



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Piper Lineatum* de la provincia de Zamora Chinchipe”.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Merino Peralta, Gabriela Alexandra.

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

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Piper Lineatum* de la provincia de Zamora Chinchipe”** realizado por: Merino Peralta Gabriela Alexandra; ha sido orientado y revisado durante su ejecución por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, mayo de 2015

f.....

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Gabriela Alexandra Merino Peralta** declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: “Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Piper Lineatum* de la provincia de Zamora Chinchipe”, de la titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

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

f) _____

Gabriela Alexandra Merino Peralta

1104751910

DEDICATORIA

A Dios por cada vez que me caí, cada vez que me sentí atrapada, siempre me mostró la luz que me guiaría a la salida.

A mis padres por su amor, esfuerzo, generosidad y sacrificios por estar siempre presentes y brindarme lo mejor.

A ti Santiago por plantar en mí una sonrisa amplia y constante, por haberme acompañado a lo largo de esta etapa siempre con una palabra de aliento.

A mis amigas por compartir tantos momentos a lo largo de mi carrera que quedaran grabados por siempre en nuestra memoria.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fortaleza para concluir esta etapa.

A mis padres por su apoyo incondicional y comprensión.

A mi director de tesis Ing. Eduardo Valarezo por sus conocimientos, sus orientaciones su manera de trabajar y su motivación que han sido fundamentales para poder concluir con mi trabajo de investigación.

A mis compañeras que han estado presentes y han colaborado para poder concluir esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.1.1. Extracción.....	6
1.1.2. Clasificación.....	8
1.1.3. Caracterización.....	8
1.1.3.1 Cromatografías de gases.....	9
1.1.4. Propiedades de los Aceites Esenciales.....	10
1.1.5. Usos y aplicaciones.....	11
1.2. Actividad Biológica.....	12
1.2.1. Bacterias.....	12
1.2.1.1. Bacterias Gram positivas.....	13
1.2.1.2. Bacterias Gram negativas.....	13
1.2.2. Hongos.....	15
1.3. Actividad Antioxidante.....	16
1.4. Plantas medicinales.....	17
1.5. <i>Flora Ecuatoriana</i>	17
1.5.1 Flora aromática del Ecuador.....	18
1.6. <i>Familia Piperaceae</i>	18
1.6.1. El género <i>Piper</i>	19
1.6.1.1. <i>Piper lineatum</i>	20
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	21
2. Metodología.....	22

2.1. Recolección de la materia vegetal.....	23
2.2. Determinación de la humedad.....	24
2.3. Extracción del aceite esencial.....	24
2.4. Determinación del rendimiento.....	25
2.5. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.....	25
2.5.1 Densidad relativa.....	25
2.5.2. Índice de refracción.....	26
2.6. Determinación de la composición química del aceite vegetal.....	27
2.6.1. Cromatografía de gases.....	27
2.6.1.1. Preparación de las muestras.....	27
2.6.1.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplado a espectrometría de masas.....	27
2.6.1.3. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.....	29
2.6.1.4. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	30
2.6.1.5. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	31
2.6.2. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite de <i>Piper Lineatum</i> , tanto en la columna polar como en la columna apolar.....	32
2.6.3. Identificación cuantitativa de los compuestos mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.....	33
2.7. Determinación de la actividad biológica.....	33
2.7.1. Microorganismos utilizados.....	33
2.7.2. Método de microdilución en caldo.....	34
2.7.2.1. Preparación de la muestra	34
2.7.2.2. Preparación del cultivo bacteriano, “Cultivo Overnight”.....	35
2.7.2.3. Preparación del inóculo bacteriano.....	36
2.7.2.4. Procedimiento.....	36
2.7.2.5. Actividad antifúngica.....	37
2.7.2.6. Preparación de la muestra.....	38
2.7.2.7. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.....	38
2.7.2.8. Procedimiento.....	38
2.7.2.9. Lectura de las placas e interpretación de resultados.....	38
2.8. Determinación de la actividad antioxidante.....	39

2.8.1. Preparación de la muestra.....	39
2.8.2. Método ABTS+ (Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+).....	40
2.8.2.1. Solución patrón y de trabajo.....	40
2.8.2.2. Trolox y BHT.....	41
2.8.2.3. Lectura de muestras.....	41
2.8.3. Método DPPH.....	42
2.8.3.1. Solución patrón y de trabajo.....	42
2.8.3.2. Trolox y BHT.....	42
2.8.3.3. Lectura de muestras.....	43
2.8.3.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS+ y DPPH+.....	43
CAPÍTULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
3.1. Humedad.....	46
3.2. Rendimiento.....	46
3.3. Propiedades físicas.....	48
3.3.1. Densidad relativa.....	48
3.3.2. Índice de refracción.....	48
3.4. Composición Química del Aceite Esencial de <i>Piper lineatum</i>	49
3.4.1. Análisis cualitativo.....	53
3.4.2. Análisis cuantitativo.....	56
3.5. Actividad biológica del aceite esencial de <i>Piper lineatum</i>	59
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	59
3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.....	60
3.6. Actividad antioxidante.....	62
3.6.1. Actividad antioxidante por el método DPPH.....	62
3.6.1.1 Lectura del estándar de Trólox y BHT.....	64
3.6.2. Actividad antioxidante por el método ABTS.....	65
3.6.2.1. Lectura del estándar de Trólox y BHT.....	67
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	78
Anexo 1. Determinación de Humedad.....	79
Anexo 2. Determinación del porcentaje de rendimiento.....	80
Anexo 3. Determinación de la densidad relativa a 20°C.....	81

Anexo 4. Determinación del índice de refracción.....	83
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra Botánica de <i>Piper lineatum</i>	20
Figura 2. Esquema de la metodología utilizada	22
Figura 3. Área de recolección de la especie <i>Piper lineatum</i>	23
Figura 4. Planta de <i>Piper lineatum</i>	24
Figura 5. Destilación del aceite de <i>Piper lineatum</i>	25
Figura 6. Determinación de la densidad relativa a) Picnómetro con agua y b) Picnómetro con aceite.....	26
Figura 7. Refractómetro ABBE	26
Figura 8. Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N	27
Figura 9. Parámetros operacionales para la columna DB-5 MS acoplada a espectrometría de masas.....	28
Figura 10. Parámetros operacionales para la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas	29
Figura 11. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS.....	30
Figura 12. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna Hp-Inowax	31
Figura 13. Cámara de trabajo	36
Figura 14. Microplaca TC96 con las diferentes concentraciones del aceite ug/ml	37
Figura 15. Frascos color ámbar con las diferentes concentraciones que van a ser utilizadas.....	39
Figura 16. Muestras del aceite <i>Piper Lineatum</i> analizadas mediante método ABTS+..	42
Figura 17. Muestras del aceite <i>Piper lineatum</i> , analizadas mediante el método DPPH.....	43
Figura 18. Ecuación utilizada para calcular porcentaje de inhibición.....	43
Figura 19. Perfil cromatográfico del aceite <i>Piper lineatum</i> en la columna no polar DB- 5MS.....	50
Figura 20. Perfil cromatográfico del aceite <i>Piper lineatum</i> en la columna polar HP- INNOWAX.....	50
Figura 21. Compuestos mayoritarios en la columna DB-5MS.....	51
Figura 22. Compuestos mayoritarios en la columna HP-INNOWAX.....	52
Figura 23. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones del aceite esencial y el % de disminución.....	63
Figura 24. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones de los estándares BHT y Trólox y el % de disminución	65
Figura 25. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones del aceite esencial y el % de disminución	66

Figura 26. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones de los estándares BHT y Trolox y el % de disminución..... 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características Taxonómicas de <i>Piper Lineatum</i>	20
Tabla 2. Microorganismos utilizados.....	34
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada Bacteria.....	35
Tabla 4. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo	38
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en aceite.....	40
Tabla 6. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.....	41
Tabla 7. Porcentaje de humedad de la materia vegetal.....	46
Tabla 8. Rendimiento del aceite de <i>Piper lineatum</i>	47
Tabla 9. Densidad relativa del aceite de <i>Piper lineatum</i>	48
Tabla 10. Índice de refracción del aceite de <i>Piper lineatum</i>	49
Tabla 11. % de la cantidad relativa de cada compuesto en las columnas: DB-5MS- Masas- FID, HP-INNOWAX-Masas-FID.....	54
Tabla 12. % de la cantidad relativa de cada compuesto en las columnas: DB-5MS- Masas- FID, HP-INNOWAX-Masas-FID.....	57
Tabla 13. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Piper lineatum</i>	59
Tabla 14. CMI antifúngica de los aceites esenciales de <i>Piper lineatum</i>	61
Tabla 15. Datos del método DPPH obtenidos con el aceite de <i>Piper Lineatum</i>	62
Tabla 16. Datos del método DPPH para el estándar BHT.....	64
Tabla 17. Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.....	64
Tabla 18. Datos del método +ABTS obtenidos con el aceite de <i>Piper Lineatum</i>	66
Tabla 19. Datos del método +ABTS para el estándar BHT.....	67
Tabla 20. Datos del método +ABTS para el estándar TROLOX.....	68

RESUMEN

Piper lineatum es una planta que crece en las elevaciones medias-altas. El aceite esencial fue extraído por hidrodestilación. La composición química del aceite esencial se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/EM y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI). La actividad antioxidante se evaluó por los métodos +ABTS y DPPH. Se determinaron las propiedades físicas del aceite. Se identificaron 58 compuestos que representan el 97,31% de identificación del aceite, los componentes más representativos fueron: apiole (21,483), safrole (19,161), myristicin (13,776), 1,8 cineole (8,914), γ -terpinene (4,230) y B-ocimene, trans (3,193). La densidad del aceite esencial de *Piper lineatum* fue de 0,879 g/cm³ y el índice de refracción de 1,692. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Klebsiella Pneumoniae* con una CMI de 1000 ug/mL; presentó actividad antifúngica frente a las cepas de *Trichopyton rubrum* con una CMI de 1000 ug/mL. El aceite esencial de esta especie no reveló actividad antioxidante a las concentraciones evaluadas.

Palabras claves: *Piper lineatum*, aceite esencial, composición química, cromatografía de gases, actividad antioxidante, actividad biológica.

ABSTRACT

Piper lineatum is a plant, wick growing wild on medium-high elevations. Essential oil was extracted from the aerial parts by hidrodistillation. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and the flame ionization detector (GC/FID). The biological activity was evaluated by the broth microdilution method and was expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC). Antioxidant Activity was determined by method of + ABTS and DPPH. Physical properties of essential oil were also determined. Fifty-eight compounds were identified representing 97,31% of the essential oil. The most representative components were: apiole (21,483), safrole (19,161), myristicin (13,776), 1,8 cineole (8,914), γ -terpinene (4,230) y B-ocimene, trans (3,193). The density was 0,879 g/cm³ and refractive index 1,692 .The essential oil presented microbial activity against *Klebsiela Pneumoniae* (MIC 1000 ug/MI); with respect to fungi showed good activity against *Trichopyton rubrum* (MIC 1000 ug/MI) . The essential oil of this species do not showed antioxidant activity at various concentrations evaluated.

Key words: *Piper lineatum*, essential oil, chemical composition, gas chromatography, antioxidant activity, biological activity.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los productos naturales gozan de amplia aceptación y remplazan, cada vez más a los productos sintéticos o materiales generados artificialmente. Como respuesta a esta tendencia, los aceites esenciales son uno de los principales productos naturales usados en un amplio rango de materiales comerciales y de consumo masivo (N. Pino, Melendez, & Stashenko, 2008).

Los aceites esenciales son productos formados por la mezcla de numerosas sustancias, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos; con una composición química bastante compleja, obtenidos a partir del metabolismo secundario de las plantas. Son lípidos simples sin ácidos grasos, y están compuestos por sustancias volátiles, a diferencia de los aceites fijos, que contienen ácidos grasos como componentes estructurales fundamentales, y no son volátiles. 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 (Cerutti & Neumayer, 2004).

El presente estudio está dirigido a la determinación de las propiedades físicas, actividad antioxidante, actividad biológica y composición química del aceite esencial de *Piper lineatum* en la provincia de Zamora Chinchipe. Se desarrolla en tres capítulos, el primer capítulo denominado: Marco teórico que tiene como propósito dar a la investigación un sistema coordinado y coherente de conceptos y proposiciones que permitan abordar el problema, el segundo capítulo denominado: Materiales y métodos, donde se da a conocer las diferentes técnicas que se emplearan a lo largo de la investigación y los materiales que se utilizaran y en el tercer capítulo se presenta y analiza los resultados obtenidos. 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 Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Con este estudio se contribuye al desarrollo del conocimiento sobre los aceites esenciales, sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: Farmacéutica, Cosmética y Alimenticia; la información es también alimentada 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.

Al aceite obtenido de *Piper lineatum* se le determinó la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción con la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la actividad antioxidante fue evaluada mediante dos métodos +ABTS y DPPH, la composición química fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/EM y acoplada un detector de Ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue estudiada con el método de microdilución en caldo determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 5×10^5 ufc/mL para bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) y bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y una concentración de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185).

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1. Aceites esenciales.

En la actualidad se definen como “aceites esenciales” a las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes). Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. 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 (Paúl, 2002).

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas; la mayoría de ellos son volátiles y son responsables del olor del vegetal. Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes (Shailili M. Moreno M., 2006).

Son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos (Günther, 1948).

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes partes de las plantas: en las hojas (albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, romero, salvia, etc.), en las raíces (jengibre, sándalo, asafrás, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, rosa, etc.) o en los frutos (perejil, pimienta, etc.) (Martínez, 2003).

1.1.1 Extracción.

Existen diversos modos de extracción de los aceites esenciales, que están contenidos en los distintos tejidos de las plantas, alojados en sus células.

- **Prensado:** el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas.
- **La extracción con disolventes:** Primero la muestra se seca, luego es molida y se pone en contacto con solventes como alcohol y el cloroformo. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias (Velázquez, 2008).
- **Método de enflorado o enfleurage:** El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Velázquez, 2008).
- **Otros métodos:** El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Este procedimiento presenta varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del solvente (que además se puede reciclar), no se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Velázquez, 2008).

- **Destilación por arrastre con vapor de agua o extracción por arrastre:** La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables. La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho (Otolora, 2012).

1.1.2. Clasificación.

Los aceites esenciales se pueden clasificar basándose en criterios como consistencia y origen:

- **Por su consistencia pueden existir:** Las esencias fluidas que son líquidos volátiles a temperatura ambiente; los bálsamos son de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos, el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, bálsamo de Tolú, Estoraque; y las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavo, etc.) (Rodríguez, Melendez, & Real, 2012).
- **Por su origen:** se encuentran los naturales que se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos; y los artificiales que 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 (Rodríguez et al., 2012).

1.1.3. Caracterización.

La caracterización química del aceite se basa en la identificación del número de compuestos presentes en el aceite esencial, el porcentaje que representa a cada uno de estos; por lo que el método más utilizado es la cromatografía de gases. Según la cromatografía de gases permite separar los componentes de una muestra vaporizada en virtud de que éstos se

distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna.

La técnica cromatográfica más utilizada para el análisis de los aceites esenciales es, la cromatografía de gases (CG). En el control de calidad, la CG se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir los mayoritarios o aquellos que, sin ser mayoritarios, tengan una especial trascendencia para la calidad (Bandoni, 2002).

1.1.3.1. Cromatografía de gases.

Desde sus inicios en los años cincuenta, la cromatografía de gases (GC) se ha convertido en la técnica principal para la separación y análisis de compuestos volátiles. A partir de entonces, las aplicaciones de esta técnica han ido aumentando a medida que se han mejorado los instrumentos de cromatografía; siendo factible la separación, caracterización y cuantificación de una gran variedad de compuestos tanto en muestras ambientales, biológicas y médicas, como en comidas, sabores y fragancias (Miller & Wiley, 2005). En la actualidad es usada rutinariamente en multitud de laboratorios universitarios, de investigación e industriales, debido a su alta resolución, sensibilidad y selectividad. Además de las aplicaciones típicamente analíticas, la GC puede utilizarse a escala preparativa para la obtención de compuestos de elevada pureza (Skoog. et al., 2008).

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

El movimiento de las sustancias durante la cromatografía es el resultado de dos fuerzas oponibles, la fuerza de manejo de la fase móvil y la fuerza resistente o acción de retardo del solvente. La fuerza de manejo mueve las sustancias del origen de la columna en dirección del flujo de la fase móvil. La acción de retardo impide el movimiento de las sustancias arrastrándolas del flujo y adhiriéndolas al adsorbente. Las moléculas se encuentran alternando entre estar pegadas al adsorbente o despegadas en el flujo, esto da como consecuencia que pese a que el flujo es constante, solo una fracción de las moléculas se está

moviendo. Las sustancias que se mueven más lentamente son porque están siendo unidas más fuertemente a la fase estacionaria, mientras que aquellas que se mueven más rápidamente son porque son menos solubles o de poca afinidad. La habilidad de tener una migración diferencial entre los componentes de la mezcla es el resultado de la selectividad del sistema cromatográfico. El flujo de la fase móvil no es selectivo en el sentido de que no afecta el movimiento de los solutos. Como parte del sistema cromatográfico, sin embargo, la fase móvil debe ser un poco selectiva para ayudar a la absorción de los solutos con la fase estacionaria. La fase estacionaria también juega un papel importante dentro del cromatograma debido a su acción resistiva como una fuerza selectiva de la velocidad de flujo de los solutos (Olguín Pérez & Rodríguez, 2004).

1.1.4. Propiedades de los Aceites Esenciales.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas, en las raíces, en el pericarpio del fruto, en las, en el tallo, en las flores y en los frutos (Stashenko, 1996).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados (Martínez, 2003).

Las principales características de los aceites esenciales son:

- Son intensamente aromáticos.
- No son solubles en agua.
- Se evaporan con rapidez.
- Tienen baja densidad.
- No son grasos.
- Son solubles en vinagre, aceites vegetales y alcohol.
- Su estructura química se altera fácilmente con la luz.
- Son muy volátiles.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- ✓ Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- ✓ Monoterpenos,
- ✓ Sesquiterpenos y
- ✓ Fenilpropanos.

Los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios, así los aceites ricos en monoterpenos se denominan monoterpenoides, y los aceites ricos en sesquiterpenos son los aceites sesquiterpenoides como el pino, junípero etc. Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales. Aunque en los aceites esenciales tanto los mono-, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (González & D, 1984).

1.1.5. Usos y aplicaciones.

Los aceites esenciales principalmente para:

- **Para producir perfumes:** Por ser capaces de combinar con los aceites de la piel para producir aromas particulares en cada persona.
- **Para conservar los alimentos:** Las plantas ricas en aceites esenciales tienen propiedades antisépticas, que reducen la degradación microbiana de los alimentos, además de poder aportar otras propiedades como digestivas o estimulantes.
- **En la confección de insecticidas y acaricidas ecológicos:** Como sustitutos de otros productos químicos más agresivos para el medio ambiente.
- **Remedios caseros:** Los aceites esenciales pueden utilizarse en el tratamiento de algunas afectaciones de salud, siempre y cuando no existan contraindicaciones.
- **Botánica:** La presencia de aceites esenciales permite clasificar plantas, árboles y flores por familias.

- **Medicina:** Algunos aceites esenciales, como el de lavanda, se utilizan en el tratamiento de heridas y quemaduras.
- **Aromaterapia.**

1.2. Actividad Biológica.

Las plantas aromáticas, aquellas que generan esencias en cantidades apreciables, pertenecen también al grupo de las llamadas plantas medicinales. Sus componentes, solos o en combinación, exhiben una o varias actividades biológicas, antibacteriana, antiviral, antifúngica, entre otras (Muñoz , Martínez, & Stashenko, 2009).

Cuando hablamos de la actividad antibacteriana, hay dos tipos de efectos: actividad letal o bactericida y la inhibición del crecimiento o la actividad bacteriostática (Jawetz, 1989).

Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Se han sugerido usos prácticos de estas actividades en humanos y animales, así como en la industria de alimentos (Teixeira, 2006).

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos in vitro o in vivo. La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión y dilución. Algunos datos de la efectividad de estos agentes puede ser obtenidas a partir de la concentración inhibitoria mínima, (CIM), la concentración mínima bactericida (CMB) y el tiempo de muerte. La concentración inhibitoria mínima mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. La concentración mínima bactericida es la concentración más baja que mata al patógeno. Para determinar la rapidez de un efecto bactericida o la duración de un efecto bacteriostático se aplica el ensayo de tiempo de muerte (Cruz et al., 2006).

1.2.1. Bacterias.

Las bacterias, como se ha definido anteriormente, son seres unicelulares procariotas.

Estructuralmente están constituidos por elementos obligados; que están presentes en todas las bacterias y son indispensables para la vida de la propia bacteria. Son la pared celular, la membrana plásmica, citoplasma, ribosomas y la región nuclear; y los elementos facultativos que son los que pueden estar o no presentes en la bacteria y son, cápsula, flagelos, pelos, endosporas e inclusiones citoplásmicas.

Las bacterias se han clasificado durante mucho tiempo como bacterias Gram + y Gram -, en función de su comportamiento frente a la tinción de Gram (Granados & Villaverde, 1997).

1.2.1.1. Bacterias gram positivas.

- ***Enterococcus faecalis.***

Habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. del género *Enterococcus*, *E. faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente todos los antibióticos en uso. Causan infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas. Se asocian en parejas y cadenas cortas y si bien, su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito aislamientos de infecciones pulpo-periapicales y de bolsas periodontales (Liébana Ureña, 2002).

- ***Staphylococcus aureus.***

Es un agente patogénico ubicuo que es considerado como parte de la microbiota normal, es un agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del Sistema Nervioso Central y del tracto génito-urinario (Waldvogel, Mandell, Bennett, & Dolin, 2000).

1.2.1.2. Bacterias gram negativas.

- ***Salmonella typhimurium.***

Es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Las cepas de *Salmonella* son una de las principales causas de infecciones de origen alimentario en los países industrializados. El comercio internacional de los animales destinados al consumo ha supuesto la diseminación de *Salmonella* en la Unión Europea. La prevención y control depende de la detección precoz de la epidemia por un sistema de vigilancia apropiado basado en la tipificación de los aislamientos. Se han descrito

brotos por *Salmonella typhimurium* en distintos países, transmitidos a través de alimentos procesados, como huevos y leche pasteurizada, alimentos crudos como leche, lechugas o por transmisión a través de manipuladores de alimentos (Olsen et al., 2004).

- ***Escherichia coli.***

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Ewing, 1985).

- ***Pseudomonas aeruginosa.***

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras pseudomonas fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono (Hardalo & Edberg, 1997).

- ***Klebsiella pneumoniae.***

Es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. La *Klebsiella pneumoniae*, dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos. A día de hoy también existe una fuerte teoría que la relaciona con la Espondilitis Anquilosante (González-Vértiz et al., 2001).

- ***Proteus vulgaris.***

Este género está muy difundido en la naturaleza, se lo encuentra en el suelo, agua, aguas servidas, materiales de animales en descomposición, tracto intestinal del hombre, etc. Juega un papel importante en la descomposición de los cadáveres. Estos microorganismos son lactosa negativos y son productores de ureasa, factor de patogenicidad en la producción de infecciones urinarias ya que esta enzima desdobla a la urea (muy abundante en la orina) en amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco es tóxico para las células con lo que se produce la irritación del epitelio urinario, lo que desencadena una reacción inflamatoria. La alcalinidad alcanzada por la orina predispone a la litiasis urinaria (Losch & Merino, 2003).

1.2.2. Hongos.

El término hongo procede del latín fungus, que significa hongo. Estos seres han sido considerados tradicionalmente más próximos a las plantas que a otros seres vivos debido a su similitud en la composición química y a su estructura ultramicroscópica, aunque en la actualidad son grupos que se estudian por separado. Los hongos son eucariotas, es decir, poseen núcleo, mitocondrias, sistemas de endomembranas y otros rasgos típicos de las células eucariotas. Estos rasgos permiten distinguir los hongos microscópicos de las bacterias procarionas. Carecen de plastidios por lo que no pueden realizar fotosíntesis, su pared celular contiene quitina y almacenan glucógeno como compuesto de reserva. En todos estos rasgos se diferencian de las algas y las plantas terrestres, y se asemejan a los animales. La mayoría de los hongos son terrestres pero algunos ocupan hábitats acuáticos (Cubas, 2007)

- ***Trichophytum rubrum.***

Es un hongo antropofílico, cuyo reservorio habitual es el hombre. Infecta principalmente a los humanos y, ocasionalmente, a los animales. Se cree que estos hongos son formas evolucionadas de hongos zoofílicos que han perdido gradualmente la afinidad por la queratina animal. Esta evolución se asocia con una disminución de la producción de esporas y una pérdida del ciclo reproductivo sexual. Es un hongo cosmopolita, de distribución mundial. Se describió como una especie propia del Viejo Mundo (países de la cuenca mediterránea como España, Portugal, sur de Francia, Italia y Grecia), donde actualmente está prácticamente erradicado. Es endémico en Méjico, donde ocasiona alrededor del 70% de las tiñas capitis, y otros países latinoamericanos, y en las islas del Pacífico Sur. La prevalencia es muy elevada en EEUU (el segundo más frecuentemente aislado tras el *Trichophyton rubrum*) y Canadá por las inmigraciones, pero actualmente se mantiene estable, tendiendo a disminuir (Monzón & Rodríguez).

- ***Trichophytum mentagrophytes*.**

El género *Tricophyton* es miembro de la familia *Arthrodermataceae* del orden de los ascomicetos *Onygenales*. *T. mentagrophytes* es un hongo de distribución mundial, produce colonias en Sabouraud dextrosa agar planas, de color blanco o crema con una superficie pulverulenta o aterciopelada y pigmento en el reverso amarillento o café-rosado, que con frecuencia se hace rojo-café con el tiempo; se encuentran numerosos microconidios semiesféricos o piriformes, con algunas hifas en espiral y clamidoconidios esféricos que se hacen más abundantes en cultivos viejos; también se encuentran algunos macroconidios en clava, de pared delgada y multiseptados en algunos cultivos (Fernández, Segundo, Arenas, Diamante, & Guzmán, 2002)

1.3. Actividad Antioxidante.

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que, cuando está presente a baja concentración comparada con la de un sustrato oxidable, previene o retrasa significativamente la oxidación del sustrato (Huang, OU, & Prior, 2005).

Debido a los posibles efectos carcinogénicos de algunos antioxidantes sintéticos las investigaciones sobre la obtención y evaluación de antioxidantes naturales tienen un creciente interés (Arango, Pantoja, Santacruz, M, & Hurtado, 2012).

La oxidación de los productos alimenticios, cosméticos y medicinales, produce un deterioro muy significativo en los mismos, haciendo que pierdan, la mayoría de las veces las propiedades para las cuales fueron elaborados. Las grasas y aceites presentes en estos productos, pueden deteriorarse fácilmente debido a la oxidación, en una serie de reacciones con participación de radicales libres, propagándose y finalmente convirtiéndose en compuestos estables oxigenados, que conllevan a la pérdida de aroma y sabor, junto con otras características indeseables que degradan la calidad del producto (Shahidi, 1997).

Para prevenir tales reacciones se utilizan compuestos con propiedades antioxidantes, en su amplia mayoría sintéticos, como ser Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Etilhidroxibenzoato (EHB), TBC, Galato de n-Propilo, por mencionar algunos. Últimamente ha crecido la demanda de “productos de origen natural”, libres de aditivos químicos sintéticos, y se ha incrementado el estudio y el uso de sustancias que contengan antioxidantes naturales. Además, está en auge el mercado de complementos dietéticos y nutraceúticos que contengan compuestos capaces de inhibir o inactivar radicales libres, ya que estos compuestos han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares (Martínez-Rocha, 2008).

1.4. Plantas medicinales.

Es indudable la importancia de las plantas y los árboles para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Hernández, 2008).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado una preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas y árboles con propiedades curativas. El deterioro del ambiente causado por la deforestación, el uso indiscriminado de agroquímicos, la contaminación del aire y del agua y otros factores están agravando las condiciones ecológicas donde crecen miles de especies con potencial medicinal, en última instancia muchas de estas especies desaparecen aún antes de haberlas identificado o haberlas estudiado (Núñez, 1982).

1.5. Flora Ecuatoriana.

Ecuador es uno de los países más ricos del planeta en términos de diversidad biológica y posee además una importante diversidad cultural. Su privilegiada ubicación geográfica en el neotrópico, su variado relieve e influencia de corrientes marinas, confluyen para construir el escenario de las más variadas formas de vida de flora, fauna y microorganismos, en su diversidad genética y de ecosistemas. El país es considerado como uno de los 17 países megadiversos. Si se considera las cifras reportadas de especies registradas por unidad de área, en comparación con otros países, se concluye que el país es el más biodiverso del mundo (Matargo, 2014).

Ecuador, con un área de 283 791 km², se encuentra en plena zona tropical. El país entero está atravesado longitudinalmente por la Cordillera de los Andes, la cual define a lo largo de todo el país una orografía y topografía muy marcadas y diferentes. Además, sus costas están influenciadas por el paso de la corriente fría y seca de Humboldt. La combinación de todos estos factores hace posible que en Ecuador existan una gran variedad de climas y tipos de vegetación, que albergan 17 058 especies botánicas —16 000 excluyendo a las Pteridofitas (De la Torre, Alarcón, Kvist, & Salazar, 2008).

1.5.1. Flora aromática del Ecuador.

Su importancia es más pronunciada en comunidades rurales, que dependen, casi exclusivamente, de los recursos vegetales para curar sus achaques y dolencias. En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía. Las causas que acentúan el arraigado y extenso empleo de plantas medicinales entre los ecuatorianos son: el bajo poder adquisitivo de la mayoría que no permite el acceso a medicamentos, la carencia de un sistema oficial de salud efectivo y, principalmente, que el conocimiento médico ancestral es inmenso (De la Torre et al., 2008).

En Ecuador se encontraron 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, el 75% de las especies medicinales son plantas nativas y el 5% de ellas son endémicas, mientras que el 11% son introducidas en el Ecuador. El 16% del total de las especies son cultivadas y la mayoría de plantas medicinales son hierbas, arbustos y árboles. Las cinco familias que tuvieron un mayor número de especies de plantas medicinales fueron Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae. Las partes de las plantas más utilizadas son las hojas (30%), la planta entera (10%) y las flores o inflorescencia (6%) (De la Torre et al., 2008).

El Ecuador se halla entre los doce países que ostentan la mayor diversidad biológica de la Tierra. En América Latina el Ecuador, Brasil, Colombia, México y Perú son los países de megadiversidad. En efecto, especies de plantas vasculares de la flora del Ecuador representan el 50% de flora brasileña y el 10% de la flora mundial (16.087 especies de plantas vasculares, pertenecientes a 273 familias, de las cuales 15.308 especies son nativas, y 4.173 son endémicas del Ecuador) (Brack, 1993).

1.6. Familia Piperaceae.

Se conoce la familia Piperaceae desde la antigüedad como una de las familias más grandes e importantes, el género más representativo es el género *Piper*, de gran importancia económica debido a sus aplicaciones a nivel alimenticio, industrial y medicinal. Por ejemplo los frutos de *Piper nigrum* (pimienta) se ha utilizado como condimento en las comidas en el

sur de la India, de donde es nativa, su importancia y demanda fue de tal impacto que permitió un giro en el curso de la historia promoviendo la búsqueda de nuevas rutas marítimas a Oriente desde Europa (De la Rua, 1999). También han sido utilizados preparados de la raíz de *P. methystium* (Kawa-Kawa) que son bebidos durante las ceremonias mágico religiosas de los indígenas en la Oceanía (Dallas, 2004).

La familia Piperaceae cuenta con más de 3610 especies agrupadas en 5 géneros: *Piper*, *Peperomia*, *Zippelia*, *Manekia* y *Verhuellia* de los cuales los más importantes y extensos son el género *Piper* seguido por el *Peperonia* (Wanke et al., 2007).

1.6.1. El género *Piper*.

Las especies del género *Piper* presentan gran diversidad de compuestos, dada esta riqueza química y sus aplicaciones en la medicina tradicional, a muchos de los extractos y compuestos aislados en esta familia se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica, obteniéndose resultados promisorios y que han permitido incluso confirmar sus usos etnobotánicos (Celis et al., 2008). También los aceites esenciales obtenidos de diferentes órganos de las plantas han presentado diferentes actividades biológicas principalmente contra insectos, microorganismos, etc. (De Moraes et al., 2007).

El género *Piper* es uno de los más diversos géneros entre el linaje de las angiospermas, así como de los bosques tropicales húmedos alrededor del mundo. Ecológicamente las especies del género *Piper* son componentes estructurales del sotobosque y también sirven de alimentos a animales. Este género comprende, arbustos, hierbas o enredaderas y rara vez árboles. Son conocidos como “cordoncillos”, debido a la presencia de diminutas flores agrupadas en una inflorescencia en forma de espiga o en racimos, con androceo formado entre 1-10 estambres y gineceo de 1-4 carpelos, poseen tallos nudosos, sus hojas son variadas, siempre simples, alternas, frecuentemente enteras, elípticas u ovaladas, acuminadas en el ápice y asimétricas en la base. Pecioladas y con nervios surcados y sus frutos generalmente están en forma de bayas o drupas pequeñas y constan de una semilla. El género *Piper* se caracteriza por poseer una gran difusión de especies ampliamente distribuidas a nivel mundial (alrededor de 2000 especies), principalmente en las regiones tropicales y subtropicales (Jaramillo, 2001). Colombia es uno de los países con mayor distribución de especies pertenecientes a este género, pues se han encontrado en gran parte del territorio Colombiano, en la región Andina, principalmente en bosques húmedos y tropicales (Quijano-Abril, Callejas-Posada, & Miranda-Esqueviel, 2006).

1.6.1.1. *Piper Lineatum*.

Los aceites esenciales obtenidos de esta especie, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes al hombre, las plantas y los animales. Los extractos de este género presentan actividad antimicrobiana representativa (Ruiz & Roque, 2009).

Tabla 1. Características Taxonómicas de *Piper Lineatum*

REINO	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Pieprales
Familia	Piperaceae
Género	Piper
Especie	Lineatum
Estatus	Nativa

Fuente: Merino, G.

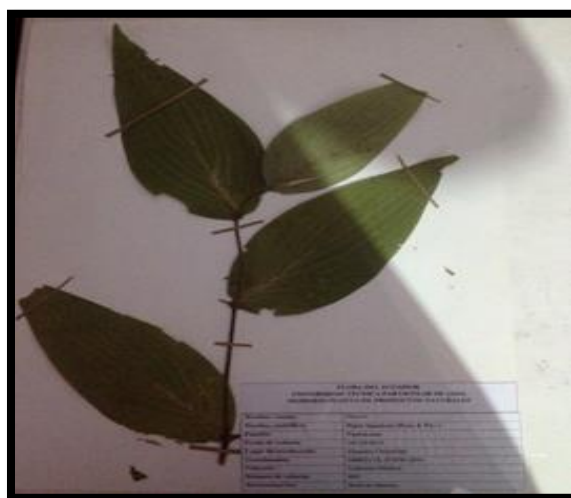


Figura 1. Muestra Botánica de *Piper lineatum*.

Fuente: Herbario de la U.T.P.L

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

2. Metodología.

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja; la metodología utilizada se describe en el esquema a continuación:



Figura 2. Esquema de la metodología utilizada.

Fuente: Merino, G.

2.1 . Recolección de la materia vegetal.

La recolección de la materia vegetal se realizó en la provincia de Zamora Chinchipe con las siguientes coordenadas: Sur 04°-08'-31,1"; Oeste 078°-56'-126" en una altura de 1075 m.s.n.m.

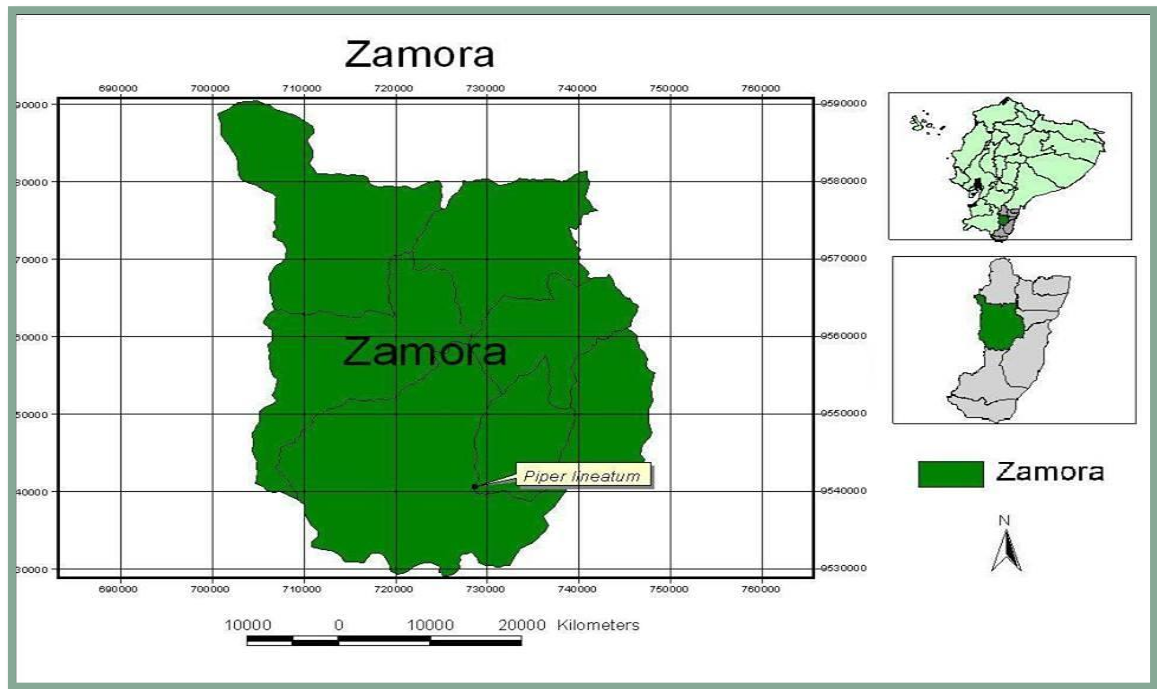


Figura 3. Área de recolección de la especie *Piper lineatum*

Elaboración: PhD. Vladimir Morocho UTPL

La identificación botánica de la planta fue realizada por el Ing. Bolívar Merino, la muestra botánica fue depositada en el Herbario del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja con voucher PPN-809.

La materia vegetal fue recolectada en estado de floración en su hábitat natural. Se realizaron tres recolecciones, una cada mes, se inició el 10 de diciembre del 2013, la segunda recolección se realizó el 15 de enero del 2013, y la última recolección se realizó el 11 de febrero del 2014. Las recolecciones se hicieron en sacos de lona, luego fueron transportadas al laboratorio de la U.T.P.L, en donde se realizó el tratamiento post-cosecha en donde fueron eliminadas las impurezas, y la parte aérea que no estaba en buen estado.



Figura 4. Planta de *Piper lineatum*

Fuente: Merino, G.

2.2 . Determinación de la humedad.

Se utilizaron las hojas de *Piper Lineatum* en estado fresco, primero fueron cortadas en partes pequeñas obteniendo así una muestra más homogénea, luego se pesó 1 g de muestra de cada destilación para proceder con el proceso de humedad que está descrito en el anexo 1. Una vez obtenidos los resultados de la humedad de las muestras de las tres destilaciones, se calculó la humedad de la planta.

2.3 . Extracción del aceite vegetal.

Para realizar la extracción del aceite vegetal de *Piper Lineatum* primero se hizo un tratamiento post-cosecha, el que consistía en eliminar la parte aérea en mal estado para luego proceder a la destilación por arrastre con vapor de agua.

La destilación de la planta tuvo duración de aproximada de 4 horas, y la cantidad utilizada fue de 1,5 kg por cada destilación.

A la mezcla que contiene el producto que se pretende separar, se le adiciona un exceso de agua, y el conjunto se somete a destilación. En el matraz de destilación se recuperan los compuestos no volátiles y/o solubles en agua caliente, y en el matraz colector se obtienen los compuestos volátiles e insolubles en agua.

Para la destilación se utilizó un equipo de destilación tipo Clavenger (Figura 5) el cual consta de un fondo de placa perforada donde es colocado el material vegetal, debajo de este se coloca agua la que al momento de empezar la ebullición se transforma en vapor entra en contacto con el material vegetal arrastrando los componentes volátiles presentes en la planta para luego pasar por el condensador, obteniéndose así la mezcla de agua y aceite que se separa por diferencia de densidades en un florentino. Una vez separado se colecta el material en una probeta, se mide el volumen, lo colocamos en frascos color ámbar y lo almacenamos bajo refrigeración a menos 4°C para su posterior análisis.



Figura 5. Destilación del aceite de *Piper lineatum*

Fuente: Merino, G.

2.4. Determinación del Rendimiento.

Para la determinación del rendimiento se hizo una relación de la cantidad (ml) de aceite esencial obtenido en cada una de las destilaciones con la cantidad de materia utilizada, empleando la fórmula que se detalla en el Anexo 2.

2.5. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.

2.5.1. Densidad relativa.

La densidad es una magnitud física que relaciona la cantidad de materia existente con el volumen que ocupa, a una determinada temperatura y presión atmosférica. La densidad del aceite esencial se determina tomando como referencia al agua. Según la norma AFNOR NF

T 75-111 (ver anexo 3), los materiales necesarios para determinar la densidad son un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un termómetro. Para determinar la densidad relativa del aceite esencial de *Piper lineatum*, se unió las tres muestras de aceites esenciales provenientes de cada destilación, este procedimiento se realizó a una temperatura de 20°C con tres repeticiones (Figura 6).



Figura 6: Determinación de la densidad relativa a) Picnómetro con agua y b) Picnómetro con aceite.

Fuente: Merino, G.

2.5.2. Índice de Refracción.

La determinación del índice de refracción se lo realizo en base a la norma AFNOR NF T 75-112 (ver anexo 4) del aceite esencial; se utilizó un refractómetro ABBE, que es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de una propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada de 20°C.



Figura 7. Refractómetro ABBE

Fuente: Merino, G.

2.6. Determinación de la composición química del aceite vegetal.

2.6.1. Cromatografía de gases

La identificación de los componentes químicos de *Piper Lineatum* se hizo mediante la técnica de Cromatografía de gases (Agilent 6890 Series) acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent 5973 series inerte) CG-EM y al Detector de Ionización de Llama CG-FID, dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB-5ms y una polar HP-INNOWAX, con el fin de obtener resultados cualitativos y cuantitativos.



Figura 8: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N

Fuente: Laboratorio del Departamento de Química

2.6.1.1. Preparación de las muestras

Previo a la preparación de las muestras, se verificó que no tengan remanentes de agua y aquellas que presentaban dichos remanentes recibieron tratamiento, se les colocó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) en cantidades equivalentes al agua introducida, luego se dejó reposar por treinta minutos y se trasvasó a nuevos recipientes. Rotulando correctamente para proceder a preparar las muestras que van a ser analizadas.

Las muestras de análisis se prepararon en un vial de cromatografía debidamente codificado, en el cual se colocó 990 μL de diclorometano, y 10 μL del aceite esencial de *Piper Lineatum*, obteniéndose una concentración del 1% (v/v) de aceite esencial.

2.6.1.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas.

La corrida cromatográfica se realizó con una mezcla de hidrocarburos de C10 (decano) a C25 (pentacosano), conocidos en el mercado como TPH-6RPM de CHEM SERVICE. Las condiciones de trabajo se describen en la Figura 9.

PARÁMETROS OPERACIONALES

Inyector

- ✓ Temperatura inicial: 250 °C
 - ✓ Modo: Split
- ✓ Radio de Partición: 50:1
- ✓ Temperatura final: 250 °C
- ✓ Volumen de inyección: 1 µL

Horno

- ✓ Temperatura inicial: 50 °C
- ✓ Tiempo inicial: 3 min
 - ✓ Rampa: 3 °C/min
- ✓ Temperatura final: 230 °C

Columna

- ✓ Capilar DB-5MS
- ✓ Temperatura máxima: 350 °C
 - ✓ Modo Flujo: constante
 - ✓ Flujo inicial: 0.9 mL/min
- ✓ Presión inicial nominal: 6.50 psi
 - ✓ Presión de salida: vacío
- ✓ Velocidad promedio 35 cm/seg

Detector

- ✓ Temperatura 250 °C
- ✓ Tipo de gas Nitrógeno

Figura 9. Parámetros operacionales para la columna DB-5 MS acoplada a espectrometría de masas

Fuente: Merino, G.

2.6.1.3 .Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite esencial de *Piper Lineatum* en la columna polar HP-INNOWAX se indican en la Figura 10.

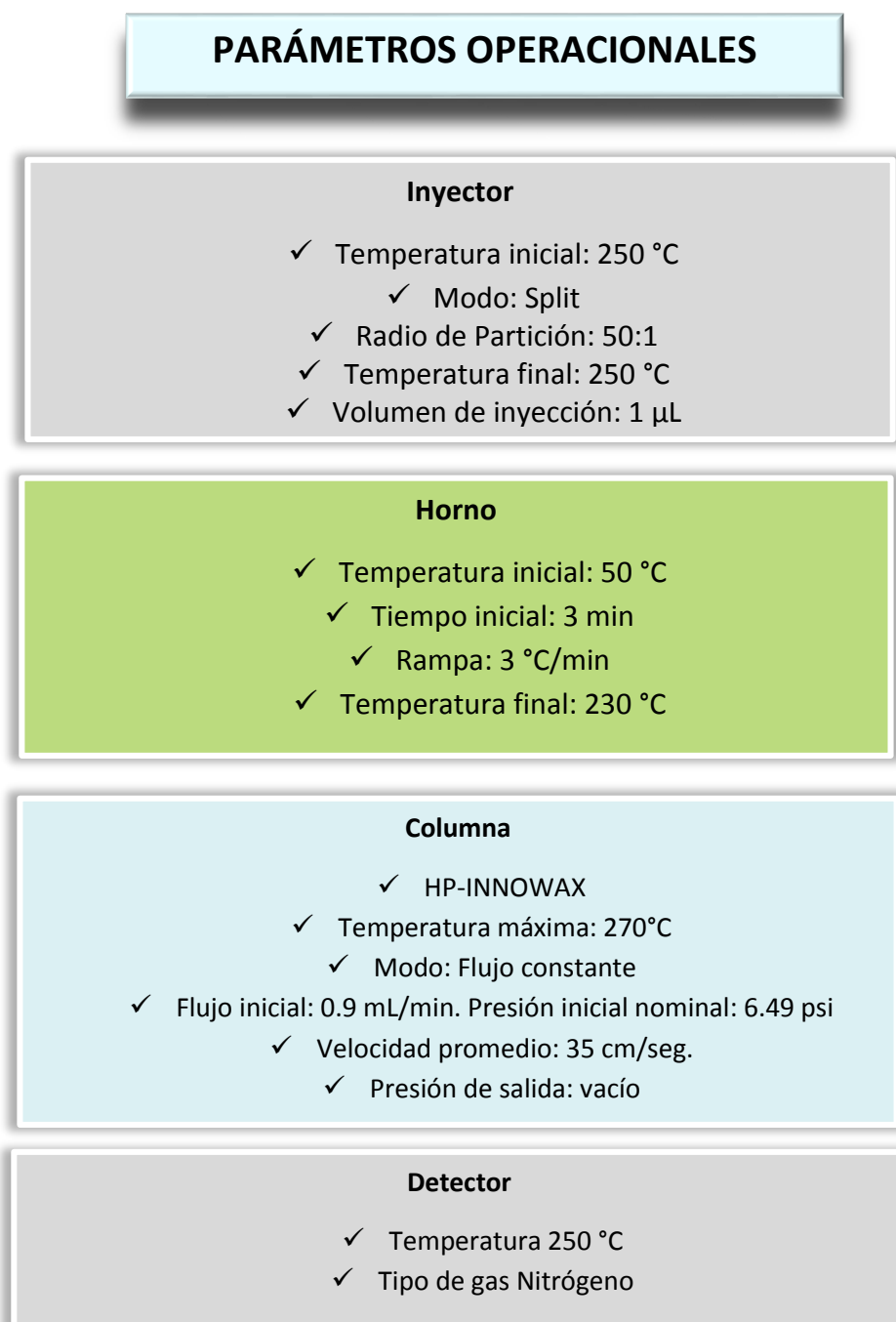


Figura 10. Parámetros operacionales para la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.

Fuente: Merino, G.

2.6.1.4 . Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama FID.

El detector de ionización de llama (CG-FID) es uno de los detectores más usados en la cromatografía de gases, es un detector especialmente apropiado para medidas cuantitativas. En la Figura 11 se encuentran los parámetros operacionales con los que se inyectaron las muestras del aceite de *Piper Lineatum*.

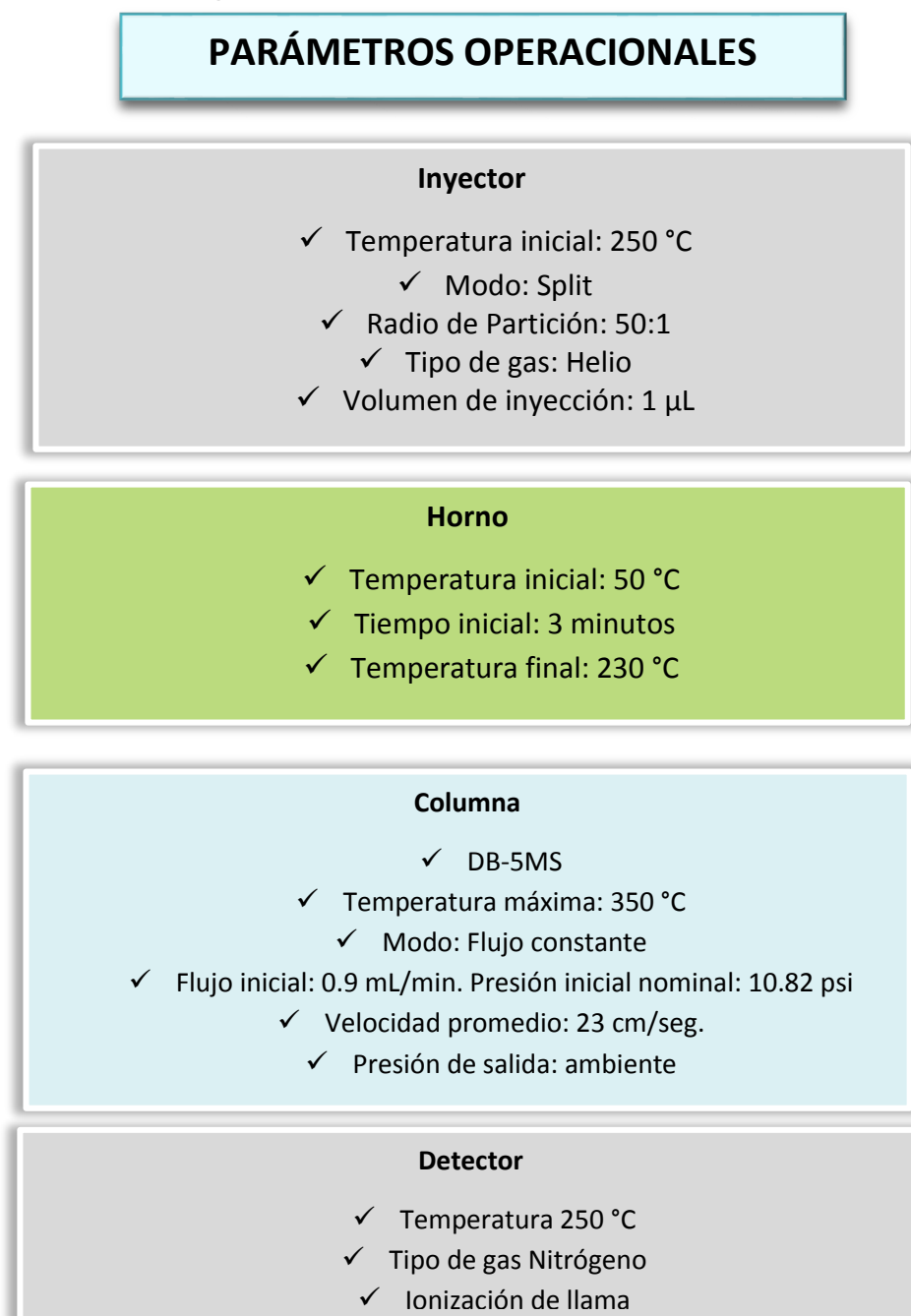


Figura 11. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS

Fuente: Merino, G.

2.6.1.5. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama FID.

Para la corrida cromatográfica por Cromatografía de Gases acoplada al detector de llama CG-FID, en columna HP-INNOWAX, se inyectaron los hidrocarburos y las muestras de aceite esencial de *Piper Lineatum*, en la Figura 12 se indican los parámetros usados.

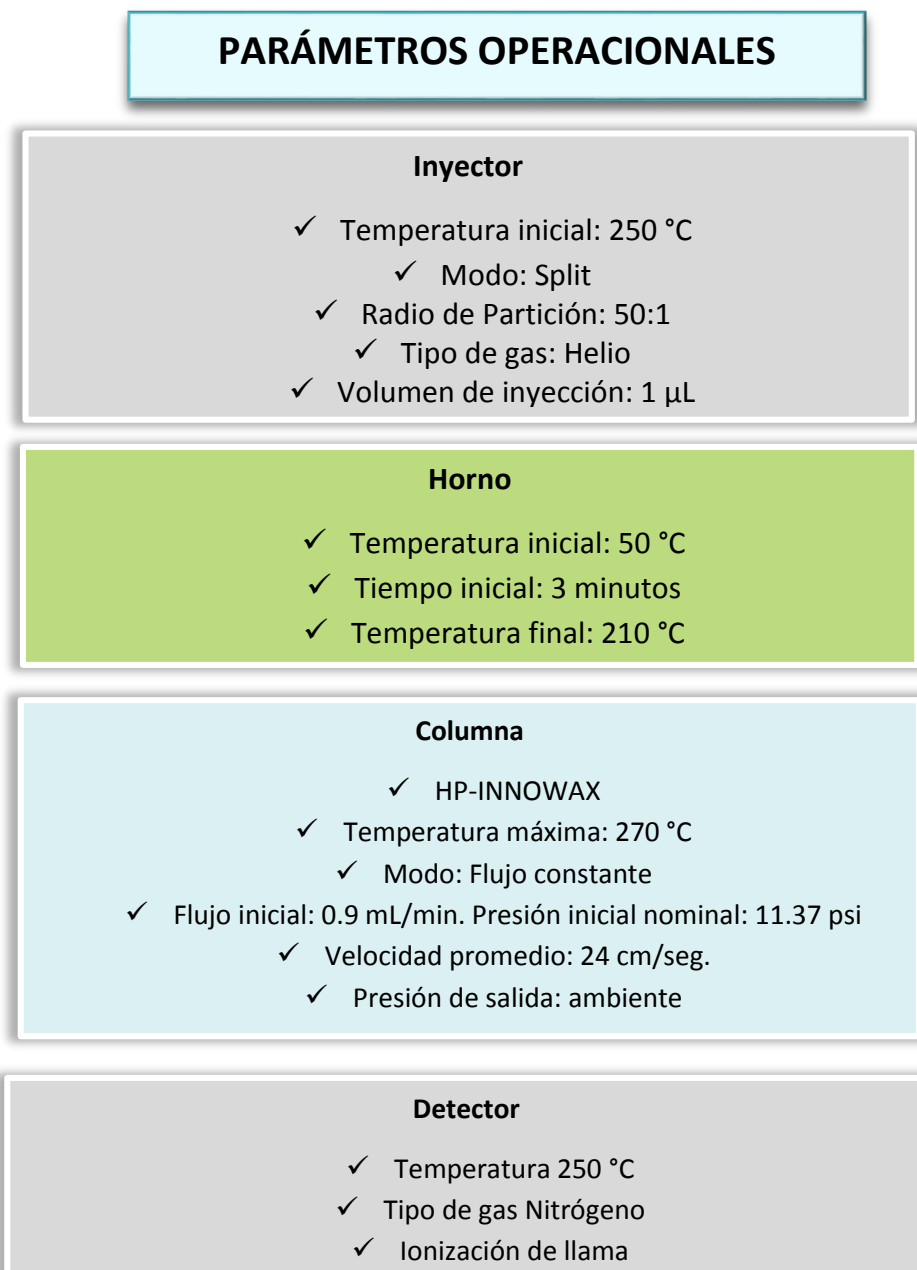


Figura 12. Parámetros operacionales para CG-FID en la columna Hp-Inowax

Fuente: Merino, G.

2.6.2. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite de *Piper Lineatum*, tanto en la columna polar como en la columna apolar.

Se procedió a integrar para obtener así un determinado número de compuestos en cada una de las muestras, esto se lo hizo en el sistema de integración Chemstation Integrator autoint1.e propio del equipo, para luego trabajar con los picos obtenidos.

Una vez obtenidos los cromatogramas se procedió a calcular el índice de Kovats (IK), que es un método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla. Se utilizó la siguiente ecuación:

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

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats.

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

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

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

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

Una vez obtenidos los valores de los (IK) de los diferentes compuestos de las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como en la columna apolar, se procede a comparar dichos valores obtenidos experimentalmente con valores de referencia de los mismos compuestos, para lo que se utiliza diferente bibliografía; la más utilizada (Adams, 2009); bases de datos electrónicas como Nist ("National Institute of Standards and Technology,") y diferentes artículos científicos. Se tomó en cuenta que la diferencia entre los Indices de Kovats obtenidos experimentalmente y los Indices de Kovats de referencia no tengan una diferencia mayor a 20 unidades.

Además de analizar un compuesto mediante la comparación de los índices de Kovats también se puede utilizar como referencia el espectro de masas característico de cada compuesto,

este espectro posee la información estructural de cada analito analizado. El equipo además de arrojar los tiempos de retención también compara los espectros de masas de cada compuesto con la base de datos del equipo, es decir con la librería Wiley 7n. 1. Los compuestos que el equipo analiza también poseen un número de registro CAS, que facilita aún más la búsqueda del material bibliográfico de referencia.

2.6.3. Identificación cuantitativa de los compuestos mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.

Para la identificación se usaron datos de hidrocarburos obtenidos en masas y en FID para obtener una recta la misma que con su ecuación nos ayuda a calcular los tiempos de retención de cada compuesto. Estos tiempos de retención que obtuvimos con la ecuación son comparados con los tiempos de retención que dio el equipo, para posteriormente irlos ajustando entre sí tanto en la columna polar como en la apolar.

2.7. Determinación de la actividad biológica.

La actividad biológica de los aceites fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo se hizo frente a diferentes cepas bacterianas y fúngicas y se calculó la Concentración mínima inhibitoria. Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar), y luego se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.

2.7.1. Microorganismos utilizados.

Se evaluó la actividad biológica de los aceites frente a 9 microorganismos patógenos, 2 cepas fúngicas y 7 cepas bacterianas. Las cepas utilizadas pertenecen a American Type Culture Collection (ATCC) Tabla 2, que es una organización norteamericana no gubernamental sin fines de lucro que se ocupa de la preservación de las muestras de cultivos celulares y microbiológicos y de la distribución de los cultivos a los centros y laboratorios de investigación en las comunidades académica, científica y médica.

Tabla 2. Microorganismos utilizados.

Microorganismos utilizados		
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-positivas	Hongos
<ul style="list-style-type: none"> ✚ <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 ✚ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 ✚ <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 ✚ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ✚ <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 	<ul style="list-style-type: none"> ✚ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ✚ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 	<ul style="list-style-type: none"> ✚ <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185 ✚ <i>Trichophytn rubrum</i> ATCC 28188

Fuente: American Type Culture

2.7.2. Método de microdilución en caldo.

Este método se basa en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Este método debe presentar concentraciones estandarizadas tanto de bacterias (5×10^5 UFC/mL) como de hongos (5×10^4 esporas/mL).

2.7.2.1. Preparación de la muestra.

Para la preparación de la muestra se utilizó una solución de 20 μL del aceite esencial en 980 μL de DMSO (dimetilsulfóxido), equivalente a 20mg/mL de muestra.

2.7.2.2. Preparación del cultivo bacteriano, “Cultivo Overnight”.

Para la preparación del inóculo bacteriano, previamente se realizó los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30 µL de cada cepa bacteriana, que se encontraban almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Posteriormente a realizar la siembra de cada cepa se incuban los medios por 14 – 16 horas a 37°C, por esta razón el cultivo se denomina overnight. Las condiciones necesarias para el crecimiento de cada bacteria y los medios de cultivo necesarios se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.

Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.		
Cepa bacteriana	Condiciones de incubación	Medio de cultivo
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo Nutritivo Oxoid
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo infusión cerebrocorazón
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Temperatura: 37°C Tiempo: 14- 16 horas	Caldo triptisoya

Fuente: American Type Culture

2.7.2.3. Preparación del inóculo bacteriano.

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

Luego, se la suspensión en solución salina se tomó 140µL y se inoculó en 6,86mL de Caldo Mueller Hilton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. De la suspensión 32 resultante se transfirieron 100µL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200µL, de tal forma que en cada pocillo la concentración final fue de 5×10^5 ufc/mL.

2.7.2.4. Procedimiento.

Para determinar la Concentración mínima inhibitoria, por medio del método de microdilución de caldo fue necesaria la limpieza y desinfección de la cámara de trabajo con alcohol etílico al 70% y la exposición a los rayos ultra violeta por 30 minutos con el objetivo de evitar cualquier tipo de contaminación.

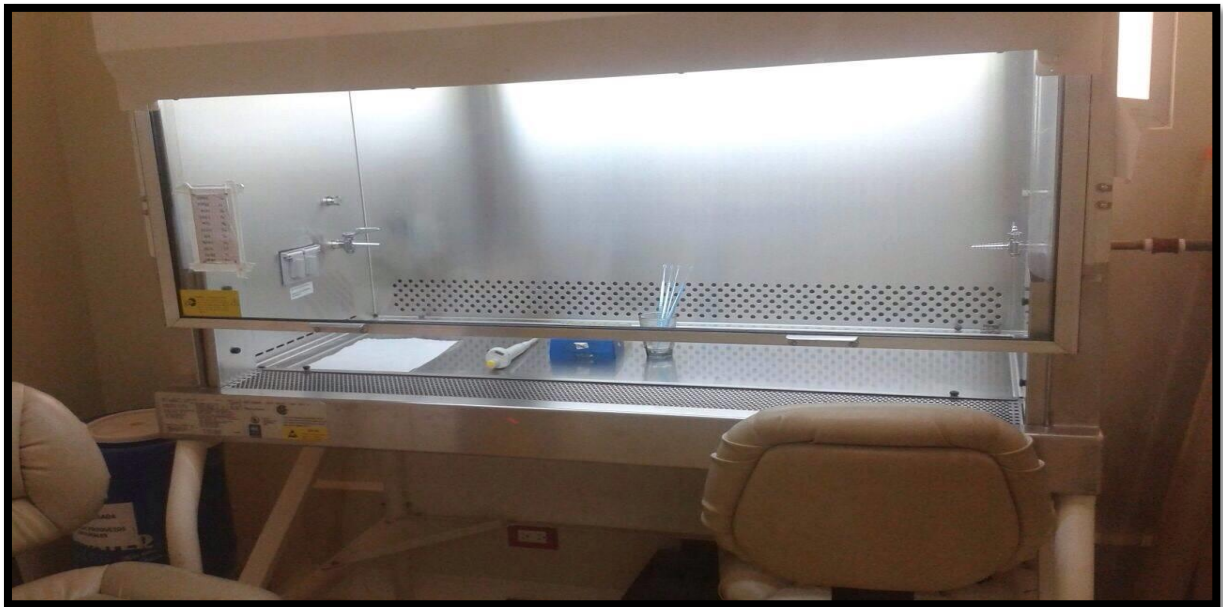


Figura 13. Cámara de trabajo

Fuente: Merino, G.

El método se realizó en placas de 96 pocillos mediante diluciones dobles seriadas; del caldo Mueller Hinton se transfirió 180 µL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocó 100 µL del mismo caldo. A continuación se colocó 20 µL de la dilución de aceite esencial más DMSO solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: el primero, 180 µL de caldo Mueller Hinton + 20 µL

de aceite diluido conocido como control de esterilidad, el segundo, un control negativo con 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de DMSO y finalmente en el tercero un control positivo, que es una mezcla de 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de Gentamicina de 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas las bacterias, excepto para *E. faecalis* y *S. tiphymurium* que se utilizó Gentamicina de 1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para que el medio y la solución de aceite se homogenicen correctamente, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila y se tomó 100 μL de la solución homogenizada, luego se diluyó con 100 μL del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desechan los 100 μL sobrantes, así la concentración final de cada solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 1000 a 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El mismo procedimiento fue aplicado con el control positivo, negativo y el control de esterilidad.

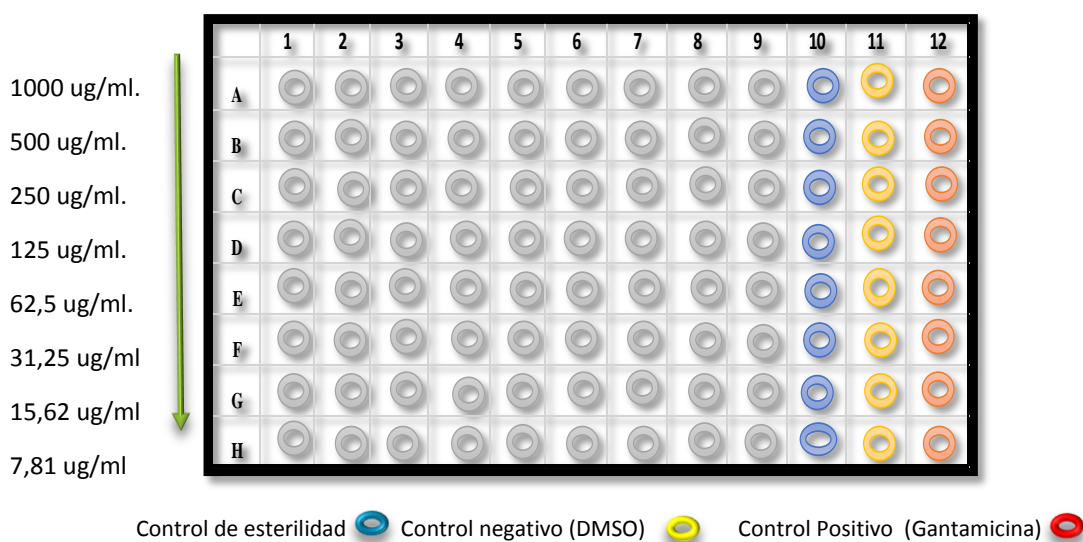


Figura 14. Microplaca TC96 con las diferentes concentraciones del aceite ug/ml

Fuente: Merino, G.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con 100 μL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos excepto en el control de esterilidad, completando así un volumen final de 200 μL , para cada pocillo; ajustando la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL. Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h, para su posterior lectura.

2.7.2.5. Actividad antifúngica.

La actividad antifúngica del aceite esencial se realizó igual que la actividad antibacteriana, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria aplicando el método de microdilución en caldo.

2.7.2.6. Preparación de la muestra.

Se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980µL de DMSO y 20µL del aceite esencial.

2.7.2.7. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos.

Se preparó la suspensión de los microorganismos fúngicos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), a partir de una reserva criogénica a -80°C. Se transfirió de las reservas fúngicas 14 µL a un tubo estéril con 7 mL de Caldo Sabouraud, de esta suspensión se tomó 100 µL para completar un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo con una concentración de 5×10^5 esporas/mL.

Tabla 4: Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo

Cepa de cultivo	Condiciones de cultivo	Medio de cultivo
<i>T. mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud	28°C por 24-72
<i>T. rubrum</i>	Caldo Sabouraud	28°C por 24-72

Fuente: American Type Culture

2.6.2.8 Procedimiento.

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo; en hongos esporulados es de 5×10^4 esporas/mL y los controles; el positivo que es una solución de 180 µL de caldo Sabouraud más 20 µL de Itraconazol de 0,39 µg/mL el control negativo que consta de 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de DMSO y finalmente Control de esterilidad, que contiene 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de aceite diluido. Cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, se sellan las cajas con parafilm y se incuban a 28°C por 96 horas.

2.7.2.9. Lectura de las placas e interpretación de resultados.

Posteriormente a retirar las placas de microdilución de la incubadora, se observa detalladamente cada caja utilizando luz reflejada, así podremos examinar el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación; si se diera el caso de que en el control de esterilidad se evidencia contaminación la prueba de CMI no puede ser interpretada y se debe repetir toda la prueba.

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

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

2.8. Determinación de la actividad antioxidante.

La determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper lineatum*, se evaluó mediante dos métodos espectrofotométricos: ABTS+ y DPPH, para cada uno de ellos se realizaron modificaciones en el procedimiento relacionados a las concentraciones de las muestras y el empleo de dos estándares de referencia “Trolox y Butilhidroxitolueno (BHT)” con la finalidad de comparar la actividad antioxidante de las muestras frente a ellos. Las mediciones se determinaron según la absorbancia que reportó el equipo de cada muestra para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907. Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515 nm respectivamente.

2.8.1. Preparación de las muestras.

Para analizar la muestra se trabajó con 5 mg del aceite esencial, con el que se procedió a realizar las diluciones respectivas, la primera dilución que se realizó fue partiendo de una concentración máxima inicial de 1000 ppm, hasta llegar a una concentración mínima final de 5 ppm, ya que la concentración 0 ppm solo contiene metanol.



Figura 15: Frascos color ámbar con las diferentes concentraciones que van a ser utilizadas.

Fuente: Merino, G.

Los volúmenes respectivos de cada dilución deben ser los necesarios para analizar cada muestra por triplicado. En la tabla 5, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 5000 μL .

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución en aceite.

Volumen necesario para cada dilución.	
<i>Concentración</i>	<i>Volumen de cada dilución</i>
Concentración 1 (1000 ppm)	5000 μL MeOH + 5 mg de aceite esencial
Concentración 2 (500 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 1
Concentración 3 (100 ppm)	4000 μL MeOH + 1000 μL de concentración 2
Concentración 4 (50 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 3
Concentración 5 (25 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 4
Concentración 6 (12,5 ppm)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 5
Concentración 7 (5 ppm)	3000 μL MeOH + 2000 μL de concentración 6
Concentración 8 (0 ppm)	5000 μL MeOH

Fuente: Merino, G.

2.8.2. Método ABTS+ (Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+).

El método ABTS+ [ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozalin-6 sulfónico)], consiste en formar un radical catiónico ABTS+ (verde- azulada) basándose en la acción oxidativa de peroxidases u oxidases sobre ABTS+ (Barrero et al., 2004).

2.8.2.1. Solución patrón y de trabajo

Para realizar la solución patrón se pesó 40.6 mg de ABTS+ y 7.028mg de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), luego se aforó cada uno de los reactivos con 10 mL de agua destilada. Estos dos reactivos se mezclaron y se dejó reposar por 12 horas protegidos de la luz.

Transcurridas las 12 horas de reposo, se tomó de esta solución una alícuota de 3.67 mL añadida a 220mL de metanol hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 a 734nm. Si la lectura de la absorbancia es menor al resultado que se desea obtener se debe añadir más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a la esperada se

debe añadir metanol. Previo a lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se procedió a encerrar el equipo con metanol.

2.8.2.2 Trolox y BHT.

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

Se pesó 25 mg de Trolox y 25 mg de BHT se aforó a 100 mL de metanol. En la tabla 6, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada uno es de 5000 μ L.

Tabla 6. Volumen necesario para cada dilución en Trolox y BHT.

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

Fuente: Merino, G.

2.8.2.3. Lectura de muestras.

Para determinar si el aceite esencial de *Piper lineatum* posee capacidad antioxidante, se debe evaluar cada muestra con suma precisión, tanto para cada dilución que se realizó anteriormente del aceite esencial como para cada alícuota de Trolox y BHT. De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se tomaron 150 μ L y se llevó a tubos de ensayo rotulados previamente, donde se le adicionó 2850 μ L de la solución ABTS+ dando un volumen de 3 mL, se dejó reposar por dos horas en obscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de aceite esencial (Figura 16).



Figura 16. Muestras del aceite *Piper Lineatum* analizadas mediante método ABTS+.

Fuente: Merino, G.

2.8.3. Método DPPH+.

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos antioxidantes de la muestra del aceite esencial. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando la muestra que se añade posee capacidad antioxidante. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trolox y BHT. Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método (Conde, Rueda, & Patiño, 2012).

2.8.3.1. Solución patrón y de trabajo.

La solución patrón se realizó pesando 24 mg de reactivo de DPPH y se aforó a 100 mL de metanol la misma fue almacenada a -4°C hasta su uso, de esta solución se tomaron 38mL y se adicionaron 216 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustando hasta obtener una lectura de 1.1 ± 0.02 . Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución de trabajo.

2.8.3.2. Trolox y BHT.

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

2.8.3.3. Lectura de muestras.

Al igual que al realizar la parte experimental del método de ABTS+, en este método también se utilizó las diferentes concentraciones del aceite esencial (ver tabla 4) y diferentes concentraciones del estándar Trolox y BHT (ver tabla 5).

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. De cada muestra se transfirieron 150 µL a un vial color ámbar ya que debe estar protegido de la luz. Este vial contiene también 2850 µL de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, estos viales se dejan reposar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se lee la absorbancia de cada muestra a 515 nm (Figura 17).

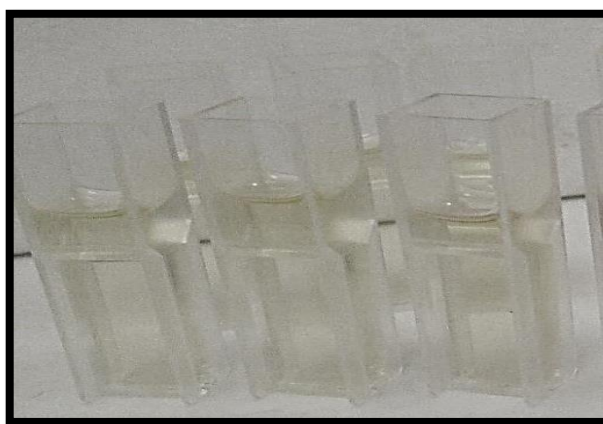


Figura 17. Muestras del aceite *Piper lineatum*, analizadas mediante el método DPPH.

Fuente: Merino, G.

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

Las absorbancias determinadas mediante el método ABTS+ y DPPH, de cada muestra de aceite esencial evaluada a diferentes concentraciones, permiten calcular el porcentaje de inhibición empleando la fórmula de la Figura 18.

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

Figura 18. Ecuación utilizada para calcular porcentaje de inhibición.

Fuente: (Conde et al., 2012)

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

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

Al igual que las muestras de aceite esencial se determinó el CI_{50} del estándar Trolox a partir de la gráfica lineal de concentración vs % de inhibición.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Humedad.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la humedad relativa de esta especie, donde para cada recolección el procedimiento se realizó por triplicado. Se indican también los valores de la media, desviación estándar y del coeficiente de variación.

Tabla 7. Porcentaje de humedad de la materia vegetal.

	HUMEDAD (%)	\bar{X}	σ	C.V
PL 1	60,60	60,16	0,48	0,80
PL 2	59,65			
PL 3	60,23			

PP: Piper lineatum ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección.
 \bar{X} : Media aritmética de las tres recolecciones
 σ : Desviación estándar
CV: Coeficiente de Variación

Fuente: Merino, G.

Cada recolección tuvo una humedad relativa diferente, pero similar obteniendo así una media de 60,16 % con lo que se puede afirmar que la humedad coincide con lo expresado por Sharapin (2000) Las plantas aromáticas tienen humedades que oscilan entre 60-80% en estado fresco.

La diferencia en los valores de humedad de las muestras se puede atribuir a las condiciones ambientales a las que la planta estaba sujeta al momento de la recolección como: temperatura, viento, CO₂, el manejo de nutrientes y el desarrollo de la planta al momento de las recolecciones (Margulis & Sagan, 2012).

3.2. Rendimiento.

El rendimiento del aceite esencial extraído de *Piper lineatum*, se indica en la tabla 8, el promedio del rendimiento para cada recolección resulta de la media de las tres repeticiones.

Tabla 8. Rendimiento del aceite de *Piper lineatum*.

	PESO (gr)	VOLUMEN (ml)	RENDIMIENTO	\bar{X}	Σ	C.V
PL 1	1500	5	0,33			
PL 2	1500	4,5	0,30	0,32	0,02	6,25
PL 3	1500	5	0,33			

PP: Piper lineatum ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección.

\bar{X} : Media aritmética de las tres recolecciones

σ : Desviación estándar

CV: Coeficiente de Variación

Peso: gramos que se utilizó en cada destilación.

Volumen: ml que se recolectó en cada destilación

Fuente: Merino, G.

En las tres destilaciones se utilizaron 1,5 kg. De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto fue de 0,33% que se obtuvo de las muestras de la primera y tercera recolección, y el rendimiento más bajo fue de 0,30% obtenido de la muestra de la segunda muestra. Teniendo como resultado una cantidad de 5 ml de aceite vegetal en la primera y tercera recolección, y una cantidad de 4,5 ml de aceite vegetal en la segunda muestra.

El rendimiento promedio de las tres destilaciones de *Piper lineatum* fue de 0,32 % que es bajo según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED), dado que valores menores a 5 mL/kg los considera bajos, valores entre 5 mL/kg y 10 mL/kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/kg altos (Morales, González, Ladio, & Agueda Castro, 2009).

Cabe mencionar que el rendimiento de una planta puede variar debido a diferentes condiciones como el estado fenológico, los factores químicos y físicos a los que estaba sometida la planta al momento de la recolección; y las condiciones que estuvieron controladas en este estudio.

3.3. Propiedades físicas.

El aceite esencial de *Piper lineatum* es un líquido viscoso de color amarillo tenue.

3.3.1. Densidad Relativa.

Para determinar la densidad relativa del aceite de *Piper lineatum*, primero se hizo una muestra única uniendo el aceite esencial de las tres destilaciones para luego comparar con agua que tiene una densidad relativa de 1 g / cm³. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Densidad relativa del aceite de *Piper lineatum*.

REPETICIONES	Densidad (g/ cm ³)	\bar{X}
PL 1	0,8802	0,8792
PL 2	0,8921	
PL 3	0,8653	

PP: *Piper lineatum* ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección.
 \bar{X} : Media aritmética de las tres recolecciones

Fuente: Merino, G.

La media de la densidad obtenida del aceite de *Piper lineatum* fue de 0,8792 g / cm³, similar a las densidades de otros aceites de la misma familia como el aceite esencial extraído de las hojas de *P. aduncum* subsp. *Ossanum* con una densidad de 0,87 g /cm³. La composición química del aceite esencial influye mucho en la densidad relativa del mismo, ya que al estar compuesta principalmente por terpenos, sesquiterpenos o monoterpenos, forman cadenas o anillos, que tienen menor densidad que la sustancia que se utilizó como referencia, que en este caso fue el agua (Ortuño, 2006).

3.3.2. Índice de refracción.

El índice de refracción del aceite de *Piper lineatum* se muestra en la tabla 10, obtenidos de las tres muestras de los aceites.

Tabla 10. Índice de refracción del aceite de *Piper lineatum*.

REPETICIONES	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	\bar{x}
PL 1	1,6964	1,6918
PL 2	1,6854	
PL 3	1,6935	

PP: *Piper lineatum* ; 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera Recolección.
 \bar{X} : Media aritmética de las tres recolecciones

Fuente: Merino, G.

El promedio del índice de refracción fue de 1,6918. Esta propiedad física es propia de cada especie y solo puede ser alterado si el aceite esencial se mezcla con otras sustancias o es disuelto en algún compuesto (Ortuño, 2006).

3.4. Composición Química del Aceite Esencial de *Piper lineatum*.

La composición química del aceite de *Piper lineatum* se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) y al detector de ionización en llama (CG-FID), utilizando las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX.

En la figura 19 y 20 respectivamente se indican los perfiles del cromatograma del aceite esencial de *Piper lineatum* obtenidos en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX, mediante la técnica CG-EM conforme a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

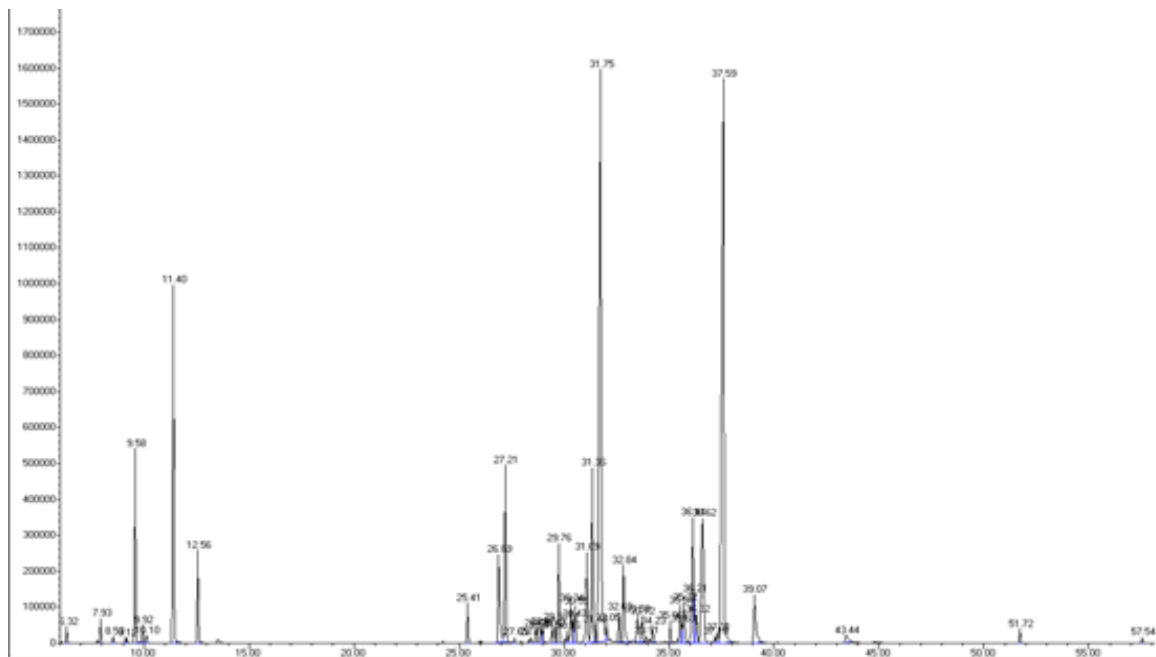


Figura 19. Perfil cromatográfico del aceite *Piper lineatum* en la columna no polar DB-5MS.

Fuente: Merino, G.

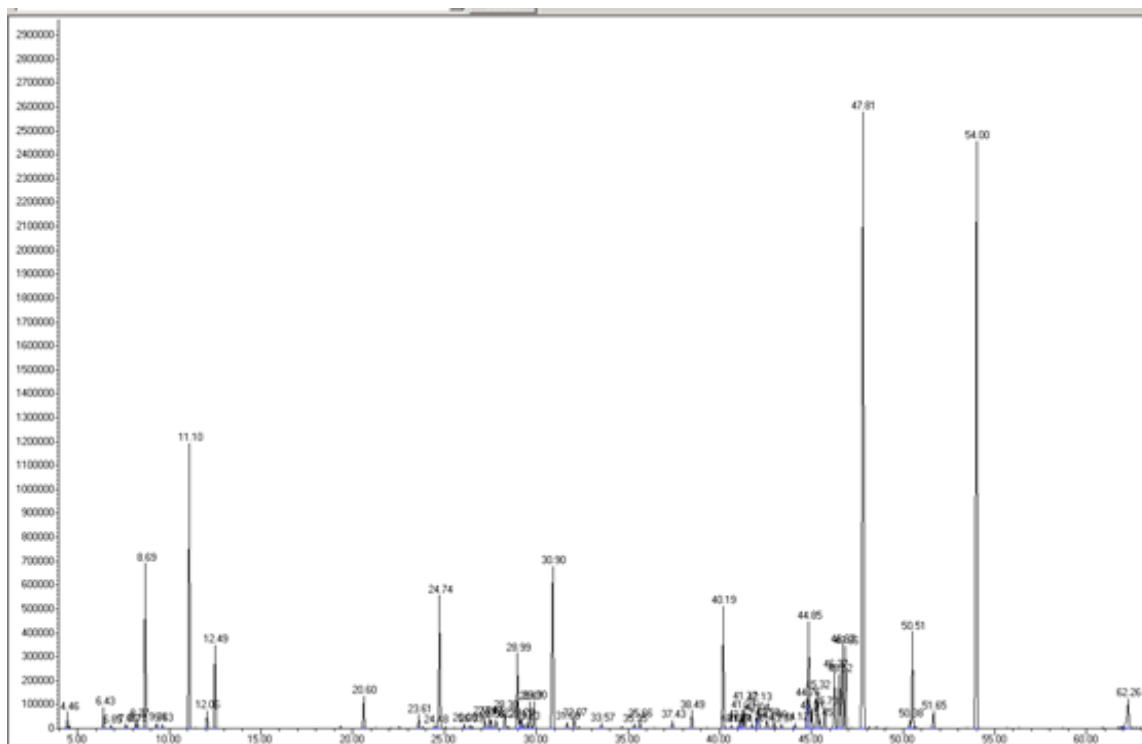


Figura 20. Perfil cromatográfico del aceite *Piper lineatum* en la columna polar HP-INNOWAX.

Fuente: Merino, G.

En el cromatógrafo se observan los diferentes tiempos de retención que tardaron cada uno de los compuestos en recorrer la columna, asignando así para cada uno de dichos compuestos un pico. El tamaño de los picos y el tiempo de retención establecen la determinación cuantitativa y cualitativa de cada compuesto respectivamente; en los cromatogramas se presentan demasiados picos y muy próximos, por lo que es difícil su identificación total, de tal manera que los compuestos resultantes se integraron para obtener una identificación más exacta.

Para realizar una separación cromatográfica óptima, debe evitarse en lo posible, el ensanchamiento de las bandas debido a la dispersión; en efecto, cuanto más anchas sean las bandas, menor número de ellas podrán ser resueltas en un espacio de tiempo dado; es decir, mientras más agudos son los picos que emergen de una columna mejor estará actuando dicha columna.

En la figura 21 se indican los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Piper lineatum* en la columna DB-5MS, en la que se obtuvieron 6 compuestos mayoritario entre los que tenemos: apiole (21,483), safrole (19,161), myristicin (13,776), 1,8 cineole (8,914), γ -terpinene (4,230) y B-ocimene, trans (3,193).

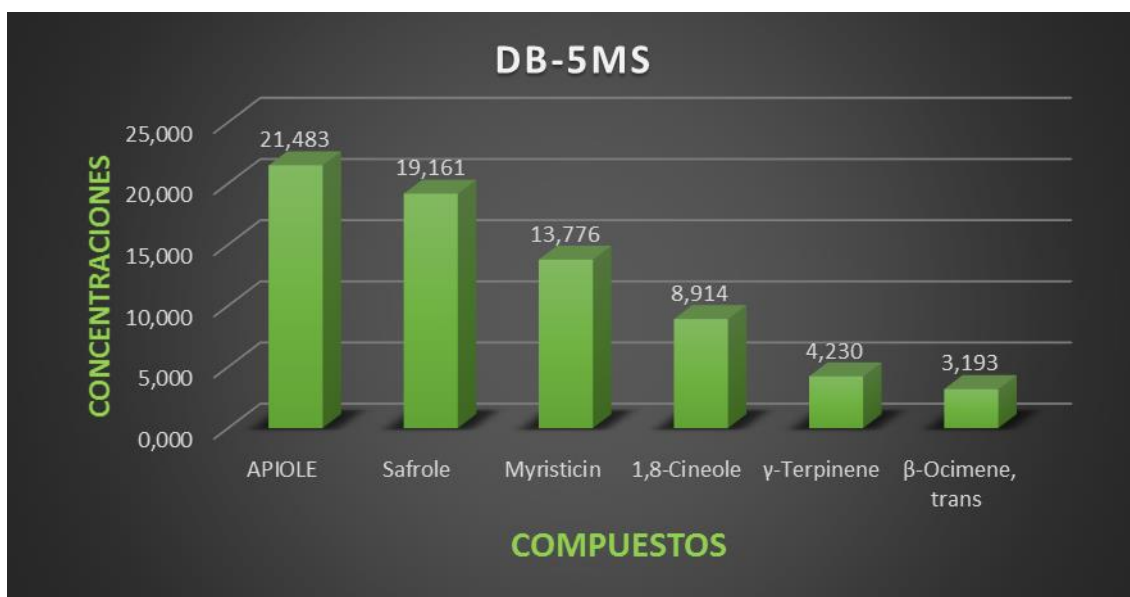


Figura 21: Compuestos mayoritarios en la columna DB-5MS

Fuente: Merino, G.

En la figura 22 se indican los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Piper lineatum* en la columna HP-INNOWAX, en la que se obtuvieron 6 compuestos mayoritario entre los que tenemos: apiole (26,256), safrole (17,374), myrcene (14,748), 1,8 cineole (8,127), γ -terpinene (3,654) y B-ocimene, trans (3,549).



Figura 22: Compuestos mayoritarios en la columna HP-INNOWAX

Fuente: Merino, G.

No se han encontrado estudios realizados en aceite esencial de *Piper lineatum* pero si hay estudios en especies de la misma familia *Piperaceae*, en donde se encuentran resultados similares a los obtenidos en estudios acerca de la composición química de varios aceites esenciales del género *Piper*, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides. Los trabajos relacionados con la composición de *P. auritum* coinciden con la presencia de safrol como componente mayoritario (Guerrero & Villamil, 2014).

También se informó como constituyente principal del aceite esencial de *Piper rubrum* el safrol, encontrándose en un rango de 70 a 85 % de la composición total (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009). Recientemente en el estudio de la Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* plantearon que el aceite esencial de esta especie contiene una fracción oxigenada como componente mayoritario, la cual es rica en safrol, myristicin, 1,8 cineole y acetato de terpineol, así como una fracción hidrocarbonada rica en sesquiterpenos (Blanco, Ramos, & Vizoso, 2006).

En el país de Colombia, el aceite esencial de las hojas de *P. auritum*, obtenido mediante hidrodestilación con equipo Clevenger a partir del material vegetal seco, presentó un 64,5% de safrol como principal componente. Se destaca además la presencia de b-cariofileno (4,65 %), germacreno (3,11 %), cis-nerolidol (2,8%), linalol (2,29%), γ-terpinene (2,19%), terpinoleno (1,87 %), α-terpineno + p-cimeno (1,79%), b-pineno (1,45%) y biciclogermagreno (1,26%); la mayoría de ellos presentes en el aceite evaluado, aunque en diferentes proporciones (Sánchez et al., 2009).

3.4.1. Análisis cualitativo.

El análisis cualitativo se realizó con una comparación directa de los IK (índices de Kovats) obtenidos experimentalmente y los IK reportados en la literatura, en ambas columnas; en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX. Los espectros de masa de cada compuesto se basaron en la información que nos proporcionó la base de datos del equipo (Wiley 7n.1). Y los tiempos de retención experimentales se determinaron en base a la serie homóloga de alcanos (C10 a C25).

En la Tabla 19 se describe la composición química de los compuestos que se identificaron en el aceite esencial de *Piper lineatum*, los mismos que están dispuestos de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS. Se indican los IK calculados y referidos, el porcentaje promedio relativo para cada compuesto en las dos columnas (DB-5MS y HPINNOWAX) correspondiente a cada una de las destilaciones, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los compuestos que se encuentran resaltados, son los que presentaron mayor área.

Tabla 11. % de la cantidad relativa de cada compuesto en las columnas: DB-5MS-Masas- FID, HP-INNOWAX-Masas-FID

No	COMPUESTOS	DB5- MASAS								HP-INNOWAX							
		IK ^C	IK ^R	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V	IK ^C	IK ^R	% DE CANTIDAD RELATIVA			\bar{X}	σ	C.V
				PL 1	PL2	PL3						PL 1	PL2	PL3			
1	α -Pinene	933	932	1,247	2,819	1,660	1,908	0,815	0,427	1035	1035	0,889	3,01	1,818	1,905	1,062	0,557
2	Camphene	947	946	0,039	0,044	0,042	0,003	0,074	1066	1071	0,053
3	β -Pinene	973	974	1,607	2,442	1,390	1,813	0,556	0,306	1101	1105	1,140	2,54	1,497	1,725	0,726	0,421
4	myrcene	988	988	0,250	0,528	0,301	0,360	0,148	0,412	2273	2240	10,860	11,24	22,143	14,748	6,408	0,434
5	α -Phellandrene	1003	1002	0,319	0,363	0,495	0,392	0,091	0,233	1158	1155	0,232	0,40	0,631	0,422	0,200	0,474
6	α -Terpinene	1013	1014	5,797	0,232	0,046	2,025	3,268	1,614	1174	1163	6,193	0,26	0,058	2,170	3,485	1,606
7	o-Cymene	1021	1022	0,946	1269	1278	0,662	0,04	0,349	0,442	1,268
8	1,8-Cineole	1028	1026	11,185	6,644	8,914	3,211	0,360	1203	1211	10,165	6,09	8,127	2,882	0,355
9	β -Ocimene, cis	1034	1032	1,086	1,251	1,168	0,117	0,100	1235	1236	1,287	1,58	1,435	0,210	0,147
10	β -Ocimene, trans	1044	1044	2,970	3,417	3,193	0,316	0,099	1252	1251	3,207	3,89	3,549	0,485	0,137
11	γ -Terpinene	1054	1054	9,783	2,740	0,167	4,230	4,978	1,177	1243	1232	10,311	0,52	0,131	3,654	5,768	1,578
12	Terpinolene	1081	1086	2,478	0,123	0,077	0,893	1,373	1,538	1280	1265	2,635	0,14	0,087	0,953	1,458	1,530
13	Linalool	1101	1095	0,856	1559	1552	1,075
14	α -Terpineol	1169	1186	0,115	0,079	0,097	0,026	0,811	1704	1697	0,993	0,49	0,743	0,353	0,475
15	Terpinene-4-ol	1177	1174	0,071	0,071	0,071	0,000	0,005	1606	1600	0,139	0,10	0,120	0,027	0,222
16	Safole	1287	1285	9,459	28,863	19,161	13,721	0,716	1880	1874	24,400	10,35	17,374	9,936	0,572
17	δ -Elemene	1324	1335	0,123
18	Cresol isobutyrate p	1325	1305	0,119
19	α -Cubebene	1340	1345	0,028	0,053	0,041	0,017	0,428
20	Isosafrole (E)	1359	1373	0,031	0,069	0,050	0,026	0,525
21	α -Copaene	1367	1374	0,531	0,205	0,417	0,384	0,166	0,431	1483	1471	0,565	0,21	0,311	0,361	0,185	0,512
22	β -Cubebene	1380	1387	0,049
23	β -Elemene	1382	1389	0,203	0,168	0,185	0,025	0,134
24	Methyleugenol	1401	1403	3,091	3,091	2025	2030	1,325	0,11	0,719	0,857	1,191
25	(E)- β -Caryophyllene	1408	1417	1,205	1,639	2,843	1,896	0,849	0,448	1588	1593	2,711	1,48	1,961	2,050	0,621	0,303
26	β -Cubebene	1419	1387	0,128	0,020	0,051	0,066	0,056	0,837
27	β -Gurjunene	1420	1431	0,064	0,017	0,020	0,034	0,026	0,776	1521	1544	0,044
28	β -Elemene	1427	1389	0,021	0,017	0,019	0,003	0,143
29	α -Humulene	1445	1452	0,581	0,801	0,691	0,155	0,225	2030	1625	0,142	0,09	0,114	0,039	0,338
30	GERMACRENE-D	1471	1484	1,522	1,400	2,090	1,671	0,368	0,220	1700	1700	1,595	1,22	1,467	1,428	0,189	0,133
31	Viridiflorene	1478	1496	0,075	0,144	0,110	0,049	0,446
32	Cadina-1(10),4-diene	1485	1475	1,404	1,402	1,851	1,552	0,259	0,167
33	δ -Amorphene	1496	1511	2,302	1,609	1,955	0,490	0,251	1682	1681	0,346	0,37	0,055	0,256	0,174	0,681

No	COMPUESTOS	DB5- MASAS								HP-INNOWAX							
				% DE CANTIDAD RELATIVA								% DE CANTIDAD RELATIVA					
		IK ^C	IK ^R	PL 1	PL2	PL3	\bar{X}	σ	C.V	IK ^C	IK ^R	PL 1	PL2	PL3	\bar{X}	σ	C.V
34	δ -Cadinene	1509	1522	0,506	0,249	3,886	1,547	2,030	1,312	1753	1755	4,253	0,38	0,373	1,667	2,240	1,343
35	Myristicin	1519	1517	11,893	12,831	16,604	13,776	2,494	0,181
36	Elemecin	1549	1555	3,151	0,294	0,294	1,247	1,649	1,323	2241	2229	0,231	0,51	2,424	1,055	1,194	1,132
37	Viridiflorol	1584	1592	0,557	0,365	0,508	0,477	0,100	0,209	2083	2069	0,332	0,54	0,524	0,464	0,115	0,247
38	laphthalene(2-acetyl-	1598	1608	0,062	0,060	0,061	0,002	0,026
39	Cadinol, epi- α	1635	1638	0,252	0,093	0,172	0,112	0,648	2235	2224	0,110	0,03	2,005	0,715	1,118	1,563
40	α -Eudesmol	1647	1652	0,293	0,368	5,214	1,958	2,820	1,440
41	Apiole	1673	1677	22,255	20,951	21,243	21,483	0,684	0,032	2455	2434	35,550	21,18	22,035	26,256	8,060	0,307
42	α -Thujene	1039	1034	0,030
43	Sabinene	1114	1115	0,243	0,08	0,041	0,120	0,108	0,904
44	β - Myrcene	1161	1159	0,419	0,67	0,406	0,498	0,148	0,297
45	limonene	1195	1196	1,101	0,72	0,909	0,272	0,300
46	Z- ocimene	1235	1236	1,287	1,58	1,435	0,210	0,147
47	α -Gurjunene	1630	1538	0,362
48	δ -Terpineol	1679	1682	0,148	0,10	0,123	0,035	0,282
49	α -muurolene	1719	1721	0,344
50	bicyclogermacrene	1725	1737	0,546	1,38	1,468	1,131	0,509	0,450
51	Germacrene B	1819	1856	0,054
52	Shyobunol	1941	1949	0,056	0,14	0,096	0,057	0,593
53	Humulene	2030	1625	0,142	0,09	0,114	0,039	0,338
54	Germacrene D-4-0l	2051	2028	0,401	0,23	0,315	0,121	0,384
55	Cubenol	2057	2023	0,344
56	Cubenol 1 epi	2062	2059	0,576
57	Guaiol acetate	2410	2409	0,125	0,43	0,278	0,217	0,780
58	Selinane	2639	2657	0,221	0,44	0,331	0,156	0,470
*TOTAL IDENTIFICADO:							97,311	*TOTAL IDENTIFICADO:							97,047		

PL 1: Aceite de la primera recolección.

PL 2: Aceite de la segunda recolección.

PL 3: Aceite de la tercera recolección.

IK^C : Índice de Kovats calculado.

IK^R : 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).

*: % de la sumatoria total de DB-5MS y HP-INNOWAX

Fuente: Merino, G.

En la tabla 11 se indica los compuestos que se obtuvieron en el aceite esencial de *Piper lineatum* analizado en las columna DB-MS y HPINNOWAX, se identificaron 58 compuestos, de los cuales 28 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 41 compuestos con un porcentaje de identificación de 97,311% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 45 compuestos que representan el 97,047%.

3.4.2. Análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo se obtuvo con una comparación del porcentaje de cantidad relativa de cada pico con los detectados en las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX-MS con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados; en las columnas DB-5FID y HP-INNOWAX-FID.

En la tabla 12 se observan los compuestos identificados en ambas columnas con sus respectivos porcentajes, tanto en Masas como en FID, donde PL1, es el aceite de la primera destilación; PL2, aceite esencial de la segunda destilación; PL3, aceite esencial de la tercera destilación. Al final de la tabla se indica el total de porcentaje de los compuestos identificados en cada una de las columnas utilizadas.

Tabla 12. % de la cantidad relativa de cada compuesto en las columnas: DB-5MS-Masas- FID, HP-INNOWAX-Masas-FID

No	COMPUESTOS	DB5- MASAS										HP-INNOWAX									
		% DE CANTIDAD RELATIVA										% DE CANTIDAD RELATIVA									
		PL1		PL 2		PL3		DB5-MS		DB5-MS-FID		PL 1		PL 2		PL 3		HP-INNOWAX-MS		HP-INNOWAX-FID	
MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
1	α -Pinene	1,247	0,976	2,819	3,847	1,660	2,107	1,908	0,815	2,3101	1,446	0,889	1,739	3,007	2,303	1,818	1,369	1,905	1,062	1,698	0,471
2	Camphene	0,039	0,059	0,044	0,064	0,042	0,003	0,0618	0,002	0,053	0,003	0,003
3	β -Pinene	1,607	1,333	2,442	3,486	1,390	1,994	1,813	0,556	2,2712	1,103	1,140	2,269	2,537	1,591	1,497	1,296	1,725	0,726	1,718	0,499
4	myrcene	0,250	0,465	0,528	0,782	0,301	0,473	0,360	0,148	0,5733	0,181	10,860	10,525	11,240	15,026	22,143	15,532	14,748	6,408	13,694	2,756
5	α -Phellandrene	0,319	0,249	0,363	0,401	0,495	0,420	0,392	0,091	0,3568	0,094	0,232	0,289	0,403	0,684	0,631	0,366	0,422	0,200	0,446	0,209
6	α -Terpinene	5,797	3,090	0,232	1,061	0,046	1,09	2,025	3,268	1,3917	1,560	6,193	9,304	0,260	1,692	0,058	0,107	2,170	3,485	3,701	4,917
7	α -Cymene	0,946	0,581	0,4172	0,232	0,662	1,118	0,036	0,048	0,349	0,442	0,583	0,756
8	1,8-Cineole	11,185	13,038	6,644	7,275	8,914	3,211	7,1344	5,975	10,165	7,128	6,090	5,323	8,127	2,882	6,226	1,276
9	β -Ocimene, cis	1,086	1,647	1,251	1,328	1,168	0,117	3,4169	3,345	1,287	1,076	1,584	1,234	1,435	0,210	1,155	0,112
10	β -Ocimene, trans	2,970	4,112	3,417	3,541	3,193	0,316	3,1813	1,153	3,207	3,089	3,892	2,752	3,549	0,485	2,921	0,238
11	γ -Terpinene	9,783	12,756	2,740	2,704	0,167	2,025	4,230	4,978	6,6491	5,363	10,311	16,016	0,521	1,041	0,131	0,070	3,654	5,768	5,709	8,939
12	Terpinolene	2,478	2,984	0,123	0,141	0,077	0,072	0,893	1,373	1,7169	1,446	2,635	1,644	0,135	0,987	0,087	0,054	0,953	1,458	0,895	0,799
13	Linalool	0,856	1,217	0,6447	0,809	1,075	1,854	1,854
14	α -Terpineol	0,115	0,598	0,079	0,6805	0,097	0,026	0,4703	0,295	0,993	0,938	0,493	0,053	0,743	0,353	0,496	0,626
15	Terpinene-4-ol	0,071	0,136	0,071	0,138	0,071	0,000	0,1370	0,001	0,139	0,266	0,101	0,097	0,120	0,027	0,181	0,120
16	Safrole	9,459	9,517	28,863	35,568	19,161	13,721	18,2552	18,138	24,400	36,171	10,348	16,376	17,374	9,936	21,274	6,927
17	δ -Elemene	0,123	0,022
18	Cresol isobutyrate p	0,119	0,019	0,0343	0,022
19	α -Cubebene	0,028	0,432	0,053	0,075	0,041	0,017	0,1843	0,215
20	Isosafrole (E)	0,031	0,145	0,069	0,216	0,050	0,026	0,1485	0,066
21	α -Copaene	0,531	0,173	0,205	0,190	0,417	0,196	0,384	0,166	0,1931	0,022	0,565	0,430	0,206	0,241	0,311	0,397	0,361	0,185	0,356	0,101
22	β -Cubebene	0,049	0,056	0,0395	0,023
23	β -Elemene	0,203	0,215	0,168	0,272	0,185	0,025	0,2202	0,050
24	Methyleugenol	3,091	3,142	3,091	1,7072	2,029	1,325	3,348	0,114	0,341	0,719	0,857	1,845	2,126
25	(E)- β -Caryophyllene	1,205	0,447	1,639	1,717	2,843	3,195	1,896	0,849	0,7456	0,862	2,711	2,196	1,479	0,941	1,961	1,057	2,050	0,621	1,398	0,694
26	β -Cubebene	0,128	0,056	0,020	0,072	0,051	0,068	0,066	0,056	0,6151	0,955
27	β -Gurjunene	0,064	0,054	0,017	0,411	0,020	0,035	0,034	0,026	0,3636	0,289	0,044	0,085	0,085
28	β -Elemene	0,021	0,215	0,017	0,272	0,019	0,003	0,6097	0,635
29	α -Humulene	0,581	0,118	0,801	0,626	0,691	0,155	0,3126	0,274	0,142	0,158	0,087	1,266	0,114	0,039	0,712	0,784
30	GERMACRENE-D	1,522	1,342	1,400	1,371	2,090	1,766	1,671	0,368	0,9229	0,751	1,595	1,414	1,222	1,048	1,467	1,615	1,428	0,189	1,359	0,288
31	Viridiflorene	0,075	0,085	0,144	0,194	0,110	0,049	0,4904	0,610
32	adina-1(10),4-dien	1,404	1,017	1,402	1,450	1,851	0,057	1,552	0,259	0,8821	0,646
33	δ -Amorphene	2,302	2,882	1,609	1,192	1,955	0,490	2,0370	13,395	0,346	0,148	0,366	0,251	0,055	0,146	0,256	0,174	0,182	0,060

No	COMPUESTOS	DB5- MASAS										HP-INNOWAX									
		% DE CANTIDAD RELATIVA										% DE CANTIDAD RELATIVA									
		PL1		PL 2		PL3		DB5-MS		DB5-MS-FID		PL 1		PL 2		PL 3		HP-INNOWAX-MS		HP-INNOWAX-FID	
MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
34	δ-Cadinene	0,506	0,338	0,249	0,203	3,886	2,683	1,547	2,030	3,1944	5,065	4,253	2,955	0,375	0,055	0,373	0,436	1,667	2,240	1,149	1,576
35	Myristicin	11,893	7,227	12,831	9,043	16,604	17,249	13,776	2,494	5,4626	4,717
36	Elemecin	3,151	1,543	0,294	0,297	0,294	0,118	1,247	1,649	0,6841	0,745	0,231	0,334	0,508	0,746	2,424	1,561	1,055	1,194	0,880	0,624
37	Viridiflorol	0,557	0,135	0,365	0,297	0,508	0,320	0,477	0,100	0,2506	0,101	0,332	0,428	0,536	0,818	0,524	1,417	0,464	0,115	0,888	0,498
38	Naphthalene(2-acetyl-)	0,062	0,323	0,060	0,036	0,061	0,002	0,1790	0,203
39	Cadinol, epi-α	0,252	3,258	0,093	0,070	0,172	0,112	1,6643	2,254	0,110	0,133	0,030	0,014	2,005	1,989	0,715	1,118	0,712	1,108
40	α-Eudesmol	0,293	0,134	0,368	0,456	5,214	5,107	1,958	2,820	0,2948	0,228
41	Apiole	22,255	17,840	20,951	15,723	21,243	23,692	21,483	0,684	26,7815	1,497	35,550	34,478	21,182	18,363	22,035	25,207	26,256	8,060	15,349	2,742
42	α-Thujene	0,030	3,467	3,467
43	Sabinene	0,243	0,348	0,075	0,045	0,041	0,538	0,120	0,108	0,310	0,249
44	β - Myrcene	0,419	0,988	0,668	1,333	0,406	0,872	0,498	0,148	1,064	0,240
45	limonene	1,101	0,805	0,716	0,700	0,909	0,272	0,752	0,074
46	Z- ocimene	1,287	1,456	1,584	1,643	1,435	0,210	1,550	0,132
47	α-Gujunene	0,362	0,146	0,146
48	δ-Terpineol	0,148	0,429	0,099	0,176	0,123	0,035	0,303	0,179
49	α-murolene	0,344	0,274	0,274
50	bicyclogemacrene	0,546	0,344	1,380	1,384	1,468	0,101	1,131	0,509	0,610	0,682
51	Germacrene B	0,054	0,317	0,317
52	Shyobunol	0,056	0,088	0,137	0,169	0,096	0,057	0,129	0,057
53	Humulene	0,142	0,187	0,087	0,112	0,114	0,039	0,150	0,053
54	Germacrene D-4-ol	0,401	0,185	0,230	0,169	0,315	0,121	0,177	0,011
55	Cubenol	0,344	0,306	0,306
56	Cubenol 1 epi	0,576	0,443	0,443
57	Guaiol acetate	0,125	0,197	0,431	0,114	0,278	0,217	0,156	0,059
58	Selinane	0,221	0,186	0,442	0,544	0,331	0,156	0,365	0,254
								*TOTAL:	96,734		97,0053							**TOTAL:	97,711		97,984

PL 1: Aceite de la primera recolección.

PL 2: Aceite de la segunda recolección.

PL 3: Aceite de la tercera recolección.

*: Total de la sumatoria del % de la cantidad relativa de los compuestos en la columna DB-5MS-Masas y HP-INNOWAX-Masas

**: Total de la sumatoria del % de la cantidad relativa de los compuestos en la columna DB-5MS-FID y HP-INNOWAX-FID

Fuente: Merino, G.

3.5. Actividad biológica del aceite esencial de *Piper lineatum*.

La evaluación biológica se realizó buscando la CMI (Concentración Mínima inhibitoria), contra bacterias Gram negativas en las que se usó *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiela pneumoniae*, *Poteus vulgaris*; bacterias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. También se buscó la CMI contra hongos los que se usaron fueron: *Trichophytum rubrum* y *Trichophytum mentagrophytes*.

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana

En la tabla 13, se observa la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 5 cepas bacterianas Gram-negativas y 2 cepas Gram-positivas.

Tabla 13. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de *Piper lineatum*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE <i>Piper lineatum</i>							
Gram-Negativas						Gram-Positivas	
Aceite esencial	<i>Poteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Klebsiela pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
PL 1	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	250 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
PL 2	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
PL 3	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
CONTROL					Gentamicina 1,95 µg/mL		Gentamicina 0,39 µg/mL
<p>PL 1: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la primera recolección.</p> <p>PL 2: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la segunda recolección.</p> <p>PL 3: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la tercera recolección</p>							

Fuente: Merino, G.

Gran parte de los aceites esenciales utilizados no mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas. Solamente se observó actividad frente a *Klebsiela Pneumoniae* con una Concentración Mínima Inhibitoria de 250 ug/mL y 1000 ug/mL,

no existen estudios de actividad biológica de esta especie con la cual se pueda comparar, pero si estudios de especies del mismo género, como *Piper tricuspe*, *P. gorgonillense*, *P. hispidum* que tienen resultados de CMI de 5 mg/ml y 2,5 mg/ml frente a cepas de *S. aureus* con lo que se puede decir que estas especies del mismo género se consideran potenciales antibacterianos en muchas regiones de Sudamérica, en Colombia por ejemplo son utilizadas como medicinales, antiinflamatorias y antibacterianas conocidas comúnmente como cordoncillos (N. Pino, 2008).

Tal como lo describen en el artículo de Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass (Rincón, Castaño, & Ríos, 2012), las bacterias gramnegativas muestran una resistencia intrínseca a una gran variedad de aceites esenciales, que se relaciona con la superficie hidrófila de su membrana externa, rica en moléculas de lipopolisacárido. Una barrera permeable en contra de los agentes tóxicos es formada. Para pequeñas moléculas hidrofílicas no se impide el paso a través de la membrana externa debido a la acción de las proteínas porinas. Sin embargo, las macromoléculas hidrofóbicas como la de los componentes de los aceites esenciales, son incapaces de penetrar la barrera. Esto lleva a pensar que el pequeño halo de inhibición producido por el aceite esencial de las flores puede estar con su contenido de terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos), que fueron identificados como los componentes mayoritarios en las fracciones volátiles de las hojas y flores.

El mecanismo de acción de los terpenos no se entiende completamente, pero se especula que participan en la disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos. Existen 3 posibles vías de acción para este particular grupo de metabolitos volátiles: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica (Maguma, Romero, Garro, & Okulik, 2006).

Las propiedades antibacterianas se deben a los compuestos que resaltan en este género que son los fenilpropanoides, estructuras simples como lo son el safrol, eugenol, miristicina, dillapiol, entre otros que derivan compuestos que se encuentran también en otro tipo de plantas. Por ejemplo, el apiol, componente mayoritario del aceite esencial de varias

Piperáceas, entre ellas *Piper hispidinervium* (83-93 %), puede actuar sinérgicamente con otros compuestos presentes en la planta incrementando así su actividad biológica (Vizcaíno, 2013).

3.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.

En la tabla 14, se observa la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 2 cepas fúngicas.

Tabla 14. CMI antifúngica de los aceites esenciales de *Piper lineatum*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE <i>Piper lineatum</i>		
HONGOS		
Aceite esencial	<i>Trichopyton rubrum</i> ATCC 28188	<i>Trichopyton mentagrophytes</i> ATCC 28185
PL 1	1000 µg/mL	> 1000 µg/mL
PL 2	1000 µg/mL	> 1000 µg/mL
PL 3	125 µg/mL	> 1000 µg/mL
CONTROL Itraconazol 1000 mg/mL 0,39 µg/mL		
PL 1: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la primera recolección. PL 2: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la segunda recolección. PL 3: Aceite de <i>Piper lineatum</i> de la tercera recolección		

Fuente: Merino, G.

Los aceites esenciales de las tres recolecciones realizadas tuvieron actividad frente a *Trichopyton rubrum* ATCC 28188, el valor de la concentración mínima inhibitoria para la primera y segunda recolección fue de 1000 µg/mL, mientras que para la tercera recolección la concentración mínima inhibitoria fue de 125 µg/mL. Con *Trichopyton mentagrophytes* ATCC 28185 no presentaron actividad ninguno de los tres aceites esenciales de *Piper lineatum*. De acuerdo con la clasificación de la actividad antimicótica para aceites esenciales, el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se clasifica de la siguiente manera, si la CMI es igual o menor a 100 µ se considera buena, si la CMI está entre 100 – 500 µ se considera como moderada y si la CMI está entre 500 – 1000 µg/mL se considera como débil (Holetz et al., 2002)

De esta especie en específico no existen estudios en base a los microorganismos fúngicos que han sido evaluados en esta investigación. Pero hay investigaciones que se han realizado dentro de la familia Piperaceae, como es el caso del extracto etanólico de *Piper betle* sobre *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *M. gypseum*, destacando *P. betle* con una CI_{50} entre 110,4—119,0 µg/MI y el extracto crudo hidroalcohólico y las neolignanas eupomatenoide-3 y eupomatenoide-5, de *Piper regnellii*, mostraron actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* con CL_{90} de 15,6 µg/mL y para *M. gypseum* con CL_{90} de 62,5 µg/mL (Palacios, Delgado, Moreno, Kato, & Rojas, 2009). Todos estos trabajos nos

indican que el extracto de varias especies vegetales de esta familia exhibe una significativa actividad antifúngica sobre diversos dermatofitos, variando significativamente sus efectos en función de las concentraciones utilizadas, destacando las especies *P. betle* y *P. regnellii*, de origen asiático y americano, respectivamente.

3.6. Actividad antioxidante.

3.6.1 Actividad antioxidante por el método DPPH.

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método DPPH, en la tabla 15 se describe las concentraciones con las que se trabajó y los datos que se obtuvieron de las absorbancias de las mismas concentraciones; cabe mencionar que se realizaron por triplicado pero en la tabla se muestra un valor medio de las tres muestras. Los valores obtenidos se reemplazaron en la fórmula que se describe a continuación.

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

Tabla 15. Datos del método DPPH obtenidos con el aceite de *Piper Lineatum*.

CONCENTRACIÓN (µM)	Absorbancia	σ	% De disminución
1000	0,937	0,074	13,272
500	0,980	0,030	9,228
100	0,981	0,057	9,136
50	0,982	0,065	9,043
25	0,983	0,066	8,981
12,5	1,016	0,037	5,895
5	1,019	0,010	5,617
0	1,030	0,004	4,599

Fuente: Merino, G.

Luego se elaboró la gráfica con los datos obtenidos; donde en el eje “x” se encuentran los valores de las concentraciones del aceite esencial de *Piper lineatum* (ppm), y en el eje “y” se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración. La gráfica se muestra a continuación en la figura 23.

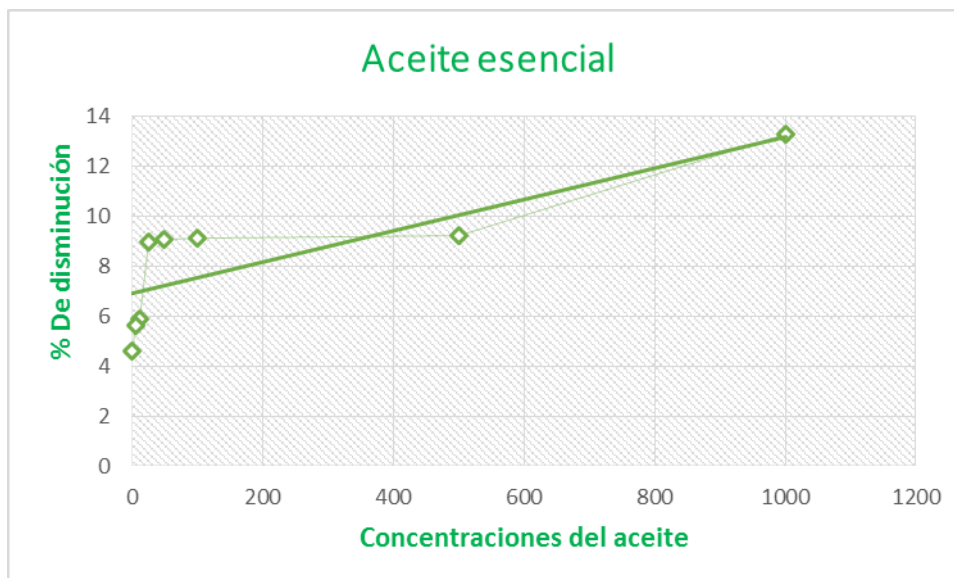


Figura 23. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones del aceite esencial y el % de disminución.

Fuente: Merino, G.

Con los resultados obtenidos se puede decir que el aceite esencial de *Piper Lineatum*, en este método no presentó actividad antioxidante en ninguna concentración con las que se trabajó, ya que el aceite de *Piper lineatum* presentó en su mayor concentración de 1000ppm un % de disminución muy bajo de 13,27 que no tiene relevancia. Por lo que no es posible calcular la IC50 ya que el porcentaje de disminución no llega a un 50%, por lo tanto no presenta actividad antioxidante.

No se encontraron estudios de la actividad antioxidante de esta especie, pero si hay estudios de determinación de la actividad antioxidante de otras especies de la misma familia como en el caso del aceite esencial de *Piper auritum* que presentó una baja actividad antioxidante comparado con el método DPPH con la vitamina E; dado que el análisis cromatográfico reveló la no existencia de compuestos de tipo fenólico, principales responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales (García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007).

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

3.6.1.1. Lectura del estándar de TROLOX y BHT.

En ambos métodos DPPH y en ABTS+, los estándares utilizados fueron TROLOX y BHT, las muestras se trataron igual que las muestras de aceite de *Piper lineatum*, el proceso se realizó por triplicado y la lectura al mismo tiempo que la de las muestras de aceite; luego se obtuvieron los cálculos para determinar el porcentaje de disminución. En la tabla 16 y 17 se muestran los resultados.

Tabla 16. Datos del método DPPH para el estándar BHT.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Absorbancia BHT	σ	% De disminución
1000	0,546	0,231	51,280
800	0,694	0,017	38,065
600	0,801	0,005	28,452
450	0,837	0,042	25,238
300	0,843	0,049	24,762
150	0,860	0,018	23,185
25	0,949	0,043	15,238
0	1,012	0,026	9,643

Fuente: Merino, G.

Tabla 17. Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Absorbancia TROLOX	σ	% De disminución
1000	0,301	0,151	73,125
500	0,416	0,013	62,887
100	0,540	0,045	51,815
50	0,686	0,045	38,780
25	0,809	0,013	27,738
12,5	0,936	0,073	16,399
5	1,003	0,011	10,417
0	1,020	0,040	8,929

Fuente: Merino, G.

Con los datos obtenidos se elaboró la gráfica; donde en el eje “x” se encuentran los valores de las concentraciones del aceite esencial de los estándares BHY y TROLOX (Um), y en el eje “y” se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración. La gráfica se muestra a continuación en la figura 24.

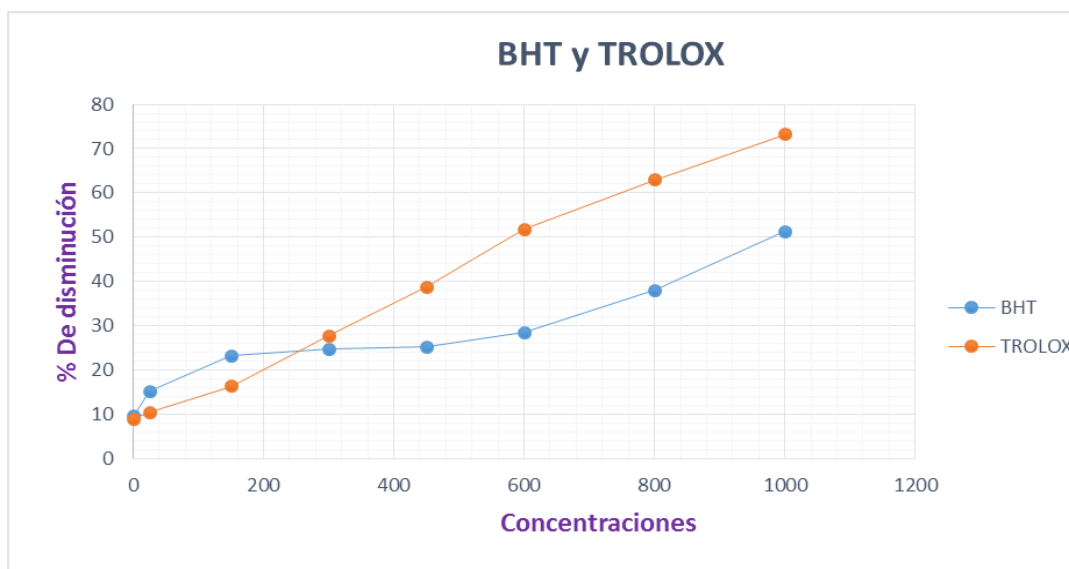


Figura 24. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones de los estándares BHY y Trólox y el % de disminución.

Fuente: Merino, G.

3.6.2. Actividad antioxidante por el método +ABTS.

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método +ABTS, en la tabla 18 se describe las concentraciones con las que se trabajó y los datos que se obtuvieron de las absorbancias de las mismas concentraciones; cabe mencionar que se realizaron por triplicado pero en la tabla se muestra un valor medio de las tres muestras. Los valores obtenidos se reemplazaron en la fórmula que se describe a continuación.

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

Tabla 18. Datos del método +ABTS obtenidos con el aceite de *Piper Lineatum*.

CONCENTRACIÓN (μM)	Absorbancia	σ	% De disminución
1000	0,957	0,036	11,389
500	0,991	0,009	8,241
100	0,988	0,001	8,549
50	0,990	0,004	8,333
25	0,991	0,004	8,272
12,5	0,988	0,001	8,549
5	0,999	0,031	7,469
0	1,011	0,024	6,358

Fuente: Merino, G.

Luego se elaboró la gráfica con los datos obtenidos; donde en el eje “x” se encuentran los valores de las concentraciones del aceite esencial de *Piper lineatum* (ppm), y en el eje “y” se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración. La gráfica se muestra a continuación en la Figura 25.

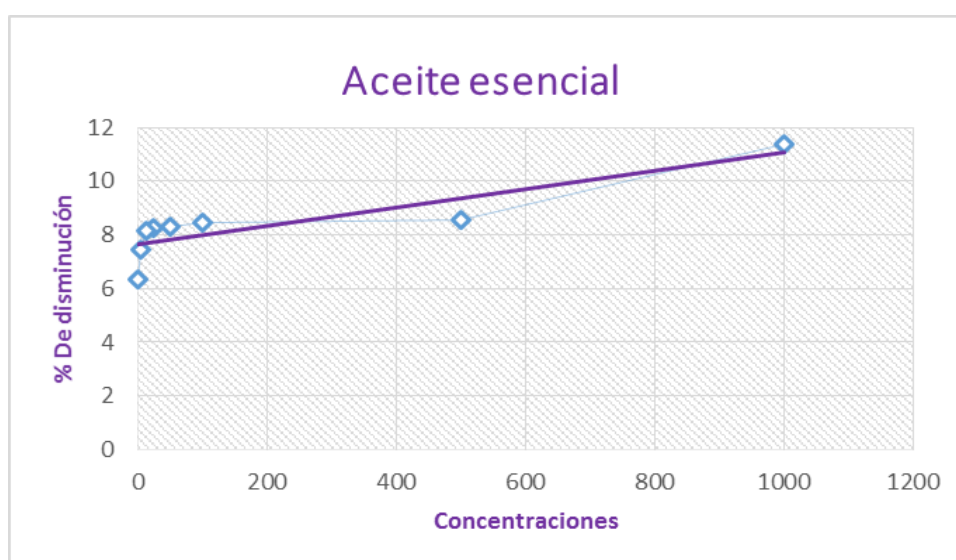


Figura 25. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones del aceite esencial y el % de disminución.

Fuente: Merino, G.

Con los resultados obtenidos se puede decir que el aceite esencial de *Piper Lineatum*, en este método no presentó actividad antioxidante en ninguna concentración con las que se trabajó, ya que el aceite de *Piper lineatum* presentó en su mayor concentración de 1000ppm un % de disminución muy bajo de 11,38 que no tiene relevancia. Por lo que no es posible calcular la IC50 ya que el porcentaje de disminución no llega a un 50%, por lo tanto no presenta actividad antioxidante.

No se encontraron estudios de la actividad antioxidante de esta especie, pero si hay estudios de determinación de la actividad antioxidante de otras especies de la misma familia como en el caso del aceite esencial de *Piper pubinervulum* que de acuerdo a los datos del IC50 obtenidos mediante el método de DPPH y +ABTS se concluye que dicho aceite presentó una baja actividad capatadora del radical DPPH y ABTS (20,399 ug/ml) y (0,414 ug/ml) respectivamente (Abad & Cabezas, 2014).

3.6.2.1. Lectura del estándar de TROLOX y BHT.

En ambos métodos DPPH y en ABTS+, los estándares utilizados fueron TROLOX y BHT, las muestras se trataron igual que las muestras de aceite de *Piper lineatum*, el proceso se realizó por triplicado y la lectura al mismo tiempo que la de las muestras de aceite; luego se obtuvieron los cálculos para determinar el porcentaje de disminución. En la tabla 19 y 20 se muestran los resultados.

Tabla 19. Datos del método +ABTS para el estándar BHT.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Absorbancia BHT	σ	% De disminución
1000	0,157	0,016	85,494
800	0,227	0,014	79,012
600	0,346	0,019	67,932
450	0,444	0,021	58,889
300	0,510	0,003	52,747
150	0,721	0,004	33,272
25	0,978	0,021	9,475
0	0,990	0,024	8,364

Fuente: Merino, G.

Tabla 20. Datos del método +ABTS para el estándar TROLOX.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Absorbancia TROLOX	σ	% De disminución
1000	0,125	0,012	88,395
800	0,190	0,008	82,377
600	0,379	0,013	64,877
450	0,431	0,012	60,062
300	0,628	0,011	41,821
150	0,750	0,010	30,525
25	0,883	0,023	18,272
0	0,980	0,004	9,228

Fuente: Merino, G.

Con los datos obtenidos se elaboró la gráfica; donde en el eje “x” se encuentran los valores de las concentraciones del aceite esencial de los estándares BHT y Trolox (Um), y en el eje “y” se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración. La gráfica se muestra a continuación en la Figura 26.

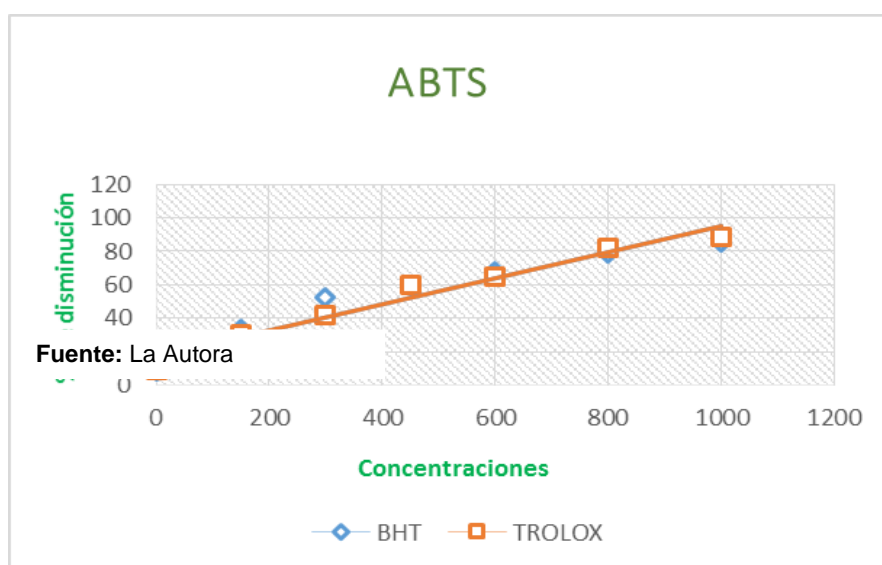


Figura 26. Gráfica con los datos de la relación de las concentraciones de los estándares BHT y Trolox y el % de disminución.

Fuente: Merino, G.

Los antioxidantes sintéticos BHT Y TROLOX en comparación con el aceite esencial de *Piper Lineatum* analizado presenta porcentajes de disminución de los radicales para ambos métodos muy alta superior al 50%; Trolox presentó un % de disminución de 88,39 y BHT un % de disminución de 85,49.

CONCLUSIONES

- ✚ La especie *Piper lineatum* recolectada en la Provincia de Zamora Chinchipe presentó una humedad relativa de 60,16%, la media de la densidad obtenida del aceite de *Piper lineatum* es de 0,8792 g/cm³, y el promedio del índice de refracción de las tres destilaciones obtenidas fue de 1,692.
- ✚ El rendimiento promedio de las tres destilaciones de *Piper lineatum* fue de 0,32 %.
- ✚ El aceite esencial de *Piper Lineatum*, en los métodos DPPH y +ABTS no presentó actividad antioxidante en ninguna concentración con las que se trabajó, ya que el aceite de *Piper lineatum* presentó en su mayor concentración de 1000 ppm un % de disminución muy bajo de 13,27 que no tiene relevancia.
- ✚ El aceite esencial de *Piper lineatum* presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Klebsiella Pneumoniae* con una Concentración Mínima Inhibitoria de 250 µg/mL y 1000 µg/mL; mientras que presentó actividad antifúngica únicamente frente a las cepas de *Trichopyton rubrum* con una concentración mínima inhibitoria para la primera y segunda recolección de 1000 µg/mL, y en la tercera recolección de 125 µg/mL.
- ✚ En la composición química se identificaron 58 compuestos de los cuales 28 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 41 compuestos con un porcentaje de identificación de 97,311% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 45 compuestos que representan el 97,047%.
- ✚ En el aceite esencial de *Piper lineatum* en la columna DB-5MS se identificaron 6 compuestos mayoritarios entre los que tenemos: apiole (21,483), safrole (19,161), myristicin (13,776), 1,8 cineole (8,914), γ-terpinene (4,230) y B-ocimene, trans (3,193).

- ✚ En la columna HP-INNOWAX se identificaron 6 compuestos mayoritarios entre los que tenemos apiole (26,256), safrole (17,374), myrcene (14,748), 1,8 cineole (8,127), γ -terpinene (3,654) y B-ocimene, trans (3,549).

RECOMENDACIONES

1. Estudiar bien como funciona el equipo de destilación, para utilizar los parámetros más adecuados para la muestra que vamos a emplear.
2. Realizar más estudios con la misma especie para poder realizar comparaciones de la composición química, para acordar cuales son los compuestos mayoritarios y los porcentajes que presenta.
3. Estimar la actividad biológica del aceite frente a cepas bacterianas y fúngicas de interés en salud pública.
4. Establecer una cultura de elaboración de productos naturales con la infinidad de aceites esenciales de muchas plantas que presentan características curativas.
5. Examinar la actividad antioxidante de esta especie con otros métodos, para poder determinar cual es el método correcto a utilizar.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, J., & Cabezas, D. (2014). *Estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de piper pubinervulum. c. dc provenientes de macas, ecuador.* universidad politécnica salesiana, Quito.
- Adams, R. (2009). *Identification of Essential oil components by chromatography/ MS Spectrometry* (4ta ed.).
- Arango, O., Pantoja, D., Santacruz, L., M, A., & Hurtado, B. (2012). Actividad Antioxidante del Aceite Esencial de Orégano (*Lippia organoides* H.B.K) del Alto Patía. *Bio. Agro*, 10.
- Bandoni, A. (2002). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. In A. Buenos Aires (Ed.), *Su Aprovechamiento Industrial Para la Producción de Aromas y Sabores*.
- Barrero, A. F., Pino, M., H, D., Burón, P. A., Mora, J. Q. d., & Arteaga, J. (2004). *Nuevas fuentes de antioxidantes*. Granada-España.
- Bathia, S., Letizia, C., & Api, A. (2008). Fragrance material review on (-)- α -terpineol. *Food Chem Toxicol*, 46, 280-285.
- Blanco, N., Ramos, A., & Vizoso, A. (2006). Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. *Revista Cubana Plant Med*, 11, 3-4.
- Brack, A. (1993). Convención de Biodiversidad. Biodiversidad, Biotecnología y el Desarrollo Sustentable de la Amazonía. *UICN*. Retrieved from
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, 26, 97-106.
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón.
- Conde, C. G., Rueda, X. Y., & Patiño, G. S. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Facultad de Ciencias Básicas*, 12-23.
- Cruz, S., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., & Morales, J. (2006). Caracterización de Aceites Esenciales y Extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y medicinales. *Universidad de San Carlos de Guatemala*, 10.
- Cubas, P. (Producer). (2007, www.aulado.net). Hongos.
- Dallas, L. (2004). Kava kava: examining new reports of toxicity. *Toxicology Letters* 150, 85-96.
- De la Rúa, A. (1999). El poder curativo de las hierbas. *Círculo de Lectores*, 145-146.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L. P., & Salazar, J. (2008). *Usos medicinales de las plantas* (Herbario QCA & Herbario AAU ed.). Quito.

- De Morais, S., Facundo, V. A., Bertini, L., Cavalcanti, E. S. B., Anjos Junior, J. F., Ferreira, S. A., . . . M, A. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 670-675.
- Ewing, W. (1985). *Edwards and Ewings's Identification of Enterobacteriaceae* (4 ed.).
- Fernández, R., Segundo, C., Arenas, R., Diamante, S., & Guzmán, A. (2002). Determinación de las variedades de Trichophyton mentagrophytes en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Bioquímica*, 27(Asociación Mexicana De Bioquímica Clínica), 41-45.
- García, A., Leyva, M., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro Del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) Difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica*, 33.
- Gomis Yagues, V. (2008). Tema 3: Cromatografía de gases *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*
- González-Vértiz, A., Alcantar-Curiel, D., Cuauhtli, M., Daza, C., Gayoso, C., & Solache, G. (2001). Multiresistant extended-spectrum B-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae causing an outbreak of nosocomial bloodstream infectio. *Infect Control Hosp Epidemiol*.
- González, P., & D, J. (1984). *Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales*. Universidad de la Salle, Bogotá.
- Granados, R., & Villaverde, M. (1997). *Microbiología "Bacteriología. Características y Clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas"* (1 ed.). Madrid-España.
- Guerrero, A., & Villamil, S. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Piper sp e Ilex guayusa* Loes sobre microorganismos de importancia clínica en caries dental. Pontificia Uniersidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Günther, E. (1948). *The Essential Oils*. (Vol. 1 The Essential Oils.History and origin in Plants Production Analysis). New York, USA.
- Hardalo, C., & Edberg, S. (1997). Pseudomonas aeruginosa: Assesment of risk from drinking-water. *Critical Reviews in Microbiology*.
- Hernández, A. (2008). Plantas Medicinales. *Revista Biocenosis*, 21.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sánchez, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Díaz Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infrcitious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.
- Huang, D., OU, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J.Agric. Food Chem*, 23.
- Jaramillo, A. M. P. (2001). Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus Piper (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88, 706-716.

- Jawetz, E. (1989). Quimioterapia antimicrobiana. *Manual de microbiología médica*, 9, 110-153.
- Liébana Ureña, J. (2002). *Microbiología Oral* (2 ed.). España: Mc Graw-Hill- Interamericana de España.
- Losch, L., & Merino, L. (2003). *Familia Enterobacteriaceae*. Universidad Nacional del Nordeste.
- Maguma, F., Romero, A., Garro, O., & Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. *Facultad de Agroindustrias, UNNE*.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. 11, 1
- Martínez-Rocha, A. (2008). Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*). *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1-5.
- Martínez, E. M. (2003). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia, Medellín.
- Matargo, W. (2014). Biodiversidad En El Ecuador. *Biocormecio Andino*
- Miller, J., & Wiley, J. (2005). *Chromatography Concepts and Contrasrts* (Second ed.).
- Monzón, A., & Rodríguez, J. Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. *SEIMC*.
- Morales, S., González, S. B., Ladio, A., & Agueda Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (*Asteraceae: Astereae*). *Acta Botánica Brasilica*, 23, 578-589.
- Muñoz, A., Martínez, J., & Stashenko, E. (2009). Cromatografía de gases como herramienta de estudio de la composición química y capacidad antioxidante de especies vegetales ricas en timol y carvacol, cultivadas en Colombia. *Scientia Chromatographica*, 1, 67-78.
- Murillo, E., Fernández, K., M, S., & Viña, A. (2004). Caracterización Físico-Química del Aceite Esencial de Albahaca. II. *Revista Colombiana De Química*, 33.
- . National Institute of Standards and Technology. Retrieved www.nist.gov
- Núñez, M. E. (1982). Plantas medicinales de Costa Rica y su fólclore. *Editorial Universidad de Costa Rica*, 318.
- Olguín Pérez, L., & Rodríguez, H. (2004). *Cromatografía de Gases*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Olsen, S., Ying, M., Davis, M., Deasy, M., Holand, B., & Iampietro, L. (2004). Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated pasteurization. *Emerg Infect.* 10.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (Primera edición ed.). España.

- Otolora, I. (2012). *Extracción por Arrastre de Vapor "Importancia y Aplicación"*. Universidad Mayor de San Simón, Bolivia.
- Palacios, Z., Delgado, G., Moreno, M., Kato, M., & Rojas, C. (2009). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberulatum*. *Revista Perú biol. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM*, 16, 209-214.
- Paúl, J. P. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género Eryngium L., En la península ibérica* doctorado, universidad complutense de MADRID Madrid. (84-669-1710-1)
- Pino, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper L.* (PIPERACEAE). *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 27 (1), 67-75.
- Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. (2008). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 301-304.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rodríguez, H., Correa, T. M., Demedio, J., & Sanabria, J. L. (2011). Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subs. *ossanum* frente a *Varoa destructor*. *Revista de Protección Vegetal*, 26.
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., & Miranda-Esqueviel, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 33, 1266-1278.
- Rincón, A., Castaño, J., & Ríos, E. (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Universidad del Quindío*.
- Rodríguez, M., Melendez, L., & Real, M. (2012). *Procedimiento Para La Extracción De Aceites Esenciales En Plantas Aromáticas* (1 ed. Vol. 1). México.
- Ruiz, Q., & Roque, A. (2009). *Actividad Antimicrobiana de Cuatro Plantas del Nor-Oriente Peruano*. UNMSM, Instituto en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología, Perú.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS). *Revista Protección Veg.*, 24, 39-46.
- Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. AOCS Press.
- Shailili M. Moreno M., O. E. C. V., Shelby Ortiz M. y Maribel Quintero. (2006). Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* TRIANA *SciELO*, 31.

- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. *Colombia: Convenio Andrés Bello (CAB)*.
- Skoog. (2001). *Química Analítica* (7 ed.). México.
- Skoog., Douglas, A., Holler., James., Nieman., & Timothi. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (6 ed.).
- Stashenko, E. (1996). *En: Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica, Universidad Industrial de Santander*. Bucaramanga.
- Teixeira, C. (2006). Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales y Aromáticas usadas en Brasil. *Revista indisciplinar dos centros e núcleos de Unicamp*.
- Velázquez, C. (2008). *Encapsulación de aceite de naranja en un secador de lecho por fuente fluidizado con sólidos inertes*. Maestro En Ciencias En Alimentos, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Vizcaíno, S. (2013). *Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno Botrydiplodia theobromae*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Waldvogel, F. A., Mandell, G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R. (2000). Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock) Mandell, Douglas & Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. . *Churchill Livingstone*, 2069-2081.
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M.-S., Quandt, D., & Neinhuis, C. (2007). Evolution of Piperales matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

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:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

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

CÁLCULO:

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

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

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

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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

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

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

ANEXO 3
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

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

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

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

REFERENCIAS:

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

PRINCIPIO:

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

NOTA:

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

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°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:

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

Dónde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

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

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:**Determinación**

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos 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 ±0.2°C y debe mantenerse a ±0.2°C.

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

Resultados:

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

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

Dónde:

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ±0.0002.