabla 5., se expone el promedio general del índice de refracción que se calculó a partir del índice de refracción de las tres muestras de aceite obtenidas por cada recolección.

**Tabla 5.** Promedio de los Índices de Refracción de los aceite esenciales.

Repeticiones	ind. Refrac	°C	$\bar{X}$	$\sigma$	CV
PLA 1	1,5128	18,6		-	-
PLA 2	1,5128	18,6	1,5128	±0,0061	0.0022
PLA 3	1,5130	18,6		-	-

PLA 1: primera recolección,  $\bar{X}$ : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,  $\sigma$ :Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación

**Fuente:** Palacio, 2014

El promedio general de los índices de refracción de las muestras de aceite esencial fue 1,5128. Este parámetro es característico de cada aceite y que cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias

### 3.4. Composición Química

#### 3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo

La composición química del aceite esencial de *Piper lanceifolium* extraído por destilación por arrastre con vapor fue analizada por CG-MS y CG-FID, obteniéndose los respectivos cromatogramas para posteriormente ser identificados y cuantificados los componentes químicos presentes en el aceite esencial estudiado.

Se observan los perfiles cromatográficos del aceite esencial de *la Piper lanceifolium* obtenidos en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX mediante la técnica de CG-MS acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología. Cada pico cromatográfico representa un compuesto de área proporcional a su concentración. Los cromatogramas obtenidos presentan un sinnúmero de 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, se observan los picos integrados considerados para su identificación.

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 (C<sub>10</sub> a C<sub>25</sub>). 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 7n.1; (2003)), con un porcentaje de coincidencia mayor al 90%. Los criterios para la identificación de los componentes químicos expuestos brevemente se explican en el capítulo de materiales y métodos.

En la tabla 6, se detallan los compuestos químicos identificados del aceite esencial de *Piper lanceifolium* 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 (Bo1), segunda (Bo2) y tercera recolección (Bo3) así mismo 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. Los compuestos químicos identificados se han agrupado en monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados y en otros compuestos.

**Tabla 6.** (continuación) Composición química de *Piper lanceifolium*

DB-5MS								HP-INNOWAX					
% de Cantidad Relativa								% de Cantidad Relativa					
	COMPUESTOS	IK <sup>c</sup>	IK <sup>r</sup>	PLA1	PLA2	PLA3	$\bar{X}$	IK <sup>c</sup>	IK <sup>r</sup>	PLA1	PLA2	PLA3	$\bar{X}$
1	$\alpha$ - thujene	<b>928</b>	924	0,21		0,25	0,23						
2	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>933</b>	932	1,24	1,25	1,30	1,26	<b>1035</b>	1032	1,35	1,45	1,27	1,36
3	<b><math>\beta</math>-Pinene</b>	<b>973</b>	974	0,57	0,32	0,64	0,51	<b>1101</b>	1118	0,56	0,64	0,56	0,59
4	myrcene	<b>988</b>	988	0,65		0,56	0,60	<b>1158</b>	1174	0,91	0,74	0,19	0,61
5	phellandrene	<b>1003</b>	1002	0,69	0,68	0,77	0,71	<b>1160</b>	1176	0,45	0,68		0,56
6	alpha terpinene	<b>1013</b>	1014	1,32	1,41		1,37	<b>1173</b>	1180	2,09	1,14		1,62
7	p-Cymene	<b>1021</b>	1020		0,78	0,92	0,85	<b>1268</b>	1260		0,72	0,82	0,77
8	limonene	<b>1027</b>	1024	0,26	0,25	0,31	0,27	<b>1194</b>	1203	0,19		0,30	0,25
9	cineole<1,8a-epoxy>	<b>1029</b>	1026	0,42	0,52		0,47	1290	1281	0,39	0,45		0,42
10	Z $\beta$ ocimene	<b>1034</b>	1032	1,86	1,66	1,55	1,69	<b>1252</b>	1266	2,41	1,97	1,89	2,09
11	ocimene neo-allo	<b>1045</b>	1040	3,85	3,94	3,79	3,86	<b>1253</b>	1259	2,21	4,11	3,71	3,34
12	terpinene a	<b>1055</b>	1054	3,86	4,82	3,70	4,12	<b>1242</b>	1255	3,15	3,54	3,91	3,54
13	terpinolene	<b>1081</b>	1086	1,12	1,47	1,07	1,22	1265	1260	1,35	1,89	1,76	1,67
14	terpineol (cis b)	<b>1140</b>	1140	0,20		0,19	0,19	<b>1280</b>	1289	0,20		0,17	0,19
15	terpinene4oi	<b>1178</b>	1174	0,07			0,07	<b>1607</b>	1611	0,08			0,08
16	terpineol (a)	<b>1193</b>	1199	1,32	1,30	1,18	1,27	1680	1687	1,12	1,45	1,56	1,38

17	safrole	<b>1288</b>	1285	36,72	48,07	41,97	42,25	<b>1879</b>	1877	38,52	41,12	40,22	39,96
18	Cyclosativene	<b>1360</b>	1360	0,09		0,08	0,09						
19	$\alpha$ -Copaene	<b>1368</b>	1374	0,35	0,28	0,21	0,28	<b>1482</b>	1478	0,27	0,30	0,42	0,33
20	caryophyllene (z)	<b>1410</b>	1408	0,67	0,64	1,95	1,09	<b>1587</b>	1594	1,56	0,87	1,22	1,22
21	humelene alpha	<b>1446</b>	1452	1,29	1,56	1,45	1,44	<b>1659</b>	1668	1,38	1,19	0,14	0,90
22	amorphene trans	<b>1467</b>	1478	0,30	0,20	0,36	0,29	1671	1679	0,25	0,37		0,31
23	germacrene D	<b>1472</b>	1484	0,97	0,47	0,82	0,75	<b>1699</b>	1714	0,94		1,23	1,09
24	selinenene b	<b>1479</b>	1489			0,12	0,12	1705	1709			0,12	0,12
25	bicyclogermacrene	<b>1486</b>	1506	0,75	0,68		0,72	1730	1738	0,71	0,55		0,63
26	naphthalene (2methoxi	<b>1488</b>	1445		0,14		0,14	<b>1752</b>	1739		0,14		0,14
27	cadinene(y)	<b>1495</b>	1513	0,74	0,83		0,79	1765	1773	1,56	1,23		1,40
28	germacrene A	<b>1497</b>	1508	0,62	0,40	0,49	0,50	1790	1798	0,55	0,69	0,50	0,58
29	cadina-1,4diene	<b>1508</b>	1513	2,01	1,59		1,80	1815	1821	2,17	2,51		2,34
30	myristicin	<b>1517</b>	1517	1,14	1,10		1,12	1865	1880	1,24	1,21		1,23
31	caryophyllene oxide	<b>1571</b>	1582	0,81	0,49		0,65	1940	1949	0,82	0,46		0,64
32	viridiflorol	<b>1585</b>	1592	2,50	2,33		2,41	<b>2083</b>	2085	3,63	2,97		3,30
33	ledol	<b>1594</b>	1602		0,13	0,21	0,17	<b>2024</b>	2020		0,14	0,20	0,17
34	dill apoile	<b>1629</b>	1620		1,42	1,34	1,38	<b>2367</b>	2360		1,43	1,40	1,42
35	cadinol (epi-a-)	<b>1637</b>	1638	2,23	2,69	3,70	2,87	2202	2202,000	2,17	2,35	2,99	2,51

36	apiole	1671	1677	15,26	11,04	14,39	13,57	2493	2496	14,30	12,32	13,89	13,50
<b>*TOTAL:</b>							94,29	<b>*TOTAL</b>					89,27

**El orden de los compuestos es de acuerdo a la elución en la columna DB-5MS.**

**PLA1:** aceite de la primera recolección. **PLA2:** aceite de la segunda recolección. **PLA3:** aceite de la tercera recolección.

**IK<sup>C</sup>:** Índice de Kovats calculado.

**IK<sup>R</sup>:** Índice de Kovats de referencia. a. Adams (2009), b. Nickavar et.a. (2006), c. Stashenko et.al. (2003), d. Jordan et.al. (2002), e. Ka et.al. (2005), f. Cavalli et.al. (2003), g. Adams (1995), h. Julien et.al. (2007), i. Choi (2003), j. Chen y Ho (1998), k. Pino et.al. (2005), l. Choi (2003).

\*: % total de compuestos identificados en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.

El análisis cuantitativo de *Piper lanceifolium*, se llevó a cabo mediante la comparación del porcentaje de cantidad relativa de cada pico detectado en el detector de ionización de llama (FID) con el porcentaje de cantidad relativa de cada pico identificado en masas, tanto en la columna no polar como polar.

En la tabla 7, se muestran los compuestos identificados en las columnas no polar (DB-5MS) y polar (HP-INNOWAX) con sus respectivos porcentajes de cantidad relativa identificados mediante el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas. Además se presentan los datos de los porcentajes de cantidad relativa proporcionados por el equipo al utilizar el detector de ionización de llama (FID).

De cada compuesto se calculó la media aritmética del porcentaje de cantidad relativa tanto para masas y FID conjuntamente con la desviación estándar en FID. La comparación del porcentaje cuantitativo relativo de los picos de los analitos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en masas, tanto el análisis cualitativo y cuantitativo confirmaron la presencia en el aceite esencial analizado de los compuestos expresados en la tabla, la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por recolección, el promedio.

En la corrida cromatográfica en DB-5MS-FID las muestras analizadas son el resultado de la unión de los aceites obtenidos por recolección mientras que para HP-INNOWAX-FID se cromatografiaron cada una de las nuevas muestras, reportándose el promedio de la cantidad relativa de los compuestos presentes en los aceites obtenidos de las tres destilaciones realizadas por recolección cada una de ellas con valores porcentuales similares de los compuestos identificados.

**Tabla 7.** Comparación de porcentajes cuantitativos

DB-5MS-FID										HP FID						
COMPUESTOS	% de Cantidad Relativa														% de Cantidad Relativa	
	PLA1		PLA2		PLA3		MS FID		PLA1		PLA2		PLA3		MS	FID
	MS	FID	MS	FID	MS	FID	X	X	MS	FID	MS	FID	MS	FID	X	X
$\alpha$ - thujene	0,21	0,30	-		0,25	0,32	0,25	0,31								
$\alpha$ -Pinene	1,24	1,34	1,25	1,34	1,30	1,33	1,30	1,34	1,35	1,22	1,45	1,34	1,27	1,14	1,35	1,26
$\beta$ -Pinene	0,57	0,64	0,32	0,43	0,64	0,64	0,46	0,57	0,56	0,59	0,64	0,60	0,56	0,57	0,60	0,58
myrcene	0,65	0,68	-		0,56	0,78	0,56	0,73	0,91	0,99	0,74	0,88	0,79	0,99	0,80	0,86
phellandrene	0,69	0,79	0,68	0,79	0,77	0,79	0,75	0,79	0,45	0,41	0,68	0,51	0,41	0,42	0,53	0,46
alpha terpinene	1,32	1,29	1,41	1,41			1,41	1,35	2,09	1,99	1,14	1,74	1,66	1,77	1,51	1,65
p-Cymene	-		0,78		0,92	0,94	0,85	0,94	-	-	0,72	0,72	0,82	0,801	0,75	0,78
limonene	0,26	0,24	0,25	0,24	0,31	0,24	0,27	0,24	0,19	0,12	-	0,16	0,20	0,14	0,18	0,17
cineole<1,8a-epoxy>	0,42	0,47	0,52	0,46			0,49	0,47	0,39	0,40	0,45	0,41	0,23	0,27	0,37	0,29
Z $\beta$ ocimene	1,86	1,66	1,66	1,66	1,55	1,62	1,62	1,65	2,41	2,36	1,97	2,25	1,89	2,16	2,04	2,03
ocimene neo-allo	3,85	3,63	3,94	3,73	3,79	3,15	3,82	3,50	2,21	2,42	4,11	2,91	2,71	2,29	3,24	2,75

α- terpinene	3,86	3,83	4,82	4,82	3,70	3,85	4,45	4,17	3,15	3,20	3,54	3,30	3,91	3,01	3,59	3,50
Terpinolene	1,12	1,12	1,44	1,47	1,44	1,07	1,21	1,33	1,37	1,35	1,25	1,89	1,50	1,76	1,22	1,72
terpineol (cis b)	0,20	0,17	-		0,19	0,17	0,19	0,17	0,20	0,20	-	0,20	0,17	0,20	0,19	0,19
α-Copaene	0,35	0,38	0,28	0,37	0,21	0,49	0,28	0,41	0,27	0,29	0,30	0,29	0,22	0,27	0,27	0,25
terpinene4oi	0,07	0,09	-					0,09	0,08	0,07	-		-			
α- terpineol	1,32	1,42	1,30	1,24	1,18	1,22	1,24	1,29	1,12	1,23	1,45	1,27	1,56	1,23	1,43	1,41
safrole	36,72	34,55	48,07	47,54	41,97	44,81	45,86	42,30	38,52	36,22	41,12	38,62	39,22	38,29	39,66	39,06
Cyclosativene	0,09	0,77	-		0,08	0,77	0,08	0,77	-	-	-		-	-		
α-Copaene	0,67	0,68	0,64	0,67	1,95	0,71	1,09	0,69	1,56	1,45	0,87	1,29	1,22	1,33	1,13	1,23
caryophyllene (z)	1,29	1,29	1,56	1,48	1,45	1,77	1,50	1,51	1,38	1,73	1,19	1,43	1,36	1,33	1,33	1,34
humelene alpha	0,30	0,33	0,20	0,23	0,36	0,35	0,26	0,30	0,25	0,20	0,37	0,27	0,23	0,23	0,29	0,25
amorphene trans	0,97	0,91	0,47	0,50	0,82	0,97	0,60	0,79	0,94	0,90	-	0,92	1,23	0,90	1,08	1,07
germacrene D	-		-		0,12	0,18	0,12	0,18	-	-	-		0,12	0,999	0,12	0,12
selinenene b	0,75	0,75	0,68	0,65			0,66	0,70	0,71	0,74	0,55	0,67	0,65	0,74	0,62	0,67
bicyclogermacrene	-		0,14	0,13			0,13	0,13	-	-	0,14	0,14	0,17	-	0,15	0,16
naphthalene (2methoxi)	0,74	0,74	0,83	0,84			0,83	0,79	1,56	1,58	1,23	1,46	2	1,56	1,40	1,49
cadinene(y)	0,62	0,68	0,40	0,38	0,49	0,66	0,42	0,57	0,55	0,51	0,69	0,58	0,50	0,52	0,59	0,54
germacrene A	2,01	2,11	1,59	1,71	1,22	1,07	1,51	1,63	2,17	2,67	2,51	2,45	2,15	2,07	2,37	2,20

1,5

cadina-1,4diene	1,14	1,03	1,10	1,03			1,07	1,03	1,24	1,14	1,21	1,20	1,23	1,14	1,21	1,20
myristicin	0,81	0,93	0,49	0,57			0,53	0,75	0,82	0,82	0,46	0,70	0,65	0,80	0,61	0,69
caryophyllene oxide	2,50	2,16	2,33	2,13	2,01	2,13	2,16	2,14	3,63	3,55	2,97	3,39	3,31	3,22	3,22	3,25
viridiflorol	-		0,13		0,21		0,17		-	-	0,14	0,14	0,20	0,16	0,16	0,17
ledol	2,23	2,07	2,69	2,47	3,70	2,07	2,95	2,21	2,17	2,22	2,35	2,25	2,99	2,47	2,53	2,66
dill apoile	-		1,42	1,22	1,34		1,33	1,22	-	-	1,43	1,43	1,40	1,33	1,42	1,38
cadinol (epi-a-)	15,26	14,05	11,04	12,05	14,39	14,09	12,49	13,40	14,30	13,13	12,32	13,25	13,89	13,99	13,16	13,68
apiole																

**El orden de los compuestos es de acuerdo a la elución en la columna DB-5MS.**

**PLA1:** aceite de la primera recolección. **PLA2:** aceite de la segunda recolección. **PLA3:** aceite de la tercera recolección.

\*: Porcentaje total de identificación en la columna DB-5MS-MASAS y DB-5MS-FID.

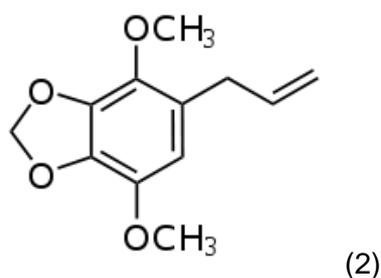
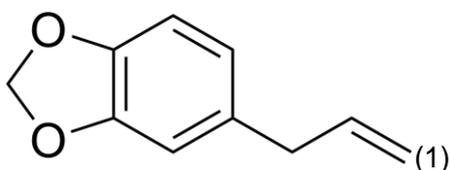
\*\* : Porcentaje total de identificación en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID.

En el aceite esencial extraído por arrastre de vapor de las partes aéreas de *Piper lanceifolium* analizado por CG-MS y CG-FID, se identificaron 33 compuestos, de los cuales 30 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 33 compuestos con un porcentaje de identificación de 93% y en la columna HP-INNOWAX 93,00%.

En las muestras analizadas se identificaron 6 compuestos mayoritarios entre los cuales tenemos:

Compuesto	Porcentaje
Safrole fig (1)	41,24
apiole(2)	13,06
terpinene a(3)	4,39
Occimene neo allo(4)	3,23
Dill apiole (5)	2,73

Estudios previos acerca de la composición química del aceite esencial de la especie *Piper lancifolium* no se encuentran disponibles en la literatura científica sin embargo el estudio de la composición química del aceite esencial de varias especies piperáceas.



### 3.5. Actividad Biológica

**Tabla 8.** Actividad Biológica

Microorganismos	Oilsamples			Positive control <sup>b</sup>
	<i>dsd</i>	<i>sds</i>	<i>sd</i>	
	MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>			
<b>Gram-negative bacterium</b>				
<i>Pseudomonaaeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1000	>1000	>1000	7,81
<i>Klebsiellapneumoniae</i> (ATCC 9997)	500	500	500	7,81
<i>Proteusvulgaris</i> (ATCC 8427)	>1000	>1000	>1000	7,81
<i>Escherichiacoli</i> (ATCC 25922)	>1000	>1000	>1000	7,81
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	>1000	>1000	>1000	7,81
<b>Gram-positive bacterium</b>				
<i>Enterococcusfaecalis</i> (ATCC 29212)	>1000	1000	>1000	7,81
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	>1000	>1000	>1000	7,81
<b>Fungi</b>				
<i>Trichophytonrubrum</i> (ATCC 28188)	>1000	>1000	>1000	7.81
<i>Trichophytonmentagrophytes</i> (ATCC 28185)	>1000	>1000	>1000	7.81
<sup>a</sup> Mean of nine determinations.				
<sup>b</sup> Gentamicine for <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ; Ampicilline for <i>E. faecalis</i> and <i>S. typhimurium</i> and Itraconazole for fungi.				

Fuente: Palacio, 2014

### 3.6. Actividad Antioxidante

ABTS

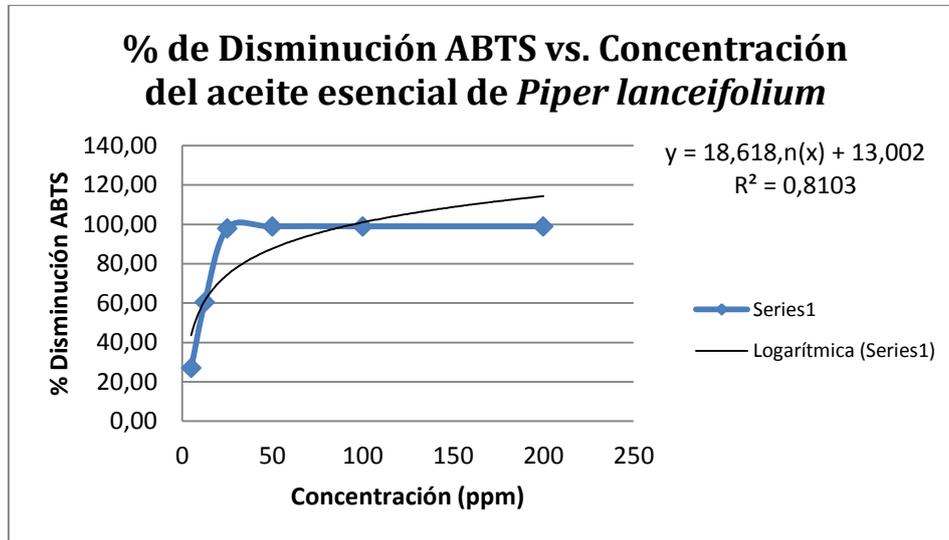
La gráfica muestra una relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la concentración del aceite esencial de *Piper lanceifolium*, por lo tanto a mayor concentración (ppm) de AE, menor es la absorbancia obtenida

**Tabla 9.** Relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la concentración del aceite

CONCENTRACIÓN	%
5 ppm	64
12,5 ppm	86,90
25 ppm	95
50 ppm	96,80
100 ppm	98,50
200 ppm	99,40

Fuente: Palacio, 2014

La composición química de los aceites esenciales es muy compleja, por lo tanto la actividad antioxidante puede arrojar resultados dispersos dependiendo del método aplicado.



Con la ecuación obtenida en la gráfica se determina la actividad antioxidante, por el método ABTS, expresando los resultados como  $CI_{50}$ .

Así se obtuvo el siguiente resultado:

$$y = 18,618 \ln(x) + 13,02$$

$$x = e^{\frac{50-13,002}{18,618}}$$

$$x = e \cdot 1,98$$

$$x = 7,08 \text{ ug/ml}$$

El  $CI_{50}$  es correspondiente a 7,08 ppm, esto indica que el aceite esencial de *piper lanceifolium*

## DPPH

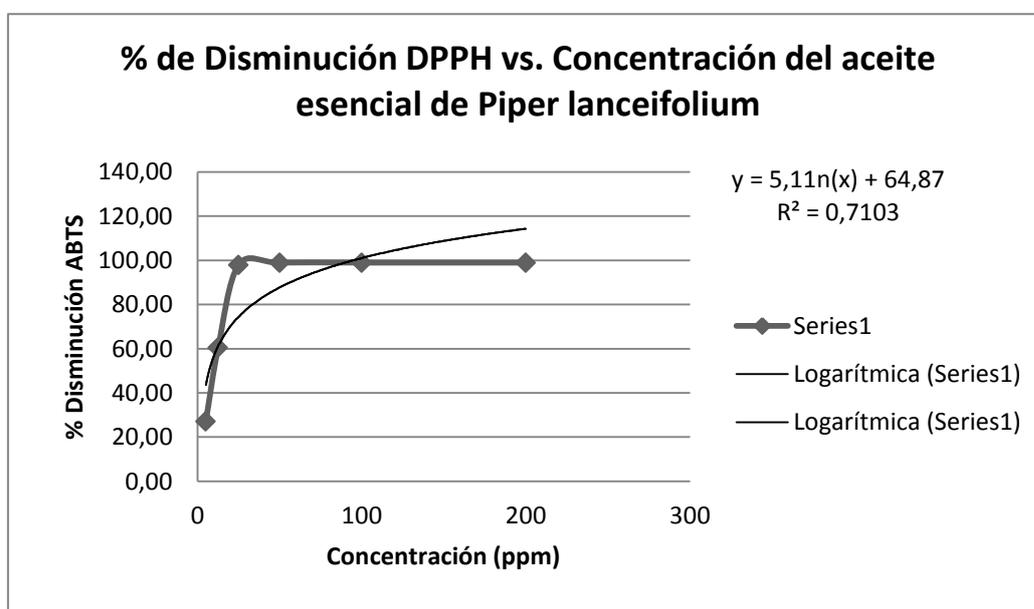
La absorbancia media obtenida de las lecturas, los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración respectivamente. También se indica el porcentaje de disminución de DPPH calculado con la siguiente ecuación.

$$\%Dism DPPH = \frac{Abs.DPPH - Abs.aceite}{Abs.DPPH}$$

**Tabla 10.** Concentración, absorbancias medias y porcentaje de disminución del aceite esencial de *Piper lanceifolium*

CONCENTRACIÓN	%
0	0
5	69
12,5	85,2
25	85,81
50	87,02
100	87,2
200	88,9

Fuente: Palacio 2014



$$y = 5,11\ln(x) + 64,87$$

$$x = e^{\frac{50-64,87}{5,11}}$$

$$x = 0,04 \text{ ug/ml}$$

Con la ecuación obtenida en la gráfica se determina la actividad antioxidante, por el método DPPH, expresando los resultados como  $CI_{50}$  dando un  $CI_{50}$  de 0,04 ug/ml.

## CONCLUSIONES.

1. Humedad.- La materia vegetal presento un 0,052% y el rendimiento promedio más alto del material vegetal recolectado.
2. Densidad.- De las recolecciones fue de 1,02, 1,02 y 1,02 para la primera, segunda y tercera recolección respectivamente. La media resultado de los valores anteriormente mencionados fue de 1,03.
3. El índice de refracción para los aceites de la primera, segunda y tercera recolección fue de 1,51; 1,51 y 1,51 a una temperatura de 18,6°C calculándose una media de 1,5128
4. Composición Química.- En el aceite esencial analizado se detectaron los compuestos que representan el 93% los cuales se identificaron en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX que fueron los métodos más eficaces de determinación. Se identificaron 2 compuestos mayoritarios: safrole (43 %), dill apiole (9,46%),
5. Actividad Biológica.- Las muestras del aceite no mostraron una buena actividad frente a *K. pneumoniae* ni frente a *E. faecalis*. Los aceites obtenidos de las distintas recolecciones presentan una moderada actividad con *Salmonella typhimurium*. Los aceites obtenidos de la materia vegetal de la tercera recolección presentan una buena actividad

## RECOMENDACIONES.

1. Podemos mencionar q mediante el proceso de extracción del aceite esencial se debe investigar y determinar los parámetros que influyen en la obtención de una producción mayor así como en la composición cualitativa y cuantitativa con la y poder verificar que el aceite presente una buena calidad.
2. En el proceso de extracción controlar la temperatura y presión de vapor, los mismos que influyen en el proceso de destilación debido a la volatilidad de los compuestos
3. Evitar la contaminación al realizar la actividad antimicrobiana, los posibles sinergismos y la forma de acción de los compuestos identificados como mayoritarios del aceite
4. Tomar como referencia la actividad de los aceites frente a otras cepas bacterianas.
5. Tomar en cuenta los estudios realizados y comparar los resultados obtenidos

## BIBLIOGRAFÍA.

- A, P. (2009). *Infecciones producidas por staphylococcus* (M. m. books Ed.).
- Adams, R. (2009). Agient technologies.
- alexss, t. (2007). Alex the African grey parrot and subject of landmark studies of bird intelligence dies at 31 [Press release]. Retrieved from [http://www.alexfoundation.org/press\\_release.html](http://www.alexfoundation.org/press_release.html)
- Allen, G. M. (2004). *Bats: biology, behavior, and folklore*. Mineola, N.Y.: Dover Publications.
- Angulo, A. B. N. F., A; Pulido, A; Rivera Z; Caballera, A. (2008). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. *Revista de dermatología venezolana*, 46, 12-17.
- Avila-Flores, R., & Medellin, R. A. (2004). Ecological, taxonomic, and physiological correlates of cave use by mexican bats. *Journal of Mammalogy*, 85(4), 675-687. doi: 10.1644/Bos-127
- Barceló, J. N., G. Sabater, B. Sánchez, R. (2007). *Fisiología Vegetal* (E. Pirámide Ed.). España.
- Bat Conservation International. (2008). Bat Conservation International. Retrieved December 15, 2011, from <http://www.batcon.org>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia* (Z. A. S.A Ed. segunda edición ed.).
- Dallwitz, M. W., Q; Page, R;. *Biodiversidad el mosaico de la vida*. España.
- Deanna, M. M., H. (2002). *Fitoquímica Orgánica* (segunda edición ed.).
- Del la torre, L. N., H; Muriel, P; Macía M; Balsle, H. (2008). Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador. (pp. 105-1114).
- Flores, R. (1997). *Atlas de las plantas medicinales y curativas* (S. A. cultural de ediciones Ed.). Madrid-España.
- Freire, A. (2004). *Botánica sistemática ecuatoriana*.
- Hartle, D. (2008). Alex & Me: How a scientist and a parrot discovered a hidden world of animal intelligence—and formed a deep bond in the process. [*Alex & Me: How a Scientist and a Parrot Discovered a Hidden World of Animal Intelligence—and Formed a Deep Bond in the Process*, by Irene M. Pepperberg]. *Library Journal*, 133(18), 94.
- Kant, R. D. P. A., S. (2010). screening of antibacterial activity os plants essentian oils Against Pathogenic Bacterial Strains. *asian Journal of Medical Sciences*.
- Maldonado, A. O., S; Dorado, R. (2004). *Preparados galénicos e imágenes de plantas medicinales* (CEAMISH-UAEM Ed. primera edición ed.). México.
- Muñoz, F. (1996). *Plantas Medicinales y aromáticas* (e. mundi-prensa Ed.).
- Oliva, M. Actvidad Biológica de los aceites ecenciales.

- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (A. ediciones Ed. Primera edición ed.). España.
- Palzelt, E. (1996). Flora del Ecuador.
- Pengelly, A. (1996). *The constituents of medicinal plants* (segunda ed.). U.K: Cabi Publishing.
- Pepperberg, I. M. (2004). Cognitive and communicative capacities of grey parrots — implications for the enrichment of many species. *Animal Welfare*, 13, S203-S208.
- Pepperberg, I. M. (2008). 'Alex & me': The hidden world of animal minds. In T. Gross (Ed.), *Fresh Air*. Philadelphia: WHY/NPR.
- Pinto, A. C. D., Chaves, F. C. M., dos Santos, P. A., Nunez, C. V., Tadei, W. P., & Pohlit, A. M. (2010). Piper peltatum: Biomass and 4-Nerolidylcatechol Production. *Planta Medica*, 76(13), 1473-1476. doi: 10.1055/s-0029-1240938
- R.Q, B. (1970). *Curso práctico de Química Orgánica*. Madrid.
- Reyes, F. P., E; López, A (2012). *Vapores de aceites esenciales : alternativa de antimicrobianos naturales*.
- Shanahan, M. (2012). The brain's connective core and its role in animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 367(1603), 2704-2714. doi: 10.1098/rstb.2012.0128
- Stashenko, E. (1998) Memorias III Seminario y Exposición Nacional de Plantas Aromáticas y Medicinales
- Tinoc, C. (Metabolitos secundarios de la especie de la flora iberoamericana como potenciales agentes antiparasitarios ).
- Valarezo, E. M., V & Ordoñez, Y. (2007). *Aceites Esenciales: Plantas aromáticas del sur del Ecuador*.
- Yovel, Y., Franz, M. O., Stilz, P., & Schnitzler, H. U. (2008). Plant classification from bat-like echolocation signals. *PLoS Computational Biology*, 4(3), e1000032. doi: DOI 10.1371/journal.pcbi.1000032

## ANEXOS.

### Anexo 1

#### DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

##### PRINCIPIO:

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

##### MATERIAL:

- Estufa
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

##### PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 2 a 10 gramos de la muestra; seguidamente colocarla durante dos horas en una estufa a 105°C (+/- 5°C).
- Enfriar la cápsula en el desecador por 10 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 una hora, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante. Dicho peso se toma como  $m_2$ .

##### CÁLCULO:

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

Donde:

**Hm:** %de humedad

**m:** peso de la cápsula vacía (gr)

**m<sub>1</sub>:** peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

**m<sub>2</sub>:** pesode 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:

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

Donde:

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**

**Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982**

### **DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C (Método de Referencia)**

#### **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°C ± 0.2°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:

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

Donde:

$d_{20}^{20}$ : 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 INDICE 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  $(589.3 \pm 0.3)$ 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  $\pm 0.0002$ .

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.

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

Donde:

$nD$  = 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  $\pm 0.0002$ .