



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

“Determinación de las propiedades físicas, químicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Zamora Chinchipe”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Ocampo Rodríguez, Marbin Jamil

DIRECTOR: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, Msc.

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ingeniero.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

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

Loja, Septiembre de 2013

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Ocampo Rodríguez, Marbin Jamil declaro ser autor 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 las investigaciones, trabajo científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

f).....

Ocampo Rodríguez Marbin Jamil

Cédula: 0704886985

DEDICATORIA

A Dios, al Divino Niño Jesús y a la Virgen María al brindarme los medios necesarios para continuar mi formación como estudiante, y siendo un apoyo incondicional ya que sin ellos no hubiera podido lograrlo.

A mi madre por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, a mi padre que a pesar de la distancia siempre me dio las fuerzas para seguir adelante, a mis hermanas que nunca dejaron de confiar en mí.

Marbin Ocampo

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios quien me dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar mi carrera universitaria.

Una mención de gratitud quiero extender al Departamento de Química, por brindarme todos los medios para llevar a cabo esta investigación y a todo el personal, por ofrecerme su amistad y ayuda incondicional. Al Ing. Vladimir Morocho que en calidad de Director de Tesis supo brindarme su ayuda incondicional, oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

A los Ing. Diana Guaya, Eduardo Valarezo por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a mi familia, por su cariño, comprensión y apoyo, sin ellos no habría podido lograrlo.

Marbin Jamil

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTORIZACIÓN	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
RESUMEN EJECUTIVO	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1. Fin del proyecto	05
1.2. Propósito del proyecto	05
1.3. Componentes del proyecto	05
1.4. Diseño estadístico	06
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Uso de plantas en el Ecuador	05
2.2. La Familia Chlorathaceae	05
2.3. Género <i>Hedyosmum</i>	05
1.4. <i>Hedyosmum racemosum</i>	06
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3. Recolección y selección de la materia vegetal	13
3.1.1. Recolección de la materia vegetal	13
3.1.2. Selección de la materia vegetal	15
3.2. Determinación de humedad	15
3.3. Destilación material vegetal	16

3.4. Determinación de las propiedades físicas	17
3.4.1. Determinación de la densidad relativa	17
3.4.2. Índice de refracción	18
3.5. Identificación composición química	19
3.5.1. Cromatografía de Gases	19
3.5.1.1 <i>Preparación de las muestras</i>	20
3.5.1.2 <i>Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS</i>	20
3.5.1.3 <i>Obtención de Cromatogramas</i>	22
3.5.1.4 <i>Determinación de los Índices de Kóvats</i>	22
3.5.1.5 <i>Análisis de los espectros de masas</i>	23
3.5.1.6 <i>Identificación cualitativa de los componentes químicos del aceite esencial con base en los Índices de Kóvats y los espectros de masas</i>	23
3.6. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica	24
3.6.1. Microorganismos de prueba	24
3.6.2. Pruebas antimicrobianas	24
3.6.3. Método microdilución en caldo	24
3.6.3.1. <i>Preparación del aceite esencial</i>	24
3.6.3.2. <i>Preparación del cultivo Overnight</i>	24
3.6.3.3. <i>Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias</i>	25
3.6.3.4. <i>Preparación de la suspensión del inóculo para hongos esporulados</i>	26
3.6.4. CMI antibacteriana	27
3.6.5 CMI antifúngica	28

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de humedad	29
4.2 Determinación del rendimiento en aceite esencial	29
4.3 Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial <i>H. racemosum</i>	30
4.3.1. Densidad	30
4.3.2. Determinación del índice de refracción	31
4.4. Composición química <i>H. racemosum</i>	31
4.5. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica	41
4.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias	41
4.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos	41

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	45
5.2. Recomendaciones	46

BIBLIOGRAFÍA	47
---------------------	----

ANEXOS	50
---------------	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las columnas capilares	19
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación para las bacterias utilizadas	25
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones para hongos	25
Tabla 4. Porcentaje de humedad <i>H. racemosum</i>	29
Tabla 5. Porcentaje rendimiento de <i>H. racemosum</i>	30
Tabla 6. Densidad relativa <i>H. racemosum</i>	30
Tabla 7. Densidad relativa <i>H. racemosum</i>	31
Tabla 8. Porcentaje de la composición química del aceite de <i>H. Racemosum</i>	33
Tabla 9. CMI para bacterias	42
Tabla 10. CMI para hongos	43

LISTA DE TABLAS

Figura 1: Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad Biológica	06
Figura 2: Metodología para la obtención del aceite esencial de <i>Hedyosmum racemosum</i>	13
Figura 3: Zona de estudio de la especie <i>H. racemosum</i>	14
Figura 4: Esquema para la identificación de los compuestos químicos en DB-5MS-MS	20
Figura 5: Parámetros operacionales en DB-5MS-MS	22
Figura 6: Cromatograma aceite esencial <i>H. racemosum</i>	22
Figura 7: Compuestos mayoritarios <i>H. racemosum</i>	35
Figura 8: Cromatogramas; a) primera recolección b) segunda recolección, c) tercera recolección	37
Figura 9: (a, b, c, d, e) Datos espectrales de los compuestos mayoritarios en DB-5 MS	39

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: <i>Hedyosmum racemosum</i>	11
Fotografía 2: Recolección <i>H. racemosum</i>	14
Fotografía 3: Extracción aceite esencial	16
Fotografía 4: Almacenamiento aceite esencial 1) Separación agua y aceite; 2) Almacenamiento en frasco ámbar	17
Fotografía 5: Determinación Densidad relativa. A) picnómetro 2 ml; B) Balanza Analítica	18
Fotografía 6: Índice de refracción A) refractómetro; B) Lectura	18
Fotografía 7: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N	19
Fotografía 8: Preparación de muestras para cromatografía en DB5-MS	21
Fotografía 9: Cultivo overnight	25
Fotografía 10: CMI Bacteriano A) Inoculación; B) Lectura	26
Fotografía 11: Inoculación antifúngica	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Siglas Números	50
Anexo II. Determinación del rendimiento de <i>H. racemosum</i>	51
Anexo III: Determinación de humedad	52
Anexo IV. Determinación de la densidad relativa	53
Anexo V. Determinación del índice de refracción	55
Anexo VI. Determinación de los índices de kóvats	56
Anexo VII. Cálculo coeficiente de variación	57
Anexo VIII. Cálculo de la desviación estándar	58
Anexo IX. Bibliografía de los índices de kóvats reportados en la literatura	59

RESUMEN

La composición química del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, fue determinada por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS) y Cromatografía de Gases- acoplado Detector de Ionización de Flama (GC-FID). Se identificó un total de 22 compuestos que representan el 97.90% del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios son estragol (25.83%), α -phellandrene (20.55%), germacrene-D (10.26%), α -pineno (7.40%), linalool (6.16%). La actividad biológica se evaluó utilizando el método de microdilución en placa. El aceite esencial *H. racemosum* mostró actividad antifúngica de (125 μ g/ml) en *T. mentagrophytes* (ATCC 281885) y (125 μ g/ml) *T. rubrum* (ATCC 28188).

Palabras claves: Aceite esencial, Composición química, Cromatografía de gases, Estragol, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oil of *Hedyosmum racemosum*, was determined by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID). A total of 22 compounds were identified representing 97,90 % of essential oil composition. The main compounds were estragole (25.83%), α -phellandrene (20.55%), germacrene-D (10.26%), α -pinene (7.40%), linalool (6.16%). The Biological activity was evaluated using the broth microdilution method. The essential oil *H. racemosum* showed antifungal activity (125 ug / ml) against *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 281885) and (125 ug / ml) *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188).

Keywords: Essential oil, Chemical composition, Gas chromatography, Estragole, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*.

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se utiliza ampliamente, es un sistema sanitario que está creciendo rápidamente y de gran importancia económica. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en África hasta un 80% de la población la utiliza para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China, se contabiliza que alrededor de un 40% la utilizan en atención sanitaria.¹

El consumo sistemático de plantas con atributos medicinales se remonta posiblemente hace 2 millones de años en África, cuna de la humanidad, la herbolaria, producto de una rica tradición cultural de nuestros pueblos, posee mayor antigüedad que cualquier otra terapia.²

Las plantas aromáticas han sido utilizadas desde hace tiempo atrás ya sea como alimento, medicamento o conservante, los avances tecnológicos y de síntesis orgánica han ido desplazando cada vez más su uso por sustancias artificiales. En la actualidad los consumidores han percibido que los productos naturales son más inocuos lo que ha dado paso a un desarrollo importante de la agroindustria de las plantas aromáticas a nivel mundial.³

Los aceites esenciales son una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados de plantas mediante métodos como destilación, extracción con solventes, etc. Generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes de bajo peso molecular, los principales constituyentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas medicinales.⁴

¹ Falkenberg T, Zhang X, Sawyer J. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. VA Lee e Y Maruyama. 2002;1:1-7.

² Chifa C. La perspectiva social de la medicina tradicional. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. OMS. 2010;9(4):242-5.

³ Castañeda M, Muñoz A, Martínez J, Stanshenko E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Scientia et Technica. 2007;23(12):165-76.

⁴ Segovia I, Suárez L, Castro A, Suárez S, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* smith y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación. 2010;13:81-6.

Los aceites esenciales tienen dos grandes mercados. El primero está dado por sus características organolépticas, explotado primordialmente por la industria de sabores y de fragancias y el segundo es el que se nutre de sus distintos componentes, aislados o no. Son los extractos naturales más complejos por su composición, pero son los más fáciles de aislar o purificar, por su baja temperatura de ebullición.⁵

Los aceites esenciales se almacenan en tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos. Estos aceites cubren un amplio espectro de actividades farmacológicas, demostrando propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes y anticancerígenas.⁶

Actualmente en el mundo moderno la población crece aceleradamente y con ella también las enfermedades producidas por bacterias, virus, hongos, etc. A pesar que existen muchos antimicrobianos para su control o tratamiento, el uso irracional de éstos viene generando resistencia microbiana y otras secuelas. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas y antifúngicas, existen algunos estudios en especies vegetales con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos.⁷

Los aceites esenciales son conocidos por ejercer actividad biológica, aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen, estudios recientes en hongos reportan otros efectos como cambios en la morfología que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas.⁸

Las bacterias y los hongos utilizadas para determinar la actividad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales son diversos, en este estudio en específico se evaluó la actividad biológica del aceite esencial frente a 9 microorganismos, 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 5 cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC

⁵ Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales, extraídos de algunas plantas aromáticas. ISSN 2001;62(2):156-61.

⁶ Castro A, Juárez J, Ramos N, Suárez S, Retuerto F, Gonzalez S. Elucidación estructural del aceite esencial de ruta graveolens L. ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. Ciencia e Tecnología. 2011;14:25-8.

⁷ Fuertes C, Munguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb de tres regiones peruanas por comatografía de gases y espectrometría de masas. Ciencia e Investigación. 2001;4(1):23-39.

⁸ Alzate N, López I, Marín I, Murillo A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Tumbaga. 2009;4:59-71.

25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) y 2 cepas fúngicas: *Tricophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) y *Tricophyton rubrum* (ATCC 28188).

CAPITULO I.

FÍN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del proyecto

La presente investigación aportará al estudio físico-químico y biológico del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*, que forma parte del estudio de la evaluación química y ecológica de *Hedyosmum* spp. en las provincias de Loja y Zamora.

1.2. Propósito del proyecto

- Contribuir al estudio físico-químico del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.
- Determinar la actividad biológica del aceite esencial frente a cepas bacterianas y fúngicas.

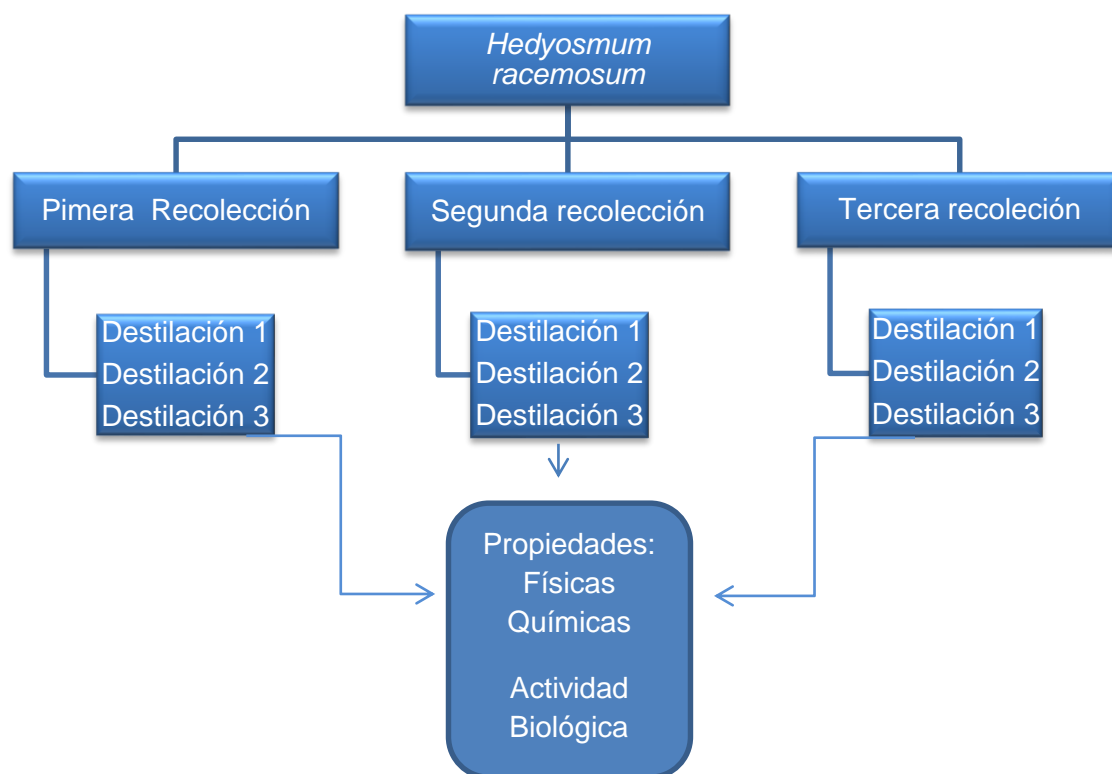
1.3. Componentes del proyecto

- Aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*.
- Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial.
- Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias y hongos.

1.4. Diseño estadístico

Se realizó un análisis estadístico a cada recolección de *Hedyosmum racemosum* con el fin de encontrar variabilidad entre los datos obtenidos (figura 1).

Figura 1: Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica



Elaboración: El autor

CAPITULO II.
MARCO TEÓRICO

2.1. Uso de plantas en el Ecuador

El Ecuador país rico por sus diversas culturas ancestrales ha concebido el uso de múltiples medicinas tradicionales. Las provincia de Zamora-Chinchiipe tiene una abundante vegetación. Las plantas medicinales y alucinógenas han sido tradicionalmente consumidas por los habitantes de esta región durante siglos.⁹

2.2. La Familia Chloranthaceae

La familia Chloranthaceae es una familia pequeña y consta de 4 géneros *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina* distribuidos en 70 especies. Las especies de esta familia son ampliamente utilizadas en medicina popular como antiespasmódico, antiséptico, medicamentos contra el cáncer, alivio del dolor y para el tratamiento de infecciones de la piel.¹⁰

2.3. El género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* puede encontrárselo como árboles o arbustos con ramas abultadas o articuladas a la altura de los nudos, hojas simples, opuestas, margen aserrado, inflorescencias en espigas, flores unisexuales o bisexuales, su follaje al ser triturado es fuertemente aromático, la mayoría de las especies se las encuentra en elevaciones medias-altas.¹¹

En el Ecuador se reporta 16 especies¹² de *Hedyosmum*. *Hedyosmum racemosum* es conocida en el Ecuador con el nombre común Úntuntup (shuar, chichan) guayusa, guayusa de monte, jicamilla grande (castellano). La infusión de sus hojas se usa como agua aromática (mestizo-pichincha; Etnia no especificada-Sucumbios). El tallo se usa en construcción por ser fuerte y resistente al agua (Kichwa de la sierra-Loja). Se usa junto con *Bixa orellana*, para reducir hinchazones, junto con *Cordia nodosa* para tratar mordeduras de serpientes (Shuar-Morona Santiago).¹³

⁹ Tene V, Malagón O, Vita P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador. *Ethnopharmacology*. 2007;111:63–81.

¹⁰ Caoa C, Penga Y, Shib Q, Xiao P. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae *Chemistry & Biodiversity*. 2008;5:220-34.

¹¹ Zamora N. Flora digital de la selva. Organización para Estudios Tropicales. 2006;1:1-3.

¹² Gulavisí L. Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del ministerio de salud pública. *MSP*. 2008;1:19-20.

¹³ Torre L, Navarrete H, Murril P, Marcia M, Hernik B. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito & Aarhus. 2008:280.

En la presente investigación se realizó un estudio fisicoquímico del aceite de *Hedyosmum racemosum* y se evaluó la actividad biológica mediante el método de microdilución en placa frente a 9 microorganismos patógenos, 7 cepas bacterianas y 2 cepas fúngicas. Con en el desarrollo de este estudio se pretende contribuir a con las diversas líneas de investigación del Departamento de Química, de la Universidad Técnica Particular de Loja, con la finalidad de que los resultados obtenidos sean utilizados en el desarrollo de la industria de los aceites esenciales en Ecuador y abrir las puertas a los posibles usos del aceite en la industria farmacéutica.

2.3.1. *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Chloranthales
Familia: Chloranthaceae
Género: *Hedyosmum*
Especie: *racemosum*

Fotografía 1: *Hedyosmum racemosum*

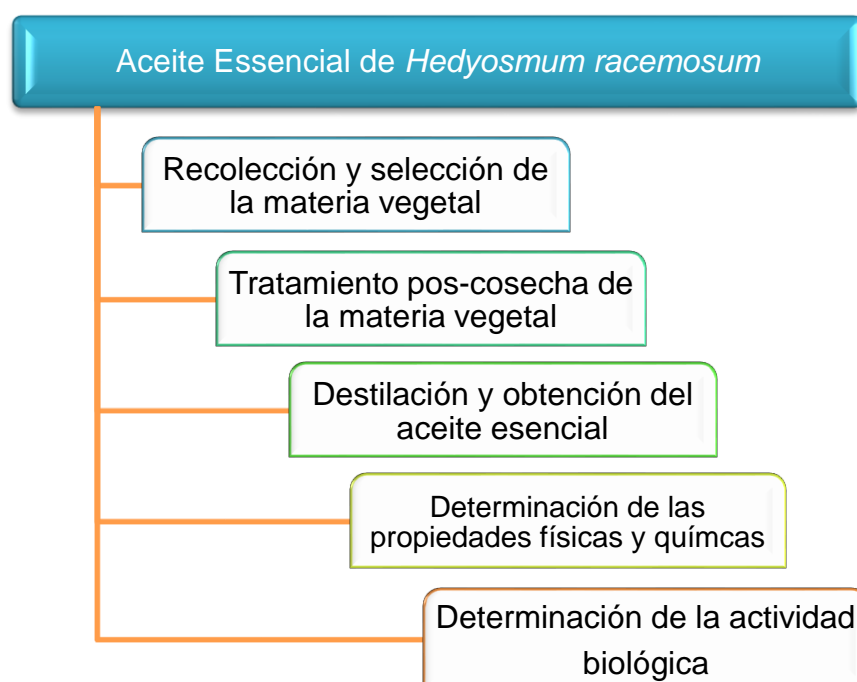


Fuente: Herbario PPN-UTPL

CAPITULO III.
MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó mediante la siguiente metodología (figura 2):

Figura 2: Metodología para la obtención del aceite esencial de *Hedyosmum racemosum*



Elaboración: El autor

3.1. Recolección y selección de la materia vegetal

3.1.1. Recolección de la materia vegetal.

Se recolectó las partes aéreas de *H. racemosum* en estado de floración (ver fotografía 2), en el sector “EL Tiro” de la Provincia de Zamora a 2762 m s.n.m con coordenadas 955889N, 17070622OE (Figura 3). La especie fue identificada por Bolívar Merino del Herbario Loja y Fani Tinoco del Herbario UTPL, la muestra reposa en el HUTPL con voucher PPN-tc-006.

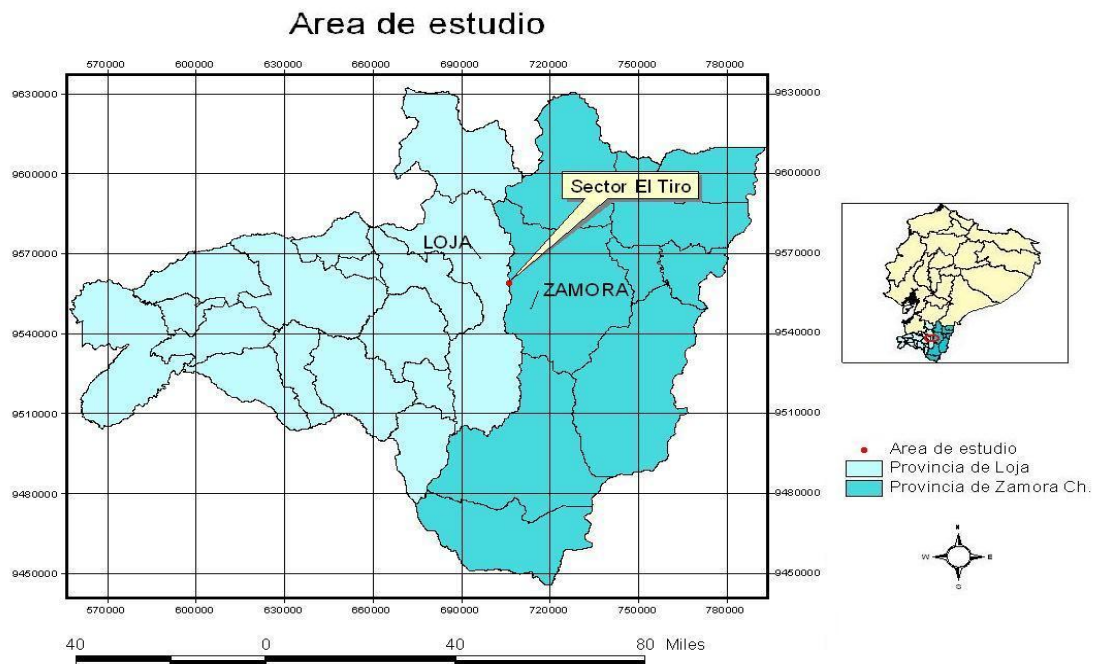
Fotografía 2: Recolección *H. racemosum*



Elaboración: El autor

Se realizó la recolección de 5000 g de las partes frescas *H. racemosum* entre los meses de septiembre y octubre del 2012, con un intervalo de 15 días entre una recolección y otra; una vez seleccionado el material vegetal fue trasladado al Departamento de Química de la UTPL para su respectivo análisis.

Figura 3: Zona de estudio de la especie *H. racemosum*



Elaboración: El autor

3.1.2. Selección material vegetal

Una vez recolectado el material vegetal se procedió a la selección de las partes aéreas de la planta (tallos, hojas e inflorescencias) eliminando la materia deteriorada e impurezas. Una vez realizado esto, se procedió a cortar las partes seleccionadas en pequeños fragmentos para aumentar área de superficie de contacto al momento de la destilación.¹⁴

3.1. Determinación de humedad

Para determinar la humedad se utilizó una balanza analítica, una lámpara UV y un desecador, se procedió a tomar una muestra de 1g de materia vegetal se realizó tres repeticiones para obtener un promedio humedad de cada destilación (ver anexo III). La fórmula a aplicar para el cálculo de la humedad es la siguiente:

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

Donde:

Hm: % de humedad promedio

m = peso de la cápsula vacía (gr)

m₁ = peso de la cápsula + muestra (gr)

m₂ = peso de la cápsula + muestra seca (gr)

3.2. Destilación material vegetal

Para la extracción del aceite esencial se recolectó 5000 g de material vegetal, de los cuales se tomó una muestra para determinar su humedad y rendimiento.

El método utilizado fue extracción por arrastre de vapor que consiste en una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de

¹⁴ Durts H, Gokel G. Química Orgánica Experimental. Mc Graw Hill. 2007;1:55-6.

otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables.¹⁵

Se partió a partir de 5000 g. por cada recolección estos fueron divididos para tres destilaciones, se utilizó un equipo de destilación tipo Clavenger el cual consta de un fondo de placa perforada donde es colocado el material vegetal (ver fotografía 3) , debajo de este lleva agua el cual al momento de empezar la ebullición el vapor entra en contacto con el material vegetal arrastrando los componentes volátiles presentes en la planta este vapor es recolectado en la tapa del equipo, luego pasa a al condensador,¹⁶ la mezcla resultante de agua y aceite se separada por diferencia de densidades en un florentino. Una vez separado se colecta el material en una probeta, se mide el volumen, lo colocamos en frascos color ámbar y lo almacenamos bajo refrigeración a menos 4 ° C para su posterior análisis. (ver fotografía 4)

Fotografía 3: Extracción aceite esencial



Elaboración: El autor

Fotografía 4: Almacenamiento aceite esencial



Elaboración: El autor

¹⁵ Vázquez O. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre. *Amazónica de Investigación*. 2001;1(2):38-42.

¹⁶ Meza M, González N, Usubillaga A. Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. *Rev Fac Agron* 2007;24:725-38.

3.4. Determinación de las propiedades físicas

3.4.1. Determinación de la densidad relativa.

Es la relación entre el peso y el volumen de una sustancia a una temperatura y presión atmosférica definidas.¹⁷ La densidad relativa del aceite vegetal se determina con respecto al agua, para ello se utiliza un picnómetro y se calcula mediante la razón entre la masa de un volumen de la sustancia a 20 °C y la masa de un volumen igual de agua.¹⁸ (ver fotografía 5)

La densidad se determinó según la norma AFNOR NF T 75 – 111, tomando como muestra la mezcla de los tres aceites esenciales de cada recolección, dando un total de tres medidas, utilizando un picnómetro de 1 mL, un termómetro y una balanza analítica. (ver anexo IV)

Fotografía 5: Determinación Densidad relativa



Elaboración: El autor

¹⁷ Atakins P. Físicoquímica Addison. Wesley Iberoamericana. 1992;3:54-5.

¹⁸ Hernández R, Martínez G, Díaz M. Aspectos químico-físicos del aceite de girasol ozonizado. CENIC Ciencias Químicas. 2004;35(3):159-62.

3.4.2. Índice de refracción

El índice de refracción es un parámetro propio de cada líquido que indica el comportamiento de la luz al atravesarlo, refleja sus características eléctricas y magnéticas.¹⁹ (ver fotografía 6)

El Índice de refracción del aceite esencial se determinó según la norma AFNOR NF T 75 – 112, utilizando un refractómetro ABBE. (ver anexo V)

Fotografía 6: Índice de refracción A) refractómetro; B) Lectura



Elaboración: El autor

3.3. Identificación composición química

Para realizar este ensayo, el aceite esencial fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de Masas CG-MS al Detector de Ionización de Llama CG-FID, en el Departamento de Química de la U.T.P.L.

3.5.1. Cromatografía de Gases (CG).

El aceite esencial fue analizado en el cromatógrafo de gases (Agilent 6890 Series) acoplada a espectrómetro de masas (Agilent 5973 series inerte). Utilizando una columna analítica no polar DB-5MS (30m x 0.25mm, espesor de la película de 0.25µm), provista de un sistema computarizado MSD ChemStation D.01.00 SP1 y un detector de ionización de llama. (ver fotografía 7)

¹⁹ Alonso M, Finn E. Fundamentos cuánticos y estadísticos. ALHAMBRA MEXICANA 1999;3:324-5.

Fotografía 7: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N



Elaboración: El autor

En la tabla 1. Se detallan las características de las columnas capilares con las que se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Tabla 1. Características de la columna capilar

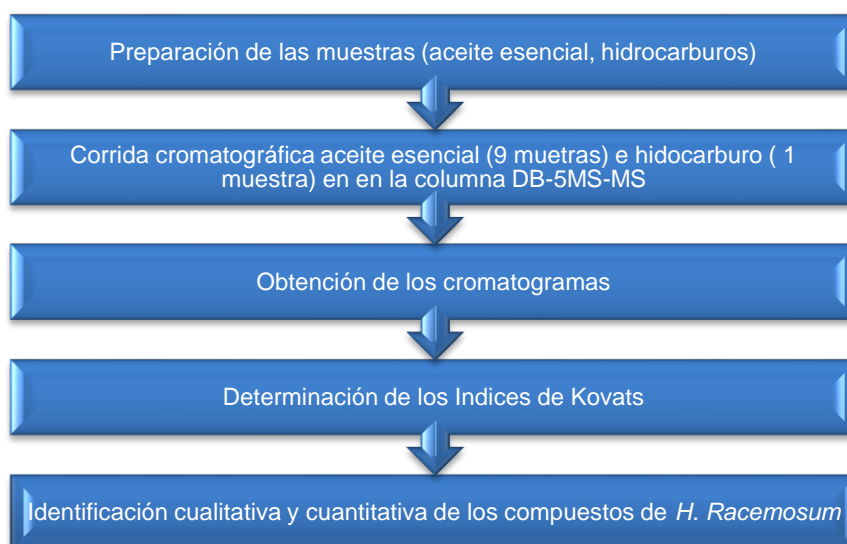
CARACTERÍSTICA DE LA COLUMNA CAPILAR

Columna	Temperatura (°C)	Película(μm)	Diámetro Interno (mm)	Longitud(m)
DB-5MS	325	0,25	0,25	30

Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N

En la figura 4 se detallan el procedimiento seguido para para la identificación química y obtención de cromatogramas en cromatografía de gases GC-MS.

Figura 4: Procedimiento para la identificación de los compuestos químicos en DB-5MS-MS



Elaboración: El autor

3.5.1.1. Preparación de las muestras.

Para la preparación de las muestras se diluyo 10 µl de aceite en 990 µl de diclorometano grado HPLC en un vial, para las 9 muestras del aceite esencial de *H. racemosum*. (ver fotografía 8)

Se prepararon los hidrocarburos de C10 a C25 (TPH-6RPM de CHEM SEVICE), diluido de la misma manera que los aceites, el tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirve como base en la determinación de índices de kóvats e identificación de cada uno de los compuestos.

Fotografía 8: Preparación de muestras para cromatografía en DB5 MS

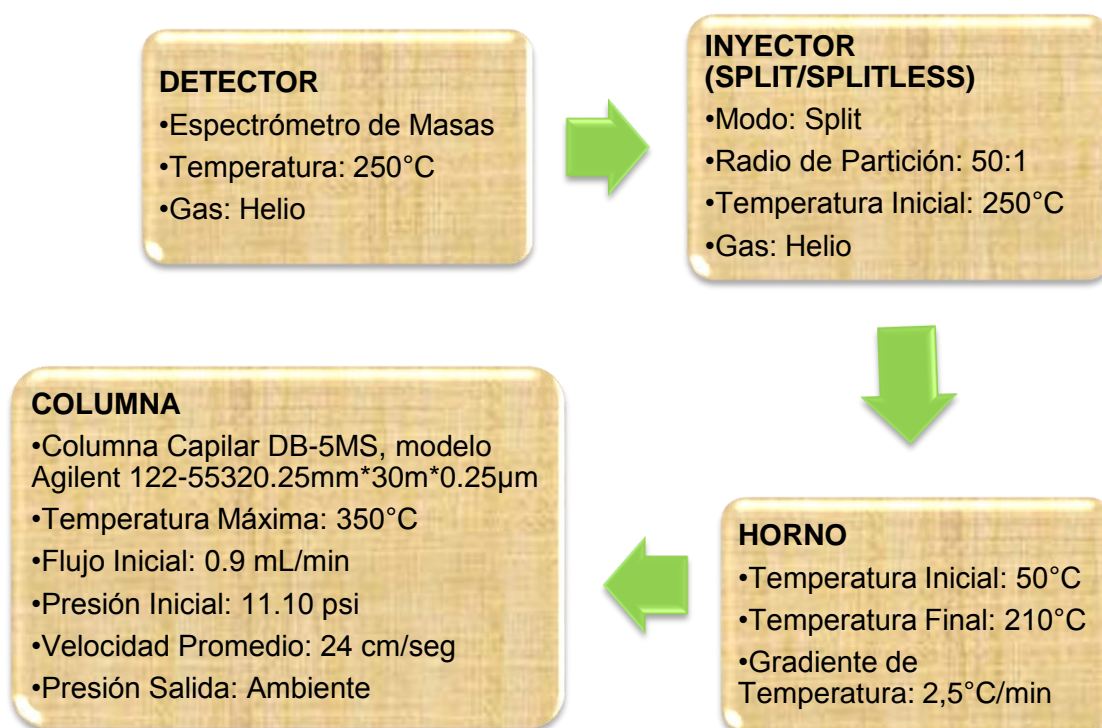


Elaboración: El autor

5.1.1.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS.

Una vez preparadas las muestras de aceite esencial y de hidrocarburos se procede a la inyección en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas en la columna capilar DB-5MS, bajo los siguientes parámetros (ver figura 5):

Figura 5: Parámetros operacionales en DB-5MS-MS



Elaboración: El autor

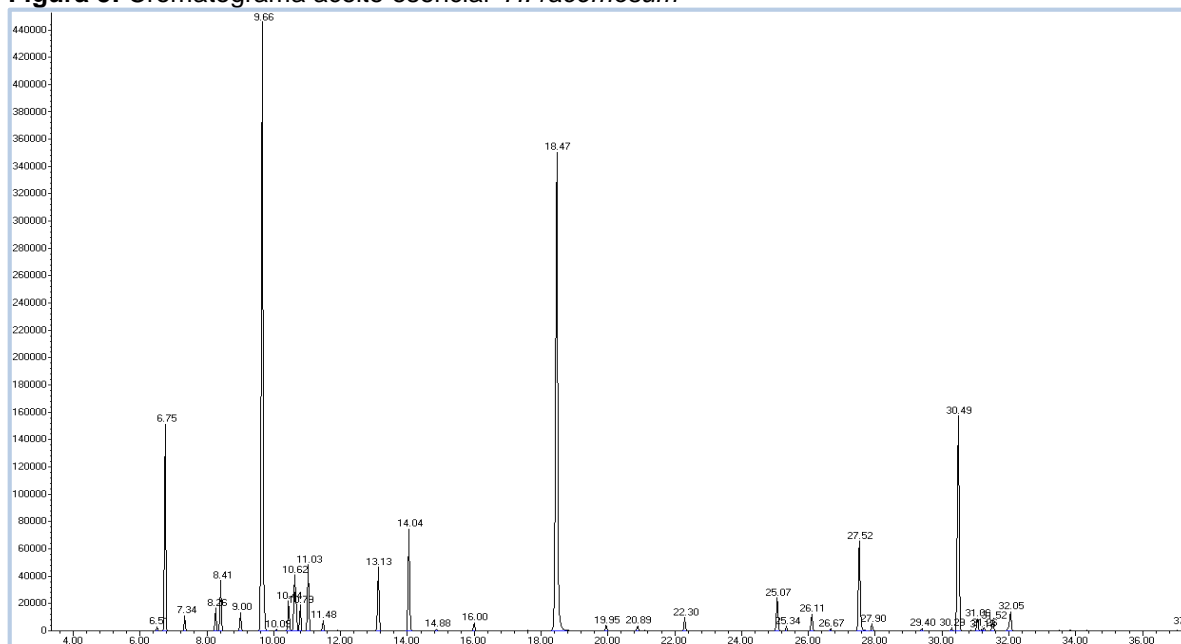
5.5.1.2. Obtención de cromatogramas.

A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario o del tiempo que eluyen, representados en forma gráfica se les denomina cromatogramas, estos pueden ayudarnos en el análisis cualitativo como cuantitativo.²⁰

En la figura 5 se indica el cromatograma de *H. racemosum*

²⁰ Bray A, Lewis J, Watson J, Dennis B. Biología molecular de la célula. Omega. 1996;3:176-9.

Figura 5: Cromatograma aceite esencial *H. racemosum*



Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N

5.5.1.3. Determinación de los índices de Kovats.

Para encontrar el índice de Kovats para un determinado soluto en una fase estacionaria dada, se requiere cromatografiar y registrar unos pocos miembros de la serie homóloga de hidrocarburos lineales, luego la muestra se corre en las mismas condiciones y el valor de su Índice se determina a partir de la gráfica siguiente fórmula:²¹

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

Donde:

IK= Índice de retención de kovats

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

²¹ Dellacasa E. Cromatografía gaseosa. Médica Panamericana. 2002;1:10-20.

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

Los resultados se interpretaron mediante comparación de los valores de retención calculados con los valores publicados en la literatura.²² (ver anexo VI)

5.5.1.4. Análisis de los espectros de masas.

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa mediante la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de estos; una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, finalmente se detectan por un dispositivo adecuado. Un espectro de masa mostrara una información bidimensional que representa un parámetro relacionada con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.²³

5.5.1.5. Identificación cualitativa de los componentes químicos del aceite esencial con base en los Índices de Kóvats y los espectros de masas.

Los datos obtenidos son procesados mediante un sistema computarizado, mediante el empleo de un software apropiado, es decir se realiza la integración de los datos de cada cromatograma, para obtener un conjunto de compuestos a identificar. La diferencia obtenida entre el índice de Kóvats experimental y el bibliográfico debe ser menor a 10, para confirmar se realizó comparación computarizada de los espectros de masa de la muestra con los reportados en la literatura.

²² Ibáñez J, Usubillaga A. Estudio de la composición del aceite esencial de un frailejón híbrido entre *Espeletia schultzei* y *Coespeletia moritziana*. *Fac Farm.* 2009;50(1):16-9.

²³ Skoog A, James F, Nieman T. *Principios de Análisis Instrumental.* Prentice Hall. 2003;5:53-65.

3.6. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

La evaluación de la actividad biológica se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos, mediante diluciones a diferentes concentraciones (CMI), del aceite esencial de *H. racemosum*.

3.6.1. Microorganismos de prueba.

Se evaluó la actividad biológica del aceite frente a 9 microorganismos patógenos. 5 cepas Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y 2 cepas: *Tricophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *Tricophyton rubrum* (ATCC 28188).

3.6.2. Pruebas antimicrobianas

3.6.3. Método microdilución en caldo.

3.6.3.1. Preparación del aceite esencial.

Para este ensayo se empleó una dilución de 20mg/ml de aceite esencial más 980ul de Dimetil sulfóxido (DMSO), esta dilución fue utilizada tanto para bacterias como para hongos.

3.6.3.2. Preparación del cultivo Overnight (Bacterias).

El inóculo bacteriano se realizó a partir de un cultivo nocturno (overnight) el mismo que es sembrado un día antes a 37°C por 14-16 horas, los medios de cultivo utilizados así como las condiciones para cada bacteria se detallan en la tabla 2.

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

Bacterias	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>E. faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 h
<i>K. pneumoniae</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>P. vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	37°C por 14-16 h
<i>E. coli</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>S. typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 h
<i>P. aeruginosa</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>S. aureus</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h

Elaboración: El autor

3.6.3.3. Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.

Se tomaron 150-300 μL del cultivo overnight en 7 mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de Mac Farland. De ésta suspensión tomamos 140 μL e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. 100 μL de ésta 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



Elaboración: El autor

3.6.3.4. Preparación de la suspensión del inóculo para hongos esporulados.

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C tomando de ésta 14 μL en 7 mL de Caldo Sabouraud; posteriormente 100 μL de ésta suspensión se usaron para completar a 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, ajustando la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL. (ver tabla 3)

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones para hongos

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

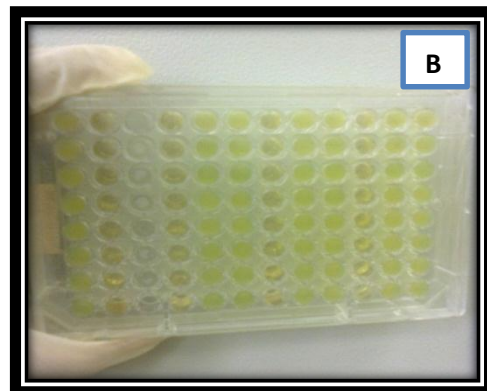
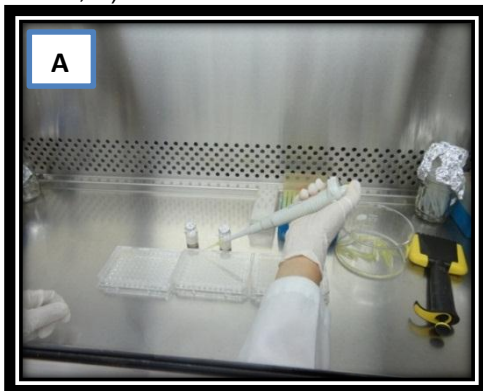
Elaboración: El autor

3.6.4. CMI Antibacteriana.

Las pruebas se realizaron en placas esterilizadas de 96 pocillos mediante dilución doble seriada, colocamos 180 μL de caldo Muller Hinton al primer pocillo y 100 μL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20 μL del aceite de *H. racemosum* (20 mg/mL), en la fila A y mezclamos. Se realiza diluciones seriadas tomando 100 μL de la fila A y diluyendo con 100 μL del pocillo siguiente fila (B), se continúa con este procedimiento hasta llegar a la fila H se desecha los 100 μL restantes, obteniendo 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180 μL caldo + 20 μL aceite) en las columnas 3, 6 y 9; para el control negativo (180 μL caldo + 20 μL DMSO) columna 11; y para el control positivo (180 μL caldo + 20 μL Gentamicina® a 1000 ppm) columna 12. (ver fotografía 10)

Una vez preparadas las placas se inoculan con 100 μL de la suspensión bacteriana a excepción de los controles de esterilidad que se completan con 100 μL de Caldo Muller Hinton, completando a un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta a población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, se sellan las placas con parafilm y se incubaron por 24h a 37°C.

Fotografía 10: CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) Bacteriano A) Inoculación en placa de cultivo; B) Lectura CMI



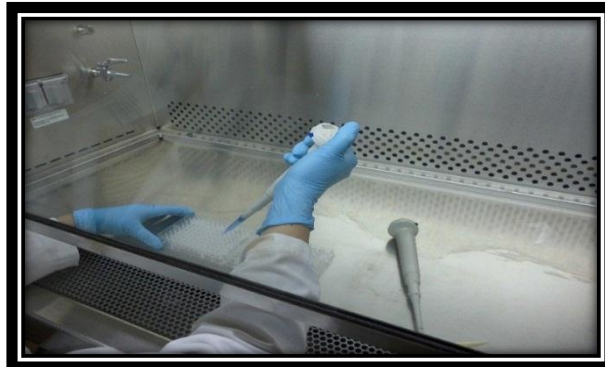
Elaboración: El autor

3.6.5. CMI antifúngica.

Se sigue el mismo procedimiento de diluciones seriadas de la CMI antibacteriana, variando únicamente ciertos parámetros: la concentración final del inóculo es de 5×10^4 esporas/mL y el control positivo que se emplea es una

solución de 1 mg/mL de Itraconazol. Se incuban las placas a 28°C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas. (ver fotografía 11)

Fotografía 11: Inoculación antifúngica



Elaboración: El autor

CAPITULO IV.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de humedad

En la tabla 4 se muestra el promedio de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación de las tres destilaciones:

Tabla 4. Porcentaje de humedad *H. racemosum*

Recolección	\bar{X}	σ	CV
1	52,28	6,69	0,13
2	61,45	3,96	0,06
3	59,58	7,54	0,13

\bar{X} = promedio

σ = desviación estándar

CV= coeficiente de variación

Elaboración: El autor

Haciendo una comparación entre los 3 promedios de las destilaciones podemos observar que la humedad mayoritaria corresponde a la segunda recolección (61,45%), y la menor a la primera recolección (52,28%). La variabilidad de estos resultados se puede atribuir a la cantidad de vapor de agua en el aire, a la temperatura del ambiente, al manejo de nutrientes, desarrollo de la planta al momento de la recolección de la planta.²⁴

4.2. Determinación del rendimiento *H. racemosum*

En la tabla 5 se detallan los rendimientos obtenidos de las tres destilaciones hechas para cada recolección en relación al peso/volumen.

²⁴ Margulis L, Sagan D. El proceso de nutrición en las plantas. McGraw-Hill. 2012;11(1):242-58.

Tabla 5. Porcentaje rendimiento de *H. racemosum*

Recolección	Destilación			\bar{X}	σ	CV
	1	2	3			
1	0,35	0,38	0,37	0,37	0,01	0,03
2	0,38	0,36	0,35	0,36	0,01	0,03
3	0,35	0,38	0,35	0,36	0,01	0,04

\bar{X} = promedio

σ = desviación estándar

CV= coeficiente de variación

Elaboración: El autor

Los rendimientos de los aceites fueron obtenidos de la relación peso/volumen, *H. racemosum* no muestra una diferencia significativa entre destilaciones, (0.37%) para la primera, (0.36%) para la segunda y tercera respectivamente.

4.3. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial *H. racemosum*

El aceite esencial obtenido de *H. racemosum* es líquido a temperatura ambiente, translucido y de olor cítrico-dulce.

4.3.1. Densidad.

En la tabla 6 se presentan las densidades promedio de la mezcla de los tres aceites de cada recolección de *H. racemosum*

Tabla 6. Densidad relativa *H. racemosum*

Recolección	d_{20}^{20}	
1	0,90	
2	0,90	$\bar{X}_t = 0,90$
3	0,90	

d_{20}^{20} = Densidad relativa

\bar{X}_t = Promedio total

Elaboración: El autor

4.3.2. Determinación del índice de refracción.

Los índices de refracción de aceites por cada recolección se muestran en la tabla 7, dándonos un promedio de 1,50.

Tabla 7. Densidad relativa *H. racemosum*

Recolección	Índice de refracción	\bar{X}_t
1	1,51	
2	1,50	1,50
3	1,50	
\bar{X}_t = Promedio total		

Elaboración: El autor

4.4. Composición química *H. racemosum*

Se determinó la composición química por cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) utilizando la columna DB5-MS La identificación se realizó en base de los índices de Kóvats y comparación de sus espectros de masas en la librería WILEY 7n.1 del equipo.

Se identificó un total de 22 compuestos del aceite de *H. racemosum*, representando el 97,90%. En comparación con otras investigaciones realizadas en otras especies del género *Hedyosmum* se han reportado valores de 87,5% en *H. angustifolium* y 69,8% en *H. scabrum*.²⁵

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial son estragol (25,83%), α -phellandrene (20,55%), germacrene-D (10,26%), α -pinene (7,40%). No se han encontrado estudios referentes a la composición química del aceite esencial de esta especie. Otras especies Del género *Hedyosmum* no presentan los mismos compuestos mayoritarios, en la especie de *H. angustifolium* los componentes principales son α -pinene (23.5%), β -pinene, sabinene (6.4%), en *H. scabrum* linalool (6.1%), 1,8-cineole (3.7%) citronellool (2.2%)²⁶ y se encontró α -terpineol (10.2%), curzerene (8.9%), pinocarvone (8.4%), β -thujene (7.1%) en *H. brasiliense*.²⁷

²⁵ Lorenzo D, Loayza I, Dellacassa E. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour Fragr.* 2003;18:32–5.

²⁶ Viscenso F, Urrunaga R. Composition of the essential oil of *Hedyosmum scabrum*. *Essential Bearing Plants.* 2007;10(1):41-5.

²⁷ Kirchner K, Wisniewski A, Bella A, Biavatti W, Netz D. Chemical Composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2010;20:692-9.

En la tabla 8 se muestran los compuestos identificados en DB5-MS, los tiempos de retención, sus índices de Kovats tanto experimentales como los de literatura, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 8. Porcentaje de la composición química del aceite de *H. Racemosum*

COMPUESTO	DB-5MS-MS							DB-5MS-FID							
	IK ^a	Ikref	HRR1	HRR2	HRR3	TR	% Cantidad MS	σ	CV	HRR1	HRR2	HRR3	FID	σ	CV
Pinene alpha	936	939	7,09	6,96	8,16	6,74	7,40	0,66	0,09	6,09	6,54	6,89	6,51	0,40	0,06
Camphene	950	954	0,59	0,96	1,07	7,33	0,87	0,25	0,29	1,01	1,10	1,08	1,06	0,05	0,04
Sabinene	971	975	0,86	1,23	1,22	8,25	1,11	0,21	0,19	1,55	1,68	1,43	1,55	0,13	0,08
Pinene Beta	975	979	1,97	2,29	2,40	8,41	2,22	0,22	0,10	2,30	2,45	2,36	2,37	0,08	0,03
Myrcene	989	990	0,71	0,61	0,54	9,00	0,62	0,09	0,14	0,63	0,65	0,66	0,65	0,02	0,02
Phelandrene Alpha	1004	1002	23,80	22,56	20,55	9,65	22,31	1,64	0,07	23,22	22,54	22,14	22,63	0,55	0,02
P-cimene	1021	1017	1,27	1,20	1,15	10,44	1,21	0,06	0,05	1,35	1,46	1,53	1,45	0,09	0,06
Limonene	1025	1029	3,14	2,97	2,83	10,62	2,98	0,15	0,05	3,25	3,23	3,16	3,21	0,05	0,01
Cineole 1,8	1029	1026	1,15	1,31	1,32	10,79	1,26	0,10	0,08	0,98	0,95	0,89	0,94	0,05	0,05
Cis Ocimene	1034	1037	3,15	3,76	4,24	11,03	3,72	0,55	0,15	3,15	3,16	3,26	3,19	0,06	0,02
Trans Beta Ocimene	1044	1050	0,57	0,61	0,63	11,47	0,60	0,03	0,05	0,45	0,34	-----	0,40	0,08	0,20
Terpinolene	1081	1088	2,86	1,22	----	13,12	2,04	1,16	0,57	2,23	1,17	0,89	1,43	0,71	0,49
Linalool	1001	1096	5,30	6,16	7,03	14,04	6,16	0,87	0,14	6,58	6,64	7,19	6,80	0,34	0,05
Camphor	1143	1146	0,47	0,81	0,91	15,99	0,73	0,23	0,31	0,57	0,74	0,71	0,67	0,09	0,13
Estrangole	1196	1195	23,91	26,06	27,51	18,47	25,83	1,81	0,07	22,35	22,78	24,74	23,29	1,27	0,05
Bornyl Acetate	1281	1289	0,43	1,26	1,16	22,29	0,95	0,46	0,48	0,80	1,45	1,48	1,24	0,38	0,31
Alpha Copaene	1367	1376	0,89	0,83	0,80	26,10	0,84	0,05	0,05	1,25	1,27	1,13	1,22	0,08	0,06
Methyleugenol	1400	1401	4,36	5,65	4,69	27,52	4,90	0,67	0,14	5,18	6,55	5,70	5,81	0,69	0,12
Germacrene D	1467	1464	11,33	9,74	9,72	30,47	10,26	0,92	0,09	10,58	9,68	9,71	9,99	0,51	0,05
Byciclogemacrene	1486	1500	0,54	0,27	0,20	31,05	0,34	0,18	0,54	0,60	0,50	0,51	0,54	0,06	0,10
Elemene Beta	1497	1491	0,57	0,45	0,46	31,51	0,50	0,07	0,13	0,37	0,39	0,47	0,41	0,05	0,13
Delta Cadinene	1510	1523	1,15	1,04	0,99	32,04	1,06	0,08	0,08	1,43	1,22	1,15	1,27	0,15	0,12

97,90

96,63

IK^a. Índices de kovats obtenido por cromatografía en columna no polar DB-5MS

IK^{ref}. Índice de kovats obtenido en bibliografía con relación a la columna no polar DB-5Ms

HRR1 Recolección 1 *Hedyosmum racemosum*

HRR2 Recolección 2 *Hedyosmum racemosum*

HRR3 Recolección 3 *Hedyosmum racemosum*

σ = Desviación Estándar

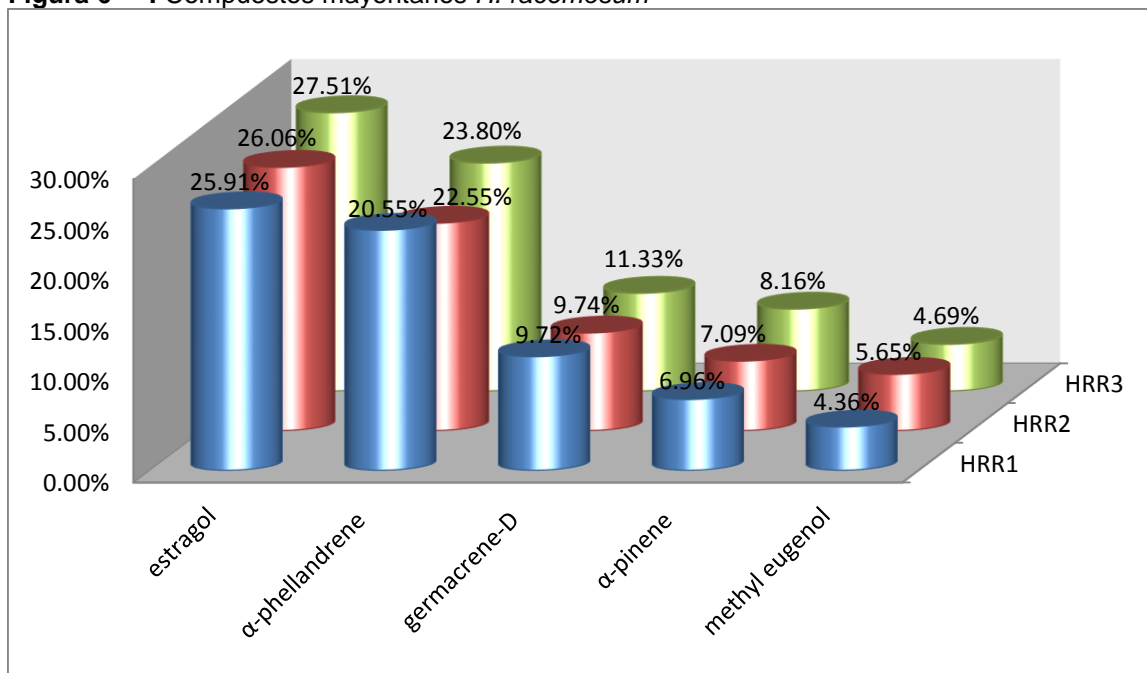
CV = Coeficiente de variación

IK Ref.: ^dref, ^eref, ^fref, ^gref, ^href (anexo IX)

Elaboración: El autor

En la figura 6 se observa los compuestos mayoritarios del aceite esencial en la columna DB-5MS.

Figura 6 : Compuestos mayoritarios *H. racemosum*



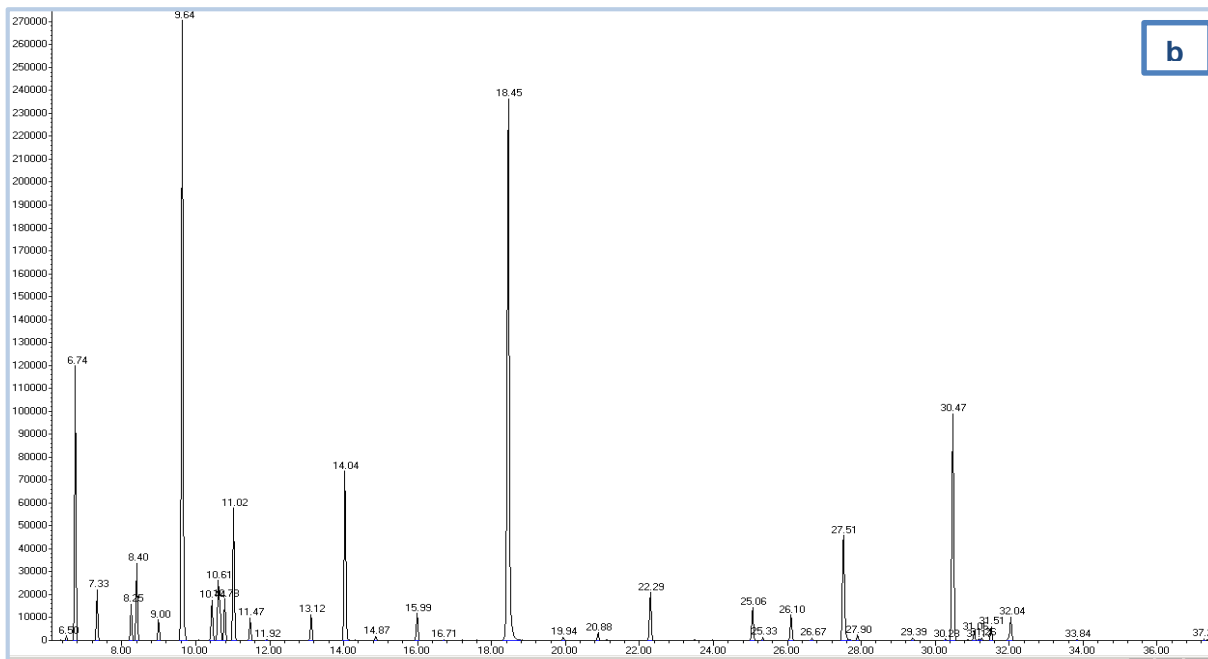
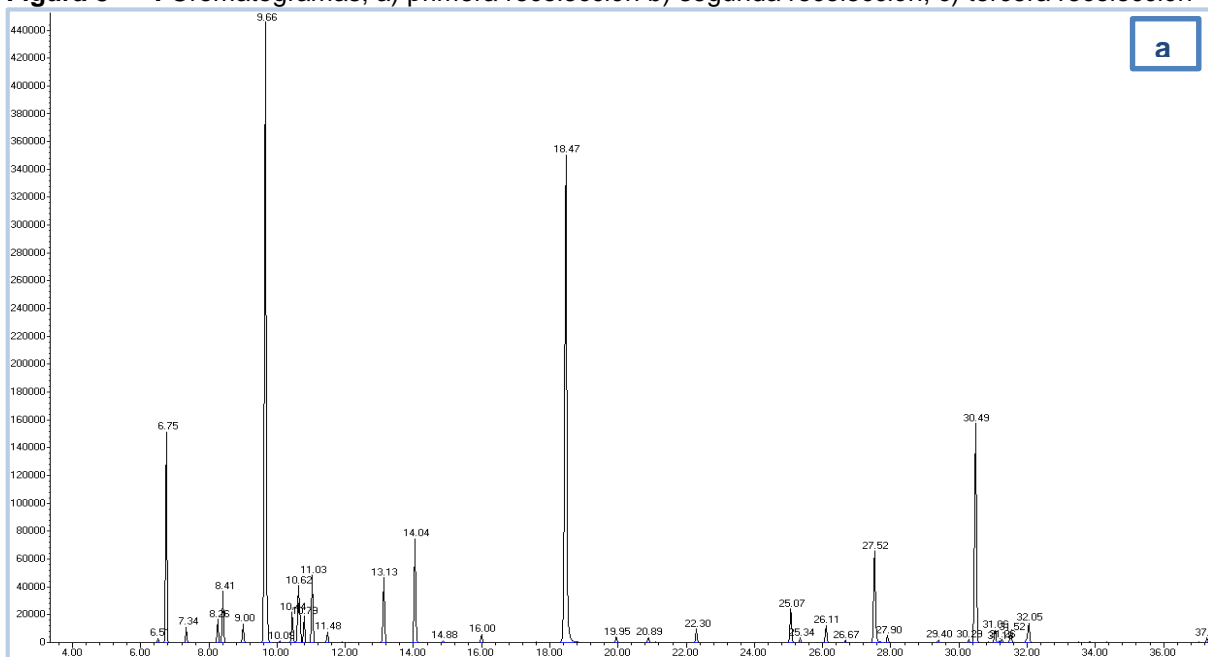
Elaboración: El autor

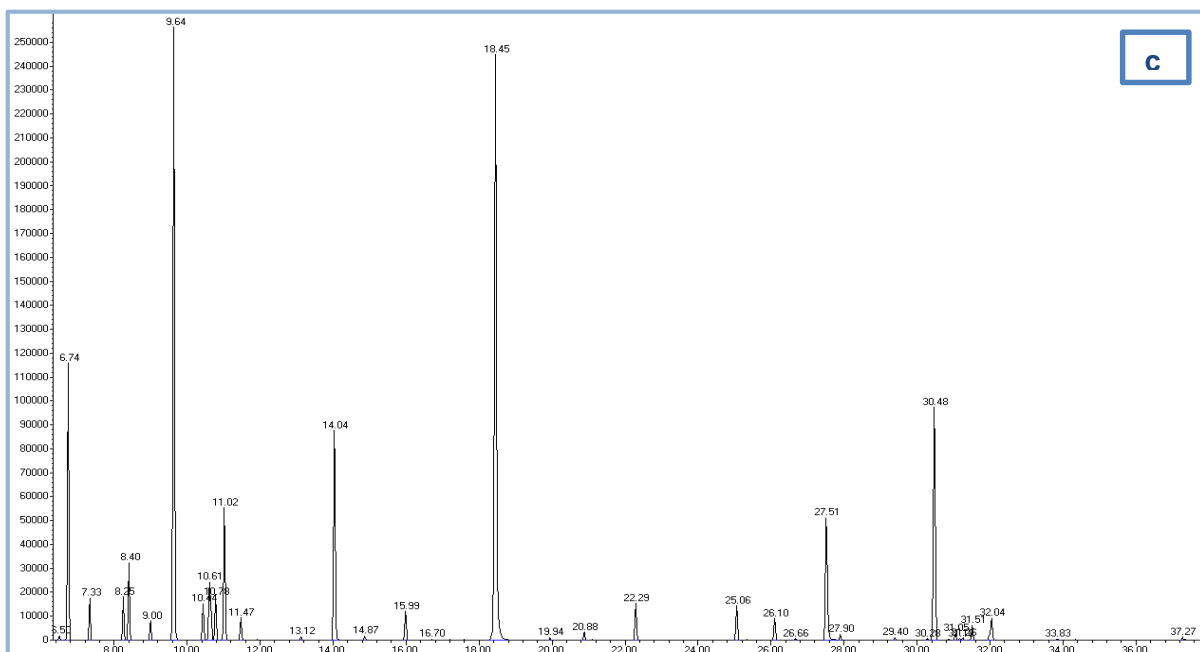
Como vemos en la figura 4.1 existe diferencia entre las recolecciones (HRR1, HRR2, HRR3). Según Rueda 2011, esto se puede deber a la época de la recolección, estado fenológico, el lugar geográfico o por pequeños cambios genéticos.²⁸

En la figura 7 se muestran los cromatogramas de las tres recolecciones, obtenidos del aceite esencial de *H. racemosum* en la columna DB5-MS.

²⁸ Rueda X, Parada D, Lugo L. Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de Norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. *Bistua*. 2011;9(1):48-54.

Figura 8 : Cromatogramas; a) primera recolección b) segunda recolección, c) tercera recolección



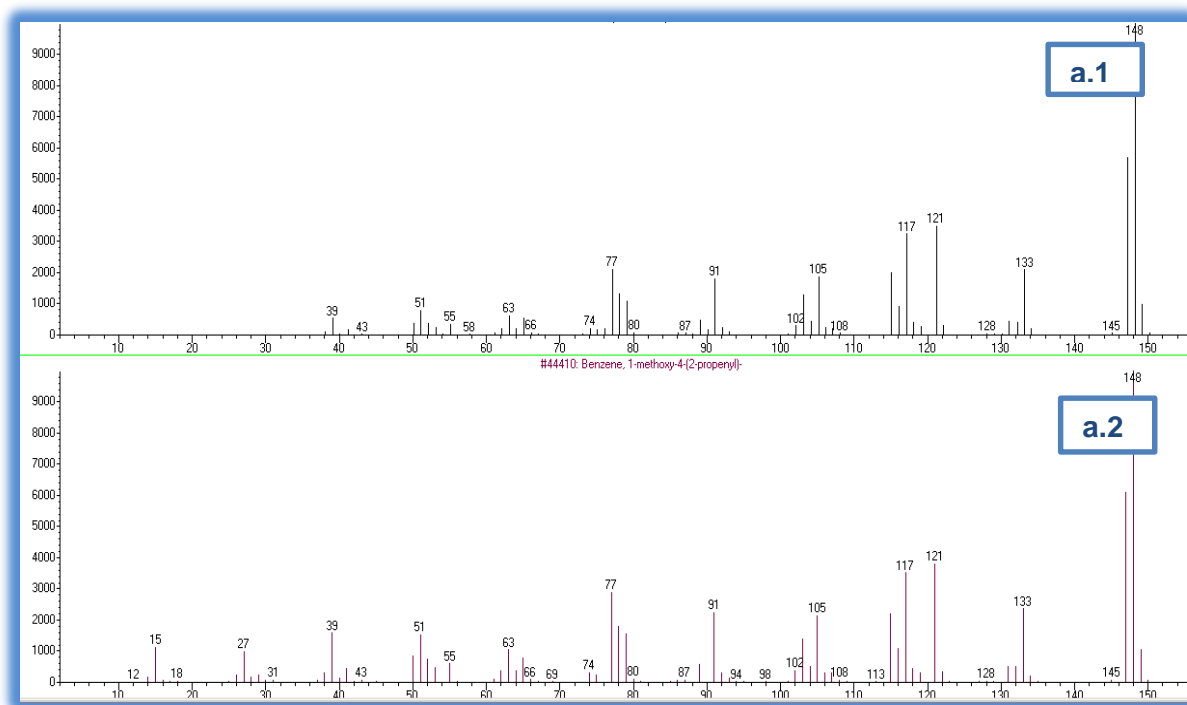


Elaboración: El autor

4.5. Espectros de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *H. racemosum*

En la figura 9 (a, b, c, d, e) se indican los datos espectrales de los compuestos mayoritarios en DB-5 MS del aceite esencial de *H. racemosum*, los espectros de masas se comparan con la librería WILEY 7n.1 del equipo.

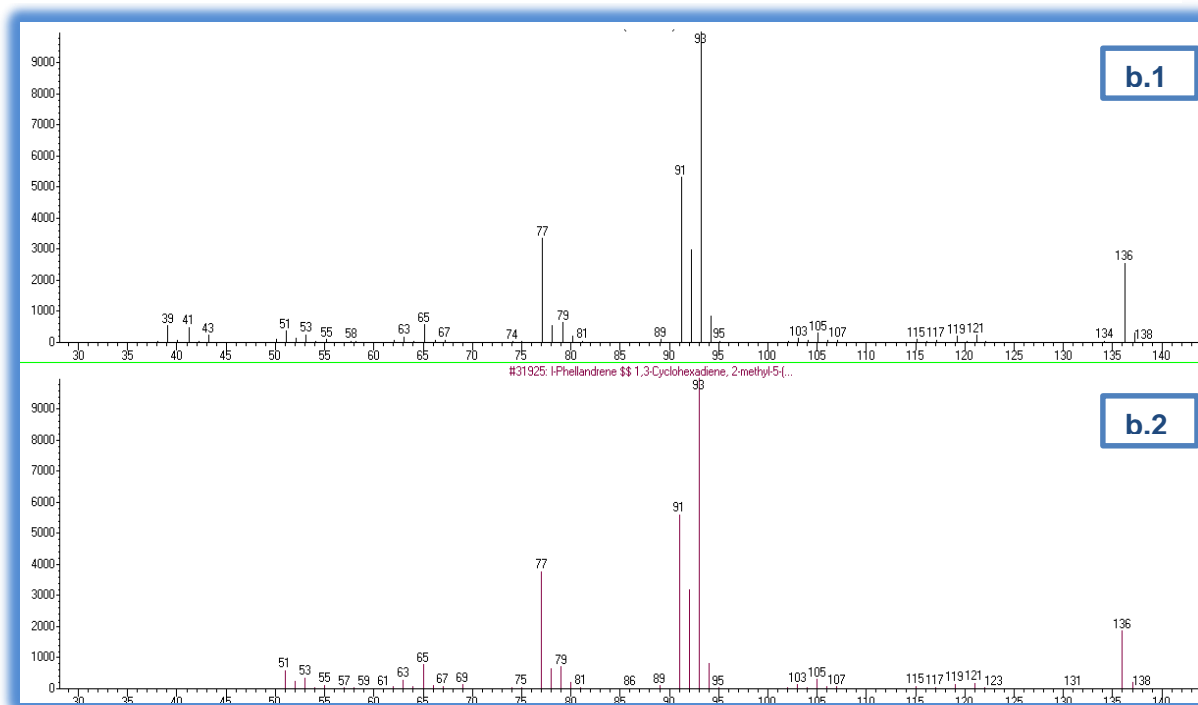
Figura 9 a: Espectro Estragol; a.1) Librería WILEY 7n.1 a.2) DB5-MS



Elaboración: El autor

Fuente: Librería WILEY 7n.1

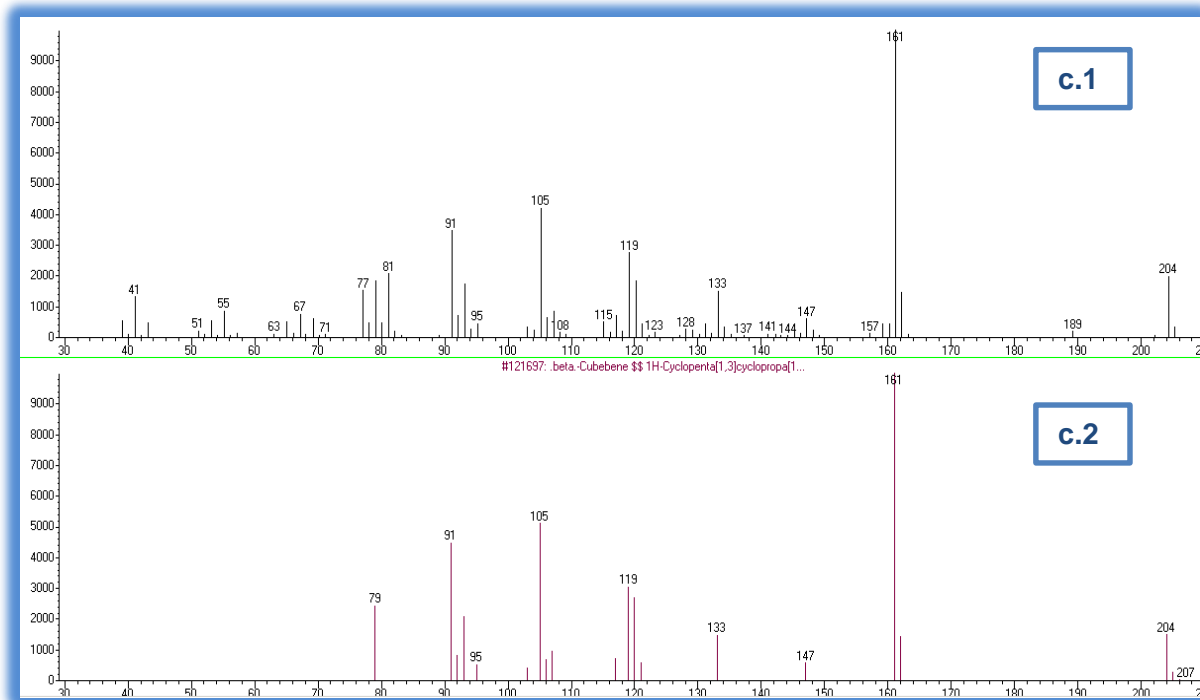
Figura 9 b: Espectro Phelandrene- alpha; b.1) Librería WILEY 7n.1 b.2) DB5-MS



Elaboración: El autor

Fuente: Librería WILEY 7n.1

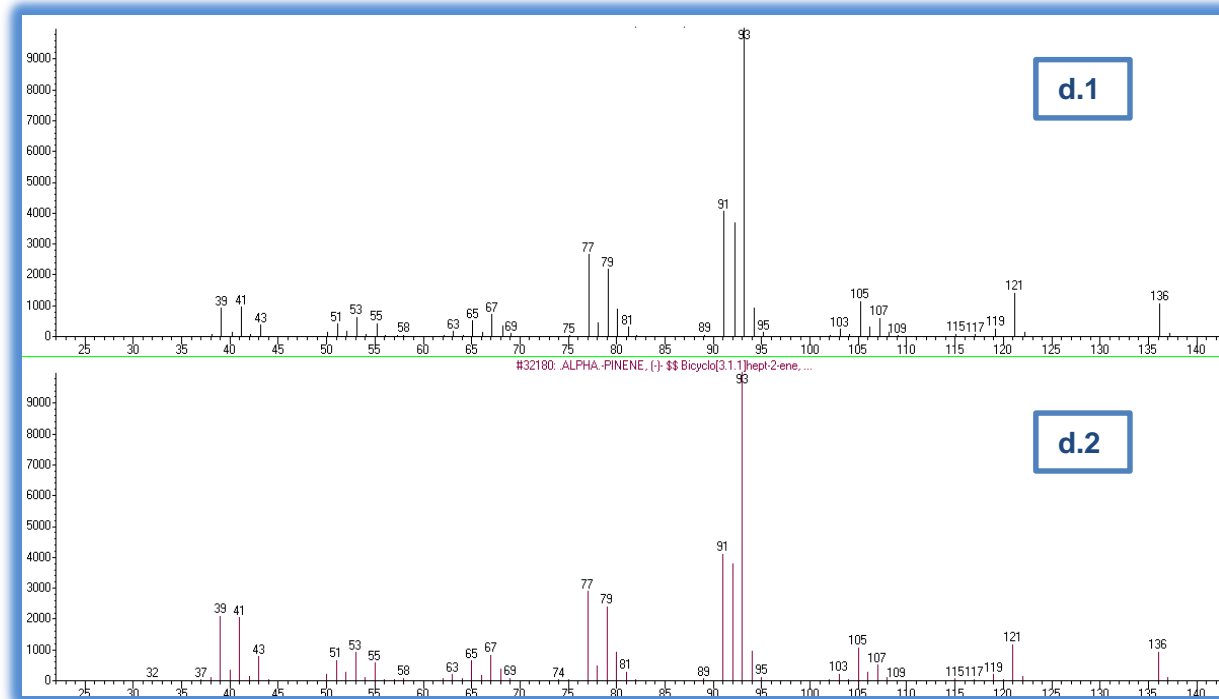
Figura 9 c : Espectro Germacrene-D; c.1) Librería WILEY 7n.1 c.2) DB5-MS



Elaboración: El autor

Fuente: Librería WILEY 7n.1

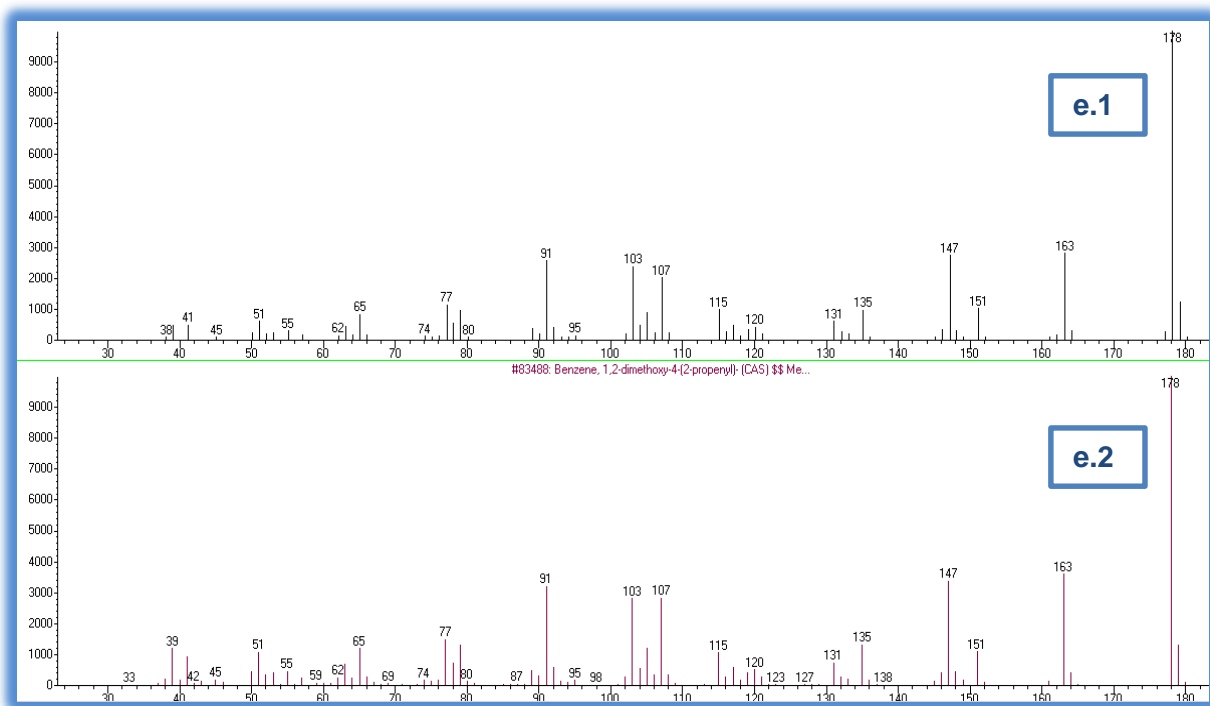
Figura 9 d : Espectro Pinene alpha; d.1) Librería WILEY 7n.1 d.2) DB5-MS



Elaboración: El autor

Fuente: Librería WILEY 7n.1

Figura 9 e: Espectro Methyl Eugenol; e.1) Librería WILEY 7n.1 e.2) DB5-MS



Elaboración: El autor

Fuente: Librería WILEY 7n.1

4.6. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

4.6.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias.

CMI es la mínima concentración de un compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano tras 18-24 horas de incubación;²⁹ Los resultados indican una débil actividad inhibitoria con un valor de CMI de 1000 ug/mL frente a *E. faecalis*, para la segunda recolección de *H. racemosum* y con un valor de CMI de 500 ug/mL frente a *K. pneumoniae*, para la tercera recolección. *Hedyosmum racemosum* mostró en estas pruebas que el aceite obtenido en la segunda recolección, poseen actividad (1000 ug/ml) en *Enterococos faecalis* (ATCC 29212), mientras que el aceite de la tercera recolección tiene actividad (500 ug/ml) en la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997). En la tabla 9 se muestran los resultados para bacterias. No se han reportado estudios previos de actividad antibacteriana para *H. racemosum*, en investigaciones del mismo género como *H. brasiliense* se ha demostrado que presenta actividad de (500 ug/ml) contra la bacteria *S. aureus* y de (250 ug/ml) *S. saprophyticus*.

²⁹ Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos; Perspectiva de la medicación antimicrobiana. O F F A R M. 2004;23(2):116-24.

Tabla 9. CMI para Bacterias

Bacterias		
Rc	ATCC 29212	ATCC 9997
HRR101	1000 ug/ml	500 ug/ml
HRR201	1000 ug/ml	500 ug/ml
HRR301	1000 ug/ml	500 ug/ml
Gentamicina; control positivo 100% inhibición (1mg/mL)		
D.M.S.O.; control negativo		

Elaboración: El autor

4.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos.

H. racemosum mostro actividad antifúngica de 125 ug/ml frente a *T. mentagrophytes* (ATCC 281885) y *T. rubrum* (ATCC 28188. Estos hongos patógenos humanos, son responsables de invasión en la piel, las uñas y el cabello (tabla10).³⁰ Para estas pruebas se utilizó el método microdilución en caldo denominado así porque involucra pequeños volúmenes, esta metodología es considerada como un método de referencia confiable y reproducible.³¹

H. racemosum no presenta estudios en hongos, se reporta actividad de (125 ug/ml) del aceite esencial de *H. angustifolium* en *C. albicans*,³² también existe estudios de actividad moderada del extracto *H. mexicanum* contra los hongos *S. schenki* y *F. pedroso* de 0.1 mg/ml y 0.05 mg/ml respectivamente.³³

Tabla 10. CMI para hongos

Hongos		
Rc	ATCC 28185	ATCC 28188
HRR1	125 ug/ml	125 ug/ml
HRR2	125 ug/ml	125 ug/ml
HRR3	125 ug/ml	125 ug/ml
Itraconazole; control positivo 100% inhibición (8mg/mL)		
D.M.S.O.; control negativo		

Elaboración: El autor

³⁰ Lorenzo D, Loayza I, Dellacassa J. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour Fragr.* 2003;18:32-5.

³¹ Cavalieri S. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Coyle Seattle-Washington. 2005;1:53-63.

³² Tangarife V, Correa J, Zapata B, Durán C, Stansheno E, Mesa A. Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio.* 2011;15(3):160-7.

³³ Castellanos M. Actividad de seis extractos de hierbas usadas medicinalmente contra pero de acuerdo a estudios realizados con una especie del mismo género *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix schenckii*. *Usancar QuiFar.* 2007;3:25-30.

CAPITULO V.
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V. CONCLUSIONES

- ✚ El promedio de humedad mayoritario fue para la segunda recolección (61,45%). El mayor promedio de rendimiento fue para la primera recolección (0.37%). La densidad promedio determinada de *H. racemosum* es de 0.90 g/ cm³. Los valores de índice de refracción de las tres recolecciones con un promedio de 1.50.
- ✚ Se identificó un total de 22 compuestos en la columna DB5-MS lo que representa el 97.90%, del aceite esencial de *H. racemosum*. Los componentes mayoritarios son: estragol (25.83%), α -phellandrene (20.55%), germacrene-D (10.26%), α -pinene (7.40%), methyl eugenol (6.16%).
- ✚ El aceite esencial de *H. racemosum* mostro actividad antibacteriana de 500 μ g/mL contra *K. pneumoniae*, en el aceite de la tercera recolección.
- ✚ La CMI para el hongo *T. mentagrophytes* en los aceites de la primera, segunda y tercera recolección es de 125 μ g/mL. En cuanto a la CMI para *T. rubrum* es de 125 μ g/MI para todas las recolecciones.

V.II RECOMENDACIONES

- ✚ La selección de la materia prima es importante antes de la extracción, ya que el vapor puede arrastrar contaminantes y afectar el aceite.
- ✚ Mantener e impulsar el estudio las plantas aromáticas en el sur del país, esto se justifica a la gran demanda de productos de origen natural a nivel mundial.³⁴
- ✚ Realizar un estudio fitoquímico de *H. racemosum* y hacer una comparación de componentes con esta investigación.
- ✚ Realizar pruebas posteriores de su posible uso en la industria farmacéutica, contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, ya que la presente investigación muestra actividad en estos hongos.

³⁴ Yáñez, X., Liliana Betancur, et al. (2009). "Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia." Salud UIS 41: 259-267.

BIBLIOGRAFÍA

- ✚ Alonso M, Finn E. Fundamentos cuánticos y estadísticos. ALHAMBRA MEXICANA 1999;3:324-5
- ✚ Alzate N, López I, Marín I, Murillo A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Tumbaga. 2009;4:59-71.
- ✚ Andarde V, Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la β -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Salud pública de México. 2004;46(6):524-8.
- ✚ Atakins P. Fisicoquímica Addison. Wesley Iberoamericana. 1992;3:54-5.
- ✚ Bray A, Lewis J, Watson J, Dennis B. Biología molecular de la célula. Omega. 1996;3:176-9.
- ✚ Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología Médica. Editorial Moderna Mexicana. 2005;18:245-9.
- ✚ Cao C, Peng Y, Shib Q, Xiao P. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae Chemistry & Biodiversity. 2008;5:220-34.
- ✚ Castañeda M, Muñoz A, Martínez J, Stanshenko E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Scientia et Technica. 2007;23(12):165-76.
- ✚ Castellanos M. Actividad de seis extractos de hierbas usadas medicinalmente contra *Periconia pedrosoi* de acuerdo a estudios realizados con una especie del mismo género *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix schenckii*. Usancar QuiFar. 2007;3:25-30.
- ✚ Cavalieri S. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Coyle Seattle-Washington. 2005;1:53-63.
- ✚ Chifa C. La perspectiva social de la medicina tradicional. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. OMS. 2010;9(4):242-5.
- ✚ Dellacasa E. Cromatografía gaseosa. Médica Panamericana. 2002;1:10-20.
- ✚ Durts H, Gokel G. Química Orgánica Experimental. Mc Graw Hill. 2007;1:55-6.
- ✚ Falkenberg T, Zhang X, Sawyer J. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. VA Lee e Y Maruyama. 2002;1:1-7.
- ✚ Fernández R, Segundo C, Arenas R, Silva D, Guzmán A. Determinación de las variedades de *Tricophyton mentagrophytes* en 10 casos de dermatofitosis en Paraguay. Bioquímica. 2002;27(2):41-5.

- ✚ Gómez J, Alcántara M, Simarro E, Martínez B, Ruiz J, Guerra B. Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiología, clínica y tratamiento. *Prous Science*. 2002;15(4):360-5.
- ✚ Gulavisí L. Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del ministerio de salud pública. *MSP*. 2008;1:19-20.
- ✚ Hernández R, Martínez G, Díaz M. Aspectos químico-físicos del aceite de girasol ozonizado. *CENIC Ciencias Químicas*. 2004;35(3):159-62.
- ✚ Ibáñez J, Usubillaga A. Estudio de la composición del aceite esencial de un frailejón híbrido entre *Espeletia schultzei* y *Coespeletia moritziana*. *Fac Farm*. 2009;50(1):16-9.
- ✚ Kirchner K, Wisniewski A, Bella A, Biavatti W, Netz D. Chemical Composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010;20:692-9.
- ✚ Lorenzo D, Loayza I, Dellacassa E. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour Fragr*. 2003;18:32–5.
- ✚ Medina M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos de la resistencia a meticilina. *Chil Infect*. 2010;17:145-52.
- ✚ Medrano V, Aparisi C, Torregrosa J, Ramón J. Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. *BES*. 2011;19(12):164-75.
- ✚ Meza M, González N, Usubillaga A. Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. *Rev Fac Agron* 2007;24:725-38.
- ✚ Michanie S. *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Énfasis Alimentos*. 2003;9(3):10-7.
- ✚ Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos; Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *O F F A R M*. 2004;23(2):116-24.
- ✚ Pontón J, Morragues M, Jene J, Guarro J. Hongos y actinomicetos alérgicos, *Trichophyton rubrum*. *Iberoamericana de Micología*. 2002;2:40-5.
- ✚ Segovia I, Suárez L, Castro A, Suárez S, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*. 2010;13:81-6.
- ✚ Skoog A, James F, Nieman T. *Principios de Análisis Instrumental*. Prentice Hall. 2003;5:53-65.

- ✚ Tangarife V, Correa J, Zapata B, Durán C, Stansheno E, Mesa A. Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*. 2011;15(3):160-7.
- ✚ Tene V, Malagón O, Vita P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ethnopharmacology*. 2007;111:63–81.
- ✚ Torre L, Navarrete H, Murril P, Marcia M, Hernik B. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito & Aarhus. 2008:280.
- ✚ Vázquez O. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre. *Amazónica de Investigación*. 2001;1(2):38-42.
- ✚ Viscenso F, Urrunaga R. Composition of the essential oil of *Hedyosmum scabrum*. *Essential Bearing Plants*. 2007;10(1):41-5.
- ✚ Yáñez, X., Liliana Betancur, et al. (2009). "Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia." *Salud UIS* 41: 259-267.
- ✚ Zamora N. Flora digital de la selva. Organización para Estudios Tropicales. 2006;1:1-3.

ANEXOS

ANEXO I: SIGLAS Y NÚMEROS

CG –EM	Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas
cv	Coeficiente de variación
\bar{X}	Promedio
σ	Desviación estándar
IK	Índices de Kóvats
I.Q.A.	Instituto de Química Aplicada
Tr	Tiempo de retención
U.T.P.L.	Universidad Técnica Particular de Loja
CMI	Concentración Minina Inhibitoria

Código envase aceite <i>H. racemosum</i>	
H	<i>Hedyosmum</i>
R	<i>racemosum</i>
R1	Numero recolección
1	Numero destilación

ANEXO II. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE *H. racemosum*

Los rendimientos de los aceites esenciales de las tres recolecciones se los obtuvo mediante la relación peso/volumen aplicando la siguiente fórmula:

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

Dónde:

R= rendimiento expresado en porcentaje

V= volumen del aceite obtenido (mL)

P= peso del material vegetal cargado en el destilador (g)

ANEXO III: DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La determinación del contenido de humedad indica la cantidad de agua involucrada en la composición de la planta, el contenido de humedad se expresa generalmente como porcentaje.

Material

- Pinza
- Balanza
- Lámpara uv
- Crisol
- Desecador

Procedimiento

- Pesar la capsula vacía
- Pesar la capsula con 1 a 2 g de muestra
- Colocar la capsula durante 45 minutos en la lámpara uv a 30 °C
- Llevar la cápsula al desecador durante 15 minutos
- Pesar la cápsula y luego someterla durante 15 minutos a la lámpara UV
- Llevar la cápsula al desecador durante 15 minutos y luego pesar nuevamente
- Continuar con este último procedimiento hasta que el peso sea constante

Se utilizó la siguiente formula:

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

Donde:

Hm: % de humedad promedio

m = peso de la cápsula vacía (gr)

m₁ = peso de la cápsula + muestra (gr)

m₂ = peso de la cápsula + muestra seca (gr)

ANEXO IV. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

La densidad es una magnitud referida a la cantidad de masa contenida en un determinado volumen, y puede utilizarse en términos absolutos o relativos. La densidad relativa o aparente expresa la relación entre la densidad de una sustancia y una densidad de referencia, resultando una magnitud adimensional y, por tanto, sin unidades.³⁵

Material

- Balanza analítica
- Pizeta con agua destilada
- Picnómetro de vidrio
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C , con una variación de $0,2^{\circ}\text{C}$ a $0,1^{\circ}\text{C}$

Procedimiento

- **Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de la balanza, pesar el picnómetro.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C , ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un papel filtro, cuando se equilibre la temperatura pesar el picnómetro lleno con el tapón.
- **Peso del aceite esencial:** para realizar el peso del aceite esencial procedemos a vaciar el picnómetro y luego lo enjuagamos y secamos. El mismo proceso que usamos para pesar el agua destilada usamos para pesar el aceite esencial

³⁵ Berbel R. Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible. Bitstream 2011;3:39-41.

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m^2 - m^0}{m^1 - m^0}$$

Donde:

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

m0 = masa en gramos del picnómetro vacío.

m1 = masa en gramos del picnómetro con agua.

m2 = masa en gramos del picnómetro con el aceite esencial

ANEXO V. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio, es una magnitud exclusiva de cada aceite. Por ser un cociente de velocidades no tiene unidades.³⁶

Materiales

- Pizeta con agua destilada
- Refractómetro: se utilizó un refractómetro modelo NAR-1T DESCO

Procedimiento

- Con la pizeta se coloca agua en el refractómetro y se calibra el refractómetro midiendo el índice de refracción
- Secar el refractómetro
- Luego medimos el índice de refracción del aceite y tomamos los datos

³⁶ Bailey E. Aceites y grasas industriales. Reverte. 1994;2(3):51-63.

ANEXO VI. DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES DE KÓVATS

Para poder determinar los índices de kóvats se comparan los tiempos de retención de los hidrocarburos obtenidos con el tiempo de retención de los constituyentes del aceite esencial en estudio en base a la siguiente fórmula.

$$IK = 10n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Donde

Ik = Índice de kóvats

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

tRx = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los *n*- alcanos.

tRn = Tiempo de retención del *n*-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado.

ANEXO VII. CALCULO COEFICIENTE DE VARIACIÓN

El coeficiente de variación es la relación entre la desviación típica de una muestra y su media.
Se calculó mediante la siguiente formula:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} * 100$$

Donde:

σ = desviación estándar

n = número de mediciones

\bar{X} = media aritmética

CV = coeficiente de variación

ANEXO VIII. CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar es una medida de dispersión, que nos indica cuánto pueden alejarse los valores respecto al promedio (media), se calcula mediante la siguiente formula:

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

Donde

x_i= dato i que esta entre (0, n)

x= promedio de los datos

n= numero datos

ANEXO IX. BIBLIOGRAFÍA DE LOS INDICES DE KOVATS REPORTADOS EN LA LITERATURA

- d)** Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 1995;1:17-29
- e)** Senatore F, Feo Vd. Chemical composition of the essential oil from *Tagetes mandonii* Sch. Bip. (Asteraceae). Flavour Fragrance. 1999;14:32-4.
- f)** Adams R, Nguyen S. Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* and *J. Sperryi* in the Davis Mountains of Texas: variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDS). Phytologia. 2005;87(2):96-108.
- g)** Adams R, González E, Slinkman E. DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango-Mexico. Biochem Syst Ecol. 2006;34:205-211.
- h)** Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 1995;1:17-29.