



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

"La Universidad Católica de Loja"

TITULACIÓN DE INGENIERO QUIMICO

TEMA:

“Estudio de la composición química y actividad biológica del aceite esencial *Siparuna muricata* de la familia de las Siparunaceae en la Provincia de Loja”

Trabajo de fin de titulación

AUTOR:

Claudia Verónica Villalta Córdova

DIRECTOR:

Ing. Segundo Vladimir Morocho Zaragocin

LOJA - ECUADOR

2013

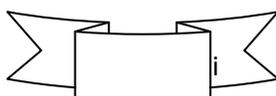
CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS

“Yo, Claudia Verónica Villalta Córdova declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Loja, mayo de 2013.

Claudia Verónica Villalta Córdova



CERTIFICACIÓN

Ing. Vladimir Morocho Z.

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO

CERTIFICO: Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: “**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL *Siparuna muricata* DE LA FAMILIA DE LAS SIPARUNACEAE EN LA PROVINCIA DE LOJA**” la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, 27 de mayo del 2013

f). 

Ing. Vladimir Morocho Z.

DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios por ser mi luz, por haberme permitido llegar a la culminación de mi carrera y por guiarme en el trayecto de toda mi vida.

A mis padres Franco y Mireya que siempre me han apoyado e impulsado desde mi infancia para llegar a cumplir mis metas, por sus consejos, cariño, dedicación y amor que siempre estuvo presente en los momentos más difíciles de mi vida.

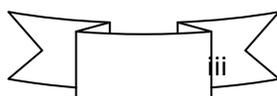
Al Ing. Vladimír Morocho que como Director de Tesis con su experiencia y conocimientos me ha sabido guiar en esta investigación, quien ha sido un gran apoyo, quien confió en mí y quien me prestó su ayuda y colaboración cuando la necesite.

Al Ing. Eduardo Valarezo, Ing. Diana Guaya y la Ing. Nathaly Solano quienes me apoyaron con sus conocimientos y consejos.

A mi esposo Jackson y a mis hijas Tiffany y Melany quienes han sabido aceptar con paciencia la espera, el tiempo no compartido y todos los sacrificios que como familia hemos hecho juntos, gracias por darme la fuerza, el valor y el deseo de superación.

A mis hermanos que siempre han estado presentes, que se han preocupado por mi bienestar y que cuando los necesite me prestaron su ayuda.

Claudia Villalta



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación primero a Dios por haberme permitido existir, por darme una vida placentera con muchas personas a mi lado por las que debo luchar, por darme fuerza y consuelo siempre.

A mis padres Franco y Mireya que me han dado una formación buena, que me han guiado por el camino del bien, que me han enseñado a luchar, a superar los obstáculos, a no rendirse, enseñándome que con paciencia, amor, se logra las metas.

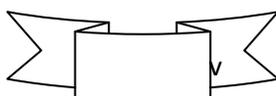
A mi esposo Jackson, a mis hijas Tiffany y Melany con mucho cariño y amor, por ser las razones más importantes de mi vida que me impulsaron a terminar mis estudios, por el apoyo, la paciencia que han tenido conmigo y por esas caritas de alegría y felicidad que me brindaron cada día en el trayecto de mi carrera.

A mi abuelita Melva quien espiritualmente me ha acompañado, quien me dio su cariño y apoyo incondicional siempre

Claudia Villalta

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE FOTOGRAFÍAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1. Fin del proyecto.....	2
1.2. Propósito del proyecto.....	2
1.3. Componentes del proyecto.....	2
1.4. Hipótesis.....	3
1.5. Diseño estadístico.....	3
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
2.1. Introducción.....	5
2.2. Antecedentes.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Identificación de la materia vegetal.....	15
3.2. Recolección de la materia vegetal.....	16
3.2.1. Recolección de la materia vegetal.....	16
3.2.2. Tratamiento pos cosecha del material vegetal.....	17
3.3. Destilación del aceite esencial.....	18
3.4. Determinación del rendimiento.....	20
3.5. Determinación de la humedad.....	20
3.6. Determinación de propiedades físicas.....	21
3.6.1. Densidad relativa.....	21
3.6.2. Índice de refracción.....	22



3.7. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	23
3.7.1. Cromatografía de Gases (GC).....	23
3.7.2. Características de las columnas capilares.....	24
3.7.3. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas GC-MS.....	25
3.7.3.1. Preparación de las muestras.....	25
3.7.3.2. Corrida cromatográfica de las muestras por GC-MS en la columna capilar DB5-MS.....	26
3.7.3.3. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna HP-INNOWAX.....	37
3.7.3.4. Obtención de los cromatogramas.....	29
3.7.3.5. Determinación de los Índices de Kóvats.....	30
3.7.3.6. Identificación de los compuestos en GC-MS en las columnas capilares DB5-MS y HP-INNOWAX.....	30
3.7.4. Corrida cromatográfica de las muestras por GC-FID en la columna capilar DB5-MS.....	32
3.7.5. Corrida cromatográfica de las muestras por GC-FID en la columna capilar HP-INNOWAX.....	34
3.7.6. Comparación de los cromatogramas obtenidos en GC/MS con los obtenidos en GC-FID.....	35
3.7.7. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial de <i>S. muricata</i>	35
3.8. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.....	35
3.8.1. Microorganismos de prueba.....	35
3.8.2. Preparación del aceite esencial	35
3.8.3. Preparación de los medios de cultivo.....	36
3.8.3.1. Bacterias.....	36
3.8.3.1.1. Caldo de cultivo Muller Hinton.....	36
3.8.3.1.2. Cultivo overnight.....	36
3.8.3.1.3. Preparación de la suspensión de los inóculos.....	36
3.8.3.2. Hongos.....	37
3.8.3.2.1. Caldo sabouraud.....	37
3.8.3.2.2. Preparación de la suspensión de los inóculos.....	38
3.8.4. Concentración Mínima Inhibitoria.....	38
3.8.4.1. CMI Antibacterianos.....	38

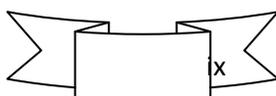
3.8.4.2. CMI Antifúngicos.....	39
3.8.5. Interpretación de los resultados.....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Determinación de humedad.....	42
4.2. Determinación del rendimiento.....	42
4.3. Propiedades físicas del aceite esencial (densidad e índice de refracción).....	43
4.4. Composición química del aceite esencial de <i>Siparuna muricata</i> (Siparunaceae).....	44
4.5. Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de <i>S. muricata</i>	57
4.6. Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial.....	59
4.6.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias.....	59
4.6.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para hongos.....	61
V. CONCLUSIONES	63
VI. RECOMENDACIONES	65
VII. ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las columnas capilares.....	24
Tabla 2. Humedad promedio de las muestras.....	42
Tabla 3. Rendimiento en % (p/v) de las tres destilaciones hechas para cada recolección.....	43
Tabla 4. Densidad del aceite <i>S. muricata</i>	44
Tabla 5. Índices de refracción del aceite <i>S. muricata</i>	44
Tabla 6. Composición química del aceite esencial de <i>S. muricata</i>	45
Tabla 7. Porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial de <i>S. muricata</i> para GC-MS y GC-FID en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX.....	49
Tabla 8. Actividad biológica en bacterias del aceite <i>S. muricata</i>	60
Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$).....	61

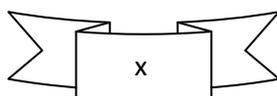
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Parámetros desarrollados en la presente investigación.....	3
Figura 2.	Esquema del desarrollo de la investigación.....	15
Figura 3.	Zona de estudio de la especie <i>S. muricata</i>	16
Figura 4.	Proceso de destilación.....	18
Figura 5.	Determinación humedad	20
Figura 6.	Esquema para la identificación de los componentes químicos del aceite esencial.....	25
Figura 7.	Parámetros de operación del GC-MS en la columna DB5-MS.....	27
Figura 8.	Parámetros de operación del GC-MS en la columna polar HP-INNOWAX.....	28
Figura 9.	Cromatograma del aceite esencia <i>S. muricata</i> de la primera recolección SYC11.....	29
Figura 10.	Espectro de alpha pinene de la muestra SYC11 de la primera recolección de <i>S. muricata</i>	31
Figura 11.	Parámetros de operación del GC-FID en la columna DB5-MS.....	33
Figura 12.	Parámetros de operación del GC-FID en la columna polar (HP-INNOWAX).....	34
Figura 13.	Compuestos mayoritarios del aceite esencial de la materia vegetal <i>S. muricata</i> en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX.....	48
Figura 14.	Cromatogramas del aceite esencial de <i>S. muricata</i> en DB5-MS.....	52
Figura 15.	Comparación de cromatogramas del aceite esencial de <i>S. muricata</i> de las destilaciones por cada recolección.....	54
Figura 16.	Espectro de germacrene D.....	57
Figura 17.	Espectro de germacrene B.....	58
Figura 18.	Espectro de delta cadinene.....	58
Figura 19.	Espectro de alpha guaiene.....	59



LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.	<i>Siparuna muricata</i>	11
Fotografía 2.	Recolección de material vegetal.....	17
Fotografía 3.	Tratamiento pos cosecha del material vegetal.....	17
Fotografía 4.	Almacenamiento y etiquetado del aceite de <i>S. muricata</i>	19
Fotografía 5.	Determinación densidad relativa.....	22
Fotografía 6.	Índice de refracción.....	23
Fotografía 7.	Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N.....	24
Fotografía 8.	Preparación de la muestras de los aceites esenciales para las inyecciones cromatografías.....	26
Fotografía 9.	Cultivo Overnight para bacterias.....	37
Fotografía 10.	Medios de cultivo para hongos.....	37
Fotografía 11.	Placa TC96 (Microplaca para cultivo de tejidos de 96 pocillos, fondo U).....	38
Fotografía 12.	CMI Antibacteriana.....	39
Fotografía 13.	CMI Antifúngicas.....	40



LISTA DE ANEXOS

Anexo I.	Determinación del rendimiento del aceite esencial.....	67
Anexo II.	Determinación de humedad.....	68
Anexo III.	Determinación de la densidad relativa a 20°C.....	69
Anexo IV.	Determinación del Índice de refracción.....	71
Anexo V.	Cálculo del coeficiente de variación (CV).....	72
Anexo VI.	Cálculo de la desviación estándar (σ).....	73
Anexo VII.	Referencias bibliográficas Índice de Kóvats.....	74

RESUMEN

La presente investigación trata del estudio del aceite esencial de *S. muricata* que se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor, la humedad promedio fue de 62% y su rendimiento de 0,19%, la densidad promedio fue de 0,93 g/cm³ y el índice de refracción de 1,5000.

Se identificaron un total de 45 compuestos en el aceite esencial correspondiendo el 87,83% y el 85,80% para DB5-MS y HP-INNOWAX respectivamente: germacrene D (41,79%), germacrene B (9,58%), delta cadinene (5,42%) son los compuestos mayoritarios en DB5-MS, y en la columna HP-INNOWAX los compuestos mayoritarios fueron: germacrene D (34,86%), germacrene B (7,99%), delta cadinene (6,16%), alpha guaiene (5,90%).

La actividad biológica se determinó mediante el método de microdilución en caldo. El aceite esencial de *Siparuna muricata* de la primera recolección tuvo actividad inhibitoria frente a la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con una concentración de 62,5 µg/mL, de igual forma la segunda y tercera recolección presentaron actividad inhibitoria en los hongos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 con concentración de 62,5 µg/mL y 125 µg/mL.

ABSTRACT

This research is the study of the essential oil of *S. muricata* was obtained by distillation by steam, the average humidity was 62% and yield of 0.19%, the average density was 0.93 g/cm³ and the refractive index of 1.5000.

We identified a total of 45 compounds in the essential oil corresponding 87.83% and 85.80% for DB5-MS and HP-INNOWAX respectively: germacrene D (41.79%), germacrene B (9.58%), delta cadinene (5.42% are the majority compounds in DB5-MS, and in the column HP-INNOWAX the majority compounds were: germacrene D (34.86%), germacrene B (7.99%), delta cadinene (6.16%), alpha guaiene (5.90%).

Biological activity was determined by the broth microdilution method. The essential oil of *Siparuna muricata* in the first collection was inhibitory activity against the gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), is obtained starting) with a concentration of 62.5 µg/mL, in the same way, the second and third collection showed inhibitory activity in the fungi *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) and *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) with a concentration of 62.5 µg/mL and 125 µg/mL.



**STUDY ON THE CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
ESSENTIAL OIL *Siparuna muricata* FAMILY OF THE
SIPARUNACEAE in Loja**

Villalta Córdova, Claudia^{1*}; Morocho Zaragocin, Vladimir²

Escuela de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto - Loja Ecuador • Apartado postal: 11-01-608 • PBX: (593-7) 2570-275

Departamento de Química. Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto - Loja Ecuador • Apartado postal: 11-01-608 • PBX: (593-7) 2570-275
<http://www.utpl.edu.ec>

cvvillalta@utpl.edu.ec; svmorocho@utpl.edu.ec

ABSTRAC

The oil composition *Siparuna muricata* leaves collected in the Yangana of the Loja canton in state of fructification, was obtained by distillation using steam, was determined by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS and GC-FID. We identified a total of 45 compounds, representing (87.83%) in DB-5MS, the (85,80%) in HP-INNOWAX. The major components were germacrene D (41.79%), germacrene B (9.56%), alpha guaiene (5.90%), delta cadinene (5.42%). The essential oil of *S. muricata*. inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (62.5 µg/mL) *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 (125 µg/mL): *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 (62.5 µg/mL) and was inactive against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ATCC 9997 *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus vulgaris* ATCC 8-127, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* LT2, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. The essential oil of *S. muricata* has a promising microbiological activity.

Keywords: Germacrene D, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

INTRODUCTION

In Ecuador there is a great cultural tradition in the use of plants species for therapeutic purposes,¹ these medicinal plants are an invaluable resource for their potential pharmacological study with the necessary demand for new drugs,² nowadays is recorded only a few publications on the use of plant richness in the south of Ecuador.¹

S. muricata belongs to the family of Siparunaceae consisted by 180 species distributed in tropical zone of America. About 40 species are represented in the Ecuador, 11 species have been recorded in the andes forests.³ Besides this species are located in the provinces of Napo, Zamora Chinchipe, Azuay, Bolivar, Cañar. Chimborazo, Imbabura, Tungurahua and Loja.⁴ The *S. muricata*, commonly known as lemongrass, is a bush or small tree with odor citrus.³



The traditional use of *siparuna* species used in traditional medicine for its, analgesic, febrifuge antitussive, hypotensive and healing.⁵ Watery infusions of the leaves and stems of *S. muricata* so used as an antacid,⁶ respiratory conditions such as pneumonia, sinusitis, otitis, bronchitis, bacteremia, meningitis, for vaginal infections after surgery and childbirth.⁷ due to studies of the extract of *S. muricata* compounds are reported as: alkaloids, terpenes, flavonoids, tannins, steroids, cumarinas.¹

METHODOLOGY

Plant material

We collected plant *S. muricata* at the parish Yangana of the canton of Loja at the Anganuma neighborhood ten minutes from the road by the bridle path that leads to the East of Numbala belonging to Zamora Chinchipe, between the months of August and September 2011 period of flowering and fruiting. The species was identified by one of the authors (Morocho Vladimir) and compared with a sample that es basedon the HUTPL Herbarium, with voucher in Herbarium PPN-mn-002 in the herbarium voucher. It was the fresh plant material and in good condition. This process is to use only the leaves are made the collections on three occasions with an interval of 15 days.

Oil extraction

The extraction of essential oil of *S. muricata* was performed using the method of distillation by entrainment by steam.⁸ After 4 kg of plant material for three hours distillate were obtained 7.5mL of essential oil, the oil is finally deposited in dark or amber vial that was

stored in refrigeration until their respective analysis.

Chromatographic analysis

The essential oil was analyzed in the laboratory of chromatography, using the gas chromatograph (Agilent 6890 Series) attached to the mass spectrometer (Agilent 5973 series inert). Equipped with a column HP-INNOWAX polar, nonpolar column DB5-MS provided with a computerized MSD ChemStation D.01.00 SP1 and flame ionization detector.

I was based on the retention time of some of the components, the qualitative and quantitative composition was determined by using known standards. The constituents of the oil were identified on the basis of their rates of Kovats (KI) in both columns. KI was determined with reference to a homologous series of aliphatic hydrocarbons (C10-C25). The mass spectra were compared with the spectra of the Wiley database 7n.1 of the team. The quantification of the components was made on the basis of their areas GC peak in two columns.

For injecting samples into the gas chromatograph was a dilution of the oil, essential oil 10 μ L concentrate diluted in 990 μ L of dichloromethane and injected using the following parameters; injector temperature 210°C. Detector temperature of 250°C, oven temperature 50°Cc-210°C with a ramp of 2.5 mL/min.

Physical properties

Essential oil density was determined according to standard NF T AFNOR 75 to 111, and the refraction index was used a refractometer (model ABBK). In accordance with the NF T AFNOR 75 to 112.



Determination of the biological activity of *S. muricata* oil

We assessed the biological activity of the oil versus 9 pathogenic microorganisms. 5 Gram-negative strains: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997; *Proteus vulgaris* ATCC 8427; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* LT2, 2 gram positive strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 2 strains fungi: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

To determine the biological activity, the method of micro broth dilution (CMI)⁹ which is defined as the lowest concentration of extract required for inhibiting the production and multiplication visible growth of a microbial strain given into the test system,¹⁰ and for bacterial strains used for Mueller Hinton Broth and the fungal strain Sabouraud dextrose broth.

The preparation of oils was made by diluting 20 μL of essential oil concentrate, in 980 μL dimethyl sulfoxide (DMSO). To assess the activity in bacteria were cultured microorganism overnight at 36°C incubated for 24 hours,¹¹ of this crop was 150-300 μL in 7 mL of physiological saline (NaCl), adjusting the inoculum at a concentration equivalent to 0.5 on the scale of McFarland, of this suspension was 140 μL , and Mueller Hinton Broth adjusting to a bacterial 2×10^6 population were inoculated in 7 mL of broth UFC/mL; 100 μL of this suspension are used to make up to 200 μL of the final volume of the course of cultivation, so the bacterial population was adjusted to

5×10^5 UFC/mL. Finally, the plates were incubated at 37°C for a period of 18 to 24h.

For the positive control, we use antibiotics in solution (8 mg/mL) of ampicillin, (1 mg/mL) gentamicin and DMSO as a negative control.

The values of CMI in fungi were determined using a final concentration of 5×10^4 spores/mL of *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) and *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188). Itraconazole was used as positive control (1 mg/mL), and the DMSO as negative control.

RESULTS AND DISCUSSION

The oil of *S. muricata* present a greenish yellow color, has an odor similar to the odor citric in lemon, its physical properties are detailed in Table 1.

Table 1. Oil Physical Properties *S. muricata*

Rc	Hm(%)	R (%)	d ²⁰	n ²³
1	63,30	0,19	0,97	1,5100
2	64,91	0,19	0,90	1,5000
3	57,78	0,19	0,91	1,5000

Rc = Collection

Hm = relative humidity

R = yield of essential oil

d²⁰ = Density of essential oil

n²⁰ = Refractive index of essential oil

We identified a total of 45 compounds in the essential oil of *S. muricata*, 32 compounds by column DB5-MS and 35 HP-INNOWAX column, 22 were identified in both columns, the majority compounds are germacrene D (41.79%), germacrene B (9.58%), delta cadinene (5.42%) in DB5-MS, and HP-



INNOWAX column the compounds were germacrene D (34.86%), germacrene B (7.99%), delta cadmene (6.16%), alpha guaiene (5.90%) (see graph 1), this is the first report of the chemical composition of the oil of this species.

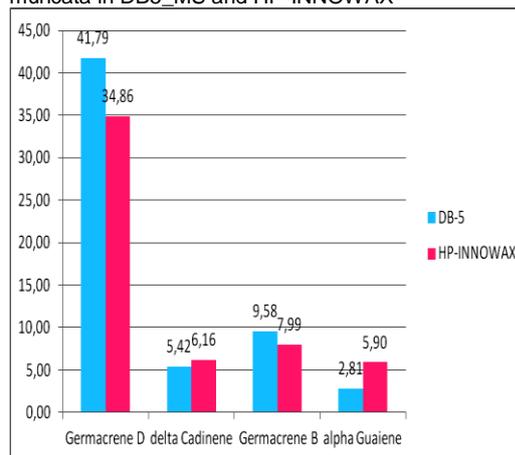
Studies of other species of *Siparuna* such as *S. thecaphora*; *S. sessiliflora* reported to germacrene D as major compound with 32.7% and 7% respectively⁵⁻¹² which is an indicative chemotaxonomic.

In another analysis of above ground parts of the species *S. guianensis Aublet (negramina)* of three populations of Brazil (samples A, B and C), flowering time, they also differ in the percentage of the major component. The main component of the oil sample A was the epi-a-bisabolol (25.1%) and spathulenol (15, 7%). In the sample B, which is the spathulenol (22%), selin-11-en-4-a-ol (19.4%), B-eudesmol (10.0%) and elemol (10.0%). For sample C, the germaerona obtained by (23.2%), germacrene B (8.0%) and atractilona (31.4%),¹³ which are also found in *S. muricata* although to a lesser percentage.

Anthony et al. (1984) found in the leaves of the species *S. guianensis* Panama compounds as curzeronona (25.64%), degradation products thereof curzeronona (42.31%), miristicina (7.93%), α -elemene, germacrene, B-elomeno. The essential oil *S. eggersii* was composed primarily of the oxygenated sesquiterpenes including the epicurzerenone (29.9%) was the most representative. In the chemical composition of the first collection *S. muricata* emphasized the presence of two major compounds and germacrone, epicurzerenone which disappear in identifying the second and third, this

shift may be due to factors such as phenolic status, plant age climate, soil type.

Graph 1. Main compounds of the essential oil of *S. muricata* in DB5_MS and HP-INNOWAX



The data obtained by gas chromatography on oil chemistry *S. muricata* are presented below in Table 2.



Table 2. Percentage of oil of the chemical composition of *S. muricata*

No.	COMPOUNDS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% RELATIVE AMOUNT											
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	DB5-MS						HP-INNOWAX					
						SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	Σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV
1	Alpha-Pinene	936	939	1016	1034	0,79	1,66	3,31	1,92	0,92	0,48	2,32	3,25	5,58	3,72	1,24	0,33
2	Camphene	950	954	1055	1077	0,10	0,54	1,13	0,59	0,36	0,60	0,52	1,10	2,05	1,22	0,55	0,45
3	Sabinene	973	975	1112	1123	3,77	0,91	0,23	1,64	1,42	0,87	–	1,83	0,53	1,18	0,65	0,55
4	Beta Pinene	978	979	1099	1113	2,67	0,43	0,78	1,29	0,92	0,71	2,83	0,72	1,45	1,67	0,78	0,47
5	Beta Myrcene	990	990	1156	1168	3,74	0,54	0,52	1,60	1,43	0,89	5,03	1,22	1,25	2,50	1,69	0,68
6	delta 3 Carene	1006	1011	1137	1148	0,31	0,34	0,35	0,33	0,01	0,04	0,95	0,71	0,71	0,79	0,11	0,14
7	limonene	1026	1029	1190	1212	0,64	0,46	1,39	0,83	0,38	0,45	1,20	0,47	1,50	1,06	0,39	0,37
8	cis- β -Ocimene	1038	1037	1227	1245	1,81	–	0,33	1,07	0,74	0,69	2,94	0,15	0,60	1,23	1,14	0,93
9	β trans Ocimene	1040	1050	1243	1242	3,93	0,14	0,18	1,42	1,67	1,18	0,45	–	0,43	0,44	0,01	0,02
10	beta Phellandrene	–	–	1201	1209	–	–	–	–	–	–	0,57	0,37	0,80	0,58	0,15	0,25
11	alpha terpinolene	–	–	1275	1275	–	–	–	–	–	–	–	0,11	0,12	0,12	0,01	0,04
12	bornyl acetate	1282	1289	1599	1580	0,15	–	0,33	0,24	0,85	3,56	0,35	–	0,47	0,41	0,06	0,15
13	alpha Cubebene	1342	1351	1457	1463	0,49	1,42	0,75	0,88	0,08	0,09	0,92	1,70	0,84	1,15	0,37	0,32
14	alpha Copaene	1369	1376	1491	1488	0,30	2,25	2,16	1,57	0,34	0,22	0,69	2,72	2,32	1,91	0,81	0,43
15	beta bourbonene	1376	1388	1521	1512	0,39	0,53	0,62	0,51	0,11	0,21	0,65	0,69	0,74	0,70	0,03	0,05
16	beta.-Cubebene	1382	1388	1547	1558	0,24	0,92	1,08	0,74	1,31	1,77	0,51	1,28	1,30	1,03	0,35	0,34
17	beta elemene	1384	1390	–	–	0,49	0,52	0,25	0,42	1,30	3,11	–	–	–	–	–	–
18	trans Caryophyllene	1411	1419	–	–	4,33	4,27	1,35	3,32	0,58	0,17	–	–	–	–	–	–



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

No.	COMPOUNDS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% RELATIVE AMOUNT											
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	DB5-MS						HP-INNOWAX					
						SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	Σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV
19	alpha Guaiene	1429	1439	1609	1651	-	4,11	1,51	2,81	0,05	0,02	9,27	2,54	5,90	5,90	-	-
20	alpha Humulene	1447	1454	-	-	0,21	1,50	1,52	1,08	0,04	0,03	-	-	-	-	-	-
21	epi Bicyclosesquiphe llandrene	1463	1471	-	-	-	0,26	0,15	0,21	0,04	0,19	-	-	-	-	-	-
22	Viridiflorene = Ledene	1470	1496	-	-	0,18	0,11	-	0,15	0,04	0,24	-	-	-	-	-	-
23	α Amorphene	1470	1484	1703	1691	-	0,82	0,74	0,78	0,28	0,36	-	0,91	0,50	0,71	0,21	0,29
24	delta elemene	-	-	1473	1452	-	-	-	-	-	-	-	0,53	0,54	0,53	0,00	0,01
25	Germacrene D	1475	1485	1747	1772	22,74	48,19	54,46	41,79	0,29	0,01	21,86	40,57	42,15	34,86	8,67	0,25
26	beta Selinene	1481	1490	1756	1781	-	1,18	0,62	0,90	0,39	0,43	1,62	2,05	1,35	1,67	0,25	0,15
27	alpha ylangene	-	-	1482	1471	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,14	0,13	0,01	0,04
28	bicyclogermacrene	1487	1500	1772	1738	4,10	2,77	2,13	3,00	0,02	0,01	1,08	1,93	1,72	1,57	0,09	0,06
29	α bulnesene	1494	1509	-	-	-	0,78	0,20	0,49	0,62	1,26	-	-	-	-	-	-
30	Eremophilene	1499	1486	-	-	-	2,14	1,37	1,76	0,01	0,00	-	-	-	-	-	-
31	E,E Alpha Farnesene	1503	1505	-	-	0,42	1,21	0,33	0,65	0,36	0,55	-	-	-	-	-	-
32	γ Cadinene	1506	1513	-	-	-	0,52	0,47	0,50	0,10	0,19	-	-	-	-	-	-
33	delta Cadinene	1512	1523	1808	1808	4,68	6,35	5,23	5,42	-	-	-	6,45	5,87	6,16	0,29	0,05
34	Cadina 1,3,5 triene	1515	1519	-	-	-	0,15	0,13	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Germacrene B	1550	1559	1885	1864	9,42	9,20	10,11	9,58	-	-	7,26	8,17	8,55	7,99	0,49	0,06
36	alpha Muurolene	1545	1500	1767	1727	-	0,10	0,29	0,20	-	-	0,18	0,35	0,25	0,26	0,06	0,23



No.	COMPOUNDS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% RELATIVE AMOUNT												
						DB5-MS						HP-INNOWAX						
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	Σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV	
37	beta caryophyllene	-	-	1609	1608	-	-	-	-	-	-	2,69		1,98	2,33	0,35	0,15	
38	alpha caryophyllene	-	-	1694	1680	-	-	-	-	-	-	0,43	1,48	1,48	1,13	0,47	0,41	
39	gamma muurolene	-	-	1699	1741	-	-	-	-	-	-	0,29	0,22	0,41	0,31	0,07	0,22	
40	epizonarene	-	-	1660	1688	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,17	0,18	0,01	0,08	
41	carotol	-	-	2037	2024	-	-	-	-	-	-	-	1,29	1,17	1,23	0,06	0,05	
42	caryophyllene oxide	-	-	2069	2068	-	-	-	-	-	-	0,24	0,19	-	0,21	0,02	0,11	
43	Germacrene D 4-ol	-	-	2172	2069	-	-	-	-	-	-	0,67	-	0,35	0,51	0,16	0,32	
44	spathulenol	-	-	2265	2150	-	-	-	-	-	-	0,32	0,18	0,16	0,22	0,07	0,30	
45	beta eudesmol	-	-	2394	2258	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,16	0,18	0,02	0,13	
									TOTAL	87,83						85,80		

IK A, P IK, Kovats indices in the polar column (DB5-MS) and polar column (HP-INNOWAX) respectively

a = compounds arranged according to the order of elution on DB5-MS column

b = average percentage calculated based on the area% of the peaks reported in Column DB5-MS for each harvest (SYC11-3,SYC21-3,SYC31-3)

c = average percentages calculated based on area% of the peaks reported HP-INNOWAX-MS column

* = Sum of the relative amount found in column DB5-MS and HP-INNOWAX-MS

\bar{x} = average of % relative amount found in column DB5-MS and HP-INNOWAX- MS

σ = standard deviation% of the relative amount found in column DB5-MS and HP-INNOWAX-MS

CV = coefficient of variation of the relative% of the amount found in the column DB5-MS and HP-INNOWAX- MS

IK Ref., referencias: ^aref, ^bref, ^cref, ^dref, ^eref, ^fref, ^gref, ^href, ⁱref, ^jref, ^kref, ^lref, ^mref, ⁿref, ^oref, ^pref, ^qref, ^rref, ^sref, ^tref, ^uref.

Source: Direct Research

Preparation: The Author



CMI tests resulted in bacteria that samples of oil obtained in the first collection possess inhibitory activity on the bacterium *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (62.5 µg/mL).

The result can be compared to other studies do *Siparuna* species which possess antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* as *S. sessiliflora* which inhibits growth at concentrations of 10, 20 and 5 mg/mL.⁵ *S. apiosyce* extract also has activity in the bacteria in 50 µL/mL. In *S. guianensis*, ethanolic extract showed antimicrobial activity against *S. aureus*. Additionally, has been found to the total ethanol extract *Siparuna echinata* presents antibacterial activity of 50% on the same bacterium. This confirms the results, taking into account the relationship between the species,¹⁴ with the same genre of the *S. muricata*. The results with bacteria *P. aeruginosa*; *K pneumoniae*; *P. vulgaris*; *E. coli*; *S. typhimurium*; *E. faecalis* is greater to 1000µg/mL, the fungal inhibitory activity which was obtained in samples, *S. muricata* to strains of *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, shown below in table 3.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (ug/mL)

Collection	Bacteria	Fungi	
	ATCC 25923	ATCC 28185	ATCC 28188
First	62,5	500	500
Second	> 1000	125	62,5
Third	> 1000	125	125

Itraconazole; positive controls 100%

inhibition (7,81 µg/mL)

ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 28185	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
ATCC 28188	<i>Trichophyton rubrum</i>

The extract of *S. muricata* reported compounds as: alkaloids, terpenes, flavonoids, tannins, steroids, coumarins,¹ which can be compared with the results of the antibacterial activity of *S. sessiliflora*, which can be attributed to alkaloids isolated from the leaves of this plant. Isoquinolinic alkaloids, which are characteristic of the genus *Siparuna* compounds, and the family Siparunaceae is rich in these compounds of the type aporfinicos. Isoquinolinic alkaloids are equipped with different biological activities within which highlights important antimicrobial activities, mainly against bacteria grampositivas.¹⁵

CONCLUSION

The essential oil of *S. muricata* identified a total of 45 compounds, of which 22 were identified in both columns whose main component is the germacrene D (41.79%), it was determined that the first collection has inhibitory activity with *Staphylococcus aureus* bacteria. the samples of the second and third collection possess inhibitory results with fungi *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, the results obtained can help to develop some kind of drugs to help offset the effects caused by the microorganisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Chemistry Department of at the Technical University of Loja for funding this research.

REFERENCES

1. Ordoñez V. Paola; Vega E. Mónica; Malagón A, Omar; *et al.*, Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

- in Loja Province. *Lyonia* 10 (2) March 2006-Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon/Dry Forest Conservation: Ethnobotany and Forest Use, 2006.
2. Eduardo P. Vivot Lupi; Cecilia I. Sánchez Brizuela; Francisco Cacik Jeifetz; Christian J. Sequin Acosta (2009), Screening of antifungal activity of extracts present in Entre Ríos flora species, vol.43 no.4, 0034-7515
 3. Carmen Ulloa Ulloa & Peter Moller Jorgensen, 1993. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador, *Rts* 30: 1-264.
 4. Jørgensen, P.M. & S. León-Yáñez (eds.). 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 75: i-viii, 1-1182
 5. Mahecha Mahecha, C.A., Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. 2010.
 6. Vicente Tene, Omar Malagón, Paola Vita Finzi, Giovanni Vidari, Chabaco Armijos, Tomás Zaragoza, 2006 An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador,
 7. Cajamarca, G.R., La Diversidad Biológica en Cajamarca. Primera ed-2012, Cajamarca – Perú: Biblioteca Nacional del Perú No: 2012-02958.
 8. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.* 2004; 18(6): 435-48.
 9. Marie B. Coyle, Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana, Departments of Laboratory Medicine and Microbiology, University of Washington; cap 5 pp (53-63)
 10. Rivera Rogel, Guisella; Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie *Piper ecuadorensis* (matico), Loja – Ecuador; UTPL
 11. Shiva Ramayoni, Carlos M; Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento; 2007 Universidad Autónoma de Barcelona
 12. Ciccio, J.F. and J. Gómez-Laurito, Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 2002. 50(3-4): p. 963-967.
 13. Valentini, C., C. Rodríguez-Ortiz, and M. Coelho, *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 2010. 12(1): p. 96-104.
 14. Ruiz, S., *et al.*, Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi Hieron.*, *Siparuna eggertii Hieron.*, *Tagetes filifolia Lag.* and *Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze* from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2010. 13(6): p. 676-691.
 15. Padilla González, G.F. and E. Gil Archila, Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2012. 17(1): p. 65-72.

*I. FIN, PROPÓSITO Y
COMPONENTES*



1.1 . Fin del proyecto

- El estudio de la especie ***S. muricata*** de la familia de las Siparunaceae, aportará con nuevos conocimientos dentro de la flora aromática del sur del Ecuador los cuales determinarán su importancia y posibles aplicaciones en la industria.
- Mediante este estudio podemos contribuir con datos reales en cuanto al porcentaje de aceite presente en ***S. muricata***, la determinación de su composición química, sus propiedades físico-químicas, la presencia de compuestos mayoritarios lo cual es de gran interés en formulaciones farmacéuticas.
- Se realizará estudios de evaluación biológica lo cual nos permitirá evaluar la actividad del aceite esencial de la especie ***S. muricata***, ante cepas bacterianas y fúngicas, dejando un precedente importante de las propiedades de dicha especie y ayudando al desarrollo de nuevos fitofármacos

1.2 . Propósito del proyecto

- Los aceites en la actualidad tienen una gran aplicación ya sea dentro de la industria alimenticia, en productos de belleza, desinfectantes, en alcoholes etc., Pero también tiene gran importancia en la medicina ya sea por su sabor, olor o por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiparasitarias, por lo que es necesario desarrollar nuevos productos naturales y no tóxicos para evitar la proliferación de bacterias y hongos para poder evitar futuras afecciones a nivel mundial.
- Contribuir al estudio del aceite esencial de ***S. muricata*** por el uso medicinal que se le da a nivel de la provincia, existen publicaciones de algunas especies del género *Siparuna* que poseen propiedades febrífugas, analgésicas, antiinflamatorias, antitusivas, hipotensivas y cicatrizantes por lo que puede formar parte de formulaciones farmacéuticas

1.3 . Componentes del proyecto

Los resultados que se esperan son:



- Obtener el aceite esencial de ***S. muricata***.
- Determinar las propiedades físicas del aceite: rendimiento, porcentaje de humedad, densidad relativa, índice de refracción
- Determinar la composición química del aceite, obtener cromatogramas y presentar gráficas con los compuestos que se encuentren en mayor porcentaje
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para bacterias y hongos

1.4 . Hipótesis del proyecto

1.4.1 Actividad biológica

H_1 : Los aceites esenciales presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

H_0 : Los aceites no presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

1.5 . Diseño estadístico

Debido a que el objetivo central del proyecto es contribuir al conocimiento y comparación de los datos dentro de la flora del sur del Ecuador, se realizó un diseño estadístico de las tres destilaciones de cada recolección de la ***S. muricata***, así para los datos de humedad, de rendimiento y cromatografía se calculó la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, los mismos cálculos se realizaron para los datos obtenidos de las propiedades físicas.

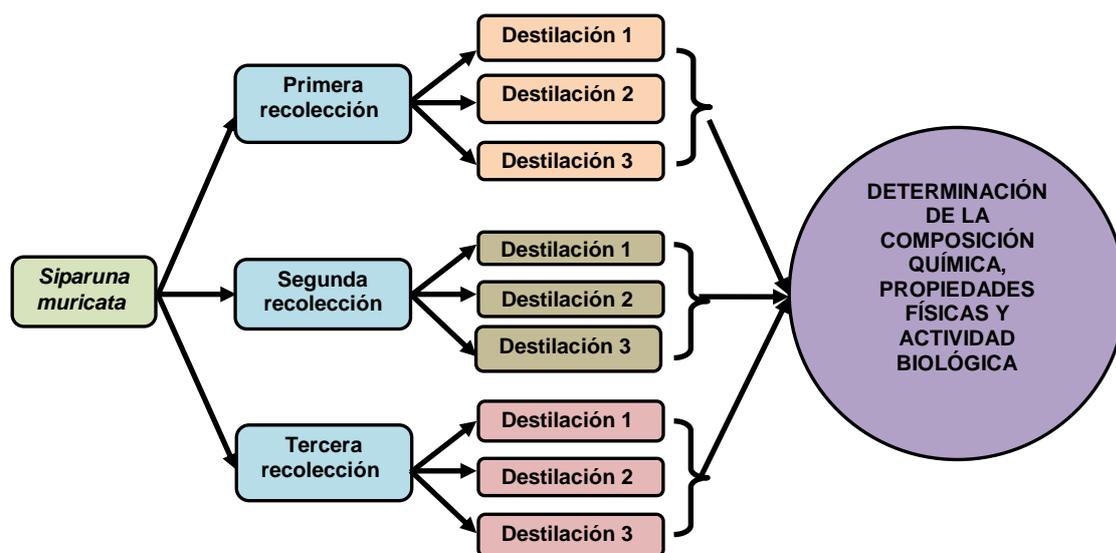


Figura 1. Parámetros desarrollados en la presente investigación

Elaboración: La Autora

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM) conforman una lista amplia y diversa de especies, muchas de las cuales no tienen un único uso.¹ Denominamos plantas aromáticas a todas las especies vegetales cuya importancia radica en poseer un aroma y/o sabor que la hace útil. Esta propiedad está dada por componentes o fracciones volátiles que químicamente se denominan esencias o aceites esenciales.²

Existen alrededor de 250000 especies de plantas medicinales en el mundo, de las cuales sólo se conocen, y no en su totalidad el 10%, proporción que indica lo mucho que falta por investigar y el gran potencial de desarrollo que existe en el área de fitoterápicos.³

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas en el mundo, especialmente en países en desarrollo. Hasta la aparición de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades y las de los animales.⁴ Las plantas aromáticas son aquellas plantas cuyos principios activos están constituidos por esencias.⁵ Son aquellos vegetales cuyos principios activos son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial sobre el organismo vivo; su utilidad primordial es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o el desequilibrio orgánico.⁶

El uso de las plantas medicinales, aromáticas y productoras de especias se remonta a la antigüedad, donde inicialmente fueron usadas siguiendo el instinto, y más tarde, gracias a los avances de la química se fue racionalizando su uso y determinando sus propiedades terapéuticas, aromáticas.⁷ El uso de plantas para la preservación y el tratamiento de enfermedades está incorporado a las costumbres y tradiciones de la población ecuatoriana, a tal punto que no ha podido ser sustituido totalmente por la medicina moderna o convencional, por el contrario la medicina natural ha cobrado

¹ Moré Palos, E. and A. Colom Gorgues, Distribución comercial de plantas aromáticas y medicinales en Cataluña. Investigación agraria. Producción y protección vegetales, 2002. **17**(1): p. 43-66.

² Forlín, Plantas aromáticas, Agropecuaria, I.E.E. Colorado-Formosa, E.

³ Para la Innovación Agraria, F., Agenda para la Innovación Agraria: requerimientos y acciones de innovación para un conjunto de 15 cadenas productivas y temas de la agricultura. 2011.

⁴ Zambrana Álvarez, T., Beneficios de la fitoterapia. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2005. **10**(2): p. 0-0

⁵ Bayona Roa, C.A., Modelamiento matemático de un secador solar de plantas aromáticas, 2011, Universidad Nacional de Colombia.

⁶ Ing. Agr. Otto Brutti, La Industria de las Plantas Medicinales Aromáticas y Condimentarias en Entre ríos, 2003 Biblioteca Virtual universal

⁷ Fundación Chemonics Colombia, Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas (Cultivo de Plantas Medicinales y Aromáticas) PERSUAP, Dic/03



vigor y está en incremento, gracias a los beneficios de los productos naturales que se destinan principalmente a fármacos, químicos, etc.⁸

Hay cientos de plantas aromáticas y sólo unas cuantas de ellas se utilizan para la producción comercial de esencias. Alrededor de un tercio de las plantas empleadas tradicionalmente en la medicina herbolaria son aromáticas. No hay dos de ellas que huelan exactamente igual, y las propiedades de cada una son únicas. La esencia de una planta es como su personalidad.⁹

En los aceites esenciales se hallan concentrados sabores y aromas característicos.¹⁰ Pueden estar localizados en pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal,¹¹ en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta.¹² Estos son compuestos odoríferos naturales que se encuentran en las plantas y son aislados de las mismas. Generalmente, son líquidos (en algunas ocasiones semisólidos y muy raras veces sólidos) poco solubles en agua pero si volatilizables con vapor, se evaporan a diferentes velocidades bajo presión atmosférica.¹³ Por lo general tienen color y suelen ser más ligeros que el agua. Se disuelven bastante bien en alcohol y se mezclan con los aceites vegetales grasas y ceras.¹⁴

Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides. Son inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada.¹⁵ Se pueden extraer de las muestras vegetales mediante diferentes métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con

⁸ Sotelo R., Verónica, "Proyecto de prefactibilidad para la producción de hierbas medicinales y aromáticas en el Valle de los chillos para exportar al mercado Alemán". 2005 Universidad Tecnológica Equinoccial

⁹ Tisserand, R., *El arte de la aromaterapia: Aceites esenciales y masajes para la cura del cuerpo y la mente*. Primera edición 2007, España: Colección Paidós Vida y salud.

¹⁰ Martínez, J., *et al.*, Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev Fac Agron*. 2003. 20: p. 502-12.

¹¹ Espitia Yanes, C.R., Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra *tribolium castaneum herbst (coleoptera: tenebrionidae)*, 2011, Universidad Nacional de Colombia.

¹² López Luengo, M.T. Los aceites esenciales: aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 2004. **23**(7): p. 88-91.

¹³ Batz, R.B.P. and P.Y.U.S.O.D.E.P. *Medicinales*, Comparación química y de rendimiento del aceite esencial de hoja y raíz de Valeriana *prionophylla Standl*. De dos diferentes localidades de Guatemala, in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia-2007*, Universidad San Carlos de Guatemala.

¹⁴ Lavabre, M., *Aromaterapia libro practico-1995*: Inner Traditions International.

¹⁵ Chávez, M.G.C., Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización, in *Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente 2007*, Universidad de Valladolid.



solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.¹⁶ El más frecuente es la extracción en corriente de vapor (destilación).¹¹

Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes).¹⁷ Los aceites esenciales (AEs) de plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables, propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes (AO), atrayendo la atención de químicos de productos naturales y sus importantes sectores de la industria farmacéutica, de perfumes, cosmética y de alimentos, entre otras, por sus posibles y viables aplicaciones.¹⁸

Para su evaluación antimicrobiana se aplica generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. Hay dos técnicas básicas usadas para la valoración de ambas actividades, antibacteriales, antimicóticas de los aceites esenciales: 1. El método de difusión en agar (pozo o disco de papel) y 2. El método de dilución (agar o caldo líquido). Las pruebas y evaluación de la actividad antimicrobiana son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad.¹⁵

Las familias Monimiaceae y Siparunaceae pertenecen a la Orden Laurales. La familia Siparunaceae comprende dos géneros, a) el género monotípico de África Occidental *Glossocalyx* y b) la Neotropical *Siparuna* género (anteriormente ubicado en la familia Monimiaceae), que contiene alrededor de 72 especies de arbustos, matorrales y árboles rezagados,¹⁹ a la cual pertenece la *S. muricata*.

Este género se caracteriza por biosintetizar compuestos tales como sesquiterpenos, flavonoides y alcaloides isoquinolínicos, sobre todo del tipo aporfinicos; compuestos a los cuales se les ha identificado importantes actividades biológicas, tales como antibacterianas, antimaláricas y antileishmaniasis, entre otras.²⁰

¹⁶ González Cabrera, M.V., Conservación de Mora, Uvilla y Frutilla Mediante la Utilización de Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeynalicum*), in Escuela de Bioquímica y Farmacia-2011, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: Riobamba.

¹⁷ Henao, J., et al., Extracción y caracterización del aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K. "orégano de monte" cultivado en el Quindío y evaluación de la actividad antimicrobiana. Rev. Invest. Univ. Quindío, 2010: p. 82-86

¹⁸ Acevedo, M.Á., et al., Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de *timol* y *carvacrol*. Scientia et Technica, 2007. 1(33).

¹⁹ Cicció, J.F. and J. Gómez-Laurito, Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. Revista de biología tropical, 2002. 50(3-4): p. 963-967.

²⁰ Padilla González, G.F. and E. Gil Archila, Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. 17(1): p. 65-72.



2.2 ANTECEDENTES

Durante siglos, las plantas autóctonas se han utilizado en la medicina natural para curar diversas enfermedades. La aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa para el cuidado de la salud y el desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos disponibles han llevado a grupos de científicos para investigar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales.²¹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población en países desarrollados se apoya en medicinas tradicionales (principalmente drogas vegetales) para sus necesidades básicas de salud. Además de las medicinas tradicionales practicadas en países en vías de desarrollo, existe un incremento en el número de medicinas alternativas o naturales. Los productos con mayor aceptación son sedantes, tónicos y tratamientos para desórdenes cardiovasculares, respiratorios, digestivos y tratamientos para la belleza.²²

La OMS (2003), en sus estudios manifiesta que la medicina tradicional es muy accesible y asequible en los países de ingresos bajos, como en el caso de Ecuador.²³ El Ecuador cuenta con muchas plantas medicinales que nuestros pueblos aborígenes utilizan con fines medicinales. Durante siglos estas plantas han sido empleadas en forma empírica y en la actualidad han llamado la atención de los investigadores a fin de descubrir los principios activos que justifican los usos terapéuticos.²⁴ Ecuador se encuentra entre los 10 países de mayor biodiversidad del mundo y gracias a esta característica se puede obtener una gran gama de productos naturales destinados al consumo directo y a la industria, entre estos productos se destacan las plantas medicinales, incluyendo las hierbas aromáticas.²⁵

Se reportan 3118 especies vegetales pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en el Ecuador. El 60% de las especies de plantas útiles registradas, tiene usos 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

²¹ Oliva, M.M., *et al.*, Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (LHer.) Britton from different regions of Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2010. **9**.

²² Beltrán Cifuentes, M.C., *et al.*, I study farmacognosico for the care of the health from essential oils obtained by distillation of steam dragging. Investigaciones Andina, 2010. **12**(20): p. 8-18.

²³ Carrión Paladines, H.V., El etnoecosistema en la producción de plantas medicinales de la comunidad" El Carmelo", parroquia de Chuquiribamba, Loja, Ecuador. 2012.

²⁴ Sulca Villamarín, T.S., Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *acmella repens* (botoncillo) *urtica dioica* (ortiga negra) y *sanchus oleraceus* (kana yuyo), plantas registradas en la parroquia la Esperanza-Imbabura sobre *astaphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* y *candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaríngeas. 2010.

²⁵ Gallardo, L.M.B., Análisis del sector de hierbas aromáticas y medicinales del ecuador y sus potenciales mercados de exportación, in Facultad de Ciencias Económicas y Negocios-2010, Universidad Tecnológica Equinoccial Quito.



Ecuador. El 16% del total de las especies son cultivadas y 9% de especies son silvestres.²⁶ Las plantas medicinales son el principal recurso terapéutico para un amplio sector de la población ecuatoriana. Las afecciones más comúnmente tratadas con plantas medicinales son: infecciones de riñón y estómago, dolor de cabeza, nervios, insomnio y gripe. Las familias más utilizadas fueron: Asteraceae, Rubiaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Solanaceae, Rutaceae, Apiaceae, Orchidaceae.²⁷

Es muy conocido en la provincia de Loja que las hierbas medicinales, son una alternativa natural para curar varias dolencias, y que se los encuentra frecuentemente en los mercados y abastos.²² La provincia de Loja cuenta con una gran riqueza vegetal que ha sido escasamente estudiada en este campo, registrándose actualmente pocas publicaciones sobre el uso de las plantas de la zona sur del Ecuador.²⁸

El género *Siparuna* consta de 180 especies distribuidas en América tropical. En el Ecuador están representadas unas 40 especies; 11 especies se han registrado en los bosques andinos.²⁹ Se caracteriza por poseer especies con arbustos de olor cítrico muy agradable y fruto color rojo-rosado muy aromático, por lo que puede situarse en el ámbito de plantas aromáticas; estos frutos presentan algún tipo de sustancia en su fragancia (aceite esencial) empleada en tratamientos naturales para mejorar afecciones de la vista, la garganta y el cerebro, su efecto se obtiene oliendo la planta, por tanto es importante extraer este aceite e identificar sus componentes, para que de ese modo se inicie con la identificación de aquellos principios activos que posiblemente le confieren estas y otras propiedades medicinales.³⁰

Siparuna es usado como antiinflamatorio, lo cual se puede atribuir a los alcaloides, terpenos, flavonoides y saponinas presentes. Los Nukak del Guaviare (República de Colombia), utilizan sus hojas maceradas en emplastos para las picaduras de hormigas yanabe (congas). Las hojas de algunas especies de *Siparuna*, especialmente el picho huayo o árbol de la fiebre, se usan en medicina tradicional por sus propiedades

²⁶ De la Torre, L., Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas 2008: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 105-114.

²⁷ Pablo César Ramos Corrales, M.C., Marta N. Colares, Etilé Dolores Spegazzini & María Adelaida Rosella, Relevamiento etnofarmacobotánico de Plantas Medicinales usadas en tres zonas diferentes del cantón Quevedo, Provincia de los Ríos (*Ecuador*). *Rojasiana*, 2011. **10**(1): p. 9-20

²⁸ Ordoñez V. Paola; Vega E. Mónica; Malagón A, Omar; *et al.* Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia* 10 (2) March 2006-Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon/Dry Forest Conservation: Ethnobotany and Forest Use, 2006.

²⁹ Carmen Ulloa Ulloa & Peter Moller Jorgensen, Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador, Tropicos.org. Missouri Botanical Garden

³⁰ Mahecha Mahecha, C.A., Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. 2010.



febrífugas, analgésicas, anti-inflamatorias, antitusivas, hipotensivas y cicatrizantes, y en uso externo por su acción desodorante.²⁹

El nombre vulgar de la *S. muricata* es limoncillo cuya infusión acuosa de sus hojas y tallos es usada como antiácida, la artritis, reumatismo, dolor de huesos, dolor muscular, dolor de estómago.³¹⁻³² En Ecuador se encuentra en las provincias de Napo, Zamora Chinchipe, Azuay, Bolívar, Cañar, Chimborazo, Imbabura, Loja y Tungurahua.²⁸ Los estudios del extracto de *S. muricata* reportan compuestos como: alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, esteroides, cumarinas.²⁷

Debido al extenso uso medicinal de la especie *S. muricata* dentro de nuestra provincia, es necesario realizar un estudio detallado sobre la composición química y actividad biológica del aceite esencial con la posibilidad de encontrar metabolitos con actividad farmacológica, además de contribuir con la investigación del proyecto: "Evaluación de la flora aromática del sur del Ecuador" que se desarrolla en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

En la presente investigación se desarrolló un estudio fisicoquímico, actividad biológica frente a cepas bacterianas y fúngicas usando el método de microdilución en placa (CMI) del aceite de *S. muricata*

³¹ Tene, V., *et al.* An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **111**(1): p. 63-81.

³² Bussmann, R.W. and A. Glenn, *Fighting pain: Traditional Peruvian remedies for the treatment of Asthma, Rheumatism, Arthritis and sore bones.* *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 2011. **10**(3): p. 397-412.



Siparuna muricata



Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Laureles
Familia: Siparunaceae
Género: *Siparuna*
Especie: *muricata*
Habito: Arbusto o árbol
Origen: Nativo
Altura: 3 – 4 m

Fotografía 1: *Siparuna muricata*
Fuente: Herbario UTP

Sinónimos

Citrosma muricata Ruiz & Pav, *Citrosma neglecta* Tul, *Siparuna boliviensis* Herzog, *Siparuna mathewsii* Perkins, *Siparuna muricato-alata* Herzog, *Siparuna neglecta* (Tul.) A. DC., *Siparuna pseudumbellata* Perkins, *Siparuna salvioides* Perkins, *Siparuna tayloriana* Perkins, *Siparuna umbelliflora* Perkins.³³

Usos terapéuticos

Se puede usar en afecciones respiratorias como neumonías, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteriemia, meningitis y otros procesos infecciosos, tos y fiebre de baja intensidad, con flema e inflamatoria. Asimismo, en la congestión. Puede usarse en niños o ancianos desnutridos con debilidad general que son propensos a la neumonía, por lo que es útil si hay resfriado común, gripe, laringitis y dolor de garganta. Puede usarse para lavar la nariz y los oídos. Las mujeres la pueden emplear para infecciones vaginales después de operaciones y partos.³⁴

³³ Jørgensen, PM, M. Nee & Beck SG. (Eds.) 2012. Catalogo de las Plantas vasculares de Bolivia. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. Trópicos

³⁴ Cajamarca, G.R., La Diversidad Biológica en Cajamarca. Primera ed-2012, Cajamarca – Perú: Biblioteca Nacional del Perú No: 2012-02958.



Enfermedades infecciosas

La enfermedad infecciosa es un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano y la respuesta inmune del mismo fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente. Este sistema reconoce en el organismo lo que es propio y rechaza lo ajeno.³⁵ Son causadas por la presencia y actividad de virus, bacterias, protozoos, parásitos multicelulares, y proteínas anormales llamadas priones, transmitidas por gran variedad de vías incluyendo el contacto directo o indirecto; ingestión (en agua o alimentos), transmisión de fluidos humanos; inhalación de partículas en el aire; transmisión por vectores tales como los mosquitos, las pulgas y garrapatas; y otros.³⁶ Estas causan enfermedades neurológicas degenerativas.³⁷

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices, son los organismos más abundantes del planeta, encontrándose en todo hábitat de la Tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre, pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior, en el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, aunque el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, sífilis, lepra, tifus, difteria, escarlatina, etc., las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias.³⁸

Los hongos son organismos eucariotas cuyas células contienen mitocondrias, un núcleo bien definido y otros organelos rodeados de membrana, carecen de clorofila y cloroplastos, por lo que no fotosintetizan, los hongos secretan enzimas digestivas y después absorben al alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática, se desarrollan mejor en hábitats oscuros y húmedos, requieren humedad y pueden obtener agua de una atmosfera humedad así como del medio en que viven, se

³⁵ Antoni de Jogna Prat S. S.A., Clínica de Enfermedades Infecciosas. Scientific, American, 1997.

³⁶ Rey, J.R., Enfermedades infecciosas emergentes. 2011.

³⁷ Ferri, E.F.R., Infecciones emergentes y enfermedades nuevas.

³⁸ Melgar Córdova, M.G., *et al.*, Fortalecimiento de la investigación Clínico Epidemiológico de las Bacterias predominantes en las enfermedades de transmisión sexual en pacientes atendidos en consulta externa y emergencia del Hospital Provincial Verdi Cevallos Balta de Portoviejo de mayo a noviembre del 2010. 2011.



reproducen por medio de esporas microscópicas, que carecen de flagelos y son estructuras reproductivas inmóviles, dispersadas por el viento o por animales.³⁹

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos. También en los últimos años se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos.⁴⁰

Los microorganismos para actividad biológica son: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,⁴¹ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,⁴² *Escherichia coli* ATCC 25922,⁴³ *Proteus vulgaris* ATCC 8427,⁴⁴ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997,⁴⁵⁻⁴⁶ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,⁴⁷ *Salmonella Typhimurium* LT2⁴⁸ y (Hongos) *Trichophyton rubrum* ATCC 28188,⁴⁹⁻⁵⁰ *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185.⁵¹

³⁹ Sólido, E.N.M.D.E.C., Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes. 2006.

⁴⁰ Cabrera, C.E., R.F. Gómez, and A.E. Zúñiga, La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica, 2007. 38(2): p. 149-158.

⁴¹ Rodríguez, C.A. and O. Vesga, *Staphylococcus aureus*. Biomédica, 2005. 25(4): p. 575-587.

⁴² García Mayorgas, A., et al. Sensibilidad a los antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España). Revista Española de Quimioterapia, 2006. 19(2): p. 140-143.

⁴³ Gisell Estefanía Pesantez Aguilar, Estudio del proceso de control del crecimiento de *Escherichia coli* mediante el uso de pasta de ajo (*allium sativum l.*), Quito – Ecuador, 2010

⁴⁴ Praise Selah G. Dagoc, Identification of *Proteus vulgaris* from an Unknown Sample, Mambajao, Camiguin

⁴⁵ Toro, L.M.E. and J.C.C. Correa, *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. Iatreia, 2010. 23(3)

⁴⁶ Andrade, V., G. de Resistencia Bacteriana, and J. Silva, *Klebsiella pneumoniae*. salud pública de México, 2004. 46(6).

⁴⁷ Martínez, C., et al., Colistin en el tratamiento de infección por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogresistente. Rev Asoc Mex Med Crit Intensiva, 2010. 26(4): p. 173-7.

⁴⁸ Müller, A.J., et al., The *typhimurium* Effector SopE Induces Caspase-1 Activation in Stromal Cells to Initiate Gut Inflammation. Cell host & microbe, 2009. 6(2): p. 125-136.

⁴⁹ Angulo, A.G., et al., Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Dermatología Venezolana, 2008. 46(4): p. 13.

⁵⁰ Hernández-Salazar, A., et al., Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. Revista iberoamericana de micología, 2007. 24(2): p. 122-124

⁵¹ Jiménez Puya, R. and J. Moreno Giménez, Micosis de las faneras. Revista iberoamericana de micología, 2006. 19(2): p. 36-90

*III. MATERIALES Y
MÉTODOS*



La metodología que se utilizó para la realización de la presente investigación se detalla a continuación (Ver figura 2.)

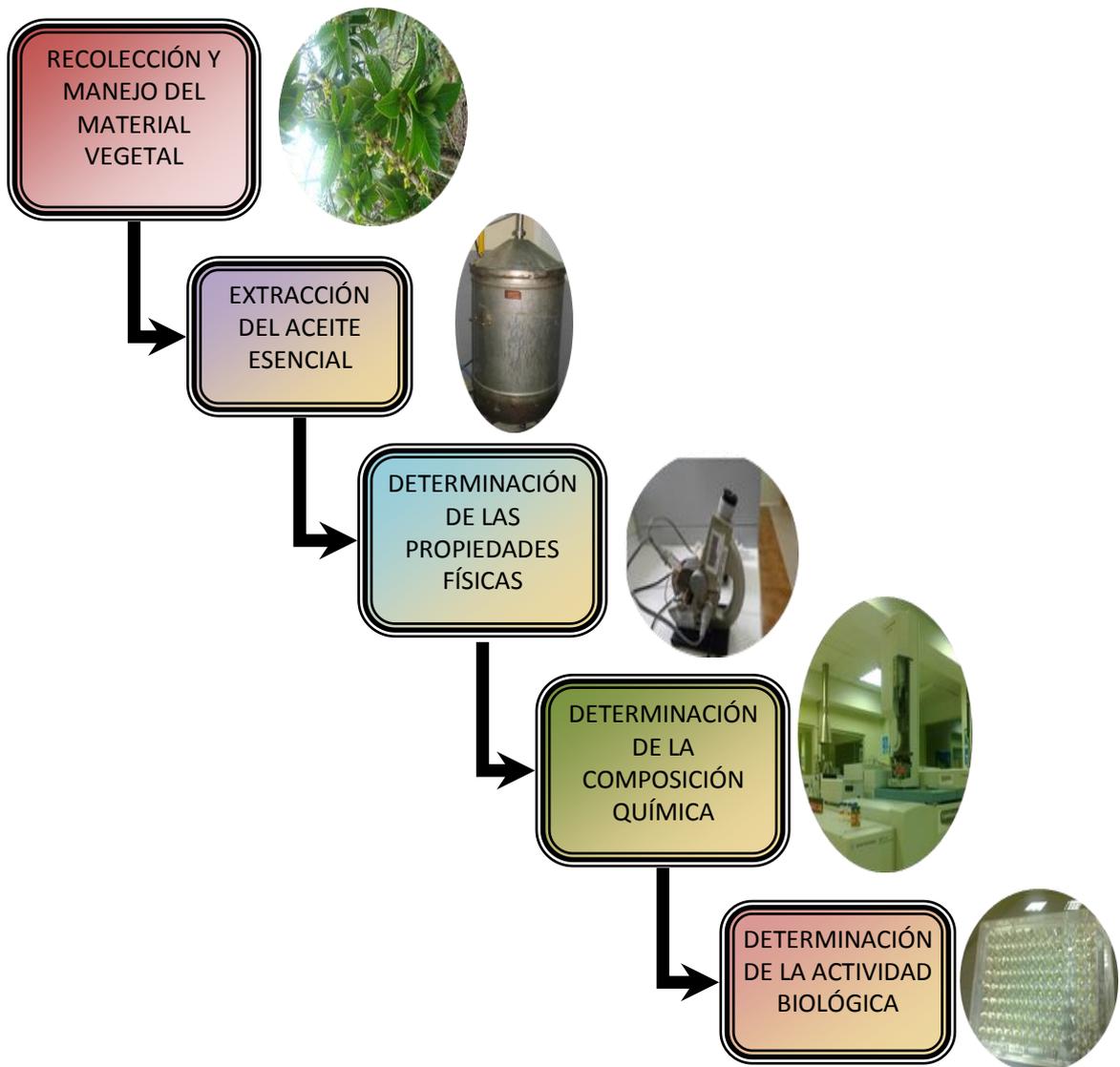


Figura 2. Esquema del desarrollo de la Investigación.
Elaboración: La Autora.

3.1. Identificación de la materia vegetal

La especie fue identificada por Bolívar Merino del Herbario Loja de la UNL y por Fani Tinitana del Herbario UTPL. La muestra reposa en el HUTPL, con voucher de Herbario PPN-mn-002.



3.2. Recolección y selección de la materia vegetal

3.2.1 Recolección de la materia vegetal

El material vegetal de *S. muricata* fue recolectada en el sector de Yangana, parroquia del cantón Loja, en el barrio de Anganuma a 10 minutos de la carretera por el camino de herradura que conduce al oriente de Numbala perteneciente a Zamora Chinchipe (Ver figura 3.)

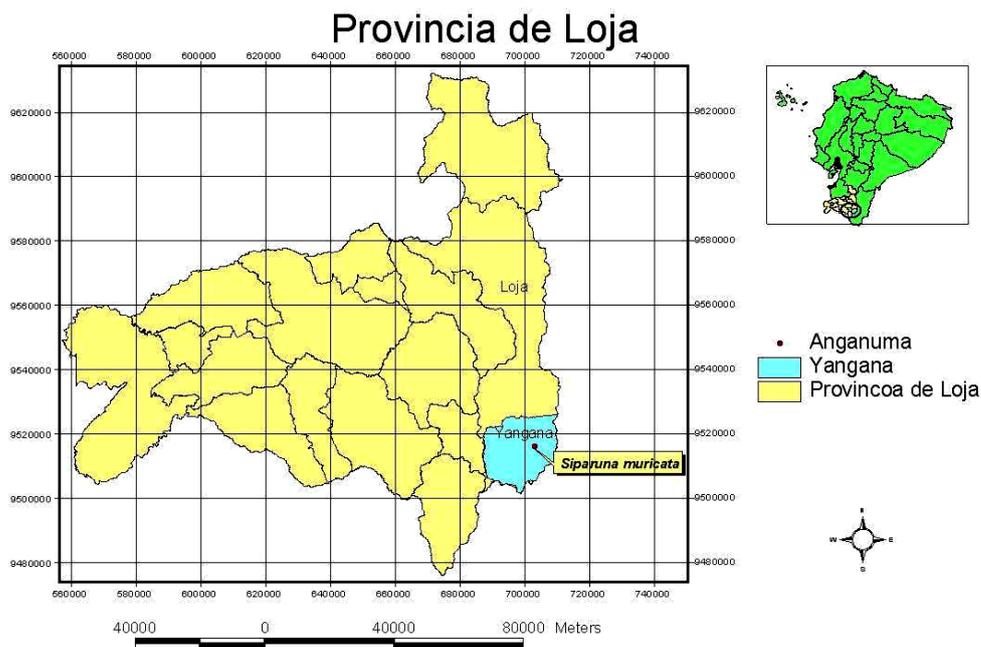


Figura 3. Zona de estudio de la especie *S. muricata*
Elaboración: La Autora

El material fue recolectado en 3 salidas de campo, las cuales se realizaron con un intervalo de tiempo de 15 días cada una, en la primera recolección el material vegetal estuvo en estado de floración mientras que en la segunda y la tercera el material se encontró en estado de fructificación, las cuales fueron llevadas al área de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química para su tratamiento post cosecha. (Ver Fotografía 2)



Fotografía 2.: Recolección de material vegetal
Elaboración: La Autora

3.2.2. Tratamiento pos cosecha del material vegetal

Este procedimiento se lleva a cabo con la finalidad de eliminar material en mal estado como ramas secas, en descomposición o putrefacción, así como impurezas que pueden afectar en nuestros resultados, luego se procede a cortar el material puesto que para este proceso sólo será necesario la utilización de las hojas, todo esto se lleva a cabo para obtener un mejor rendimiento. (Ver Fotografía 3.)



Fotografías 3: Tratamiento pos cosecha del material vegetal.
Elaboración: La Autora



3.3 Destilación del aceite esencial

La materia vegetal fue destilada luego de 4 horas de su recolección durante 3 horas tiempo en el que se obtuvo el aceite esencial. El proceso se detalla a continuación (Ver figura 4).

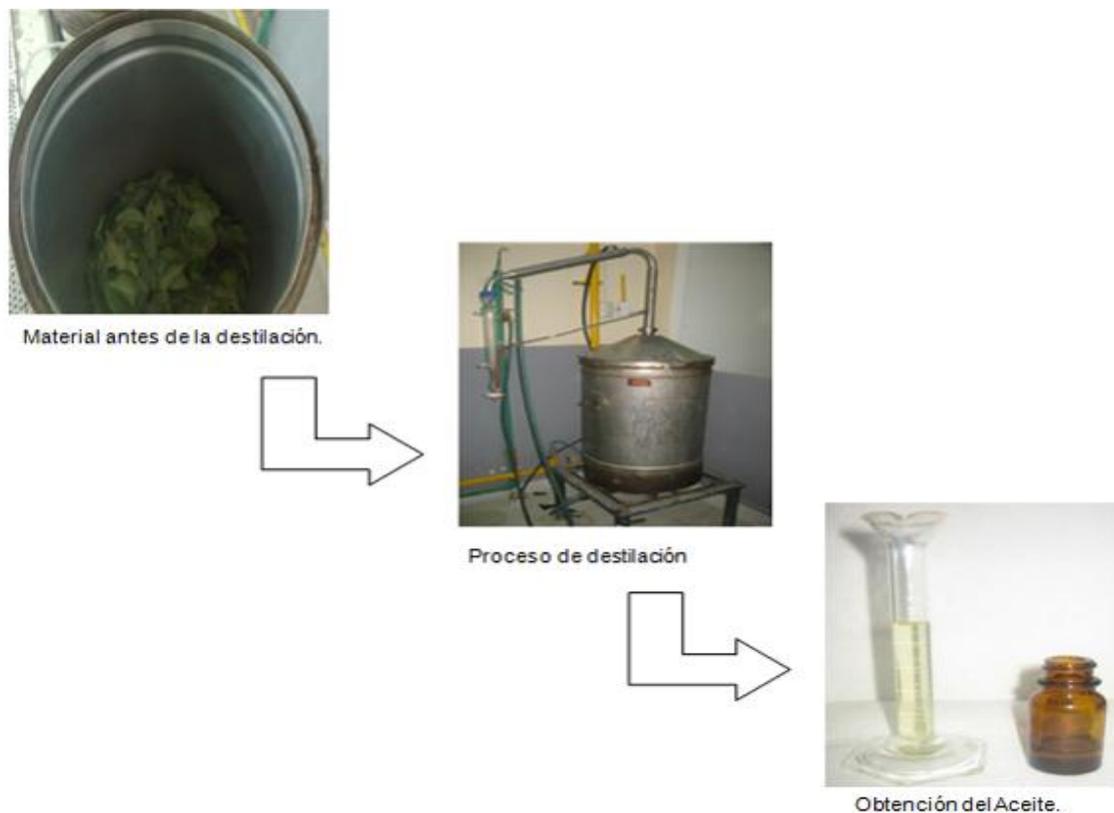


Figura 4. Proceso de destilación
Elaboración: La Autora

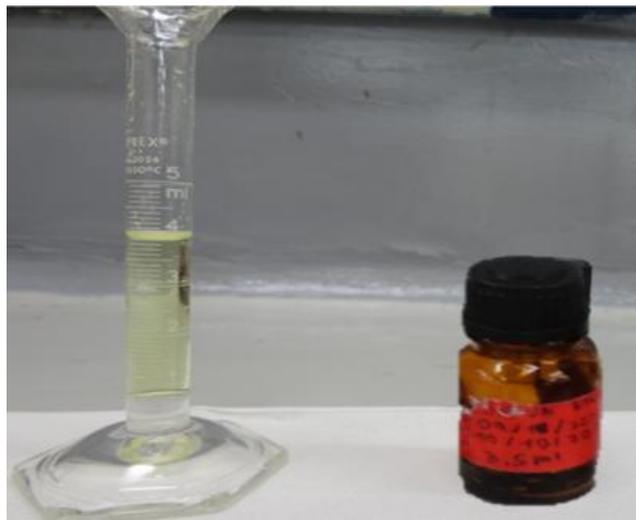
Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas de *S. muricata* por medio de destilación por arrastre de vapor. Es el método más utilizado, se aplica calor a un destilador generando vapor el cual pasa a través del material botánico arrastrando el aceite. El principio básico de la destilación de dos líquidos heterogéneos, como el agua y el aceite esencial, es que cada uno ejerce su propia presión de vapor como si el otro componente estuviera ausente. Cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión del recinto, la mezcla hierve. Aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300°C, evaporan a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. El vapor y el aceite esencial son condensados y separados.⁵²

⁵² Cerutti, M. and F. Neumayer, Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Invenio: Revista de investigación académica, 2004(12): p. 149-155.



➤ **Envasado y Almacenamiento**

El aceite esencial extraído pasa a una probeta para medir su volumen, luego envasado en un frasco ámbar debidamente etiquetado con una codificación: inicial de la especie, inicial donde se recolectó, inicial del recolector, número de recolección, número de destilación (Ver fotografía 4). Para una óptima conservación del aceite esencial es importante que no reciba luz natural directa y que el recipiente utilizado para su conservación esté herméticamente cerrado. El aire en el interior del recipiente puede ocasionar la alteración de algunos principios activos con la consiguiente pérdida de calidad. Los recipientes más adecuados son los de vidrio de color topacio, aunque para el transporte a gran escala se utilizan recipientes metálicos con el interior vitrificado. Para su conservación y almacenamiento en frigorífico se deben mantener sin humedad y a una temperatura entre 0-4^o C.⁵³



Fotografía 4: Almacenamiento y etiquetado del aceite de *S. muricata*.

Elaboración: La Autora

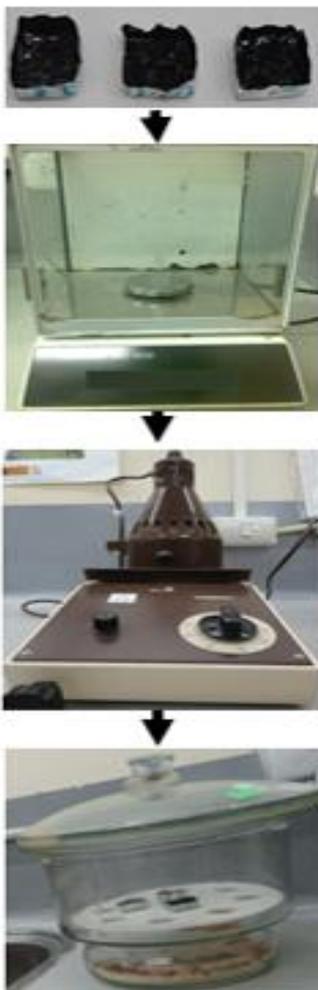
⁵³ Usano Alemany, J., Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de "Salvia lavandulifolia" VAHL, 2012, Servicio de Publicaciones, Universidad Complutense de Madrid.



3.4. Determinación del rendimiento

El rendimiento del aceite esencial depende del estado fenológico y las condiciones de la materia,⁵⁴ el cálculo del rendimiento se hizo de acuerdo al anexo I.

3.5. Determinación de la humedad



Para determinar el porcentaje de humedad se separó una pequeña cantidad del material vegetal de *S. muricata* que va a ser destilado (Ver figura 5), cortado en pedazos pequeños se colocó en cápsulas de porcelana pesándolas, para posteriormente colocarlas en la lámpara UV durante 45 minutos y pesar, realizar este proceso hasta que su peso no varié, se hizo por triplicado para obtener un promedio de las mismas. Se utilizó una lámpara UV, un desecador y balanza analítica (Ver Anexo II).

La fórmula para el cálculo de la humedad fue la siguiente:

$$Hm = \frac{(W_2 - W_1)}{(W_1 - W)} \times 100$$

Figura 5. Determinación humedad
Elaboración: La Autora

Donde:

W_2 = Peso de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

W_1 = Peso de la cápsula con la muestra de ensayos de secado (g)

W = Peso de cápsula vacía (g)

100 = Factor matemático

⁵⁴ Pino, O., et al., Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. Revista de Protección Vegetal, 2012. 27(3): p. 181-187.



3.6. Determinación de propiedades físicas

El aceite esencial de *S. muricata* presenta las características de líquido viscoso, de color amarillo verdoso y posee un olor cítrico fuerte a limón.

3.6.1. Densidad relativa

La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua, salvo los de canela, clavo de olor y sazafrán, con una densidad superior a la unidad.⁵⁵ La densidad de una sustancia es la relación que existe entre la masa y el volumen de dicha sustancia. Con estos dos datos en cualquier estado que se encuentre la sustancia, sea sólido, líquido o gaseoso, se determina su densidad mediante la ecuación:⁵⁶

$$\rho = \frac{M}{V}$$

Donde:

ρ = Densidad

M = Masa

V = Volumen

La densidad del aceite esencial se obtuvo por medio del método de variación de peso y volumen, utilizando para este análisis un picnómetro de 1 mL, un termómetro y una balanza analítica (Ver Fotografía 5). La determinación de la densidad del aceite esencial se realizó según la norma ANFOR NF T 75 – 111 (Ver Anexo III).

⁵⁵ Carrillo, M.A.S., Evaluación del rendimiento de aceite esencial de hinojo (*Foeniculum Vulgare* Miller) procedente de dos niveles altitudinales de Guatemala, in Escuela de Ingeniería Química 2006, Universidad de San Carlos de Guatemala.

⁵⁶ Del Pozo Espinosa, X.A., Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon Citratus* (DC) stapf). 2006.



Fotografía 5. Determinación densidad relativa
Elaboración: La Autora

3.6.2. Índice de refracción

Se llama índice de refracción a la relación que existe entre la velocidad de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la muestra cuyo índice se calcula. La velocidad de la luz a través de la muestra está relacionada con la clase de grupos funcionales (estructura de las moléculas) que la sustancia posee.⁵⁴ El índice de refracción de los aceites esenciales son considerablemente altos, puesto que éstos ayudan a determinar la pureza de los mismos. Se considera que el índice de refracción se puede utilizar como referencia en el comportamiento de los componentes químicos del aceite esencial, ya que su índice de refracción es afectado respecto a los cambios químicos que suceden.⁵⁷

El valor del índice de refracción depende de la temperatura a la cual se lo esté midiendo, ya que por diferencia de 1°C se hace una corrección de 0.0004 unidades. Cuando la temperatura es menor, el índice de refracción es mayor y cuando la temperatura es más elevada este valor va disminuyendo.⁵⁶ Para determinar el índice de refracción se utilizó un refractómetro ABBE según la norma AFNOR NF T 75 – 112 (Ver Fotografía 6 y Anexo IV).

⁵⁷ Hernández, V.L.T., Comparación de la calidad del aceite esencial crudo de *citronela* (*Cymbopogon winteriana jowitt*) en función de la concentración de geraniol obtenido por medio de extracción por arrastre con vapor y maceración.



Fotografía 6. Índice de Refracción
Elaboración: La Autora

3.7. Determinación de la composición química del aceite esencial

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de la especie *Siparuna muricata* se realizó mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas GC – MS y al Detector de Ionización de Llama GC – FID, obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos, las corridas se realizaron en dos columnas capilares DB5-MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano) y HP-INNOWAX (Polietilen Glicol).

3.7.1. Cromatografía de Gases (GC)

Cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a desglosar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario. Es decir, es un proceso físico que nos permite separar los diferentes componentes de una disolución.⁵⁸

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 muestra que se va a analizar se lleva a la fase gaseosa y se inyecta en una de las cabezas de la columna cromatográfica. La elusión de los componentes se realiza mediante el flujo de una fase gaseosa móvil que, a diferencia de la de otros métodos cromatográficos, es inerte

⁵⁸ Bermejo, M.J.G., Laboratorio de bioquímica: Técnico sup. En laboratorio de diagnóstico clínico 2006: MAD-Eduforma.



y no interactúa con las moléculas de las especies de la muestra; sólo las transporta a través de la columna.⁵⁹

Para la obtención de la composición química se utilizó el equipo Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un Espectrómetro de Masas Agilent serie 5973 inert, constituido con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, acoplado a un Detector de Ionización de Llama.(Ver Fotografía 7).



Fotografía 7: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N
Elaboración: La Autora

3.7.2. Características de las columnas capilares

Tabla 1. Características de las columnas capilares

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLUMNAS CAPILARES		
COLUMNA	DB5-MS	HP-INOWAX
TEMPERATURA (°C)	325	260
PELÍCULA (Mm)	0,25	0,25
DIÁMETRO INTERNO (mm)	0,25	0,35
LONGITUD (m)	30	30

Fuente: Proveedores, Agilent Technologies; Inc. KHYMOS LTDA
Elaboración: La Autora

⁵⁹ Sagastume, D.D.R. and Q. Farmacéutica, Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género *piper* y evaluación de la actividad citotóxica



3.7.3. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS)

La identificación de los componentes químicos presentes en las muestras del aceite esencial de *S. muricata* se desarrolló en CG-MS y CG-FID (Ver Figura 6).

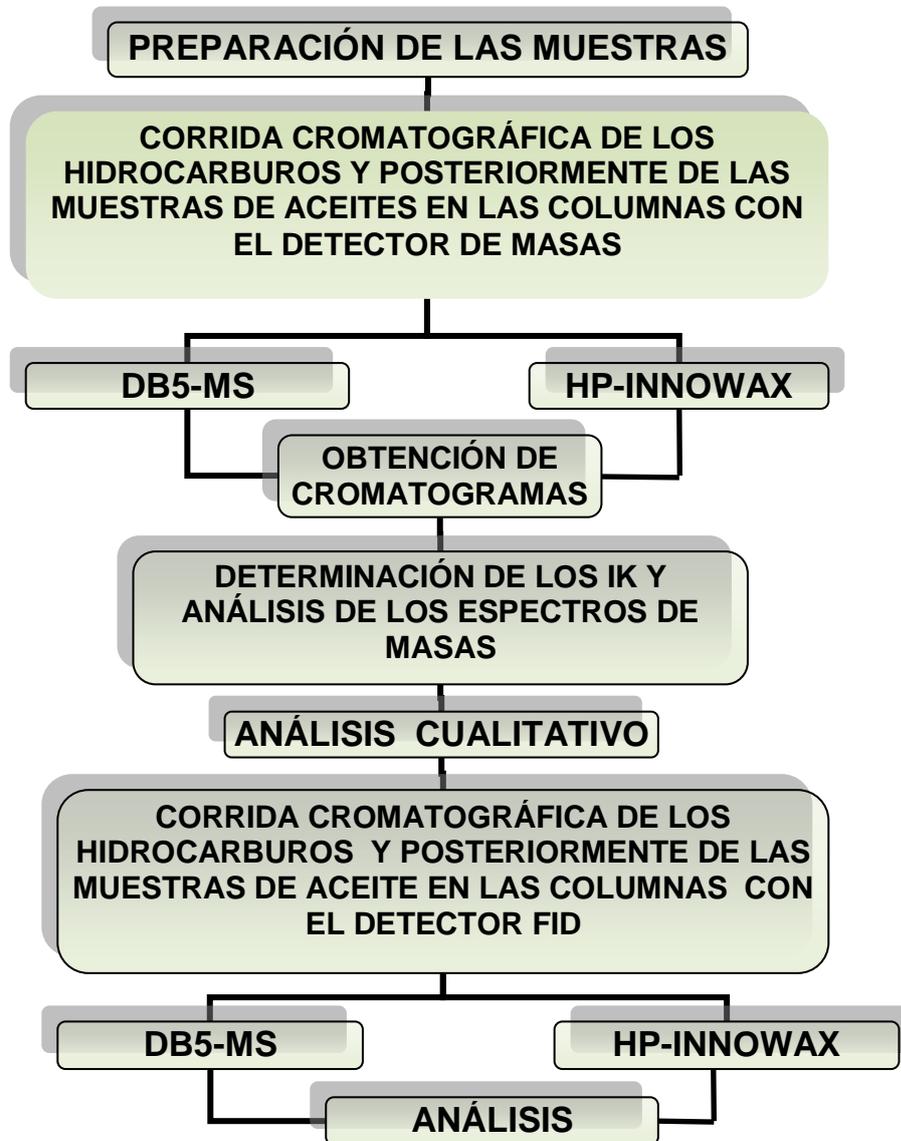


Figura 6. Esquema para la identificación de los componentes químicos del aceite esencial.
Elaboración: La Autora

3.7.3.1. Preparación de las muestras

Para las inyecciones cromatográficas se realizó una disolución con los aceites de *S. muricata*, 990 μ L de diclorometano grado HPLC y 10 μ L de aceite en un vial etiquetado cada uno e insertarlos en el cromatógrafo de gases, además bajo los mismos parámetros que los aceites esenciales se realizó la inyección de hidrocarburos (C10 -



C25) los cuales fueron inyectados tanto en la columna DB5-MS como en HP-INNOWAX con la finalidad de ser utilizados para obtener los Índices de Kóvats que son indispensables en la determinación de la composición química (Ver Fotografía 8).



Fotografía 8. Preparación de las muestras de los aceites esenciales para las inyecciones cromatográficas
Elaboración: La Autora

3.7.3.2. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna capilar DB5-MS

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite de *S. muricata* en la columna DB5-MS con acoplamiento al detector de espectrometría de masas, se muestran en el esquema, además cabe destacar que bajo los mismos parámetros fue inyectada una muestra de hidrocarburos de C10-C25, los cuales se usaron posteriormente para el cálculo de los Índices de Kóvats (Ver Figura 7).

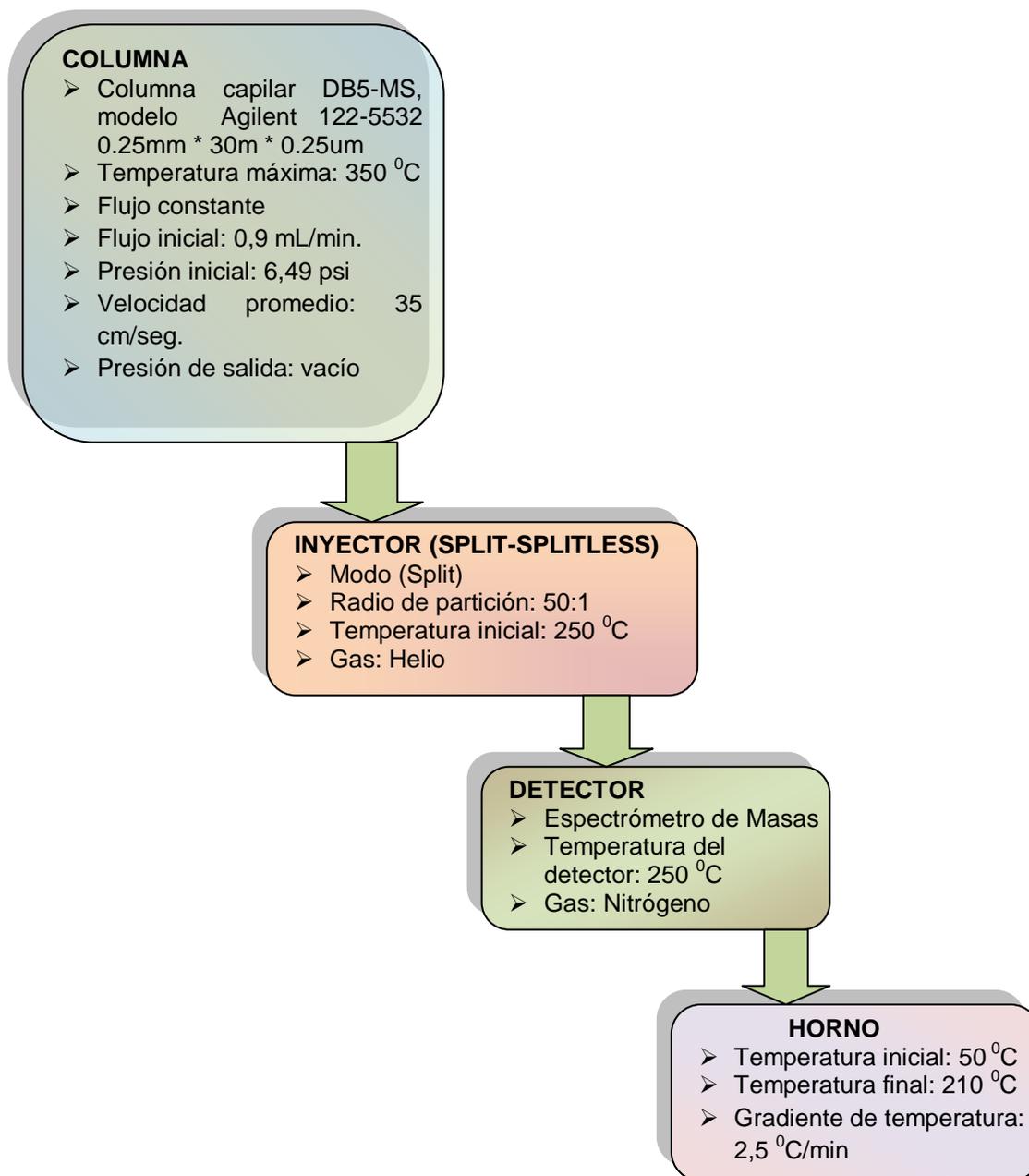


Figura 7. Parámetros de operación del GC-MS en la columna DB5-MS.

Elaboración: La Autora

3.7.3.3. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna HP-INNOWAX

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite de *S. muricata* en la columna polar (HP-INNOWAX) con acoplamiento al detector de espectrometría de masas, se muestran en el esquema, además cabe destacar que bajo los mismos parámetros fue inyectada una muestra de hidrocarburos de C10-C25 (Ver Figura 8).

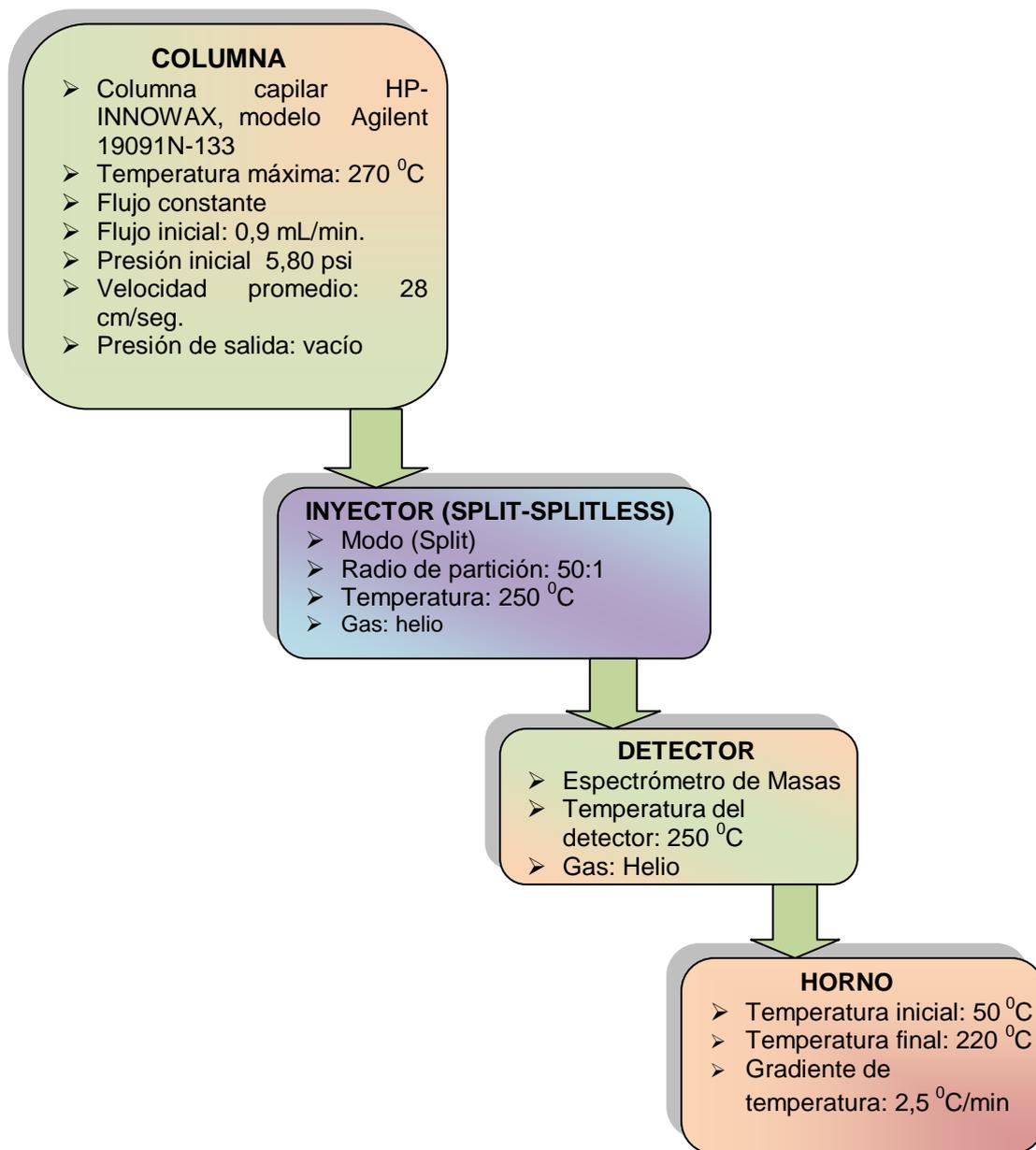


Figura 8. Parámetros de operación del GC-MS en la columna polar HP-INNOWAX

Elaboración: La Autora



3.7.3.4. Obtención de los cromatogramas

Cromatograma es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, de la concentración del analito en el efluente o de otra magnitud utilizada para medir una propiedad del efluente frente al volumen de efluente o tiempo.⁶⁰

Mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se obtienen los cromatogramas para el análisis del aceite esencial de *S. muricata* (Ver Figura 9). El presente cromatograma pertenece a la muestra de la primera destilación en la primera recolección de la planta, obtenido mediante la inyección en la columna DB5-MS el cual indica el área de los picos y el tiempo de retención en el que se encuentra cada compuesto.

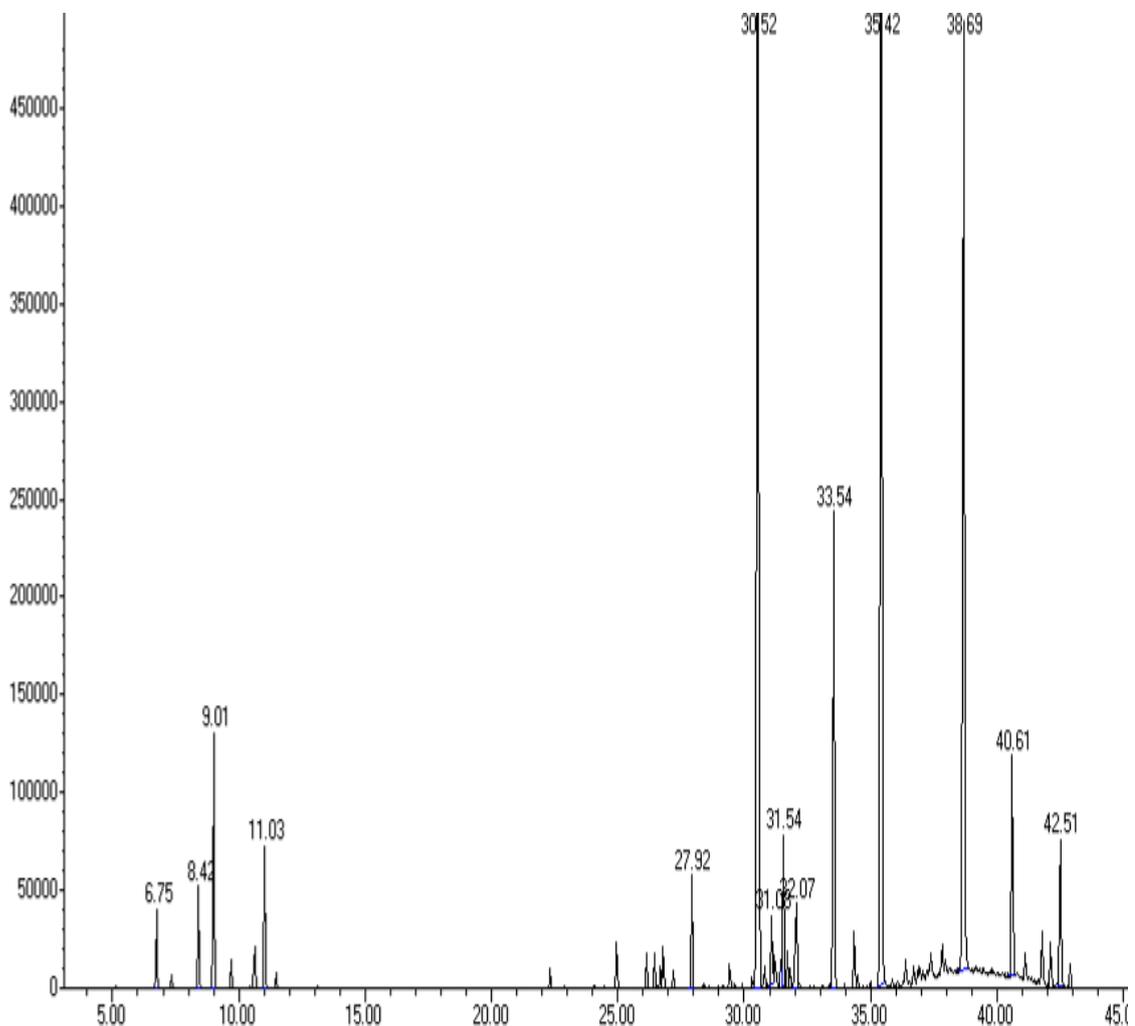


Figura 9. Cromatograma del aceite esencia *S. muricata* de la primera recolección SYC11
Elaboración: La Autora

⁶⁰ Ettre, L.S., M.I.J. Vacas, and R.S.E. de Química, Nomenclatura para cromatografía 1995: Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines (RSEQ).



3.7.3.5 Determinación de los Índices de Kóvats

El tiempo de retención no es un parámetro absolutamente confiable para el análisis cualitativo de componentes, ya que dependen de muchas variables, tipo de columna, temperatura, flujo de gas de arrastre, cantidad de muestra inyectada, etc. Por este motivo, se hizo necesaria la aplicación de un sistema de índices de retención, propuesto por Kóvats, que sirve para la identificación cualitativa. Este sistema se basa en la comparación de la posición del pico del compuesto de interés, con la de los picos correspondientes a los hidrocarburos patrón, uno, que eluye antes y, otro, después del analito.⁶¹

Para determinar los índices de kóvats se compararon los tiempos de retención de los hidrocarburos obtenidos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial de *S. muricata* utilizando la siguiente fórmula:

$$Ik = 100_n + 100 * \frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Dónde:

IK = Índice de retención de Kóvats

N = Número de átomos de carbono en el n-alcano

TRx = Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos.

TRn = Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado.

Trn = Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

3.7.3.6. Identificación de los compuestos en GC-MS en las columnas capilares DB5-MS y HP-INNOWAX.

➤ Análisis de los espectros de masas

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-

⁶¹ Díaz, O., Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia, 2007, Tesis para optar el título de Químico. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.



carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en inglés, GC-MS.⁶² (Ver figura 10). En donde se muestra un espectro del compuesto alpha pinene obtenido en la columna DB5-MS, presente en el aceite de la primera destilación en la primera recolección de la planta.

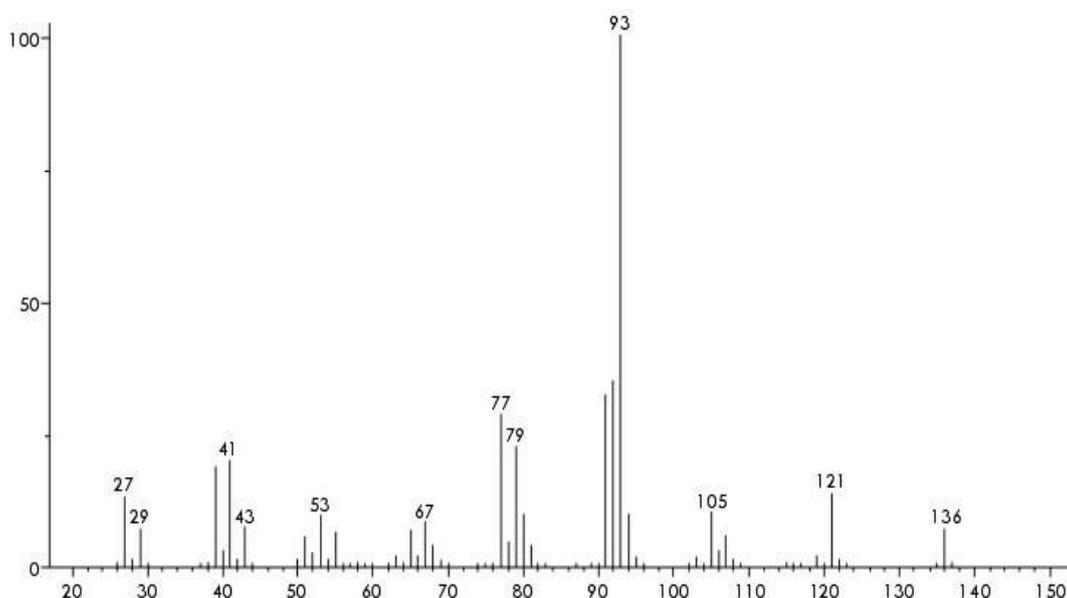


Figura 10. Espectro de alpha pinene de la muestra SYC11 de la primera recolección de *S. muricata*
Fuente: Pherobase (MS)

➤ Identificación cualitativa de los compuestos del aceite esencial

Mediante cromatografía de gases es posible realizar análisis cualitativos y cuantitativos, al finalizar una muestra no tan sólo se determina la naturaleza de sus componentes, también es posible determinar la proporción de los mismos en la muestra. Generalmente el objetivo de la mayor parte de los análisis cromatográficos es la determinación cuantitativa de algunos compuestos presentes: no obstante; es indispensable identificarlos para un análisis óptimo.⁶³ Un análisis cromatográfico puede dar una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y evaluar los analitos separados, así si se utiliza un detector que permita obtener un espectro de cada compuesto separado y a su vez contenga una base de datos que pueda realizar su comparación con una biblioteca de espectros se

⁶² Giménez Egado, A., Captura y caracterización de compuestos aromáticos volátiles en alimentos cocinados: estudio preliminar. 2012.

⁶³ Herrera Cruz, F.V. and F. Calleja Hernández, Caracterización de las grasas de sobrepeso por medio de cromatografía de gases. 2011.



podría, de una forma muy precisa, establecer la identidad de los componentes de una muestra, de hecho esto se logra fácilmente con cromatógrafos que contienen sistema de detección como el Infrarrojo (IR), el de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o el Espectrómetro de Masas (MS).⁶⁴

Para el análisis cualitativo de los componentes químicos del aceite esencial de *S. muricata*, se determinaron los Índices de Kóvats de los picos detectados en columnas (DB5-MS y HP- INNOWAX), se comparó los espectros de masas dados para cada uno de los picos detectados, con los espectros propuestos en la librería WILLEY el cual nos da un CAS (identificación numérica para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones) para cada compuesto. Posteriormente se realiza la comparación de los Índices de Kóvats obtenidos experimentalmente en las dos columnas con los reportados en la literatura.

3.7.4. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna capilar DB5-MS por GC-FID

El Detector de Ionización de Llama (FID) es uno de los detectores más usados y versátiles. Básicamente es un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura. La mayoría de compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas pirolizan y se producen iones y electrones, que son conductores eléctricos.⁶⁵

El Detector de Ionización de Llama responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por ello es, más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración. Grupos funcionales, tales como el carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno. Además, el detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, SO₂ y NO_x. Estas propiedades hacen del detector de ionización de llama uno de los detectores generales más utilizados, para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, incluyendo aquellos que están contaminados con agua, y con óxidos de

⁶⁴ Arias, S. and D. Fabricio, Caracterización Físico-Química de Naftas producidas en la Refinería Estatal de Esmeraldas, mediante cromatografía de gases. 2012.

⁶⁵ Trujillo Mejía, M., Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en la cuenca del río Otún y en el agua potable de la ciudad de Pereira mediante cromatografía de gases capilar (GC-FID). 2010



nitrógeno y azufre. Una desventaja del detector de ionización de llama es que se trata de un detector destructivo de la muestra.⁶⁶

Las condiciones operacionales bajo las cuales se han inyectado las muestras de aceites esenciales de *S. muricata*, utilizando Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama GC – FID usando la columna (DB5-MS) se detallan a continuación (Ver Figura 11).

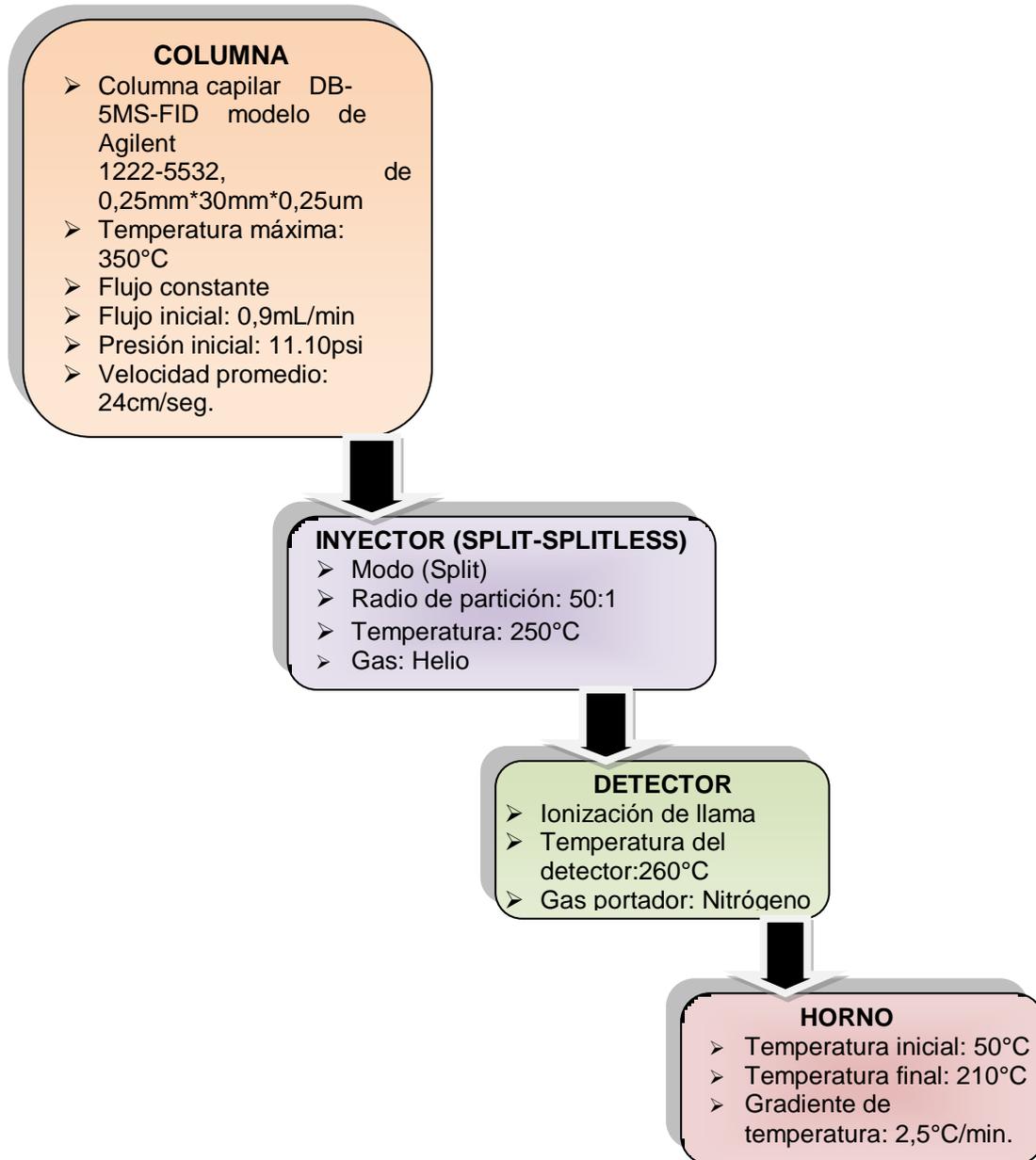


Figura 11. Parámetros de operación del GC-FID en la columna DB5-MS
Elaboración: La Autora

⁶⁶ Rendón Marín, J.M. and L.M. Orozco Pineda, Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por cromatografía de gases-FID. 2010



3.7.5. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna capilar HP-INNOWAX por GC-FID

Las condiciones operacionales bajo las cuales se han inyectado las muestras de aceites esenciales de *S. muricata*, utilizando Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama GC-FID usando la columna polar (HP-INNOWAX) se detallan a continuación (Ver Figura 12).

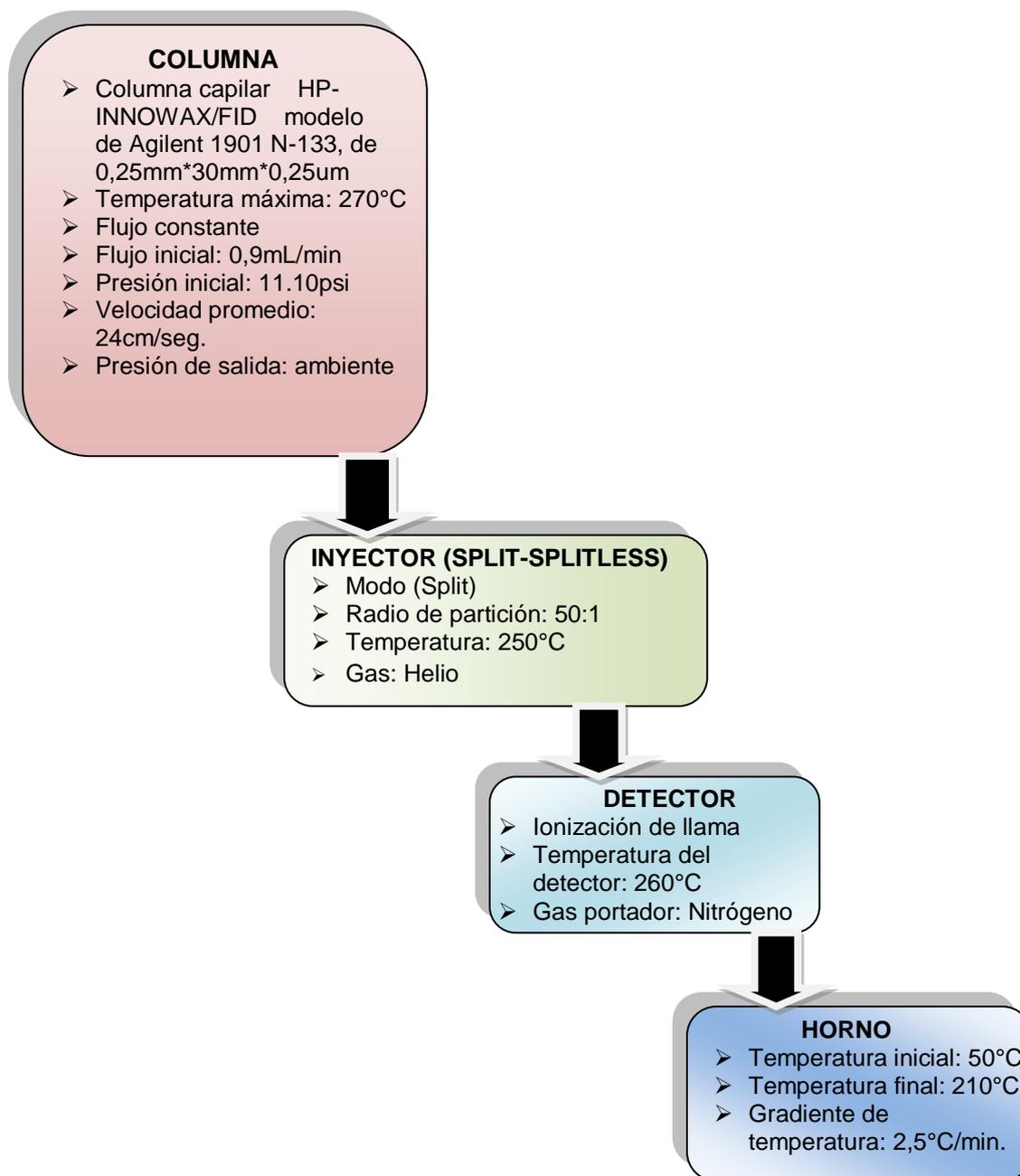


Figura 12. Parámetros de operación del GC-FID en la columna polar (HP-INNOWAX)
Elaboración: La Autora



3.7.6. Comparación de los cromatogramas obtenidos en GC-MS con los obtenidos en GC-FID

Con los cromatogramas obtenidos en GC-MS y en GC-FID realizamos una comparación con el fin de determinar si en el porcentaje de cada compuesto identificado en ambos detectores existe alguna variabilidad.

3.7.7. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial de *S. muricata*.

Identificados cualitativamente los componentes químicos del aceite esencial por GC-MS se determinó del porcentaje que corresponde a cada componente químico en función del área de cada pico cromatográfico tanto en GC-MS como en GC-FID.

3.8. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.

La actividad biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida, lo que dependerá de sus componentes, sus estructuras y la concentración en las que se hallen presente el aceite esencial.⁶⁷⁻⁶⁸

3.8.1. Microorganismos de prueba

Para evaluar la actividad bacteriana se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC ® 8427, *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Salmonella typhimurium* LT2; y 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, mientras que para la evaluación antifúngica se emplearon 2 organismos: *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185.

3.8.2. Preparación del aceite esencial

Para las pruebas de microdilución en caldo se preparó una dilución de 20 µL del aceite esencial de *S. muricata* concentrado, diluidos en 980 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución será igual para CMI antibacteriano y CMI antifúngico.

⁶⁷ Maguna, F.P., *et al.*, Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad del Nordeste de Argentina. Resumen: E-057. Pág, 2006: p. 1-4

⁶⁸ Gómez Ríos, G.A., Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia Alba* (Mill) NE Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta. 2012.



3.8.3. Preparación de los medios de cultivo

En los Laboratorios de Microbiología se utiliza una gran variedad de medios de cultivos para mantener las cepas, aislar o identificar microorganismos con varias finalidades: determinar la existencia de contaminación de alimentos, medicamentos o cosméticos; diagnosticar alguna enfermedad, elaboración de vacunas bacterianas, etc.

Los medios de cultivo son mezclas complejas de sustancias químicas y/o productos naturales (proteínas, sangre, suero, etc.) capaces de soportar el crecimiento de las bacterias. Pueden ser líquidos o sólidos.⁶⁹

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente, un medio de cultivo artificial debe ser apto para las bacterias y hongos a utilizar.

3.8.3.1. Bacterias

3.8.3.1.1. Caldo de Cultivo Muller Hinton

El principal medio para el crecimiento de bacterias es el caldo Muller Hinton, en la determinación de la cantidad de medio necesario se debe realizar los cálculos previos tomando en cuenta el número de pocillos, el número de aceites y el número de bacterias a utilizar.

3.8.3.1.2. Cultivo overnight

Para realizar el inóculo de las bacterias se elabora un cultivo overnight, entre los medios utilizados tenemos Caldo Oxoid: *Salmonella typhimurium*; Caldo triptica: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli*; Caldo Muller Hinton: *Proteus vulgaris*; Caldo Infusión Cerebro: *Enterococcus faecalis*, luego se procedió a esterilizarlos mediante autoclave, para posteriormente realizar el inóculo de las bacterias en los medios correspondientes a cada una de ellas.

3.8.3.1.3. Preparación de la suspensión de los inóculos

Se realizó un cultivo overnight de 14-16 horas, antes de realizar las pruebas correspondientes se tomaron 150-300 μL en 7 mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de Mac Farland, tomamos 140 μL de esta suspensión e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. 100 μL de esta

⁶⁹ Estebanez, N. And N. Santano, Microorganismos patógenos del agua estudio de molinao erreka. "XXI Certamen de jóvenes investigadores". Injuve y Ministerio de Ciencia e Innovación. Málaga. Octubre 2008, La Anunciata Ikerketa



suspensión se usan para completar a 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL (Ver Fotografía 9).



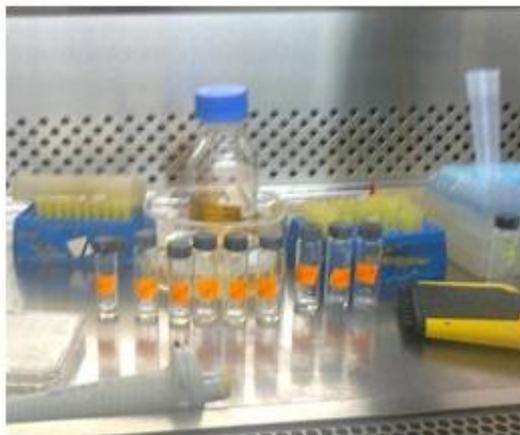
Fotografía 9. Cultivo Overnight para bacterias
Elaboración: La Autora

3.8.3.2. Hongos

3.8.3.2.1. Caldo Sabouraud

El principal medio utilizado para las pruebas de actividad fúngica es el Caldo Sabouraud, para elaborar el medio necesario se realizan los cálculos previos, tomando en cuenta el número de pocillos, el número de aceites y el número de hongos a utilizar.

Se esterilizó los cultivos con la ayuda del autoclave junto con el material necesario, evitando las contaminaciones para posteriormente ser almacenados en la estufa hasta el inicio de la prueba.



Fotografía 10. Medios de cultivo para hongos
Elaboración: La Autora



3.8.3.2.2. Preparación de la suspensión de los inóculos

El inóculo fúngico se realizó a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a 80°C. De esta reserva se tomó 14 uL en 7 mL de Caldo Sabouraud. 100 µL de esta suspensión se usan para completar a 200 µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

3.8.4 Concentración Mínima Inhibitoria

Para la prueba de Microdilución en Caldo se procedió a esterilizar durante 15 minutos en la cámara de flujo laminar bajo rayos UV todo el material y el área de trabajo.

3.8.4.1. CMI Antibacterianos

En este ensayo se usó placas TC96 (Ver Fotografía 11) en las cuales se colocó 180 µL de caldo Muller-Hinton en todos los pocillos de la primera fila de la placa, luego 100 µL de caldo Muller-Hinton en los pocillos restantes, se añadió 20 µL de la dilución de aceite esencial de *S. muricata* y DMSO en la primera fila de la placa, a continuación se mezcló en el primer pocillo y se realizó diluciones seriadas tomando 100 µL del primer pocillo y traspasando al siguiente pocillo, todo en dirección vertical, se realizó el mismo procedimiento hasta el último pocillo donde está la concentración mínima a la que se quiere llegar, los 100 µL tomados al final se desecharon, quedando 100 µL de medio + aceite en cada pocillo.



Fotografía 11. Placa TC96 (Microplaca para cultivo de tejidos de 96 pocillos, fondo U)
Elaboración: La Autora



Posteriormente se colocó en la placa 100 μL de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos excepto los controles de esterilidad, el volumen final es de 200 μL en los pocillos, así se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, así como la concentración final del aceite esencial de 1000 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

También se emplearon dos controles el uno positivo: Gentamicina – 180 μL de caldo+ 20 μL Gentamicina y el otro negativo: DMSO – 180 μL de caldo+20 μL de DMSO. Finalmente las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C por un periodo de 18-24 h. La prueba se realizará por triplicado (Ver Fotografía 12).



Fotografía 12. CMI Antibacteriana
Elaboración: La Autora

3.8.4.2. CMI Antifúngicos

Para este ensayo se realizó el mismo procedimiento utilizado en CMI Antibacteriano, es decir, se colocó 180 μL de Agar Sabouraud en la primera fila de la placa TC96, luego se agregó 100 μL de Agar Sabouraud en los pocillos restantes, posteriormente se añadió 20 μL de la dilución de aceite esencial de *S. muricata* y DMSO; se realizó diluciones seriadas tomando 100 μL del primer pocillo y traspasando al siguiente pocillo en dirección vertical, así se procedió hasta el último pocillo para llegar a la concentración mínima, finalmente se desechó los 100 μL , quedándose así 100 μL de medio + aceite en cada pocillo.

Luego se realizó la siembra de 100 μL del inóculo en todos los pocillos de la placa a excepto de los controles de esterilidad, teniendo así un volumen final de 200 μL en todos los pocillos, ajustando de esta manera la población de hongos esporulados a 5×10^4 esporas/mL, concentración final del aceite esencial de 1000 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Finalmente se emplearon dos controles de esterilidad el uno negativo: DMSO y el otro positivo-Itraconazol, luego las placas fueron selladas e incubadas a 28°C por un periodo de 24-72 horas. La prueba se realizó por triplicado (Ver Fotografía 13).



Fotografía 13. CMI Antifúngicas
Elaboración: La Autora

3.8.5. Interpretación de los resultados

Habiendo terminado el periodo de incubación para cada cepa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realiza de manera visual y la lectura de la placa se define como la menor concentración del aceite esencial necesario para inhibir en crecimiento del microorganismo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Determinación de humedad

El material vegetal de la primera recolección se encontró en estado de floración y las muestras de la segunda y tercera recolección se encontraron en estado de fructificación. En la Tabla 2. se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes de humedad obtenidos de las tres destilaciones de cada recolección.

Tabla 2. Humedad promedio de las muestras

RECOLECCIÓN	DESTILACIONES (Hm%)			\bar{x}	σ	CV
	1	2	3			
1	60,97	65,42	63,30	63,23	1,51	0,02
2	64,82	66,35	63,57	64,91	0,96	0,01
3	61,28	56,03	56,03	57,78	2,33	0,04

Hm (%) Humedad

\bar{x}

Promedio de las tres muestras de cada recolección

σ

Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección

CV

Coficiente de variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La Autora

Realizando una comparación entre los promedios de las tres recolecciones realizadas se puede observar que el promedio de humedad mayoritario corresponde para la segunda recolección (64,91%), y el menor para la tercera recolección (57,78%); podemos apreciar que existe una variabilidad y es importante dar a conocer que existen ciertas condiciones que pueden influir en los resultados finales como condiciones de clima, suelo (uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos) y estado fenólico de la planta.

4.2 Determinación del rendimiento

En la Tabla 3. Se detallan los rendimientos obtenidos de las tres destilaciones hechas para cada recolección en relación al peso/volumen.⁷⁰

⁷⁰Gil Pavas, E. and A. Sáez Vega, Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de *cardamomo*, bajo la filosofía "cero emisiones. Cuadernos de Investigación, 2012(30).



Tabla 3. Rendimiento en % (p/v) de las tres destilaciones hechas para cada recolección

RECOLECCIÓN	DESTILACIONES (%)			\bar{x}	σ	CV
	1	2	3			
1	0,17	0,18	0,21	0,19	0,02	0,08
2	0,18	0,19	0,20	0,19	0,01	0,04
3	0,19	0,19	0,18	0,19	0,00	0,02

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección.
 σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección.
CV Coeficiente de variación.

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

Se obtuvo un rendimiento promedio en las tres recolecciones del 0,19%. Sin embargo, cabe destacar que existen factores que afectan el rendimiento del aceite esencial como: origen de la planta, el lugar, la edad, cuidados que ésta haya tenido, el tamaño de partícula ya que mientras más pequeña sea, mejor será la transferencia de calor entre el agua y la especie, además de la cantidad de materia prima, la cantidad de agua o vapor, su temperatura y presión utilizada.⁷¹

4.3. Propiedades físicas del aceite esencial

El aceite esencial de *S. muricata* es un líquido viscoso de color amarillo verdoso y con fuerte olor cítrico.

➤ Densidad

La Tabla 4. muestra la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizaron por cada recolección, proporcionando de esta manera una densidad final de 0,93 gr/cm³, parecida a la de *Siparuna apiosyce* que es de 0,9699 gr/cm³ a 25°C.⁷²

⁷¹ Morán, T.M.D.L., Extracción de aceite esencial crudo de Hierbabuena (*Menta citrata* EHRB) con la aplicación del método de extracción por arrastre de vapor variando los tamaños de la muestra y humedad a partir de pruebas a nivel laboratorio. 2005, Universidad de San Carlos de Guatemala.

⁷² Fischer, D.C.H., Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de limoeiro-bravo-*Siparuna apiosyce* (Martius) ADC. 2011.



Tabla 4. Densidad del aceite *S. muricata*

Recolección	ρ (gr/cm ³)	\bar{x}	σ	CV
Primera	0,97			
Segunda	0,90	0,93	0,03	0,03
Tercera	0,91			

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección
 σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección.
CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

➤ Índice de refracción

En la Tabla 5. se muestra los índices de refracción de las tres recolecciones teniendo como promedio 1.500n²⁰

Tabla 5. Índices de Refracción del aceite *S. muricata*

Recolección	Índice de refracción n ²⁰	\bar{x}	σ	CV
1	1,5100			
2	1,5000	1,5000	0,004	0,003
3	1,5000			

\bar{x} Promedio de las tres muestras de cada recolección
 σ Desviación estándar de las tres muestras de cada recolección.
CV Coeficiente de variación

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

4.4. Composición química del aceite esencial de *Siparuna muricata*.

Se identificó un total de 45 compuestos que corresponden a un 87,83% en la columna DB5-MS, un 85,80% en la columna HP-INNOWAX. En la Tabla 6. se detalla la composición química, los índices de Kóvats tanto experimentales como los reportados en literatura, el porcentaje relativo para cada una de las recolecciones realizadas, la desviación estándar y el coeficiente de variación.



Tabla 6. Composición química del aceite esencial de *S. muricata*

No.	COMPUESTOS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% CANTIDAD RELATIVA											
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	DB5-MS						HP-INNOWAX					
						SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV
1	Alpha-Pinene	936	939	1016	1034	0,79	1,66	3,31	1,92	0,92	0,48	2,32	3,25	5,58	3,72	1,24	0,33
2	Camphene	950	954	1055	1077	0,10	0,54	1,13	0,59	0,36	0,60	0,52	1,10	2,05	1,22	0,55	0,45
3	Sabinene	973	975	1112	1123	3,77	0,91	0,23	1,64	1,42	0,87	–	1,83	0,53	1,18	0,65	0,55
4	Beta Pinene	978	979	1099	1113	2,67	0,43	0,78	1,29	0,92	0,71	2,83	0,72	1,45	1,67	0,78	0,47
5	Beta Myrcene	990	990	1156	1168	3,74	0,54	0,52	1,60	1,43	0,89	5,03	1,22	1,25	2,50	1,69	0,68
6	delta 3 Carene	1006	1011	1137	1148	0,31	0,34	0,35	0,33	0,01	0,04	0,95	0,71	0,71	0,79	0,11	0,14
7	limonene	1026	1029	1190	1212	0,64	0,46	1,39	0,83	0,38	0,45	1,20	0,47	1,50	1,06	0,39	0,37
8	cis- β -Ocimene	1038	1037	1227	1245	1,81	–	0,33	1,07	0,74	0,69	2,94	0,15	0,60	1,23	1,14	0,93
9	β trans Ocimene	1040	1050	1243	1242	3,93	0,14	0,18	1,42	1,67	1,18	0,45	–	0,43	0,44	0,01	0,02
10	beta Phellandrene	–	–	1201	1209	–	–	–	–	–	–	0,57	0,37	0,80	0,58	0,15	0,25
11	alpha terpinolene	–	–	1275	1275	–	–	–	–	–	–	–	0,11	0,12	0,12	0,01	0,04
12	bornyl acetate	1282	1289	1599	1580	0,15	–	0,33	0,24	0,85	3,56	0,35	–	0,47	0,41	0,06	0,15
13	alpha Cubebene	1342	1351	1457	1463	0,49	1,42	0,75	0,88	0,08	0,09	0,92	1,70	0,84	1,15	0,37	0,32
14	alpha Copaene	1369	1376	1491	1488	0,30	2,25	2,16	1,57	0,34	0,22	0,69	2,72	2,32	1,91	0,81	0,43
15	beta bourbonene	1376	1388	1521	1512	0,39	0,53	0,62	0,51	0,11	0,21	0,65	0,69	0,74	0,70	0,03	0,05
16	beta.-Cubebene	1382	1388	1547	1558	0,24	0,92	1,08	0,74	1,31	1,77	0,51	1,28	1,30	1,03	0,35	0,34
17	beta elemene	1384	1390	–	–	0,49	0,52	0,25	0,42	1,30	3,11	–	–	–	–	–	–
18	trans Caryophyllene	1411	1419	–	–	4,33	4,27	1,35	3,32	0,58	0,17	–	–	–	–	–	–



No.	COMPUESTOS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% CANTIDAD RELATIVA											
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	DB5-MS						HP-INNOWAX					
						SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{M}_n	σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{M}_n	σ	CV
19	alpha Guaiene	1429	1439	1609	1651	–	4,11	1,51	2,81	0,05	0,02	9,27	2,54	5,90	5,90	–	–
20	alpha Humulene	1447	1454	–	–	0,21	1,50	1,52	1,08	0,04	0,03	–	–	–	–	–	–
21	epi Bicyclosquiphellandrene	1463	1471	–	–	–	0,26	0,15	0,21	0,04	0,19	–	–	–	–	–	–
22	Viridiflorene = Ledene	1470	1496	–	–	0,18	0,11	–	0,15	0,04	0,24	–	–	–	–	–	–
23	α Amorphene	1470	1484	1703	1691	–	0,82	0,74	0,78	0,28	0,36	–	0,91	0,50	0,71	0,21	0,29
24	delta elemene	–	–	1473	1452	–	–	–	–	–	–	–	0,53	0,54	0,53	0,00	0,01
25	Germacrene D	1475	1485	1747	1772	22,74	48,19	54,46	41,79	0,29	0,01	21,86	40,57	42,15	34,86	8,67	0,25
26	beta Selinene	1481	1490	1756	1781	–	1,18	0,62	0,90	0,39	0,43	1,62	2,05	1,35	1,67	0,25	0,15
27	alpha ylangene	–	–	1482	1471	–	–	–	–	–	–	–	0,13	0,14	0,13	0,01	0,04
28	bicyclogermacrene	1487	1500	1772	1738	4,10	2,77	2,13	3,00	0,02	0,01	1,08	1,93	1,72	1,57	0,09	0,06
29	α bulnesene	1494	1509	–	–	–	0,78	0,20	0,49	0,62	1,26	–	–	–	–	–	–
30	Eremophilene	1499	1486	–	–	–	2,14	1,37	1,76	0,01	0,00	–	–	–	–	–	–
31	E,E Alpha Farnesene	1503	1505	–	–	0,42	1,21	0,33	0,65	0,36	0,55	–	–	–	–	–	–
32	γ Cadinene	1506	1513	–	–	–	0,52	0,47	0,50	0,10	0,19	–	–	–	–	–	–
33	delta Cadinene	1512	1523	1808	1808	4,68	6,35	5,23	5,42	–	–	–	6,45	5,87	6,16	0,29	0,05
34	Cadina 1,3,5 triene	1515	1519	–	–	–	0,15	0,13	0,14	–	–	–	–	–	–	–	–
35	Germacrene B	1550	1559	1885	1864	9,42	9,20	10,11	9,58	–	–	7,26	8,17	8,55	7,99	0,49	0,06
36	alpha Muurolene	1545	1500	1767	1727	–	0,10	0,29	0,20	–	–	0,18	0,35	0,25	0,26	0,06	0,23



No.	COMPUESTOS	DB5-MS		HP-INNOWAX		% CANTIDAD RELATIVA											
		IKA ^a	IKA ^{ref}	IKA ^a	IKA ^{ref}	DB5-MS						HP-INNOWAX					
						SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV	SYC11-3	SYC21-3	SYC31-3	\bar{x}	σ	CV
37	beta caryophyllene	-	-	1609	1608	-	-	-	-	-	-	2,69		1,98	2,33	0,35	0,15
38	alpha caryophyllene	-	-	1694	1680	-	-	-	-	-	-	0,43	1,48	1,48	1,13	0,47	0,41
39	gamma muurolene	-	-	1699	1741	-	-	-	-	-	-	0,29	0,22	0,41	0,31	0,07	0,22
40	epizonarene	-	-	1660	1688	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,17	0,18	0,01	0,08
41	carotol	-	-	2037	2024	-	-	-	-	-	-	-	1,29	1,17	1,23	0,06	0,05
42	caryophyllene oxide	-	-	2069	2068	-	-	-	-	-	-	0,24	0,19	-	0,21	0,02	0,11
43	Germacrene D 4-ol	-	-	2172	2069	-	-	-	-	-	-	0,67	-	0,35	0,51	0,16	0,32
44	spathulenol	-	-	2265	2150	-	-	-	-	-	-	0,32	0,18	0,16	0,22	0,07	0,30
45	beta eudesmol	-	-	2394	2258	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,16	0,18	0,02	0,13
TOTAL									87,83								85,80

47

IK A, IK P, Índices de kóvats en la columna polar (DB5-MS) y en la columna polar (HP-INNOWAX) respectivamente

a= Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS

b=Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS para cada recolección (SYC1-SYC2-SYC3)

c= Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna HP INNOWAX-MS Fuente: Investigación directa

* = sumatoria del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB5-MS y HP INNOWAX-MS Elaboración: El autor

\bar{x} = promedio del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB5-MS y HP INNOWAX-MS

σ = desviación estándar del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB5-MS y HP INNOWAX-MS

CV=coeficiente de variación del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB5-MS y HP INNOWAX-MS

IK Ref., referencias: ^dref, ^eref, ^fref, ^gref, ^href, ⁱref, ^jref, ^kref, ^lref, ^mref, ⁿref, ^oref, ^pref, ^qref, ^rref, ^sref, ^tref, ^uref.

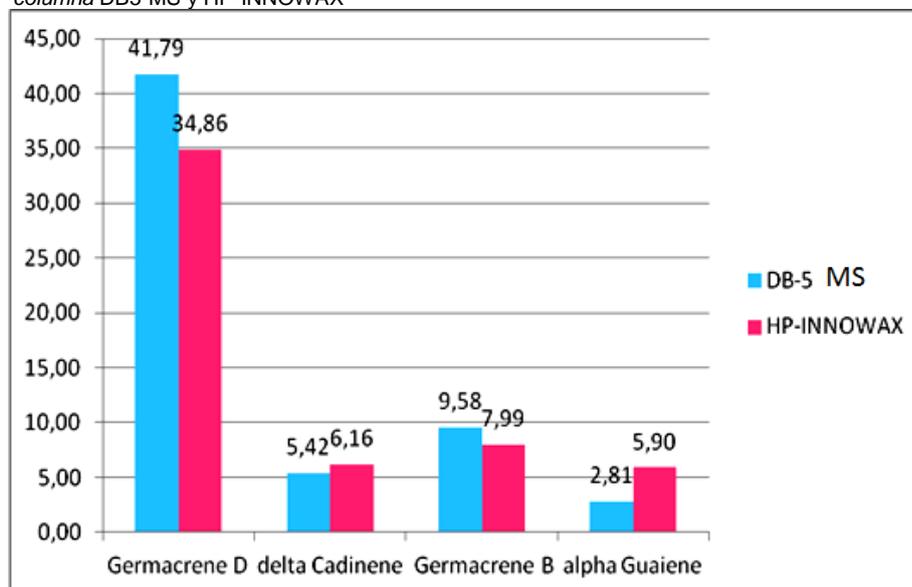
Fuente: Investigación directa

Elaboración: La Autora



Los compuestos mayoritarios determinados en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX se muestran en la figura 13.

Figura 13. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de la materia vegetal *S. muricata* en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

Hasta el momento no existen publicaciones sobre la composición de la especie *S. muricata*, sin embargo en estudios de especies vegetales del mismo género, como *S. thecaphora* y *S. sessiliflora* que en su composición química presenta compuestos similares a los de la *S. muricata* además presentan al germacrene D como componente mayoritario con un porcentaje de (32,7% y 7%) respectivamente, lo cual indica que existe una relación entre estas especies del mismo género.¹⁹

Análisis de las partes aéreas de *S. guianensis Aublet (negramina)* de tres poblaciones de Brasil (muestras A, B y C), tiempo de floración, también difieren con respecto al porcentaje del componente mayoritario. El componente principal de la muestra de aceite A fue el epi- α -bisabolol (25,1%) y spathulenol (15,7%). En la muestra B, se encuentra spathulenol (22,0%), selin-11-en-4- α -ol (19,4%), β -eudesmol (10,0%) y elemol (10,0%). Para la muestra C, la obtenida germaerona (23,2%), germacrene B (8,0%) y atractilona (31,4%),⁷³ estos compuestos también están presentes en *S. muricata* aunque en menor concentración.

En la tabla 7. se observa el porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial identificados en la columna DB5-MS con DB-5FID y para la columna HP-INNOWAX-MS con HP-INNOWAX-FID, también se observa el promedio y desviación estándar para cada columna.

¹⁹ Ciccio, J.F. and J. Gómez-Laurito, Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 2002. **50**(3-4): p. 963-967.

⁷³ Valentini, C., C. Rodríguez-Ortiz, and M. Coelho, *Siparuna guianensis Aublet ("negramina"): a review*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2010. **12**(1): p. 96-104



Tabla 7. Porcentaje relativo de los componentes del aceite esencial de *S. muricata* para GC-MS y GC-FID en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX

No.	COMPUESTOS	DB5-MS										HP-INNOWAX									
		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		\bar{x}		σ		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		\bar{x}		σ	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
1	Alpha-Pinene	0,79	2,77	1,66	2,63	3,31	5,49	1,92	3,63	0,92	1,24	2,32	5,37	3,25	1,47	5,58	5,37	3,72	4,07	1,24	1,73
2	Camphene	0,10	0,38	0,54	0,88	1,13	1,96	0,59	1,07	0,36	0,59	0,52	2,67	1,10	0,96	2,05	2,67	1,22	2,10	0,55	0,76
3	Sabinene	3,77	3,34	0,91	1,33	0,23	0,45	1,64	1,71	1,42	1,09	-	-	1,83	1,29	0,53	0,51	1,18	0,90	0,65	0,39
4	Beta Pinene	2,67	6,41	0,43	0,72	0,78	1,50	1,29	2,88	0,92	2,36	2,83	1,36	0,72	0,91	1,45	1,36	1,67	1,21	0,78	0,20
5	Beta Myrcene	3,74	0,67	0,54	0,99	0,52	1,22	1,60	0,96	1,43	0,19	5,03	0,68	1,22	0,96	1,25	1,16	2,50	0,93	1,69	0,17
6	delta-3-Carene	0,31	1,86	0,34	0,10	0,35	0,17	0,33	0,71	0,01	0,77	0,95	0,51	0,71	0,69	0,71	0,68	0,79	0,63	0,11	0,08
7	Limonene	0,64	0,48	0,46	0,49	1,39	1,58	0,83	0,85	0,38	0,49	1,20	1,16	0,47	0,48	1,50	1,34	1,06	1,00	0,39	0,34
8	cis- β -Ocimene	1,81	0,46	-	-	0,33	0,65	1,07	0,55	0,74	0,10	2,94	0,75	0,15	0,32	0,60	0,81	1,23	0,63	1,14	0,20
9	β -trans-Ocimene	3,93	3,95	0,14	0,38	0,18	0,47	1,42	1,60	1,67	1,57	0,45	0,81	-	-	0,43	0,54	0,44	0,68	0,01	0,14
10	beta.-Phellandrene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	1,34	0,37	0,36	0,80	0,75	0,58	0,82	0,15	0,35
11	alpha-terpinolene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,10	0,12	0,12	0,12	0,11	0,01	0,01
12	bornyl acetate	0,15	0,29	-	-	0,33	0,41	0,24	0,35	0,09	0,06	0,35	0,48	-	-	0,47	0,46	0,41	0,47	0,06	0,01
13	alpha.-Cubebene	0,49	1,74	1,42	1,38	0,75	0,75	0,88	1,29	0,35	0,36	0,92	0,84	1,70	1,40	0,84	0,84	1,15	1,03	0,38	0,25
14	alpha.-Copaene	0,30	0,57	2,25	2,23	2,16	1,90	1,57	1,57	0,85	0,66	0,69	0,85	2,72	2,77	2,32	2,17	1,91	1,93	0,74	0,72
15	beta-bourbonene	0,39	0,61	0,53	0,68	0,62	0,69	0,51	0,66	0,08	0,03	0,65	0,79	0,69	0,74	0,74	0,74	0,70	0,76	0,03	0,02
16	beta.-Cubebene	0,24	0,46	0,92	1,14	1,08	1,20	0,74	0,93	0,34	0,32	0,51	0,32	1,28	0,87	1,30	0,96	1,03	0,72	0,35	0,26
17	beta.-elemene	0,49	0,76	0,52	0,69	0,25	0,32	0,42	0,59	0,11	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	trans-Caryophyllene	4,33	2,77	4,27	4,19	1,35	1,37	3,32	2,78	1,31	0,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



No.	COMPUESTOS	DB5-MS										HP-INNOWAX									
		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		K _d		σ		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		K _d		σ	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
19	alpha.-Guaiene	-	-	4,11	3,67	1,51	1,26	2,81	2,47	1,30	1,20	9,27	1,57	2,54	1,57	5,90	2,96	5,90	2,03	2,25	0,62
20	alpha.-Humulene	0,21	0,46	1,50	1,50	1,52	1,52	1,08	1,16	0,58	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	epi Bicyclosesquiphellandrene	-	-	0,26	0,45	0,15	0,35	0,21	0,40	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Viridiflorene = Ledene	0,18	0,21	0,11	0,10	-	-	0,15	0,15	0,04	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	α-Amorphene	-	-	0,82	0,89	0,74	0,66	0,78	0,78	0,04	0,11	-	-	0,91	0,88	0,50	0,86	0,71	0,87	0,21	0,01
24	delta-elemene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,84	0,54	0,54	0,53	0,69	0,01	0,15
25	Germacrene D	22,74	21,98	48,19	43,64	54,46	47,90	41,79	37,84	12,71	10,57	21,86	17,06	40,57	45,55	42,15	43,43	34,86	35,35	8,67	12,19
26	beta.-Selinene	-	-	1,18	1,09	0,62	0,57	0,90	0,83	0,28	0,26	1,62	3,17	2,05	1,51	1,35	2,34	1,67	2,34	0,25	0,55
27	alpha-ylangene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,13	0,14	0,29	0,13	0,21	0,01	0,08
28	bicyclogermacrene	4,10	2,50	2,77	3,53	2,13	2,93	3,00	2,99	0,73	0,36	1,08	2,37	1,93	1,41	1,72	1,89	1,57	1,89	0,33	0,32
29	α-bulnesene	-	-	0,78	0,40	0,20	2,77	0,49	1,58	0,29	1,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Eremophilene	-	-	2,14	2,56	1,37	1,28	1,76	1,92	0,39	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	E,E Alpha Farnesene	0,42	3,13	1,21	0,49	0,33	0,41	0,65	1,34	0,37	1,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	γ-Cadinene	-	-	0,52	1,02	0,47	0,87	0,50	0,94	0,02	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	delta.-Cadinene	4,68	2,25	6,35	3,68	5,23	2,93	5,42	2,96	0,62	0,49	-	-	6,45	6,66	5,87	6,42	6,16	6,54	0,29	0,12
34	Cadina-1,3,5-triene	-	-	0,15	0,17	0,13	0,71	0,14	0,44	0,01	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Germacrene B	9,42	6,83	9,20	7,67	10,11	8,01	9,58	7,50	0,36	0,45	7,26	8,45	8,17	8,46	8,55	8,40	7,99	8,44	0,49	0,02
36	alpha.-Muuroolene	-	-	0,10	0,20	0,29	0,29	0,20	0,24	0,10	0,04	0,18	0,18	0,35	0,33	0,25	0,26	0,26	0,26	0,06	0,05



No.	COMPUESTOS	DB5-MS										HP-INNOWAX									
		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		\bar{x}		σ		SYC11-3		SYC21-3		SYC31-3		\bar{x}		σ	
		MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID	MS	FID
37	beta-caryophyllene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,69	0,93	-	-	1,98	2,31	2,33	1,62	0,35	0,69
38	alpha-caryophyllene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	2,53	1,48	2,50	1,48	2,54	1,13	2,52	0,47	0,02
39	gamma-muurolene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	0,55	0,22	0,54	0,41	0,58	0,31	0,56	0,07	0,02
40	epizonarene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	1,22	0,17	1,24	0,18	1,23	0,01	0,01
41	carotol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,29	1,37	1,17	1,39	1,23	1,38	0,06	0,01
42	caryophyllene oxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	0,38	0,19	1,36	-	-	0,21	0,87	0,02	0,49
43	Germacrene D 4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,67	0,17	-	-	0,35	0,15	0,51	0,16	0,16	0,01
44	spathulenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,35	0,18	0,70	0,16	0,53	0,22	0,53	0,07	0,12
45	beta-eudesmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,59	0,16	0,54	0,18	0,57	0,02	0,03
		TOTAL										TOTAL									
		87,83										85,66									
												85,79									
												86,01									

a= Compuestos identificados en la columna DB5-MS.
 b= Compuestos identificados solo en la columna HP-INNOWAX.
 c= Porcentajes promedio del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas
 * = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas
 \bar{x} = Promedio
 σ = Desviación estándar
 CV = Coeficiente de variación
 lK ref, Literatura ^dref, ^eref, ^fref, ^gref, ^href, ⁱref, ^jref, ^kref, ^lref, ^mref, ⁿref, ^pref, ^qref, ^rref, ^sref, ^tref, ^uref.

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La Autora

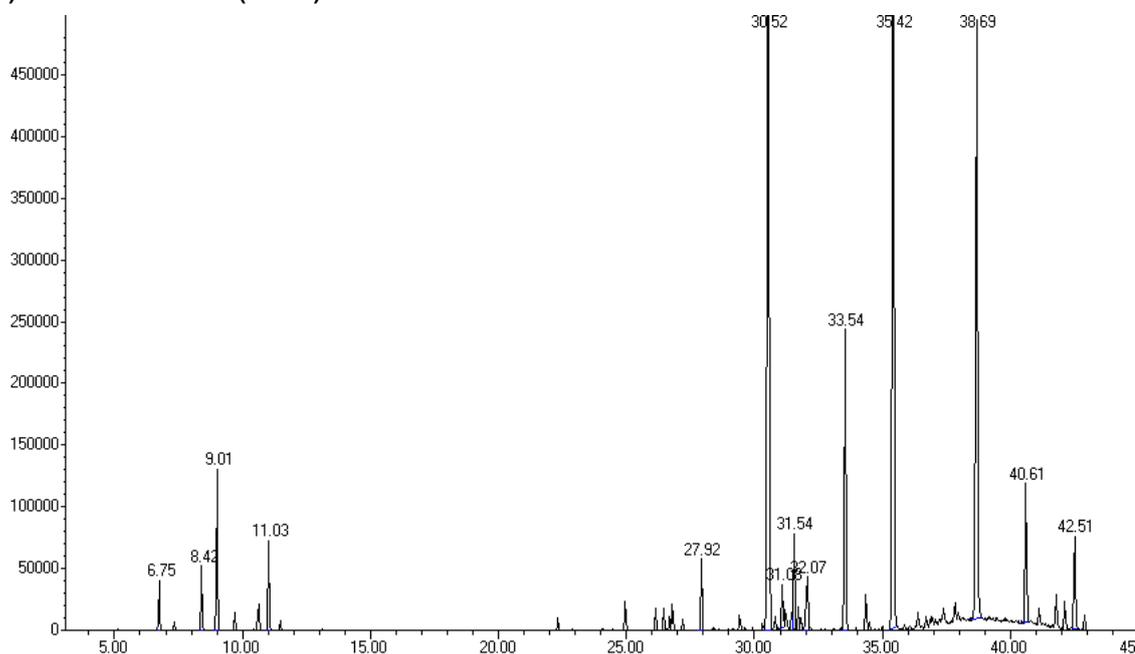


Teniendo en cuenta que los aceites esenciales son producto del metabolismo de la planta, la composición de éstos puede presentar constante cambio, modificándose las proporciones de los analitos, o transformándose unos en otros. Algunos de los factores que afectan la composición química de los aceites esenciales son: el estado y procedencia de la planta, las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo, el clima (humedad, oxígeno, luz solar), el momento del día, así como también ciertas variables del proceso o método de extracción, su duración, temperatura, y la parte de la planta, etc. El quimiotipo depende de la genética de la planta y de las condiciones geobotánicas de su crecimiento.⁷⁴ Como en el caso de la *S. muricata* que en el estado de floración presenta compuestos mayoritarios los cuales desaparecen cuando está en estado de fructificación.

En la Figura 14. se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos de las tres recolecciones en la columna DB5-MS.

Figura 14. Cromatogramas del aceite esencial de *S. muricata* en DB5-MS.

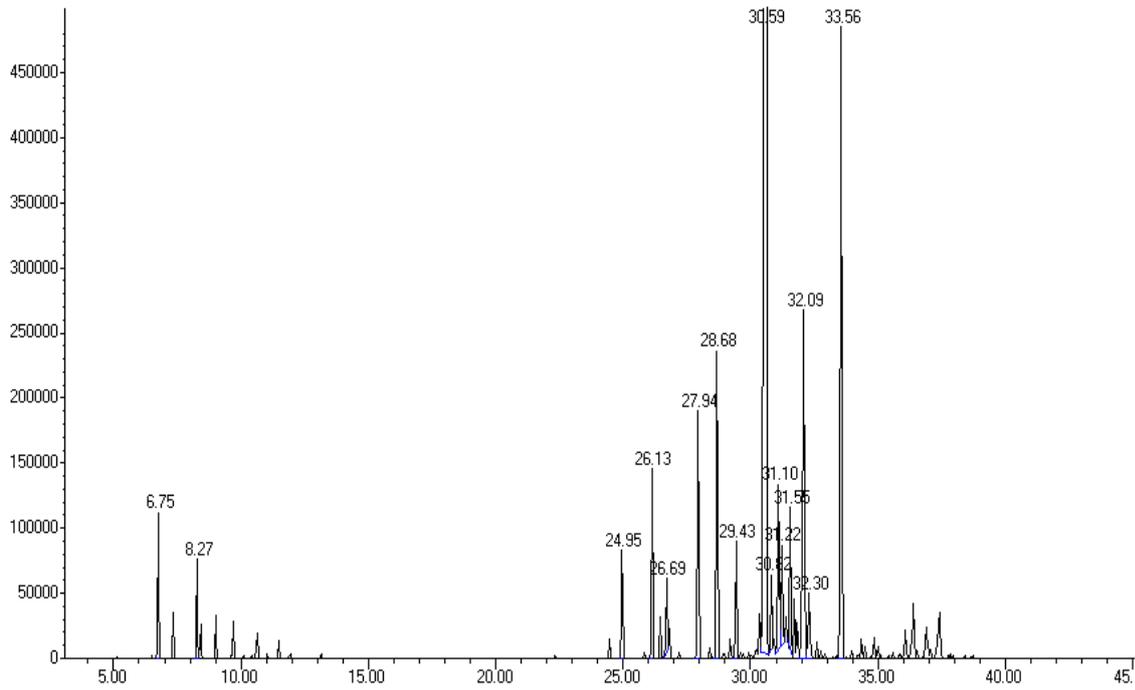
a). Primera recolección (SYC11)



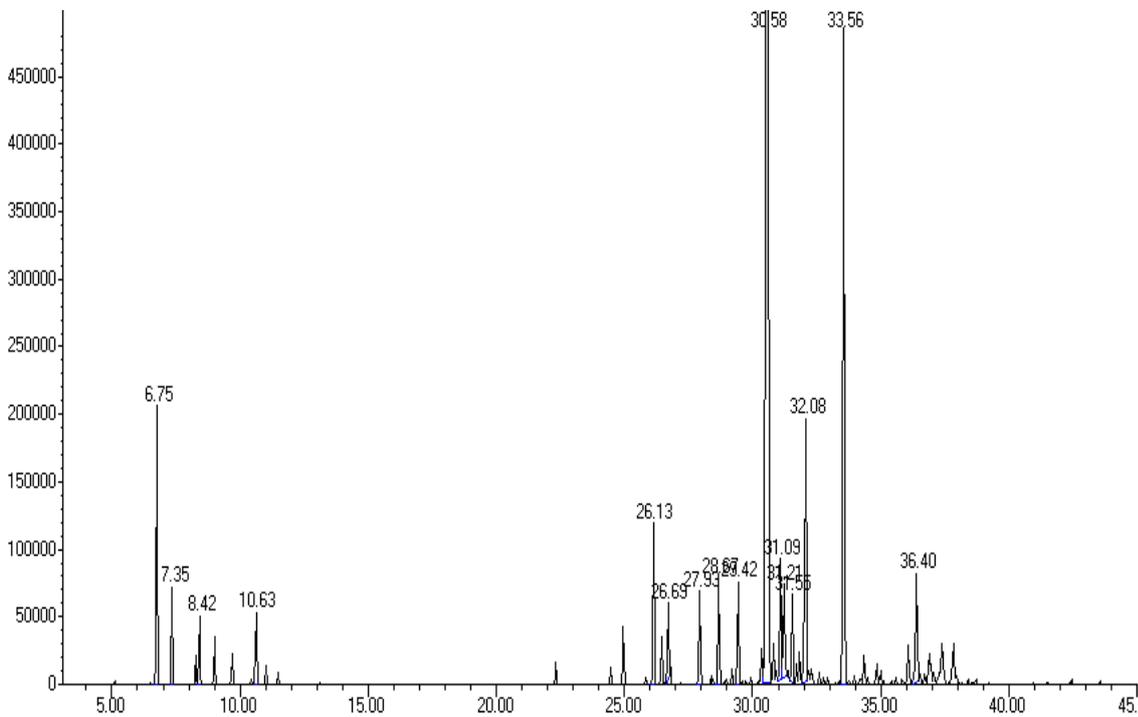
⁷⁴ Celis, C., et al., Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. Scientia et Technica, 2007. **13**: p. 103.



b) Segunda recolección (SYC21)



c) Tercera recolección (SYC31)



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

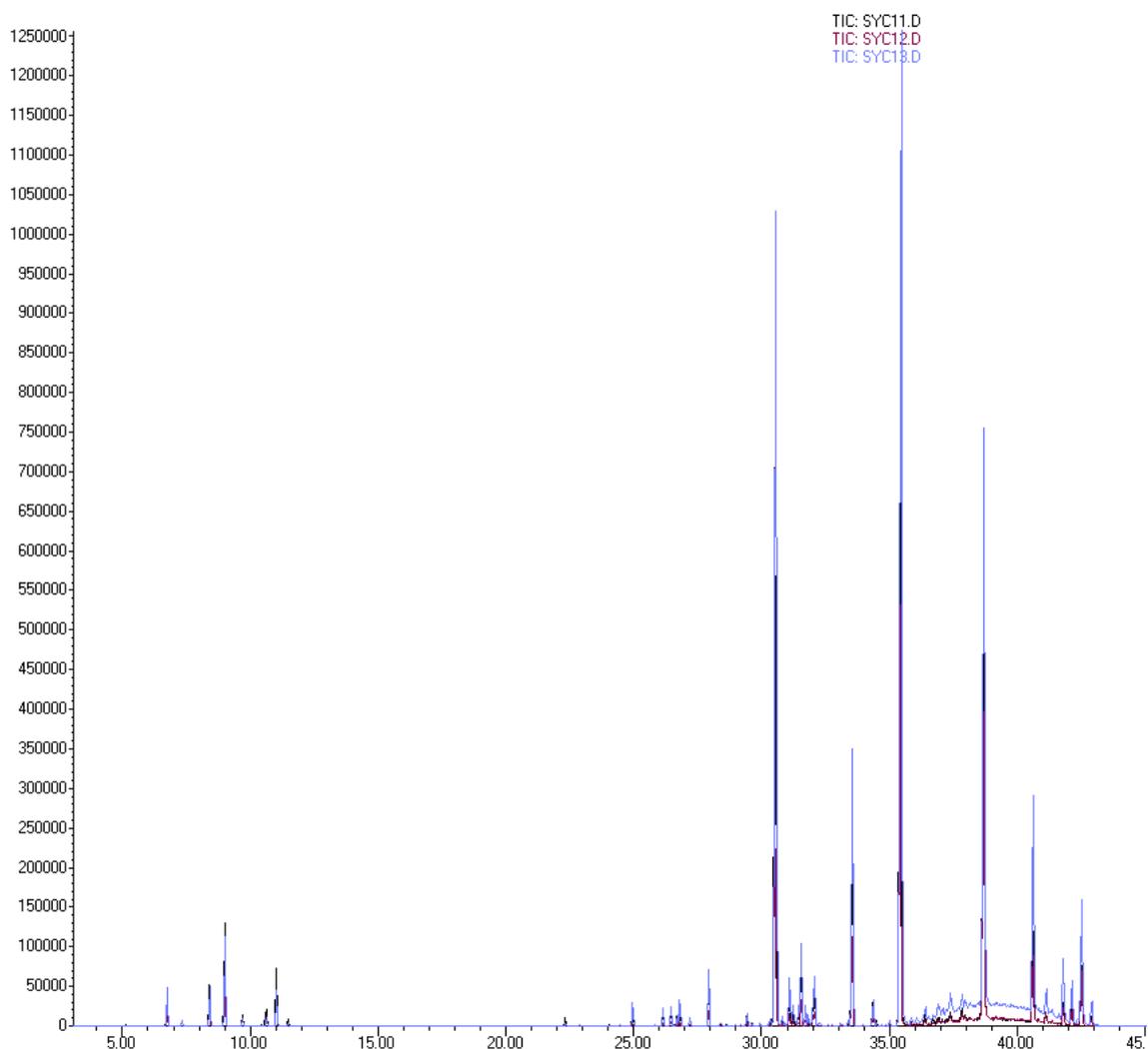


En los cromatogramas se pudo apreciar que los picos en la primera recolección tanto en DB5-MS como en HP-INNOWAX es diferente a los de la segunda y tercera recolección, esto pudo ocurrir por el estado fenológico de la planta, al tiempo entre cada recolección, a las condiciones de clima, al lugar de recolección, además de la edad de la planta.⁷⁵

En la Figura 15. se muestra las comparaciones de los cromatogramas de las destilaciones por cada recolección en la columna DB5-MS.

Figura 15. Comparación de cromatogramas del aceite esencial de *S. muricata* de las destilaciones por cada recolección

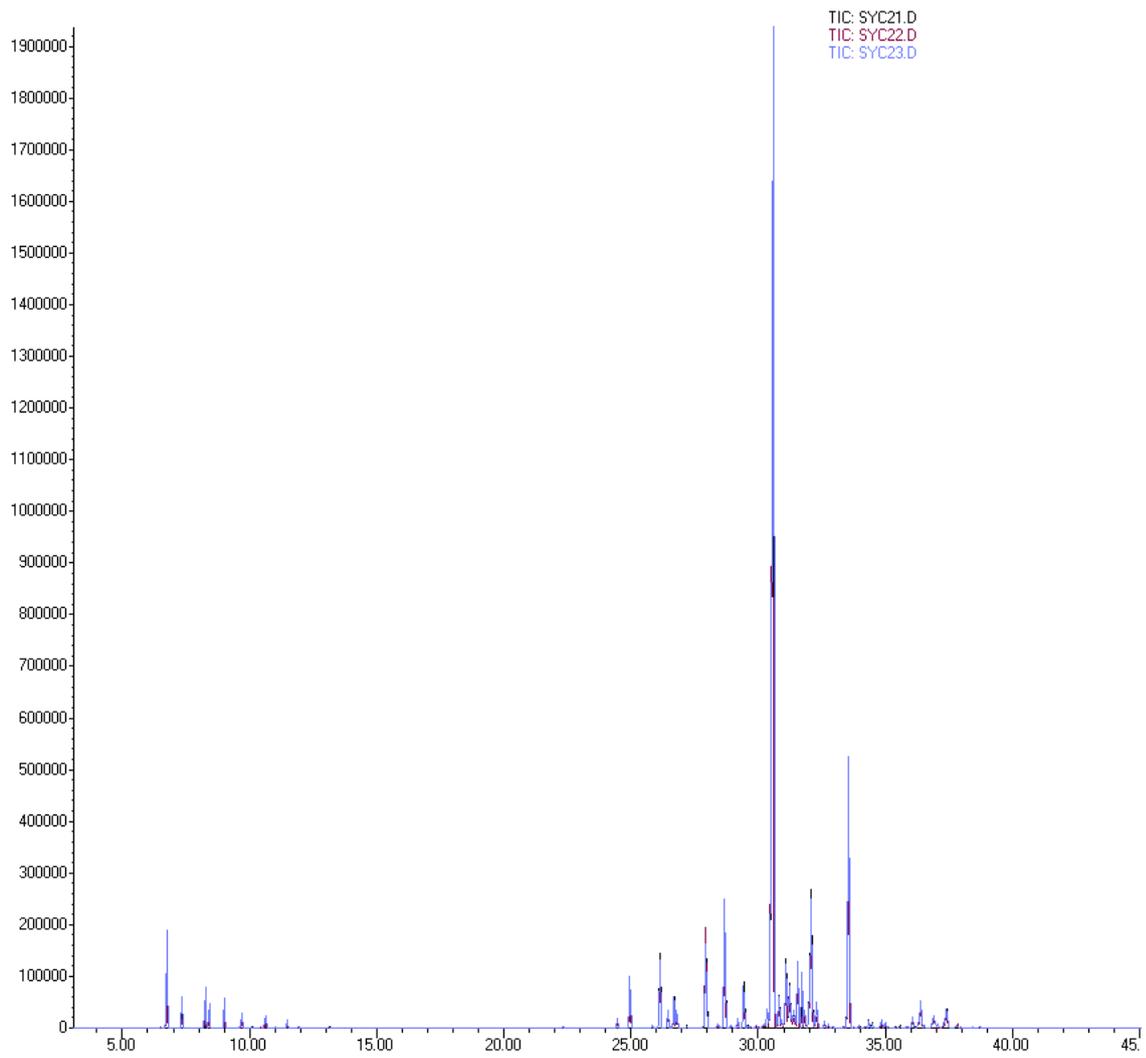
a) Primera recolección



⁷⁵ Monsalve Salamanca, L.A., Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) NE Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. 2012.

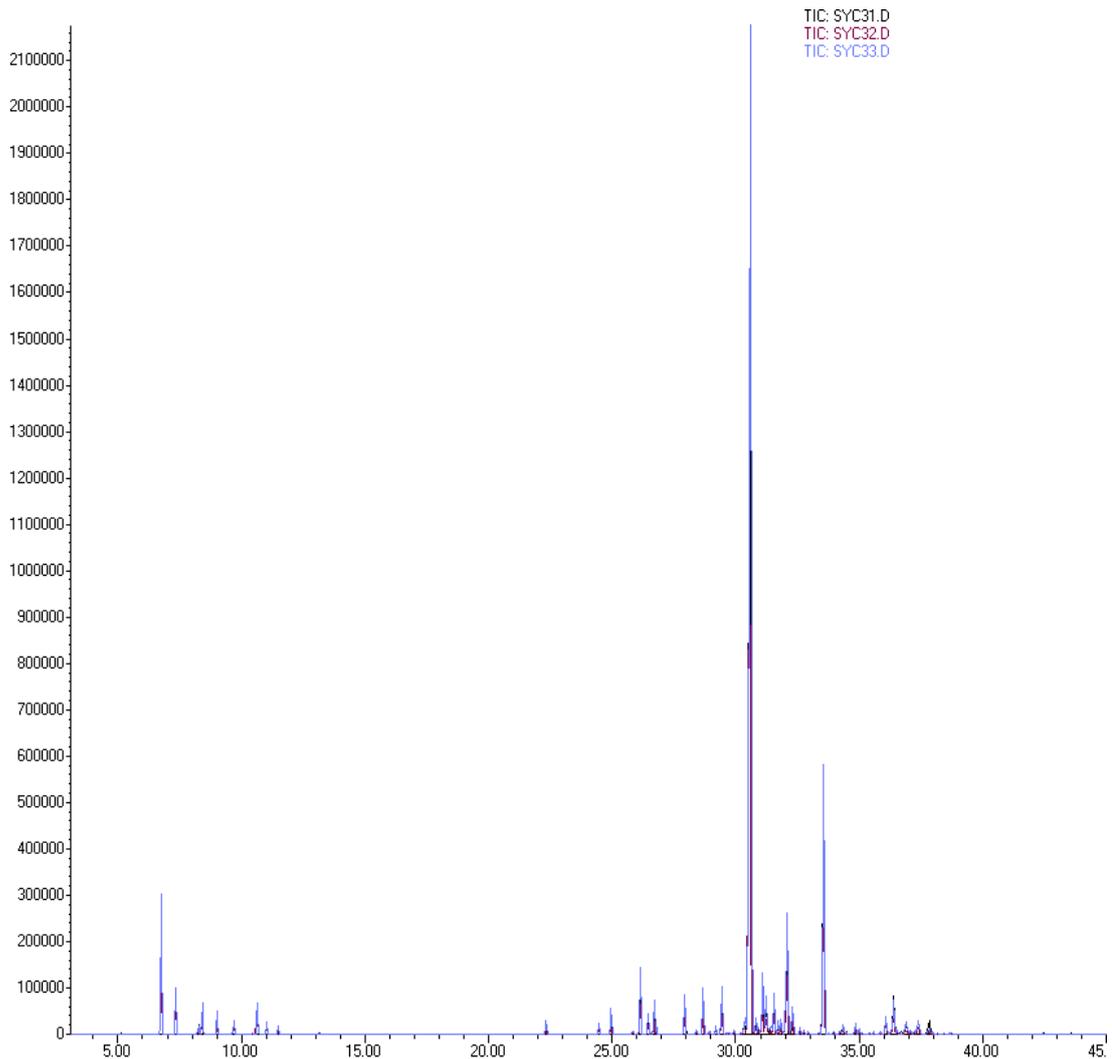


b) Segunda Recolección





c) Tercera Recolección



Fuente: Investigación directa
Elaboración: La Autora

Entre los componentes mayoritarios en la primera recolección existen el epicurzerenone, germacrone, los cuales con el desarrollo de la especie y cambio de estado fenológico al parecer desaparecen en la segunda y tercera recolección, lo que influyó en la identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *S. muricata*.

Anthony et al. (1984) encontraron en las hojas de *Siparuna* de Panamá compuestos como: curzeronona (25,64%), los tipos y/o productos de degradación de los mismos curzeronona (42,31%), miristicina (7,93%); δ -elemeno, germacreno, β -elemeno,⁷³⁻³⁰ lo

⁷³ Valentini, C., C. Rodriguez-Ortiz, and M. Coelho, *Siparuna guianensis Aublet ("negramina"): a review*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2010. 12(1): p. 96-104

³⁰ Mahecha Mahecha, C.A., Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. 2010



que indica que el epicurzerenone y el germacrone pueden estar presentes en el período de floración y desaparecer en durante el período de fructificación.

La influencia de las condiciones climáticas sobre la composición del aceite de *Siparuna* se observó al detectar en el estado de Rondônia (Brazil), que el nerolidol fue el principal componente en junio durante la floración, pero no se encontró en febrero. Esto nos da una referencia de que los compuestos pueden estar presente durante cierto tiempo y desaparecer luego según determinados cambios que pueda sufrir la especie.

4.5. Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *S. muricata*.

Los espectros que se muestran a continuación representan a los compuestos mayoritarios del aceite esencial identificados en la presente investigación.

Germacrene D

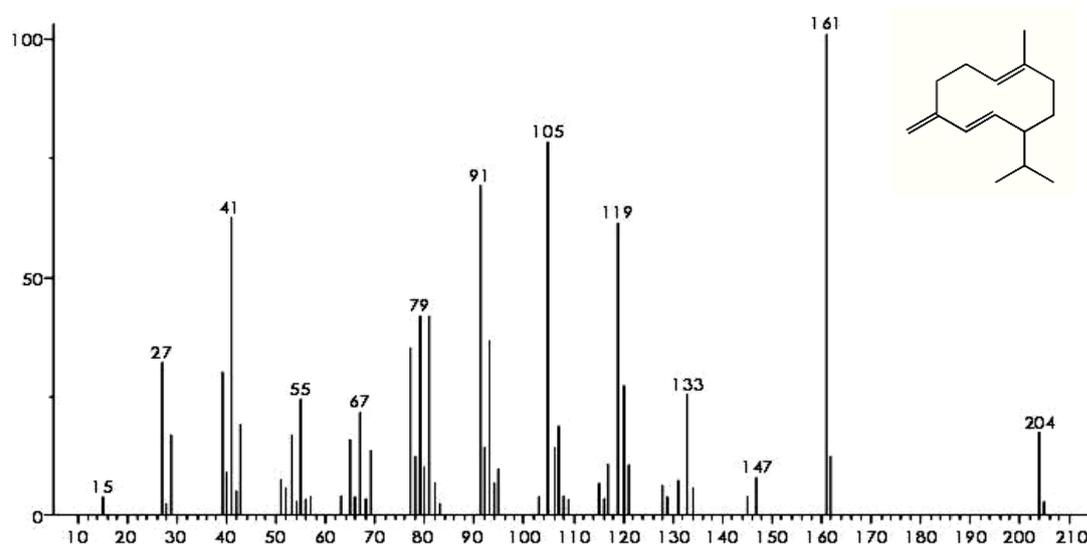


Figura 16. Espectro de germacreno D
Fuente: Pherobase (MS)



Germacrene B

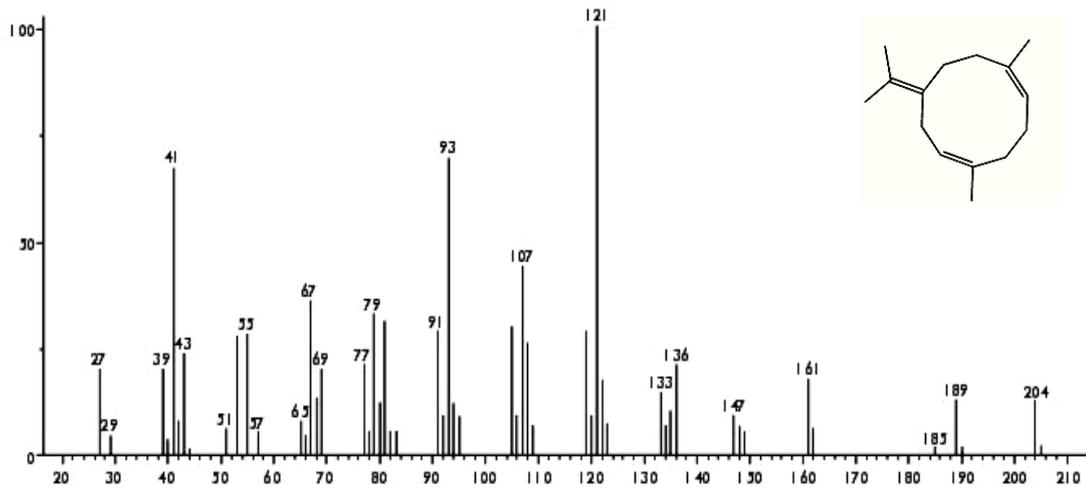


Figura 17. Espectro de germacreno B
Fuente: Pherobase (MS)

Delta cadinene

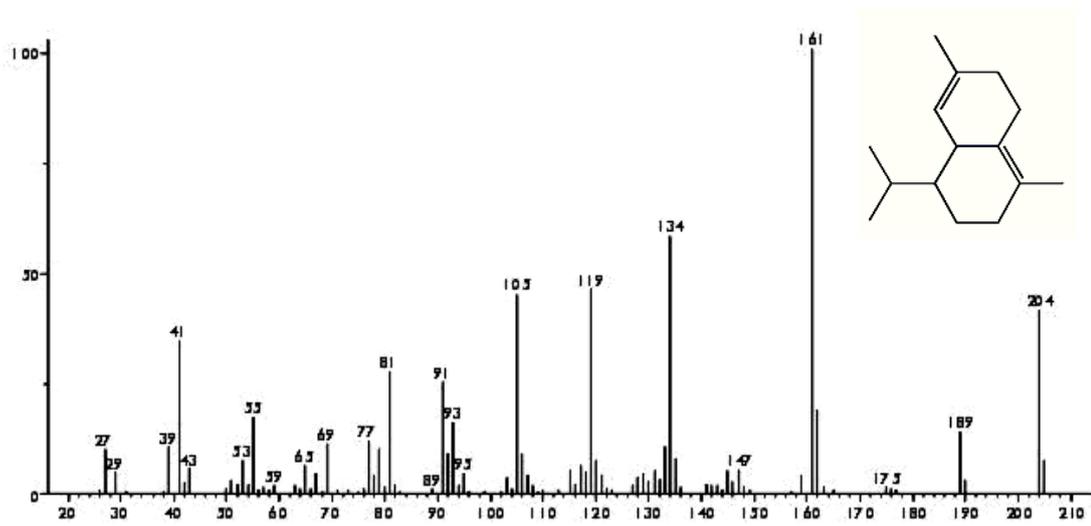


Figura 18. Espectro de germacreno delta cadinene
Fuente: Pherobase (MS)



Alpha guaiene

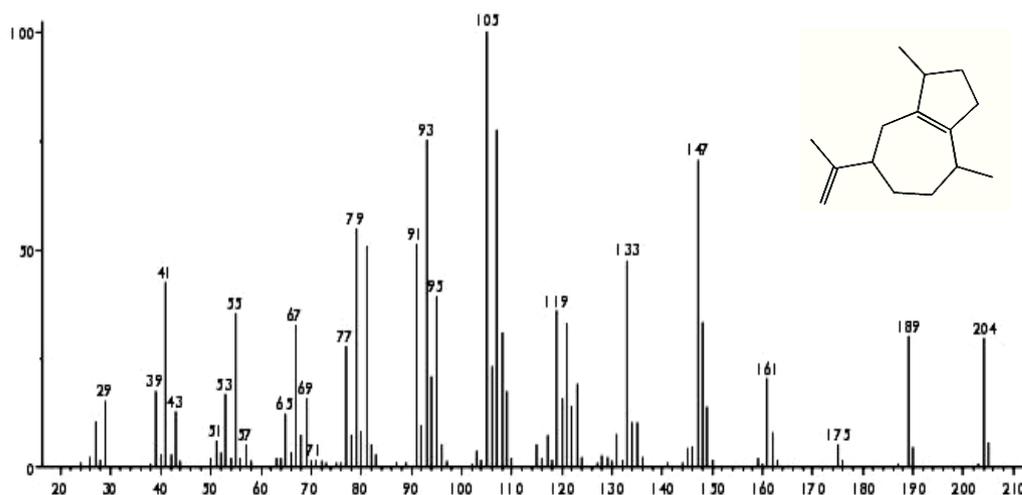


Figura 19. Espectro de alpha guaiene
Fuente: Pherobase (MS)

4.6. Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial

La resistencia de los microorganismos a los fármacos y plaguicidas existentes, es un problema que tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene la búsqueda de nuevos antimicrobianos para combatir las enfermedades, superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles una de las opciones que está en vía de desarrollo y explotación es el uso de antimicrobianos de origen natural y, dentro de ellos, están los aceites esenciales.⁷⁶ Algunos poseen propiedades antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos, son tóxicos a nematodos, un amplio espectro de insectos plagas y parecen ser particularmente efectivos contra plagas de productos almacenados. Además de sus efectos tóxicos agudos, producen numerosos efectos subletales, actúan como inhibidores del crecimiento larval, antialimentarios y repelentes para un amplio rango de insectos y ácaros.⁷⁷

4.6.1. Concentración Mínima Inhibitoria de Bacterias

Se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria de bacterias determinándose que el aceite de *S. muricata* de la primera recolección tiene resultado inhibitorio de 62,5 µg/mL en *Staphylococcus aureus*, mientras que la segunda y tercera recolección

⁷⁶ Pino, O., et al., Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) ST Blake. Revista de Protección Vegetal, 2011. 26(3): p. 177-186.

⁷⁷ Pino, O., et al., Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum subsp. ossanum* frente a *Varroa destructor*. Revista de Protección Vegetal, 2011. 26(1): p. 52-61.



presentan un CMI mayor a 1000 µg/mL. en la Tabla 8. se reportan los resultados obtenidos.

Tabla 8. Actividad biológica en bacterias de aceite *S. muricata*

Especie	Recolección	Código	Ec	Kp	Pa	Pv	Sa	Ef	St
<i>Siparuna muricata</i>	Primera	SYC1	—	—	—	—	62,5	—	—
	Segunda	SYC2	—	—	—	—	—	—	—
	Tercera	SYC3	—	—	—	—	—	—	—

Ec: *Escherichia coli*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Pv: *Proteus vulgaris*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ef: *Enterococcus faecalis*; St: *Salmonella tyhimurium*; —: >1000 µg/mL.

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La Autora

Una característica importante de este estudio del aceite de *S. muricata* es que existe diferencia entre los compuestos de cada recolección, por lo que en la primera recolección aparecen compuestos mayoritarios como el epicurzerenone y el germacrone estos compuestos en algunos estudios de otras especies también se encuentran mayoritariamente y poseen actividad inhibitoria en bacteria *S. aureus*.⁷⁸⁻⁷⁹

En la actualidad no existen publicaciones sobre estudios de actividad bacteriana sobre el aceite esencial de *S. muricata*, sin embargo investigaciones del género *Siparuna* presentan compuestos similares; *S. aureus* ATCC 6535, fue sensible a la acción antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de hojas y frutos de la *S. sessiliflora*, en las concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL y 5 mg/mL.³⁰ El extracto de las hojas de *Siparuna apiosyce* presentan actividad antibacteriana en *S. aureus* ATCC (6538) con una concentración de 50 µL/mL.⁷³

Otras especies del género *Siparuna* como: el extracto metanólico de *S. guianensis* y el extracto etanólico de *S. echinata* que presentaron actividad antimicrobiana frente a la bacteria de *S. aureus*, la *S. echinata* presenta actividad antibacteriana de 50%. Esto

⁷⁸ Lai, E.Y., et al., Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. The American Journal of Chinese Medicine, 2004. 32(02): p. 281-290.

⁷⁹ Carrizo Flores, R., et al., Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity. Journal of the Chilean Chemical Society, 2009. 54(4): p. 475-476.

³⁰ Mahecha Mahecha, C.A., Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. 2010

⁷³ Valentini, C., C. Rodriguez-Ortiz, and M. Coelho, *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2010. 12(1): p. 96-104



confirma los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la relación entre las especies,²⁰ con el mismo género de la *S. muricata*.

El extracto de *S. muricata* que reporta compuestos como: alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, esteroides, cumarinas,¹ que puede ser comparado con los resultados de la actividad antibacteriana de *S. sessiliflora*, la cual puede ser atribuida a los alcaloides aislados a partir de las hojas de esta planta. Los alcaloides isoquinolínicos, los cuales son compuestos característicos del género *Siparuna*, y la familia Siparunaceae es rica en estos compuestos del tipo aporfínicos. Los alcaloides isoquinolínicos están dotados de diferentes actividades biológicas dentro de las cuales se destacan importantes actividades antimicrobianas, principalmente contra bacterias grampositivas.²⁰

4.6.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para hongos

La Tabla 9. Indica los valores de la CMI para los hongos evaluados de los nueve aceites de las tres recolecciones realizadas del aceite de *S. muricata*: para los hongos *T. mentagrophytes* ATCC® 28185 y *T. rubrum* ATCC ® 28188 se observó que las muestras de los aceites de la primera recolección tienen una menor inhibición en el crecimiento de hongos, esto puede deberse a la diferencia de compuestos en la determinación de la composición química del mismo.

Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)

Recolección	Código	Hongos	
		ATCC 28185	ATCC 28188
Primera	SYC1	500	500
Segunda	SYC2	125	62,5
Tercera	SYC3	125	125

Itraconazole; positive controls 100%
inhibición (7,81µg/mL)

ATCC 28185 *Trichophyton mentagrophytes*

ATCC 28188 *Trichophyton rubrum*

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La Autora

La concentración inhibitoria determinada en los ensayos para hongos con los aceites de la segunda y tercera recolección está entre 62,5 µg/mL y 125 µg/mL. La variación en las concentraciones se pudo dar por la diferencia de la composición química.

²⁰ Padilla González, G.F. and E. Gil Archila, Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (*limoncillo*). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. 17(1): p. 65-72.

¹ Ordoñez V. Paola; Vega E. Mónica; Malagón A, Omar; et al., Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia* 10 (2) March 2006-Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon/Dry Forest Conservation: Ethnobotany and Forest Use, 2006.

V. CONCLUSIONES



- El promedio de humedad en el aceite de *S. muricata* es 61,97%. El rendimiento es 0,19% el cual fue suficiente para realizar los análisis realizados en esta investigación. La densidad promedio de las tres recolecciones de la especie es 0,93gr/cm³ y el índice de refracción fue 1,5000.
- En la composición química del aceite de *S. muricata* se identificaron 45 compuestos, cuyos componentes mayoritarios fueron: germacrene D (41,79%), germacrene B (9,58%), delta cadinene (5,42%), alpha guaiene (5,90%), además únicamente en la primera recolección están presentes como compuestos mayoritarios el epicurzerenone (25,71%) y germacrone (17,92%).
- En cuanto a las pruebas de actividad bacteriana se determinó que los aceites de la primera recolección tienen actividad inhibitoria en la bacteria *Staphylococcus aureus* con una Concentración Mínima Inhibitoria de (62,5 µg/mL).
- El aceite esencial de *S. muricata* presenta en los hongos *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum* una mejor actividad inhibitoria en la segunda recolección con una concentración de (62,5 µg/mL), ya que esta es la Concentración Mínima Inhibitoria obtenida en las pruebas de actividad biológica realizadas.



VI. RECOMENDACIONES



- La selección y tratamiento de la materia prima es importante antes de la extracción, ya que en el proceso, el vapor de agua puede arrastrar impurezas dando como resultado un aceite esencial contaminado.⁸⁰
- Realizar pruebas con *S. muricata* en diferentes estados fenólicos y de diferentes localidades de la provincia de Loja para comparar sus propiedades fisicoquímica, composición química y actividad biológica. Sabiendo que la regulación de la producción y síntesis de aceite esencial metabolitos se integra en la fisiología de las plantas y depende del estado metabólico y su adaptación al ecosistema. La latitud y la altitud determinan el clima, que a su vez, afecta a los tipos de suelo y la vegetación.⁸¹
- Realizar estudios posteriores para determinar formulaciones farmacéuticas ya que el aceite de *S. muricata* posee actividad antibacteriana en estado de floración y antifúngica en estado de fructificación. Con los resultados obtenidos, se recomienda posteriores investigaciones para desarrollar productos fitofarmacéuticos con este aceite, a los cuales se le realicen la etapa clínica así como la estabilidad del mismo.⁸²
- Impulsar proyectos de investigación de la especie de *S. muricata* a diferentes edades, para determinar si existe diferencia significativa en el rendimiento de extracción y en la composición química del aceite esencial..

⁸⁰ Paredes Punina, D.O. and F.D. Quinatoa Chicaiza, Desarrollo de un Sistema de Extracción de Aceites Esenciales. 2012.

⁸¹ Betancourt López, L.L., *Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde*, 2012, Universidad Nacional de Colombia.

⁸² Flores Solano, A.L., *et al.*, Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (oregano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto), en *microsporium canis trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*, 2004, Universidad de El Salvador.

VII. ANEXOS



ANEXO I.

DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL

El rendimiento del aceite esencial se determina con la relación del volumen obtenido del aceite y la cantidad de materia vegetal en gramos que se usó en cada destilación. El rendimiento se expresó en porcentaje

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = \frac{V}{P} * 100$$

Donde:

R = rendimiento (%).

V = volumen del aceite obtenido (mL).

P = peso de la especie vegetal (g).

100 = Factor matemático.



ANEXO II. 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, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada en porcentaje.

Material

- Pinza
- Balanza
- Cápsula
- Desecador

Procedimiento

- Pesar la cápsula vacía.
- Pesar en la cápsula 0,5 a 1 gramo de la muestra.
- Colocar la cápsula durante 45 min en la lámpara ULTRA X.
- Enfriar la cápsula por 15 min. aproximadamente, hasta que su temperatura se iguale a la temperatura ambiente.
- Luego pesar y anotar el peso.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante.

Cálculo

$$Hm = \frac{(w1 - w2)}{(w1 - w)} * 100$$

Donde:

w2 = Peso de la cápsula con la muestra de ensayo (g).

w1 = Peso de la cápsula con la muestra de ensayos de secado (g).

w = Peso de cápsula vacía (g).

100 = Factor matemático.



ANEXO III.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

Principio:

La densidad relativa se mide a una temperatura de 20°C y 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 la misma temperatura.

Material

- Picnómetro de vidrio (1mL).
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C.
- Balanza analítica.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°C ± 0.2°C.

Procedimiento:

- **Picnómetro:** Lavar el agua destilada y secar, posteriormente lavamos el picnómetro con etanol y acetona, para por último secarlo con una corriente de aire. Luego se pesa el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1 mg de Nota. Para conseguir que el agua tenga una temperatura de 20°C podemos utilizar hielo y enfriar.
- **Agua destilada:** Para obtener el peso del agua destilada se debe llenar el picnómetro con agua destilada a 20°C, colocar en el baño termostático controlando con el termómetro hasta que tenga la temperatura adecuada, luego poner el tapón y secar completamente los exteriores finalmente se pesa el picnómetro en su sitio con 1mg de precisión al igual que en el caso anterior.
- **Aceite esencial:** Vaciar completamente el agua del picnómetro, secar completamente con una corriente de aire y realizar el mismo procedimiento que con el agua.



Cálculo

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{(w_2 - w_0)}{(w_1 - w_0)}$$

Donde:

d_{20}^{20} = densidad (20°C), referido al agua a 20°C.

w_0 = peso en gramos del picnómetro vacío.

w_1 = peso en gramos del picnómetro con agua.

w_2 = peso en gramos del picnómetro con aceite esencial.



ANEXO IV.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio. Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. En la línea de separación entre ambos campos establece el ángulo de límite de la luz incidente.⁸³

Materiales

- Refractómetro: se utilizó un refractómetro modelo NAR-1T DESCO

Procedimiento

- Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de calibrarlo antes de medir el índice de refracción del aceite.
- Luego medimos el índice de refracción del aceite y se anota el resultado

Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

⁸³ Estrada Orozco, S.P., Determinación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis* y *Tomilla*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). 2011.



ANEXO V.

CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)

Esta medida relaciona la desviación estándar y la media, para expresar la variación de la desviación con respecto a la media aritmética. Este coeficiente de variación se acostumbra expresarlo en porcentaje.

Comparando dos o más distribuciones de datos, mientras menor sea el coeficiente de variación la muestra será más homogénea. Señala que tan grande es el valor de la desviación estándar respecto al promedio del conjunto de datos que se examina.

El coeficiente de variación es una medida muy utilizada en control de calidad. Para estos casos, generalmente existen especificaciones que limitan el coeficiente de variación. También nos sirve para determinar la homogeneidad de la información, es decir, si el coeficiente de variación es pequeño la información es homogénea y si el coeficiente de variación es grande la información es heterogénea.

La fórmula del coeficiente de variación es la siguiente:

$$Cv = \frac{\sigma}{\bar{x}}$$

Donde

σ = desviación estándar.

\bar{x} = promedio o media aritmética.



ANEXO VI.

CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)

La desviación estándar es una medida de dispersión, corresponde exactamente a la raíz cuadrada de la varianza. Este indicador, comúnmente empleado, permite describir la variabilidad de los valores de un conjunto de datos. El objetivo es ver si los valores de un conjunto de datos están más o menos reagrupados alrededor de la tendencia central, a mayor dispersión mayor valor tomará la desviación estándar.

La desviación estándar es un promedio de las desviaciones individuales de cada observación con respecto a la media de una distribución. La desviación estándar se basa en la media como punto de referencia y procede a tomar en consideración la magnitud y la ubicación de cada puntuación. Cuán desviado o separado está cada puntuación respecto a la media.

La desviación estándar se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$\sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \tilde{x})^2}{n - 1}}$$

Donde

x_i = dato i que está entre (0, n).

\tilde{x} = media aritmética.

N = número datos (muestra).



ANEXO VII.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ÍNDICE DE KÓVATS

- d. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 1995.
- e. Adams R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Ms Spectrometry, 2009, 4th Edition.
- f. Hamm, S.; Bleton, J.; Tchaplá, A., Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples, J. Sep. Sci., 2004, 27, 235-243.
- g. König, W.A.; Joulain, D.; Hochmuth, D.H., GC/MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, 2006, retrieved from <http://www.massfinder.com/mfterpenoids.htm>.
- h. Senatore, F.; Apostolides Arnold, N.; Bruno, M., Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea liberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon, Nat. Prod. Res., 2005, 19, 8, 749-754.
- i. Abreu, P.M., and Noronha, R.G. 1997. Volatile constituents of the rhizomes of *Aframomum albobviolaceum* (Ridley) K. Schum. from Guinea-Bissau. Flavour Fragr. J. 12:79-83.
- j. Chisholm, M.G., Wilson, M.A., and Gaskey, G.M. 2003. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). Flavour Fragr. J. 18:106-115.
- k. Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
- l. Chung, T.Y., Eiserich, J.P., and Shibamoto, T. 1993. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). J. Agric. Food Chem. 41:1693-1697.



- m. Davies, N.W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A.* 503:1-24.
- n. De Martino, L., et al., Chemical composition and phytotoxic effects of essential oils from four *Teucrium* species. *Natural product communications*, 2010. 5(12): p. 1969.
- o. Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998:201-211.
- p. Jerkovic, I., and Mastelic, J. 2003. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochem.* 63:109-113.
- q. Olivero, J., Gracia, T., Payares, P., Vivas, R., Diaz, D., Daza, E., and Geerlings, P. 1997. Molecular structure and gas chromatographic retention behavior of the components of ylang-ylang oil. *J. Pharm. Sci.* 86:625-630.
- r. Özek, G., et al., One- step multiple component isolation from the oil of *Crinitaria tatarica* (Less.) Sojak by preparative capillary gas chromatography with characterization by spectroscopic and spectrometric techniques and evaluation of biological activity. *Journal of separation science*, 2012.
- s. Priestap, H.A., Van Baren, C.M., Di Leo Lira, P., Coussio, J.D., and Bandoni, A.L. 2003. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochem.* 63:221-225.
- t. Szafranek, B., Chrapkowska, K., Ska, M.P., and Szafranek, J. 2005. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53:2817-2822.
- u. Umamo, R.P., Hagi, Y., and Shibamoto, T. 2002. Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.). *J. Agric. Food Chem.* 50:5355-5359.