UNIVERSIDAD CIENFUEGOS
Carlos Rafael Rodríguez

Facultad de Ciencias Agrarias.
SEDE universitaria.

Rendimiento, parámetros de calidad del aceite esencial obtenido de las hojas de Piper angustifolium var.ossanum C.DC

Autor: Pedro Quintana Pino.
Tutor: Msc.Keila Yaima Villazón Chaviano.

"Año del 54 de la Revolución."
2012

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la extracción del aceite esencial de hojas *Piper angustifolium*, recolectadas en el Jardín Botánico de Cienfuegos, en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de Las Villa, empleando la técnica de hidrodestilación y se determinó el contenido de aceite esencial en las hojas de esta planta, obteniéndose 2.04 % de rendimiento. Se determinaron los parámetros de control de calidad del aceite a través de los índices cualitativos establecidos en las Farmacopeas vigentes y los mismos resultaron aceptables para este tipo de muestra según la literatura. Se utilizó la Cromatografía de Gases (CG), como técnica analítica para determinar el perfil cromatográfico del aceite, en el cual se pudo realizar, a través del reconocimiento por patrones externos, la identificación de componentes en el aceite, lo que ayudará posteriormente a su caracterización por Cromatografía de Gases acoplada a Masa (GC-MS). El contenido fenólico del aceite, determinado por el método de Folin-Ciocalteau, resultó ser de 128,04 µg equivalentes a pirogalol /mg de aceite esencial para el *P. angustifolium*, este valor puede estar relacionado con el buen potencial antioxidante en el sistema lipídico, ya que en la literatura consultada se refieren explícitamente que existe una relación directa entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos presentes en la fuente natural.

INDICE

INTRODUCCIÓN…….. 1

REVISION BIBLIOGRAFICA…….. 4

1.1. Consideraciones generales acerca de plantas medicinales. Plantas aromáticas y aceite esenciales 4

1.2. Estudios reportados de las plantas incluidas en el trabajo 6

1.2.1 Estudios reportados de las plantas piperáceas 6

1.2.2. *Piper angustifolium.* 7

1.3. Aceites Esenciales. 10

1.3.1. Reseña historica 10

1.3.2. Métodos de obtención 11

1.3.3 Análisis y parámetros de calidad del aceite esencial.. 12

1.4. Estudios antioxidantes en aceites esenciales. 15

1.4.1. Términos y definiciones…….. 15

1.5 Concideraciones finales del estudio bibliográfico..... 18

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS. 19

2.1. Aceite esencial, equipos y reactivos. 19

2.2. Metodologia de obtención del aceite esencial de las hojas.Determinacion del rendimiento del aceite Piper angustifolium..... 20

2.2.1.Metodología de obtención del aceite esencial. 20

2.2.2. Determinación del contenido de aceite en las hojas de Piper angustifolium. 22

2.3. Determinación del índice de calidad del aceite. 24

2.3.1.Características organolépticas 24

2.3.2. Densidad relativa. 25

2.3.3.Indice de saponificación..... 26

2.3.4. Indice de refracción 27

2.3.5. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos en el aceite esencial 27

2.3.6. Espectro UV 28

2.3.7. Espectro IR 28

2.3.8. Perfil cromatográfico del aceite. 28

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 29
3.1 Determinación del contenido de aceite en las hojas Piper angustifolium. 29
3.2. Indices de calidad del aceite esencial de *Piper angustifolium*. 30
3.2.1 Las Características organolépticas. 30
3.2.2. La Densidad relativa. 30
3.2.3. El Índice de refracción 30
3.2.4. El Índice de saponificación. 30
3.2.5..Espectros UV para el aceite 30
3.2.6.Espectro IR para el aceite 31
3.2. 7. Perfil cromatográfico del aceite utilizando GC. 32
3.3.Determinación del contenido de fenoles totales del aceite esencial…….. 36
CONCLUSIONES ……..... 38
RECOMENDACIONES…….... 39
BIBLIOGRAFIA…….. 40

INTRODUCCIÓN

La OMS (Organización Mundial de la Salud) considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica. El aprovechamiento por el hombre de las plantas medicinales consta en numerosos testimonios escritos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina, presente en virtualmente todas las culturas conocidas; la industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos.

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones (Morin, 2000). La Organización Mundial de la Salud se destaca por el trabajo constante para incorporar la fitoterapia dentro de los programas de salud, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad (Akerele and Olayiwola, 2007) ,(OMS, 2008).

Entre las plantas medicinales utilizadas en todo el mundo a lo largo de la historia, y aun de la prehistoria del hombre, las plantas aromáticas y sus componentes olorosos ocupan un lugar especial. Desde que Homo sapiens discriminó el alimento tóxico, el aire limpio del contaminado, o reconoció las virtudes del aroma de una flor o un fruto, comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su habitad, su comportamiento, sus costumbres, sus medicinas, hasta sus placeres y sus vicios, hasta sus recuerdos y deseos. La vida era para él, entre otras cosas, una experiencia que se genera desde el olfato y el paladar. Desde entonces, su memoria se enriquecía con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura y de su idiosincrasia.

Nuestro país no está exento de todo este rescate de la medicina popular lo cual tiene gran importancia desde el punto de vista económico y dentro del campo de la Salud Pública, constituyendo una alternativa a tener en cuenta por nuestros investigadores, debido a que posee una rica flora y una valiosa tradición en el uso de las plantas medicinales. Aunque es un país en vías de desarrollo y con limitados recursos económicos, tiene un cuadro de salud eminentemente de nación desarrollada además de garantizar plenamente el acceso de toda la población a los servicios médicos de alta calidad que se perfeccionan cada año, especialmente con la inclusión del médico de la familia (Apifármacos, 1992).

Las plantas aromáticas insertadas en el programa de medicina verde del Ministerio de Salud Pública son muchas pero cada día se realizan estudios a nuevas especies de plantas para determinar si pueden incluirse en este programa pues constan con investigaciones anteriormente realizadas donde se reportan posibles propiedades terapéuticas que podrían ser de muy buena utilización en nuestro país, tal es el caso de las especies de la familia Piperáceas, las cuales se usan tradicionalmente por sus acciones tales como antiparasitarias, antiespasmódicas, antirreumáticos, etc. Teniendo en cuenta esto en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de Las Villas existe un grupo de investigación que tiene como objetivo fundamental el estudio de las plantas medicinales, particularmente los aceites esenciales presentes en las plantas aromáticas. El presente trabajo se desarrolló en este grupo de investigación y para su estudio se tuvo en consideración la poca información de la planta estudiada en la literatura, razón por la cual la investigación incluyó estudiar el aceite esencial presente en las hojas del *Piper angustifolium*, planta que crece de forma silvestre en Cuba. Constituye, por tanto, el problema científico del presente trabajo que el aceite esencial, obtenido de las hojas de P. *angustifolium,* no posee estudios reportados que permitan proponer su uso en la industria cosmética y alimentaria, así como justificar su uso farmacéutico en la medicina tradicional cubana. Tampoco se dispone de la información físico-química necesaria para el establecimiento de los parámetros de control de calidad del aceite esencial de la planta.

Atendiendo a ello, con el objetivo de contribuir con el programa de medicina natural y tradicional del país, este trabajo científico parte de la siguiente hipótesis: Si se realizan estudios que permitan conocer el rendimiento, las propiedades físico-químico del aceite esencial obtenido del *P. angustifolium*, se realizará un aporte importante a la información necesaria para proponer su uso en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. Para fundamentar dicha hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

1. Determinar el rendimiento del aceite esencial en las hojas de *P. angustifolium,* aplicando la técnica de hidrodestilación.
2. Realizar la evaluación de la calidad del aceite a través de índices cualitativos establecidos en las Farmacopeas vigentes.

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

1.1. Consideraciones generales acerca de las plantas medicinales. Plantas aromáticas y aceites esenciales.

Las plantas con propiedades beneficiosas para la salud humana vienen acompañando al hombre desde sus orígenes. La utilización de las mismas es una de las terapias médicas más antiguas y extendidas que se remonta a los tiempos prehistóricos. Cada cultura ha desarrollado sus tradiciones de medicina popular, con remedios y ritos en los que utilizan plantas locales. Desde la época de los aborígenes, estas han sido, a través de los tiempos, el recurso más utilizado por el hombre y los animales para aliviar o curar sus dolencias. Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y son una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas. Así comenzó la historia de la fitoterapia. (Navarro, 2000).

En las últimas décadas puede observarse, como tendencia global, un aumento del consumo de plantas medicinales, tanto en los países industrializados como los del tercer mundo. Se estima que alrededor del 80 % de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud. En Asia, millones de personas mantienen su salud a través del uso de hojas, raíces y cortezas de árboles. De hecho, el 25 % de las medicinas prescritas por los médicos europeos y estadounidenses se derivan de plantas existentes en los bosques. Según reconocidos investigadores, prácticamente todas esas plantas se han descubierto gracias a la información derivada de su uso en medicina tradicional (Barquero, 2007).

En el año 2006, el mercado farmacéutico mundial fue de 643 miles de millones de dólares y el mercado de las plantas medicinales llegó a los 62 miles de millones de dólares con una tasa anual de crecimiento estimada según un informe del Banco Mundial de entre el 5 y el 15 %. Es decir, además de los fármacos derivados de plantas que se comercializan a través de la Industria Farmacéutica, existe un mercado de hierbas medicinales que se venden como suplementos dietarios o “medicinas naturales o tradicionales,” que se encuentra en expansión. Para los países industrializados, estas

se han convertido en fuentes importantes de ingredientes para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas y al mismo tiempo su empleo directo como alternativa a las prescripciones sanitarias (Barquero, 2007).

En los productos naturales los constituyentes químicos pueden variar dependiendo de la cosecha, de las estaciones del año, los orígenes de la planta, procesos de secado y otros factores. Así, resulta ser interesante determinar algunos de los constituyentes fitoquímicos de los productos herbarios para asegurar la fiabilidad y repetibilidad de la farmacología clínica de investigación y entender su bioactividad y el posible efecto colateral de componentes activos. Varias técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de gases con detección por espectrofotometría de masas (GC\MS), la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de capa delgada (TLC), pueden aplicarse para esto.

El concepto de fito equivalencia se desarrolló en Alemania para asegurar la consistencia de productos herbarios. Según este concepto, un perfil químico, como la huella digital cromatográfica, para un producto natural serían construidas y comparadas con el perfil de un producto de referencia probado clínicamente. (Raven et al., 1999; Yang et al., 2000).

Entre las plantas medicinales, las aromáticas juegan un rol importante, son aquéllas que tienen un contenido sobresaliente en aceites esenciales y representan una amplia variedad de especies. Como grupo son especies valoradas por sus aromas y sabores característicos así como por sus propiedades medicinales; representan alrededor de un 0,7 % del total de las plantas medicinales. El comercio de los aceites esenciales mantiene un crecimiento sostenido debido a su aplicación en diversas industrias como: cosmética, farmacéutica, alimenticia, productos de limpieza, plaguicidas, entre otras (Davies, 2004).

Las plantas medicinales poseen múltiples componentes que varían, según la especie. Entre estos se destacan los alcaloides, taninos, aminoácidos, proteínas, saponinas y aceites esenciales. Teniendo en cuenta que el presente trabajo tiene como objeto de

estudio el aceite esencial obtenido de una especie de Piperáceas, a continuación se relacionan aspectos de esta planta y sus metabolitos

1.2. Estudios reportados de la planta incluida en el trabajo.

1.2.1. Estudios realizados en la familia Piperáceas.

La planta estudiada en el presente trabajo pertenece a la familia Piperácea, estas son una familia tropical con ocho géneros que se reconocen por sus hojas simples y por tener flores muy pequeñas, sin perianto, en forma de espiga simple y apretada. Generalmente son hierbas, arbustos o árboles muy pequeños. El género Piper (constituido por más de 700 especies) presenta tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada (Gómez, 1987).

Estas plantas poseen una serie de usos como medicina popular en toda América: en Guatemala y México la planta tiene valor como astringente, estimulante digestivo y diurético. En Cuba es usada como hemostático, en remedios para las hemorroides, gonorrea, leucorrea, para las hemorragias menstruales y en baños para el tratamiento de varias dolencias externas. En Islas Vírgenes se toma la decocción de la planta como sedante, laxante y bebida refrescante (Cicció and Ballestero, 1996).

Estudios más recientes dan fe de estas acciones, (Reddy 2004) plantea que son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desordenes intestinales, y como antimicrobiano y citotóxico. La evaluación *in vitro* de extractos de estas plantas, muestran propiedades antifúngica y antibacteriana.

Los aceites esenciales (AE) de la especie de Piper, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa, E.coli, y los hongos Trichophyton mentagrophytes, C. albicas, A. flavus y A. fumigatus* (Lopez et al., 2001).

Desde el punto de vista químico, se encuentran en la literatura estudios acerca de la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de estas especies y de algunas variedades recolectadas en diversas partes del mundo (Smith, 1996). Se ha

informado que los constituyentes principales del aceite obtenido por destilación al vapor de hojas frescas recolectadas en las Islas Fiji son dilapiol (58%) y piperitona (4%). En Panamá (Gupta, 1995) investigó la composición del aceite esencial de las hojas frescas de la planta recolectada, encontrando dilapiol (90%) como componente mayoritario, pero no encontraron piperitona. El aceite esencial obtenido de diferentes variedades en la región amazónica tiene como componente mayoritario al dilapiol en un rango desde 3.4 a 12 %.(Maia et al., 1998)

(Díaz, 1984) identificó que las plantas recolectadas en Colombia (en la zona de Santandersito, Cundinamarca), que existían como constituyentes mayoritarios el dilapiol, miristicina y piperitona. El dilapiol reduce el crecimiento de larvas de pestes de insectos, incluida la larva de la mayor peste de maíz en Norte América, la miristicina actúa como inhibidor de la monoaminoxidasa comportándose como antidepresivo; ambos componentes, el dilapiol y miristicina, son conocidos por su actividad insecticida y su uso como sinergistas de insecticidas organofosforados (Bernard and Chauret, 1995). Por su parte la piperitona ha sido también reportada como repelente y presenta actividad fungicida en hongos patógenos de la caña de azúcar a partir de mezclas racémicas de piperitona, se realizaron bioensayos que mostraron su efectividad como repelente de la mosca doméstica (Bowers-WS et al., 1993.; Wimalaratine et al., 1996; Smith, 1996; Singh-SP et al., 1998).

1.2.2. *Piper angustifolium var.ossanum C.DC*

El *Piper angustifolium var.ossanum* C.DC, es una planta conocida como: matico, cordoncillo, moho-moho, hierba de soldado. En Cuba se conoce como Platanillo de Cuba y Canilla de Muerto reflejado así en la Flora de Cuba, 1951. Sus hojas y ramas contienen aceites esenciales, ácido artánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides triterpenoides. Los taninos contribuyen a su actividad cicatrizante; los flavonoides tienen propiedades antioxidantes y protectoras de la membrana celular (Arroyo et al., 2003). Según (Vander and Put, 1972 y Fonc, 1986.), la planta posee las siguientes características y usos tradicionales:

CARACTERÍSTICAS:

Es una planta dicotiledónea semiarbústica, que presenta un tallo cilíndrico, ramificado leñoso que a su vez presenta nudos prominentes y abultados, también presenta hojas simples sésiles, estipuladas enteras alternas, penninervias de apariencia muy rugosa por el haz y con las nervaduras sobresalientes en forma de malla por el lado del envés. Presenta inflorescencia en espiga simple densa o compuesta con flores pequeñas hermafroditas desnudas acompañadas de una bráctea que va a tener un ovario con dos estambres. Su fruto va a ser una drupa y su semilla va a ser una semilla inseminal, no presenta cáliz y corola.

HABITAT:

Esta planta va a tener un hábitat bastante amplio pero principalmente se la encuentra en lugares donde el clima es templado tropical, pero se han encontrado ejemplares hasta 3500 m.s.n.m. Abunda de manera especial en el Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina, prefiere los lugares húmedos en las orillas de los riachuelos, en los fangos, etc. Se adapta fácilmente a cualquier clima.

DESCRIPCIÓN QUÍMICA:

El componente más importante, desde el punto de vista cuantitativo, y al que se atribuye en parte sus virtudes cicatrizantes, es el tanino. Esta sustancia se encuentra en una concentración de 5,7%. Otros constituyentes importantes son varios tipos de alcaloides, a los que se les atribuye un efecto relajador de la musculatura lisa. Por último, se señala la presencia de numerosos glucósidos, especialmente de tipo flavonoides.

En el *Piper angustifolium var. Ossanum C.D.C* el compuesto principal es el Alcanfor (22,68 %), el Canfeno (21,18 %), Isoborneol (11, 53 %). Además contiene alfa pineno, mirceno, limoneno, borneol y terpinol acetato.

USOS TRADICIONALES DE LA PLANTA.

- Cicatrizante.

- Conjuntivitis.
- Diarrea.
- Digestivo.
- Sangrado de encías.
- Antibacteriano (faringitis, infecciones vaginales, infecciones de las vías urinarias).
- Antiinflamatorio (inflamación de la boca, inflamación de la piel).
- Inflamaciones respiratorias.
- Tos.
- Úlceras gástricas y bucales**.**

Los estudios científicos reportados de la planta son muy escasos .El primero de ellos aparece en 1996 en el cual Tirillini y colaboradores estudiaron la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta .El análisis por Cromatografía de Gases acoplado a masa aportó que los componentes mayoristas presentes son el canfeno y canfor, el aceite presenta actividad bacteriostática y antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes, Pseudomonas eruginosa, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, and Escherichia coli.*

(Ranilla et al., 2010), estudiaron la actividad antioxidante y el potencial inhibitorio in vitro de compuestos fenólicos presente en las plantas medicinales cultivadas en América Latina entre la que se encontraba el *Piper angustifolium var. ossanum C.D.C.* Como resultado se obtuvo que las plantas tuvieran alta cantidad de compuestos fenólicos.

1.3. Aceites esenciales.

1.3.1. Reseña histórica

El uso de los aceites esenciales se remonta a la antigüedad. Los egipcios los utilizaron bajo la forma de baños aromáticos. Homero decía del Egipto:"Tierra fecunda que produce en abundancia drogas, unas son remedios, las otras son perfumes: país de médicos los más sabios del mundo". El egipcio Zoísmo de Tebas (siglo III), eminente químico, reportó que la destilación seca era practicada en los templos. Se han encontrados escritos que demuestran que los egipcios sabían destilar las esencias de

las coníferas 40 siglos antes de Cristo. Los faraones utilizaron los aceites para ser embalsamados. Esta técnica logró una conservación del cuerpo de, al menos 3000 años (Salle and Pelletier, 1991).

En ‘’La Historia Natural”, del libro XIII, Plinio cita los orígenes y los compuestos de perfumería que existían en esa época. Describe igualmente un aparato de destilación para obtener la esencia de trementina a partir de la resina del pino. La caída del imperio romano hace olvidar la utilización de los aceites esenciales. Recién en la edad media los árabes redescubren la destilación de plantas, y es en el siglo XIII gracias a los trabajos de Gerberen que inventa el serpentín y el medio de enfriamiento. Al mismo tiempo en Francia la burguesía y los señores usaban baños aromáticos, la capital tenía una treintena de baños públicos. Es en esta época que la farmacia favorece el desarrollo de la destilación de aceites esenciales que fueron conocidos por el nombre como “quinta esencia”.

El químico y médico de Luís XIV, Lémery, describe en su “Diccionario de drogas simples” todas las plantas medicinales que se utilizaban para la fabricación de medicamentos. Se contaban con alrededor de 60 plantas de las cuales se extraían aceites esenciales. En el siglo XVIII se realizaron los primeros controles, con el fin de descubrir las falsificaciones. Demanchy en su obra habla sobre “El arte de destilación de aguas fuertes”, en 1775 describe un equipo para la destilación de plantas empleando el vapor de agua.

A mediados de siglo XIX los primeros análisis químicos y la producción de aceites esenciales comerciales hacen su aparición. Cabe señalar que el codex medicamentarius francés de 1837 contenía la descripción de 44 aceites esenciales; mientras que el codex de 1949 mencionaba solamente 10. Esto fue la consecuencia del fuerte impulso dado a la industria de síntesis en esos años, y que llegó pasado los primeros 50 años del siglo XX. Desde finales del siglo XIX hasta nuestros días el desarrollo de la ciencia y la tecnología han permitido ampliar enormemente el conocimiento de las propiedades y la composición de los aceites esenciales. Fueron fundamentales los trabajos de Otto Wallach, premio novel de química de 1910 por su

labor en el análisis de los terpenos; los del suizo Leopold Ruzicka, premio novel de química de 1939 por su trabajos sobre semisíntesis orientada a la perfumería; las contribuciones de los ingleses A.V Martin y R.L Synge, premio novel de química de 1952, por haber desarrollado la técnica de la cromatografía de fase gaseosa como la herramienta analítica por excelencia para el estudio de los aceites esenciales (Bandoni, 2000).

1.3.2. Métodos de obtención

Los aceites esenciales pueden ser extraídos de las muestras vegetales mediante diversos métodos como: expresión, extracción y destilación (Bandoni, 2000; Meireles, 2009.

Expresión: En la expresión el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Estos procesos son aplicados a los frutos de los cítricos. Todos los métodos se basan en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar en forma inmediata la esencia, para evitar ser absorbida por la corteza esponjosa que resulta después de este tipo de procesos. Por esta razón todas las máquinas que procesan los cítricos cuentan con un sistema de aspersión de agua que moja constantemente la superficie del fruto.

Extracción: Se utiliza cuando el aceite se descompone fácilmente o se halla en cantidades tan pequeñas que no es posible su obtención por los otros métodos. En estos casos se extrae por disolución o absorción del aceite en disolventes inmiscibles entre ellos o volátiles a través de procesos como maceración, digestión, eufloración o lixiviación.

Destilación: La destilación es un método para separar los componentes de una disolución, el que depende de la distribución de las sustancias entre las fases gaseosas y líquidas y es aplicable a los casos donde todos los componentes se hallan presentes en ambas fases. En lugar de introducir una nueva sustancia a la mezcla, la nueva fase se crea de la solución original por evaporación y condensación. Teniendo en cuenta el procedimiento utilizado durante la destilación este se clasifica en: destilación con agua (hidrodestilación), destilación con vapor directo (arrastre con vapor de agua), destilación con agua y vapor de agua (cohobación) y destilación previa maceración. En

el presente trabajo se emplearon las dos primeras técnicas de destilación por lo que a continuación se exponen los aspectos más importantes sobre las mismas.
De forma general de todos los métodos tradicionales reportados para la obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas los más utilizados son la destilación con agua o hidrodestilación y destilación por *arrastre con vapor (Bandonil, 2000, European Pharmacoppeia. 5ta ed. Strasbourg).*

Ambos métodos aparecen reportados en la mayoría de las investigaciones relacionadas con aceites esenciales, aunque la hidrodestilación abarca un mayor porciento. Algunos autores reflejan en sus artículos publicados en los dos últimos años dicha temática (Skala et al., 2007; Zhang et al., 2008.; Norajit et al., 2007; Tabanca et al., 2007;Yousefzadi et al., 2007; Loizzo et al., 2007; Kosar et al., 2008; Zhang et al., 2008;Su et al., 2008).

1.3.3. Análisis y parámetros de calidad de los aceites esenciales.

Recordemos que los aceites esenciales son mezclas que pueden llegar a ser muy complejas, por lo que la identificación de sus componentes no es una tarea simple. Antiguamente esta identificación se convertía en una larga y tediosa operación, que consumía muchísimo tiempo ya que requería del aislamiento y purificación de cada componente, utilizaban por ejemplo (la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, destilación fraccionada), y su posterior determinación estructural por métodos químicos tradicionales (obtención de derivados, reacción de coloración, pruebas de grupos funcionales (Bandoni, 2000).

Es por ello que el control de aceites esenciales se limita en buena parte a la determinación de sus contantes físicas (solubilidad, densidad, poder rotatorio, índice de refracción) o algunos índices químicos (acides, éster, acetilo, fenoles, etc.). Valores de estos parámetros para un gran número de aceites se encuentran reunidos en el texto clásico sobre aceites esenciales como el de Gunther y el de Gildemeister y Hoffmann. La evaluación de estas contantes físico-químicas se mantiene todavía en las tareas de control de la calidad a nivel industrial (Cañigueral et al., 1998).

Los parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los aceites esenciales, se realizan con el objetivo de normalizar las especificaciones de calidad de producciones nuevas o realizar el control de calidad de una producción determinada, además permite conocer si cierto aceite esencial ha sido adulterado o deteriorado, por el tiempo o por falta de condiciones de almacenamiento adecuadas (Cuellar, 1983; Bandoni, 2000; Bilbo, 2002; European Pharmacopeia. 5ta ed. Strasbourg).

Parámetros de calidad en el análisis de los aceites esenciales:

Características Organolépticas:

Olor: El olor de los aceites volátiles es sumamente variable, es su propiedad característica, y se modifica notablemente cuando les da el aire.

Color: La mayoría de éstos son incoloros en estado puro y cuando están recién preparados, o se pueden hacer incoloros mediante la redestilación. Si se les deja en el aire, pueden producirse variaciones en el color.

Sabor: Este es casi tan variable como el olor; algunos son dulces, otros más o menos picantes, acreos, cáusticos o ardientes.

Apariencia: Son transparentes y no presentan sedimentos.

Determinaciones Físicas:

Densidad Relativa**:** En los aceites varía desde 0,842 hasta 1,172. La mayor parte de ellos son más ligeros que el agua. Mediante este análisis se determina cuando un aceite esencial ha sido alterado.

Índice de Refracción: Cuando la luz atraviesa el límite entre dos medios transparentes (dioctrios) el rayo de luz incidente será reflejado o refractado según el índice de pureza de la sustancia por medio de una desviación. Este es de suma importancia, pues sirve para determinar con exactitud la identidad y pureza de aceites y grasas**.**

Índices Químicos:

Estos comprenden una serie de determinaciones químicas que se relacionan a continuación, cuya utilización va decayendo debido a la implantación de métodos instrumentales de análisis, principalmente cromatográficos y espectroscópicos, que tienen las ventajas de ser más rápidos, completos y sensibles, sin embargo, en algunos

casos (por razones económicas, logísticas, etc.) siguen siendo muy útiles y por eso se incluyen en casi todas las normas existentes.

Índice de Saponificación: Es el grado de acidez de un aceite esencial y se define como el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres existentes en 1 g de la muestra.

Características Espectroscópicas:

Infrarroja (IRR): Permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C cis y trans, etc. Para determinar el espectro basta con colocar una gota del componente en una celda de cloruro de sodio.

Ultravioleta (UV): El espectro UV de los monoterpenos y sesquiterpenos permite el reconocimiento de grupos funcionales y grupos cromóforos. En general, la espectrofotometría ultravioleta tiene una utilidad limitada en el estudio de la gran mayoría de los aceites esenciales terpénicos, ya que pocos terpenos tienen grupos cromóforos. Sin embargo, en la fracción no volátil de los aceites esenciales cítricos se encuentran componentes carotenoides o con núcleos heterocíclicos oxigenados (cumarinas, furocumarinas sustituidas y polimetoxiflavonas), lo que da a estas esencias un comportamiento característico en el UV. Esta particularidad se ha utilizado para el uso de métodos que permiten evaluar la calidad y la genuinidad e identificar el origen geográfico de una muestra.

Características Cromatográficas:

Un parámetro muy importante que se tiene en cuenta en la evaluación de la calidad de cualquier aceite esencial es el perfil cromatográfico para lo cual se emplea la cromatografía de gases como técnica de elección y es usada para cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir, los mayoritarios o aquellos que sin ser mayoritarios tengan una especial trascendencia para la calidad. Los ensayos antes mencionados se realizan en Cuba según las Normas Cubanas Estatales de Calidad de los Aceites Esenciales .(Quert et al., 1998)

La técnica más empleada para el análisis de los aceites esenciales es la cromatografía gaseosa lo cual se justifica por las características volátiles que poseen estos compuestos así como su estabilidad a altas temperaturas (Bandoni, 2000). En las

últimas décadas el desarrollo de estas y otras técnicas instrumentales de análisis, su acoplamiento al sistema informático y bases de datos, han cambiado sustancialmente el panorama, agilizando de forma notable la identificación de los componentes de los aceites esenciales. Han contribuido especialmente a este cambio, el desarrollo de:

- ✓ Técnicas cromatográficas de alta resolución, principalmente la cromatografía de gases con columnas capilares.
- ✓ Técnicas espectroscópicas, particularmente la espectroscopía de masas (EM), la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).
- ✓ Sistema cromatográfico acoplado a técnicas espectroscópicas, especialmente la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría masas (GC-MS) y la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopía infrarroja (GC-FTIR).

1.4. Estudios antioxidantes en aceites esenciales.

1.4.1. Términos y definiciones.

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como: proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee et al., 2004).

La relación que existe entre la concentración de radicales libres y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado en la actualidad por la comunidad científico-médica. Vocablos nuevos, tales como: estrés oxidativo, actividad pro-oxidante y producto anti-oxidante, son cada vez más comunes y el interés sobre el tema es cada vez más creciente, lo que ha provocado la aparición de miles de productos, de origen

natural o sintético, con el calificativo de antioxidante, lo cual se quiere significar la capacidad de disminuir la concentración de radicales libres en el organismo humano, por tanto, mejorar el estado de salud de quien lo consume (Martínez al., 2003). Por otra parte, la oxidación es una de las principales causas de deterioro químico en multitud de productos. En el caso de los alimentos, su incidencia da como resultado el sabor rancio de algunos frutos, así como una alteración en el resto de cualidades organolépticas como: color, aroma o textura. La oxidación no sólo modifica la apariencia y/o la aceptación por parte del consumidor de un producto alimenticio, sino, puede provocar el deterioro de las cualidades nutricionales e incluso, afectar a la seguridad de los alimentos (Vaya and Aviriam, 2001).

El término estrés oxidativo hace referencia al desequilibrio entre la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa y sus efectos adversos (Mayne, 2003).

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxido-reducción. El término especies reactivas del oxígeno es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres (Halliwell and Whiteman, 2004).

Los radicales libres son protagonistas de numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena, estas reacciones solo son eliminadas por la acción de otras moléculas en estos procesos tóxicos en el organismo, los llamados sistemas antioxidantes defensivos. Se ha demostrado que el organismo posee un número de mecanismos a través de los cuales produce y a la vez limita la producción de especies

reactivas de oxígeno. Un exceso de radicales libres suele iniciar el daño de la pared vascular y en este proceso se encuentra implicado el colesterol; se ha demostrado en la incidencia de enfermedades cardiovasculares con suplementos individuales de antioxidantes.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, beta-caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, y otros. Entre las fuentes habituales de antioxidantes de la dieta (las frutas y plantas ricas en compuestos fenólicos), se caracterizan por su actividad anticarcinogénica, antiinflamatoria, antiaterogénica, antimicrobiana y antioxidante (Robards y col., 1999; Maure y col., 2001).

El mecanismo de protección de los polifenoles (representado por AOH) ocurre en el estado inicial y más efectivamente durante el estado de propagación de la oxidación, por captura de los radicales libres (R.), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena. R. + AOH RH + AO. La transferencia de electrones desde el radical libre (R.) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes (reductonas), como el ascorbato (Robards et al., 1999; Maure y col., 2001).

Actualmente existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se pueden mencionar el uso del 2,2-difenil-1-picril hidrailo (DPPH), la fuerza reducida, el ensayo de peroxidación lipídica con ácido linoleico, generación de radicales peróxido, superóxido e hidroxilo, y otros (Ramos y col., 2005; Reddy et al., 2004).

1.5 Consideraciones finales del estudio bibliográfico.

La exhaustiva revisión realizada de la literatura especializada permitió concluir que las hojas de las especies de piperáceas estudiadas en el presente trabajo poseen en común algunos aspectos que citamos a continuación:

(**I)-** Los aceites esenciales poseen una gran cantidad y variedad de componentes, entre los cuales abundan aldehídos de cadena corta, terpenos, sesquiterpenos, etc.

(**II**)- Las técnicas de extracción de aceite más empleadas suelen ser la hidrodestilación y el arrastre con vapor.

(**III**)-La técnica analítica de elección para cuantificar los componentes presentes en un aceite es la cromatografía de gases.

(**IV**)- Las acciones farmacológicas más abundantes del aceite esencial son la antioxidante y la antibacteriana.

(**V**)- Los estudios reportados de la planta son escasos, apareciendo sólo referencias sobre sus usos tradicionales.

Capítulo II. Materiales y Métodos.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, en la Universidad ‘’Martha Abreus de Las Villas’’, durante la etapa comprendida desde octubre de 2009 hasta agosto de 2011; utilizando las partes aéreas de *Piper angustifolium,* planta procedente del Jardín Botánico de Cienfuegos.

Se utilizó, en todos los procedimientos desarrollados, cristalería específica de laboratorio, previamente descontaminada. Se emplearon reactivos de calidad analítica y equipos certificados como aptos para el uso.

2.1. Aceite esencial, equipos y reactivos.

Aceite esencial: se obtuvo a partir de las hojas secas del *P. angustifolium* recolectados en el Jardín Botánico de Cienfuegos.

Materiales, utensilios y equipos de medición:

- Agitador magnético SELECTA P
- Agimatinc- E
- Balanza digital, *BOECO*, Alemania.
- Baño ultrasónico, *BRANSON 1510,* México.
- Centrífuga, 5702 *EPENDORF*, Alemania
- Cristalería de laboratorio.
- Cromatógrafo Gaseoso, *AGILENT 6890N series,* USA.
- Espectrofotómetro IR, *FTIR, MATTSON 3000,* Inglaterra.
- Espectrofotómetro UV-VIS, Termo electrón, *Genesys 10UV,* USA.
- Estufa, *BINDER.* .
- Micropipetas de 5, 20, 100, 1000 µL, *EPENDORF*, Alemania.
- Refractómetro digital de *ABBE*, *WYA-S, Alemania*.
- Peachimetro HANNA

Reactivos y disolventes utilizados:

- 1-butanol, *Merck.*
- 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH), *SIGMA- ALDRICH.*
- *2,4 difenil hidracina, CHEMAPOL.*
- Aceite crudo de semillas de Cucurbita.
- Acetona, *UNI-CHEM*. Barcelona.
- Ácido acético glacial, *Merck.*
- *Ácido gálico o Pirogalol SCHARLAU.*
- Ácido linoléico, *Merck.*
- Ácido tiobarbitúrico, *SIGMA-ALDRICH.*
- *Acido clorhídrico*, *Merck.*
- Ácido tricloroacético, *EPB "Carlos J. Finlay, Merck.*
- Agua destilada.
- Almidón, *Merck.*
- Buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6)
- *Benceno Merck.*
- *Buffer fosfato 0,05M pH7*
- Carbonato de sodio, *UNI-CHEM.*
- Ciclohexano, *SIGMA-ALDRICH*.
- Cloroformo, *Fluka.*
- *Carvacrol SAFC.*
- *Dicloruro de hierro Merck.*
- Etanol absoluto, *UNI-CHEM.*
- Eugenol, *Merck.*
- Ferricianuro de potasio, *UNI-CHEM.*
- Hidroxianisol butilado (BHA), *SIGMA- ALDRICH.*
- Hidróxido de potasio, *Panreac.*
- Hidroxitolueno butilado (BHT), *SIGMA- ALDRICH.*
- *Hidróxido de sodio, Merck .*
- *Hexanal* , *Merck .*
- Ortofosfato dihidrógeno de potasio, *Merck..*
- Propilgalato (PG) *SCHARLAU.*
- Reactivo Folin–Ciocalteau, *SIGMA- ALDRICH.*
- Sulfato de sodio anhidro, *UNI-CHEM.*
- Timol, *SAFC.*
- *Tricloruro de hierro, Merck.*
- Tiocianato de amonio, *Merck.*
- Tiosulfato de sodio, *Merck.*
- *Tolueno, Merck.*
- Yoduro de potasio, *Merck.*

2.2. Metodología de obtención del aceite esencial. Determinación del rendimiento de aceite en las hojas del *Piper angustifolium.*

2.2.1. Metodología de obtención del aceite esencial.

Para la obtención del aceite se utilizaron las hojas secas del *Piper angustifolium.*

El aceite se extrajo utilizando el método de Hidrodestilación empleando una trampa tipo Clevenger.

Este método es prescrito por la Farmacopea Europea, 2005 (Eur Ph, siglas en inglés) y consiste en usar el equipo de destilación que aparece en la Figura 2.1 (Llamado Trampa de tipo Clevenger). La extracción se realizó pesando aproximadamente 56gr. del material vegetal cada vez, adicionando una cantidad de agua destilada que garantizara cubrir totalmente la planta y hasta obtener un volumen constante de aceite (5 horas).

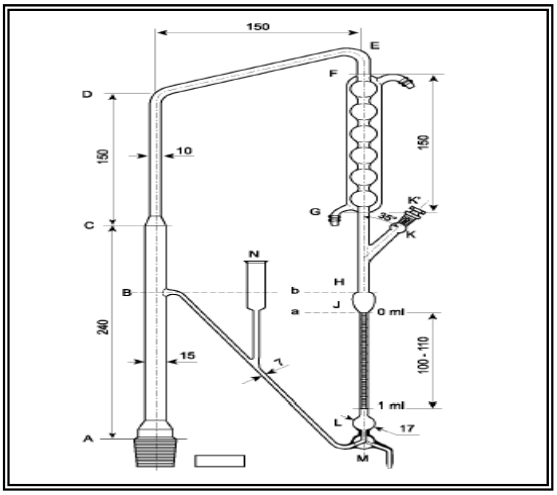


Figura 2.1. Equipo de destilación de aceite esencial (Trampa Clevenger).

- ✓ **Procedimiento**

El propio equipo de destilación permitió determinar el contenido de aceite en la planta, lo que constituye el método oficial en todas las farmacopeas vigentes para esta finalidad (Farmacopea Europea, 2005). Se basa en efectuar una hidrodestilación de un peso conocido de material vegetal y recoger el aceite esencial en un tubo graduado (1 ml dividido en 0,01 ml) que se encuentra en un colector de destilación especialmente diseñado para este tipo de análisis. El colector se acopla a un matraz que contiene el material vegetal y un cierto volumen de agua, el cual se calienta mediante una manta calefactora de potencia regulable para provocar la destilación. Tras la destilación, podemos medir el volumen de esencia destilado y fácilmente calcular el contenido, que se expresa en porcentaje volumen/peso (ml de aceite esencial por 100 g de material vegetal).

Aunque este equipo está universalmente aceptado, y está citado salvo mínimas variaciones, por casi todas las normas existentes sobre extracción de esencias, conviene tener en cuenta que los resultados que se obtienen con el mismo no siempre puede extrapolarse a un proceso realizado a escala industrial. Pero si se quiere utilizar la información obtenida del equipo siempre es conveniente ensayar previamente en una escala intermedia o piloto, para confirmar los resultados en escala de laboratorio y así poder extrapolar a escala industrial. Finalmente, debe considerarse que el proceso que se realiza en esta trampa, es más un proceso de cohobación que de destilación simple, pues el agua condensada en el refrigerante vuelve al matraz o balón extractor, por lo que permite hacer una extracción más exhaustiva de los componentes hidrosolubles (Bandoni, 2000).

2.2.2. Determinación del contenido de aceite en las hojas del *Piper angustifolium.*

Antes de proceder a realizar la determinación del rendimiento de aceite fue necesario determinar el contenido de agua en el material vegetal, lo que permitió realizar la determinación del rendimiento en base a droga seca.

- **Determinación del contenido de agua en la planta por el método del tolueno.**

Aparato. El aparato (figura. 2. 2.) Está formado por un matraz de vidrio (*A*) unido por un tubo de conexión (*D*) a un tubo cilíndrico de condensación (*B*) con un tubo colector graduado (*E*). El refrigerante está situado sobre el tubo cilíndrico (*B*). El tuvo colector (*E*) está graduado en 0,1 ml. La fuente de calor que debe utilizarse preferentemente es un calentador eléctrico regulado por un reóstato o un baño de aceite. La parte superior del matraz y el tubo de conexión pueden estar aislados.

Procedimiento. Limpiar el tubo colector y el refrigerante del aparato, enjuagar cuidadosamente con agua y después secar. En el matraz seco introducir 200 ml de *tolueno R* y aproximadamente 2 ml de agua. Destilar durante 2 h, dejar enfriar durante 30 min. Aproximadamente y leer el volumen de agua con una aproximación de 0,05 ml (V_1). A continuación introducir en el matraz la cantidad de sustancia a examinar, 10 g, pesada con una aproximación del 1 por ciento, que pueda contener de 2 ml a 3 ml de agua aproximadamente. Si se trata de una sustancia pastosa, pesarla en una navecilla

constituida por una lámina de metal. Calentar suavemente el matraz durante 15 minutos en presencia de algunos trozos de material poroso para asegurar una ebullición regular. Cuando el tolueno empieza a hervir, destilar a la velocidad de aproximadamente dos gotas por segundo, hasta que se haya arrastrado la mayor parte del agua, seguidamente aumentar la velocidad de destilación hasta 4 gotas por segundo. Cuando toda el agua ha sido arrastrada, enjuagar el interior del tubo refrigerante con *tolueno R*. Continuar la destilación durante 5 min. , parar la calefacción y dejar enfriar el tubo colector hasta temperatura ambiente. Hacer caer cualquier gota de agua adherida todavía a la pared del tubo. Cuando el agua y el tolueno se hayan separado, leer el volumen final del agua (V_2) y calcular en porcentaje la concentración en agua de la sustancia a examinar (H) a partir de la siguiente relación:

$$H = \frac{V_2 - V_1}{m} \times 100 \quad (\%)\ v/p$$

Donde: m masa de la porción de ensayo (g)= 10 g

100 factor matemático para los cálculos.

V_2 volumen de agua final (mL)

V_1 volumen de agua inicial (mL)

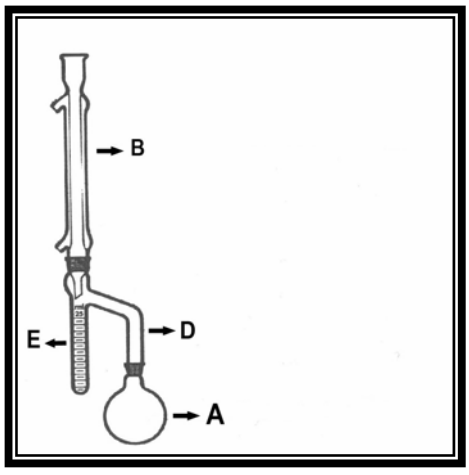


Figura 2.2. Equipo de arrastre con vapor (método del tolueno).

- **Determinación del contenido de aceite.**

Tras la destilación, se midió el volumen de esencia destilado y se calculó el contenido, que se expresó en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100 g de material vegetal) en base a la droga seca.

En el caso de la trampa Clevenger el aceite esencial es recogido en un tubo graduado que posee el equipo (1 mL dividido en 0,01mL) que se encuentra en un colector de destilación especialmente diseñado para este tipo de análisis.

$$R = \frac{C}{M} \times 100$$

Donde: **R** es rendimiento de aceite esencial en %.

C es cantidad de aceite esencial obtenida en mL.

M es masa de la droga sin humedad residual en gramos, que se calcula:

Donde: **H** es humedad de la droga en %.

$\mathbf{M_0}$ es cantidad de planta sometida a hidrodestilación en gramos.

100 factor matemático.

$$M = \frac{M_0 \times (100 - H)}{100}$$

2.3. Determinación del Índice de calidad del aceite.

El índice de calidad del aceite fue seleccionado teniendo en cuenta los incluidos en las monografías de control de la calidad de aceites esenciales reportados en la Farmacopea Europea (European pharmacopeia 2005), estos incluyen: características organolépticas, espectro ultravioleta (UV), espectro infrarrojo (IR), índice de refracción, densidad relativa, índice de acidez e índice de fenoles (Bandoni, 2000). A continuación se exponen los procedimientos de trabajo para cada ensayo.

2.3.1. Características Organolépticas: Para determinar el color y la apariencia se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco, se llenó hasta las ¾ partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

2.3.2. Densidad Relativa: d_{20} de una sustancia es la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a 20 ^{0}C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Determinar la densidad relativa d_{20} con el número de decimales indicados en la monografía, con la ayuda de un picnómetro, de una balanza hidrostática o de un areómetro, sin tener en cuenta el efecto del empuje del aire en el momento de la pesada, lo que puede introducir un error de una unidad en la tercera cifra decimal.

Se determinó por la relación entre la masa de 1mL del aceite a 20 ^{0}C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Las mediciones se realizaron por duplicado con una diferencia máxima entre las mismas de 0,002, y se calculó el promedio. Como las determinaciones no se hicieron a 20 ^{0}C se empleó la fórmula para la corrección:

$$d_{20}^{20} = d_{20}^{t} + f\,(t - 20)$$

Donde: d_{20}^{t} densidad relativa a la temperatura de medición

t temperatura de la medición en ^{0}C.

f factor de corrección (0,0008)

2.3.3. Índice de Saponificación: Se introdujo 0.5gr del aceite en un matraz de vidrio borosilicatado de 250ml y acoplado a un condensador a reflujo .Se añadió 6ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5mol/L .Se acopló un condensador y se calentó a reflujo durante 1hora. Luego se añadió 0.25ml de disolución de fenolftaleína y se valoro inmediatamente (mientras esté caliente) con HCL, 5mol/L ($n_1$mlde HCL, 5mol/L) .Se realizó un ensayo en blanco en las mismas condiciones ($n_1$ml de HCL, 5mol/L), siendo M la masa de la sustancia a examinar en gramos, se calculó el índice de saponificación por la siguiente expresión:

$$I_S = \frac{28{,}05\,(n_1 - n_2)}{M}$$

2.3.4. Índice de Refracción: Se realizó en un refractómetro de Abbe. Se limpiaron los prismas cuidadosamente utilizando una solución de alcohol-éter etílico 50 % v/v. Con un capilar de vidrio se colocó en el prisma fijo, sin tocarlo, 1 ó 2 gotas de la muestra de ensayo. Se cerró el doble prisma y se esperaron unos minutos antes de efectuar la lectura, hasta que la temperatura fue estable. Se realizaron tres mediciones y se calculó el promedio de las mismas, observando que estas no diferían en más de 0,002. Los refractómetros habituales determinan el ángulo límite. La parte esencial de estos instrumentos es el prisma de índice de refracción conocido, que se pone en contacto con el líquido a examinar. Si se trabaja con luz blanca el refractómetro está provisto de un sistema de compensación. El aparato da la lectura con una exactitud de al menos la tercera cifra decimal y posee un dispositivo que permite trabajar a la temperatura prescrita. El termómetro permite una lectura con una aproximación de 0,5 ^{0}C o inferior.

2.3.5. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos en el aceite esencial.

El contenido total de compuestos fenólicos en el aceite esencial del *Piper angustifolium* fue determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteau, expresado como Pirogalol, compuesto fenólico empleado como estándar referido al utilizar la curva de calibración del mismo.

Desarrollo de la técnica.

La determinación del contenido de compuestos fenólicos en el aceite esencial fue determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteau, de acuerdo con el procedimiento descrito por Nurmi y col. (1996). Para ello a 100 µl de la muestra (25 µl de aceite esencial y 75 µl de acetona) se le adicionó 200 µl de reactivo de Folin – Ciocalteau, 2 ml de agua y 1 mL de solución de carbonato de sodio al 15 %, la lectura de la absorbancia a 765 nm se realizó después de transcurridos 30 minutos de reacción. La curva de calibración se preparó empleando pirogalol como sustancia patrón en el rango de concentraciones de 100 a 500 mg /L. El contenido de fenoles totales del aceite esencial se expresó en mg pirogalol/100 mL. Se realizaron 3 réplicas.

2.3.6. Espectro Ultra Violeta (UV): A 0,05 g de la sustancia a examinar, se le añadió ciclohexano y se diluyó hasta 50,0 ml con el mismo disolvente. Se desarrolló el espectro de absorción en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 200 y 400 nm.

2.3.7. Espectro Infrarrojo (IR): Se desarrolló el espectro IR en el intervalo comprendido entre 500 y 4000 cm^{-1}.

2.3.8. Perfil Cromatográfico del Aceite.

El perfil cromatográfico del aceite se realizó empleando la Cromatografía de Gases siguiendo el siguiente procedimiento:

Disolución problema: Se preparó una dilución del aceite en acetona (10 µL /1000 µL).

Disoluciones de referencia: Fueron probadas sustancias de referencias, que constituyen componentes comunes reportados para la planta en estudio y múltiples aceites esenciales: Timol, Carvacrol, Cineol, Eugenol, Mentol, α-Pineno, Salicilato de Metilo, δ-Terpineno, Cumarina, Ciclohexano, Alcanfor, G- terpinene, Anisaldehido, Acetaldehído.

Todas las sustancias de referencias fueron preparadas en acetona en la proporción 10µg \ 1000µL.

La cromatografía se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

- ✓ Columna capilar de Sílice fundida de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno, manteniendo la temperatura de la columna a 60 ^{0}C durante 1 minutos, luego aumentándola a una velocidad de 5 ^{0}C por minuto hasta 120 ^{0}C y manteniéndola a 120 ^{0}C durante 50 min.
- ✓ Nitrógeno para cromatografía R como gas portador.
- ✓ Detector de ionización en llama: 280 ^{0}C.
- ✓ Temperatura del inyector: 180^{0}C.

Inyectar aproximadamente 1 µL de la disolución de referencia y la muestra problema. Cuando los cromatogramas se registran en las condiciones indicadas, los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la disolución de referencia. Registrar los tiempos de retención de estas sustancias.

Capítulo III. Análisis y discusión de los resultados.

3.1. Determinación del contenido de aceite en las hojas del *Piper angustifolium*

Para la extracción se empleó el método de hidrodestilación, que consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de la planta, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, es posteriormente separado. Se estableció el tiempo total de destilación como 5 horas para la planta, teniendo en cuenta que a partir del mismo no ocurre ningún aporte de aceite en el tubo graduado (1mL dividido en 0,01 ml) que se encuentra en el colector de destilación especialmente diseñado para recoger y medir el aceite.

Para la determinación del contenido de aceite en las hojas se empleó el mismo equipo utilizado en la extracción. El uso de este equipo (también llamado trampa de tipo Clevenger) está universalmente aceptado, y está citado, salvo mínimas variaciones, por casi todas las normas existentes sobre extracción de aceites para realizar la determinación (en porcentaje) de la cantidad de aceite esencial presente en la planta. El resultado es el promedio de tres determinaciones. Esta determinación en la planta se realizó en base al material seco lo que implicó determinar previamente el porcentaje de humedad en el material vegetal, para lo que se empleó el método recomendado para las plantas aromáticas (Bandoni, 2000), el método azeotrópico de destilación con tolueno, con el cual se obtuvo que las hojas del *Piper angustifolium* tenían un contenido de humedad de 7%.

En la planta estudiada el contenido de aceite que se obtuvo en las hojas fue de 2,04%. Este valor no se encuentra reportado en la bibliografía consultada de la planta por lo que no fue posible compararlo y por tanto el mismo constituye un aporte del presente trabajo. Es conveniente tener en cuenta que los resultados que se obtienen aplicando esta técnica no siempre puede extrapolarse a un proceso realizado a escala industrial. Por lo que, si se quiere utilizar la información obtenida del equipo, siempre es conveniente ensayar previamente en una escala intermedia o piloto, para confirmar los resultados obtenidos a escala de laboratorio y así poder extrapolarlos a escala industrial (Bandoni, 2000).

3.2. Índice de calidad del aceite esencial *Piper angustifolium.*

3.2.1. Las Características Organolépticas se determinaron por simple observación: es un líquido traslúcido, ligeramente amarillo, de olor característico de la planta.

3.2.2. La Densidad Relativa obtenida para el aceite se muestra en la Tabla 3.1. Es el resultado de tres determinaciones. Dicho valor se encuentra muy cerca de 1 para el aceite, lo que coincide con lo reportado en la literatura para la mayoría de los aceites esenciales, Bandoni, (2000) afirma que la mayoría de estos compuestos muestran este comportamiento (densidad menor que el agua) y solo excepciones superan este valor.

3.2.3. El Índice de Refracción del aceite obtenido de la planta se relaciona en la Tabla 3.1**.** Este valor constituye el promedio de tres determinaciones. El valor de este parámetro no aparece informado en la literatura y tiene interés para detectar adulteraciones y envejecimiento y sus principales ventajas son la rapidez y sencillez con que se pueden obtener. Además, pudiera ser la técnica de elección para el seguimiento de procesos extractivos o de fraccionamiento del aceite, cuando no se dispone de un cromatógrafo.

3.2.4. El Índice de Saponificación de este aceite, recogido en la Tabla 3.1 permitió conocer la presencia de ácidos grasos en el mismo, por el alto valor obtenido para este índice.

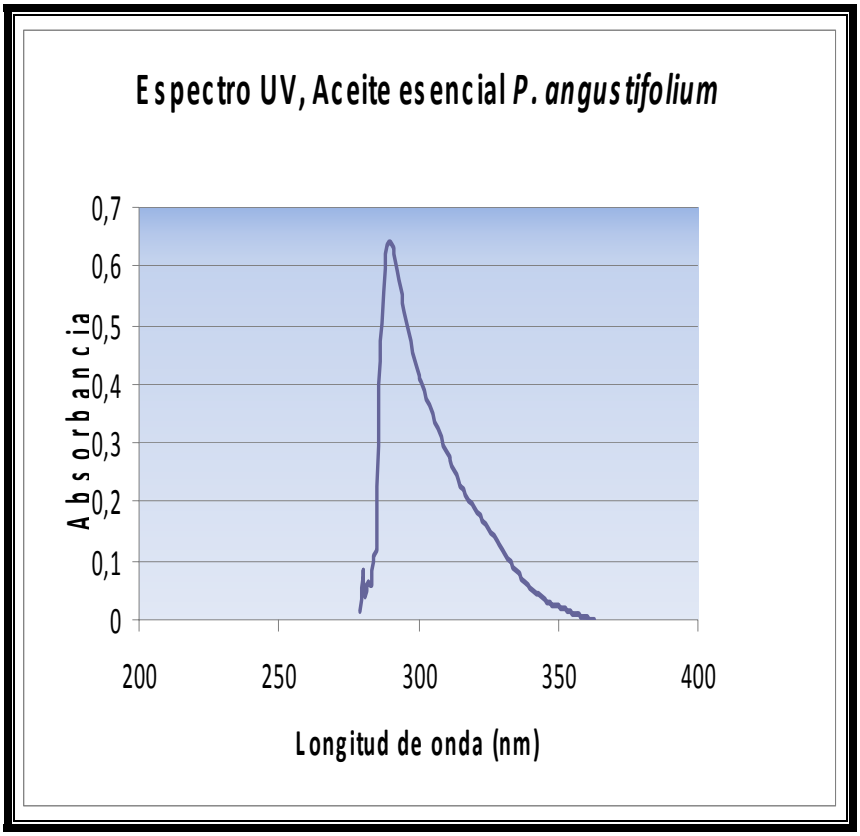
Tabla 3.1. Valores obtenidos para el índice de calidad.

Planta	Densidad[1]	I. Refracción[1]	I. Saponificación
Piper angustifolium	**0,889**	**1,4880**	**39.27**

[1] Valores promedio de tres determinaciones

3.2.5. Espectros Ultra Violeta del aceite

Los espectro UV del aceite aparecen reflejado en la Figura 3.1, en la cual se observa la presencia de una banda en la zona de los 290 nm que indica la existencia de insaturaciones o grupos funcionales con pares de electrones libres, que son capaces de conjugarse con dichas insaturaciones como los grupos carbonilo (COOH), nitro (NO_2), entre otros.



B: Piper angustifolium (λmáx. = 290 nm)

Figura 3.1. Espectro UV del aceite esencial de *Piper angustifolium*.

3.2.6. Espectro IR del aceite.

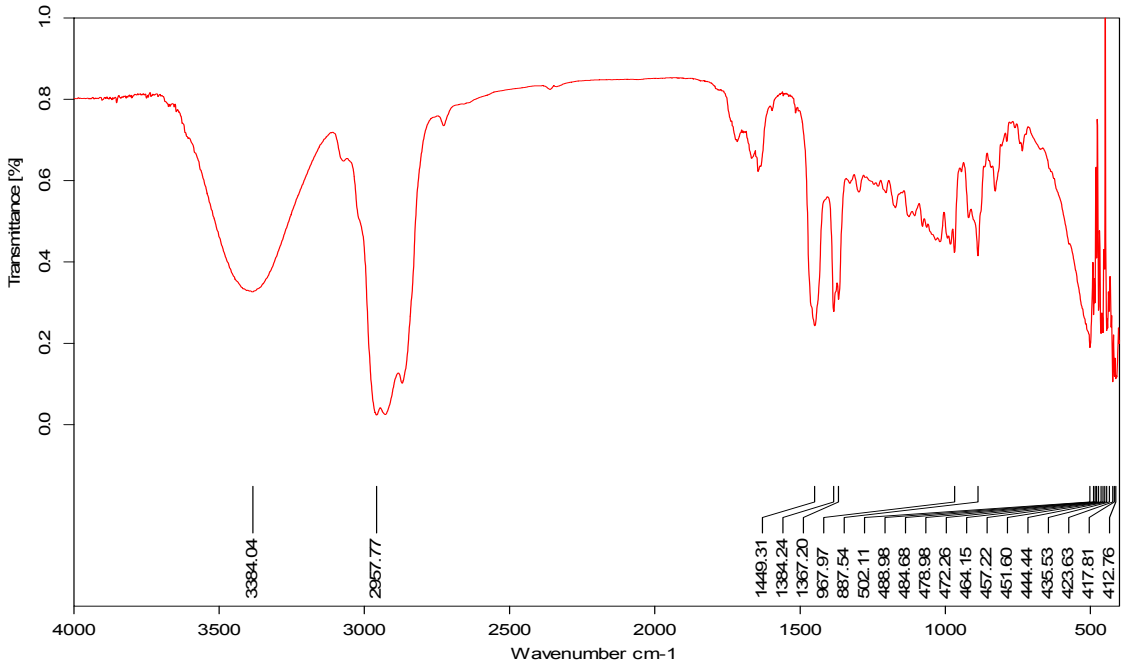


Figura 3.2. Espectro infrarrojo del aceite esencial *Piper angustifolium***.**

La Figura 3.2 muestra el espectro IR del aceite, en el mismo se muestra una banda ancha a 2952 que muestra la presencia de hidrocarburos saturados, mientras que la banda correspondiente a 3384 cm^{-1} muestra la presencia de H_2O probablemente de humedad existente en las pastillas o en el propio aceite. Es importante señalar que la información que aporta el espectro IR es muy limita al tratarse de compuestos con una variada composición.

3.2.7. Perfil Cromatográfico del aceite utilizando Cromatografía de Gases (GC).

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

El perfil cromatográfico de un aceite esencial constituye uno de los ensayos que conforman la monografía analítica de control de calidad del mismo y tienen como objetivo identificar los principales componentes presentes en el aceite. Para proponer dicho perfil se seleccionaron las condiciones cromatográficas reportadas en las Farmacopeas actuales (Farmacopea europea 2005), con ligeras modificaciones, las que permitieron una separación adecuada de los distintos picos obtenidos en el cromatograma del aceite. En el presente trabajo, se utilizó como fase móvil el Nitrógeno. El uso de un modo isocrático a 120^{0}C durante 50 minutos permitió lograr una buena separación de los diferentes picos obtenidos en el cromatograma (Figura 3.3, Tabla 3.2).

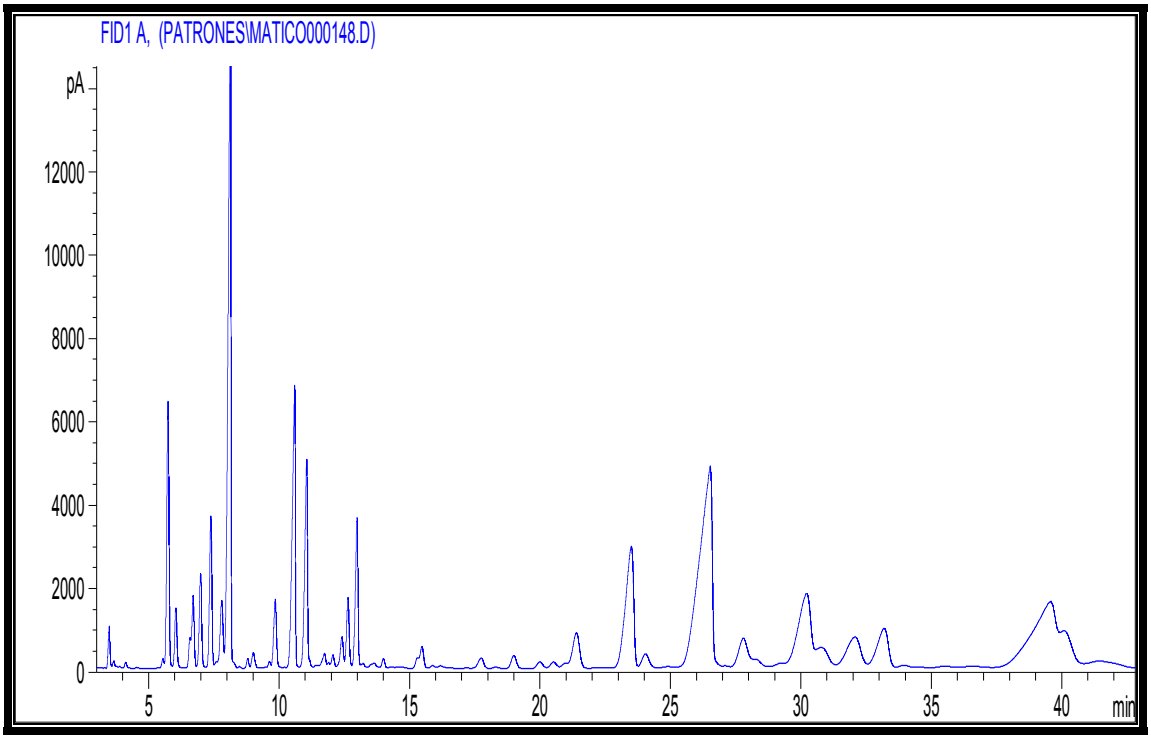


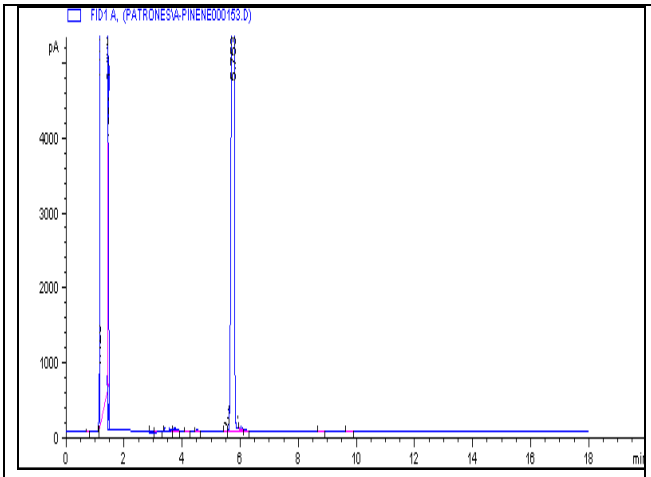
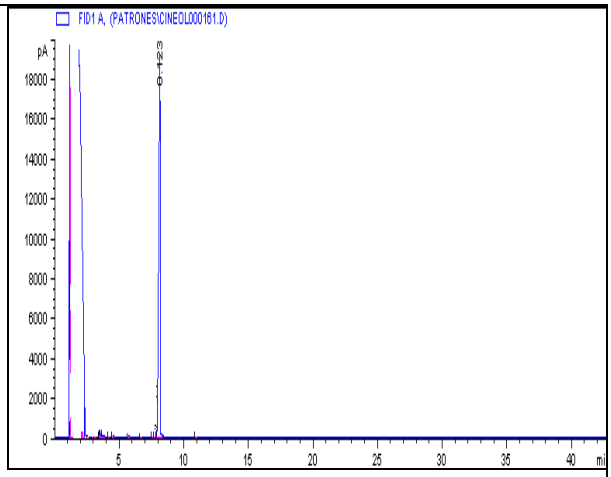
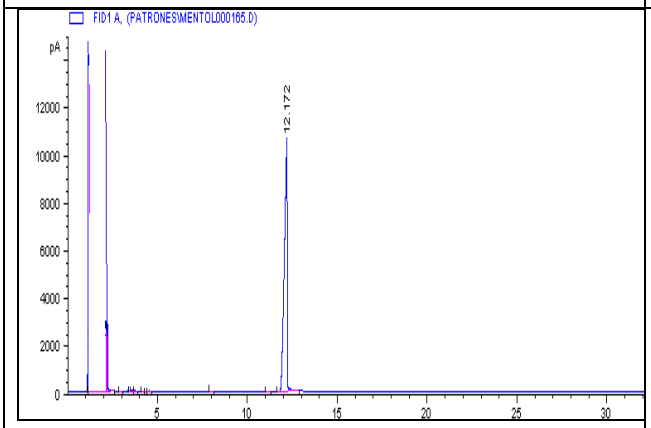
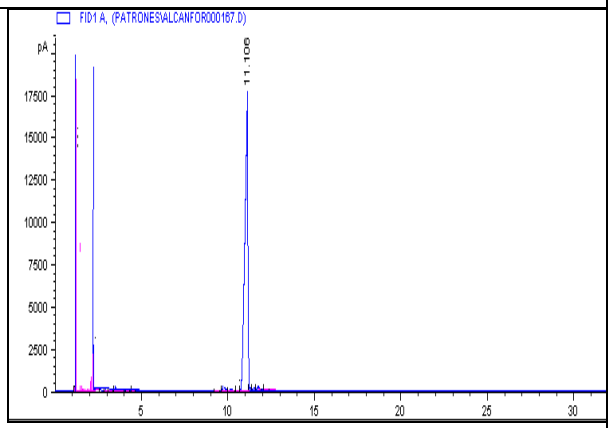
Figura 3.3. Cromatograma del aceite esencial *Piper angustifolium (Matico).*

Tabla 3.2. Valores de los tiempos de retención de los picos correspondientes a los cromatogramas, realizado al aceite esencial *Piper angustifolium* con la técnica de Cromatogafía de Gases (GC).

Piper angustifolium	
t. retención	**% área relativa**
5.73	3.49
6.03	0.80
6.69	1.01
6.98	1.38
7.37	2.18
7.79	1.23
8.12	11.42
9.85	1.16
10.60	5.24
11.06	3.49
12.64	1.09
12.99	2.40
21.40	1.52
23.50	5.96
26.52	15.64
30.23	6.18
30.77	1.38
39.57	9.57

Con el objetivo de identificar los principales picos en el cromatograma obtenido y teniendo en cuenta que la composición química de un aceite esencial incluye una variedad y cantidad muy grande de componentes (aldehídos de cadena corta, hidrocarburos, terpenos, sesquiterpenos, etc.) se realizó una selección de compuestos orgánicos que abundan frecuentemente en los aceites. Para ello se tuvo en cuenta la composición química reportada en la literatura para aceites esenciales y la disponibilidad del posible patrón. Lo anterior permitió probar 17 compuestos orgánicos: Timol, Carvacrol, 1,8 cineol, Eugenol, Mentol, α-Pineno, Salicilato de Metilo, Cineol, Coumarina, anisaldehido, acetaldehído, ciclohexano, G-terpinene, Isobutaldehído, Benzoato de Bencilo, Benzaldehído y Alcanfor. Al comparar los tiempos de retención de

cada patrón con los tiempos de retención de los picos obtenidos en el cromatograma obtenido se obtuvo para el aceite una coincidencia en los pico con los patrones siguientes: **A:** α-pinene**, B:** 1,8 cineol, **C:** mentol, **D:** alcanfor, **E:** acetaldehído, **F:** benzoato de bencilo y **G:** eugenol (Figuras 3.4. A, B, C, D, E, F y G), resultados que tampoco están reportados en la literatura**.**

<table>
<tr>
<td> 
</td>
<td> 
</td>
</tr>
<tr>
<td>A:α-Pinene (tr=5.75 min)</td>
<td>B:1,8-Cineol (tr=8.12 min)</td>
</tr>
<tr>
<td> 
</td>
<td> 
</td>
</tr>
<tr>
<td>C:mentol(tr=`12.17 min)</td>
<td>D:alcanfor (tr=`11.10 min)</td>
</tr>
</table>

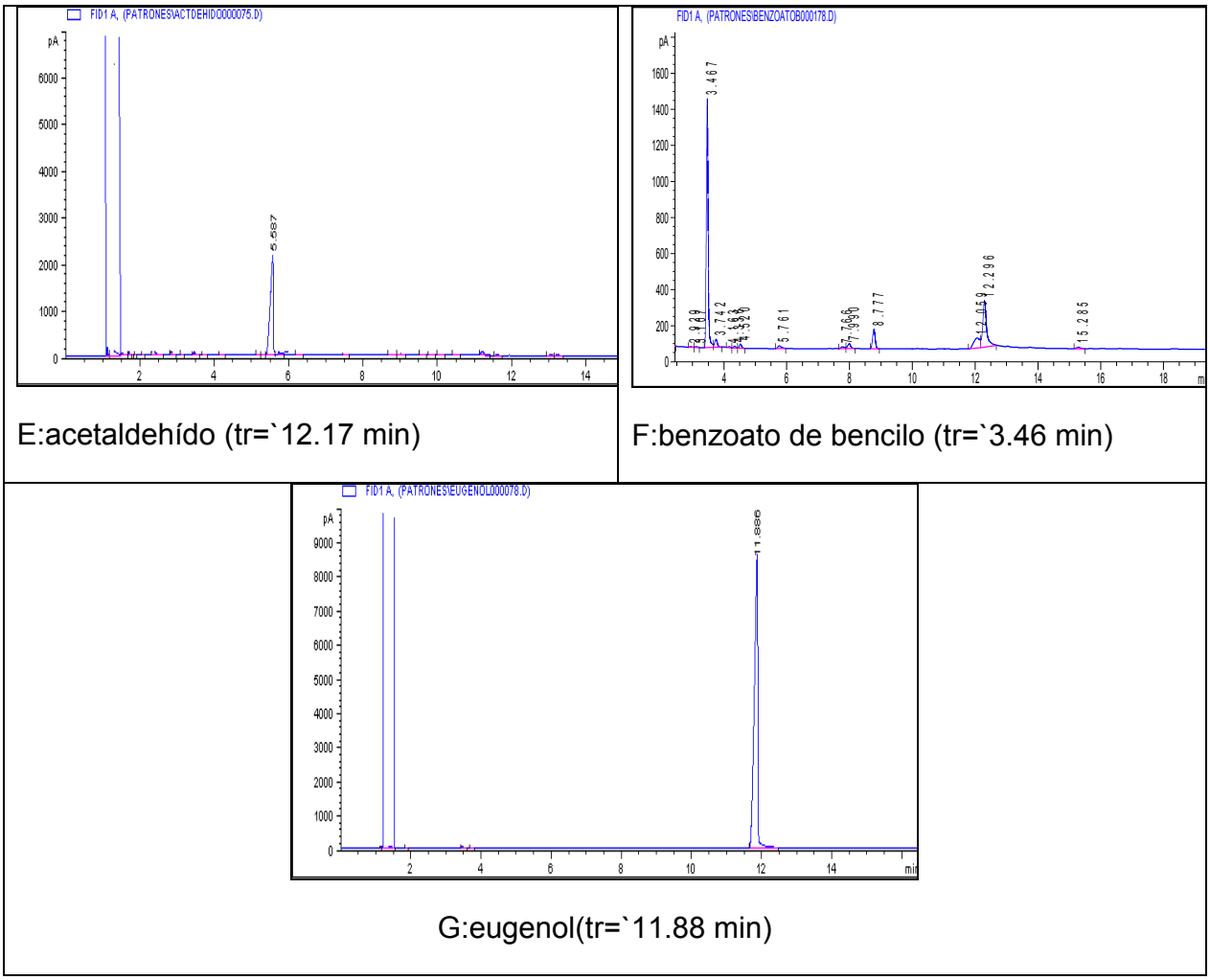


Figura 3.4. Cromatogramas correspondiente a los patrones que poseen coincidencia con los picos obtenidos en el cromatograma correspondiente al *P. angustifolium*.

3.3. Determinación del contenido de fenoles totales en el aceite esencial.

El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del pirogalol (Figura 3.5). El contenido total de compuestos fenólicos obtenido para el aceite *P. angustifolium* fue de 128,04 µg equivalentes a pirogalol /mg de aceite esencial. Este valor resulta de gran importancia al valorar la actividad antioxidante del aceite esencial ya que un gran número de trabajos reportados refieren que la misma posee una relación directa con la presencia en estos compuestos en la fuente natural.

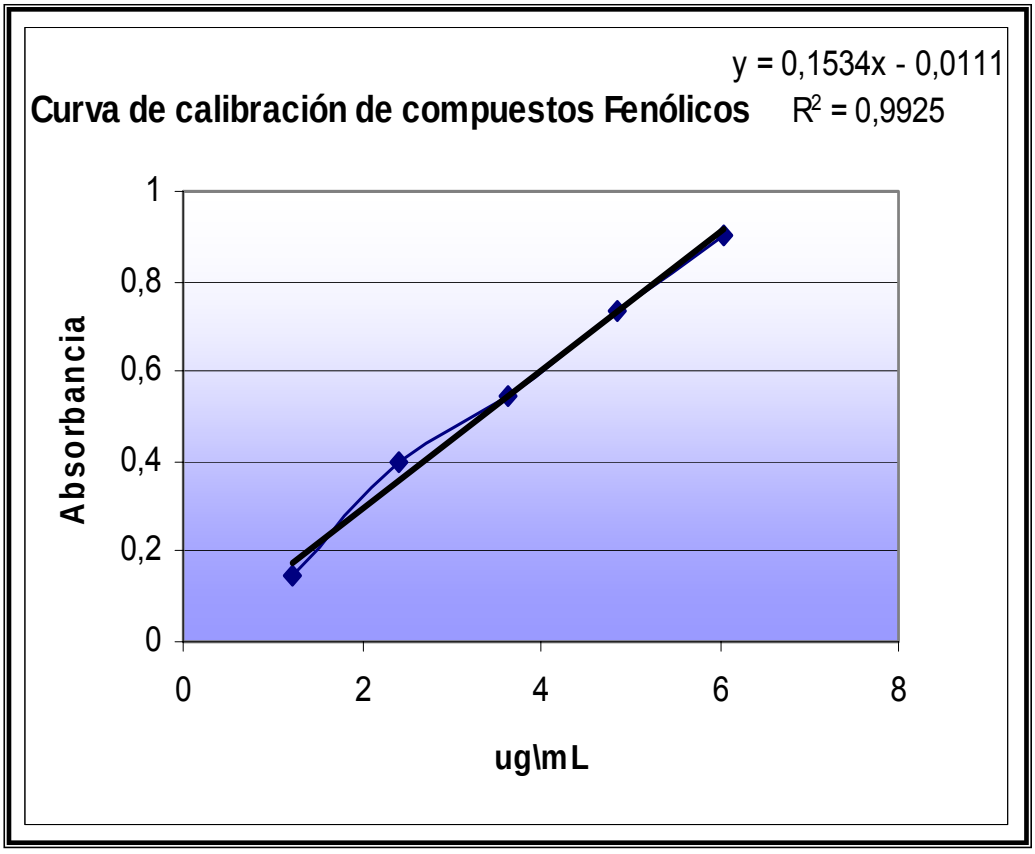


Figura 3.5 Curva de calibración del Pirogalol, para la determinación del contenido de compuestos fenólicos.

Entre estos reportes Singh y col. (2008) enfatizan que el grupo fenólico juega un rol importante en esta actividad, mientras que Silva y col. (2000) y Lu y Foo (1995; 2001) reportaron que la mayoría de los compuestos antioxidantes naturales ofrecen un sinergismo entre ellos para producir un espectro abierto de propiedades antioxidantes que crea un sistema de defensa efectivo contra radicales libres. Por lo tanto en el presente trabajo la presencia de compuestos fenólicos en el aceite estudiado puede ser la causa de la actividad antioxidante que se evalúa, sin descartar que esta actividad podría ser debida, además, al efecto sinérgico de dos o más compuestos presentes en el aceite que consiste en una compleja mezcla de compuestos orgánicos los cuales podrían producir su efecto sinérgico o antagónico en el proceso de oxidación lipídica.

Conclusiones

1. La determinación del contenido de aceite esencial en las hojas de *Piper angustifolium* L., aplicando la técnica de hidrodestilación, aportó un 2.04 %.
2. Los parámetros de calidad del aceite, evaluados a través de los índices cualitativos establecidos en las Farmacopeas vigentes, resultaron aceptables para este tipo de muestra según la literatura.
3. El contenido fenólico, determinado por la técnica de Folin-Ciocalteau en el aceite, justifica la acción antioxidante moderada encontrada en los ensayos realizados.

Recomendaciones

1. Determinar la composición del aceite esencial *Piper angustifolium*, empleando técnicas de caracterización (GC/MS), con vistas a relacionar sus componentes con las acciones farmacológicas que se estudien.
2. Realizar ensayos antioxidantes *in vitro*, que permitan llegar a conclusiones definitorias con respecto a esta actividad.

BIBLIOGRAFIA

Akerele, O. (1987). The best of Both Worlds: Bringing Traditional Medicine up to date. Soc. *Sci. Med,* 24, 177-181.

Aqil, F., Ahmad, I. y Mehmood, Z. (2006). Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medicinal Plants. Turk J Biol, 30, 177-183.

Arroyo, J., Raez, J. y Bonilla, P. (2003). Efecto del jabón con *Piper angustifolium* (matico) sobre la piel normal de conejos. Folia Dermatol, 14, 224-28.

Aruoma, O. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. New York: Mutation Res.

Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata: Universidad.

Barquero, A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química Viva,* 2, 53.

Benzie, I. y Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70 – 76.

Berdonces, J. L. (1995). Principios activos y preparaciones farmacéuticas. Natura medicatrix, 50, 37– 53.

Bernard, C.B. y CHauret, D. (1995). Insecticidal defences of piperaceae from the neotropics. Journal of Chemical Ecology, 6, 801-811.

BIlbo**.** (2002). [WWW] http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla4.pdf

Bowers,W.S., Ortego, F., You,X. Q. y Evans,P. H. (1993). Insect repellents from the Chinese prickly ash Zanthoxylum bungeanum. Journal of natural products*,* 69, 35-38.

Brand, W. CUVELIER, M. E. BERSET, C**.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U*-Techno, 28, 25 – 30

Cañigueral, S., Arteche, A., Vanaclocha, B. y Guenechea, J. (1998). Fitoterapia: Concepto y límites. En Fitoterapia. Vademecum de Prescripción*.* Plantas Medicinales**:** (pp.123-125). Barcelona: Masson.

Cicció, J. y Ballestero, C. (1997). Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (piperácea) de Costa Rica. En International Journal of Tropical Biology and Conservation. (pp. 783-790). San José: ünica.

Cuellar, A. (1983). Química de los Fármacos Naturales. La Habana: Revolucionaria.

Dastmalchi, K. Dorman, D. Kosarb, M. y Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extract, LW. (t. 40). (pp. 239–248). New York: Mutation Res.

Davies, P**.** (2004). Plantas aromáticas y medicinales. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas, 11, 19.

Desmarchelier, C. y Ciccia, G. (1998). Antioxidantes de origen vegetal. Ciencia hoy, 8,32-34.

Diaz, P. P., Maldonado, E. y Ospina, E. (1984). Aceite esencial de *Piper* aduncum. Revista Latinoamericana de Química, 3, 136-138.

Dramou, P**.** (2008). Aceite obtenido a partir de las semillas de Cucúrbita moschata Duch: Monografía analítica y estudios de estabilidad. Santa Clara: UCLV.

Dudonné, S., VItrac, X., Coutiére, P., Woillez, M. y Morillon, J. M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRA, SOD, and ORAC Assays. En J Agric Food Chem. (pp. 1768 – 1774). New York: *Mutation Res*.

European Pharmacoppeia. (2005). Strasbourg. Paris: Council of Europe.

Fonc, H. (1986). Plantas medicinales y sus principios activos. Madrid: AELUZ.

Frankel, E.N. (1998). Lipid Oxidation. En The Oily Press, Dundee. (pp. 567).Montreal: UK.

Gómez, A. (1987). Descripción de malezas en plantaciones de café. Centro nacional de investigaciones del café CENICAFE. Caldas: Chichina.

González, R. y col 2007. Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana, Grasas y Aceites, 1, 5-9.

Guía terapéutica dispensarial de fitofármacos y apifármacos. (992). La Habana: Pueblo y Educación.

Gupta, M.P (1995). Plantas medicinales iberoamericanas. Santa Fé de Bogotá: CYTED-SECAB.

Halliwell, B. y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacologic, 142, 231-255.

Hortwitz, W. (2002). Peroxide value of oils and fats. AOAC official method 965.33. Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC International: Gaithersberg, MD. New York: Mutation Res.

http://www.pharma.unibas.ch/bio/4. research.php.pageno all.Plantas medicinales. (consultado en 11/2/09).

Huda, F.A., Noriham, A., Norrakiah, A.S. y Babji, A.S. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. African Journal of Biotechnology **,** 3, 484-489.

Kerdchoechuen, O**.** (2007). Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules, 8, 47-60.

Kim, D., Jeoung,S., y Lee, CH**.** (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry, 81, 321-326.

Koşar, M., DemircI, B., Demirci, F.y Başer, K.H. (2008). Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important Satureja species from Turkey: Satureja cuneifolia Ten. (Lamiaceae). J Agric Food Chem, 6, 60 - 65.

Lee, J., Koo, N. y Min, D.B**.** (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative utraceuticals. Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 21-33.

Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A. y Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. En *Anticancer Res.* (pp. 3293-3987). New York: Mutation Res.

Lopez, A., Hudson, J.B. y Towers, G.H. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. J Ethnopharmaco, 77, 189-196.

Lu, F.y Foo, L.Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenol from sage (Salvia officinalis). Food Chem, 75, 197–202.

Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L y Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. In Filippo imperato ed. Phytochemistry: Advances in Research. (pp.105 – 135). New York: Kerala.

Maia, J.G.S., Zohhbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos,A. S., Luz, A.I.R., Bastos, C.N y Da Silva, M. (1998). Constituents of the essential oil of Piper aduncum L. Growing wild in the Amazon region. Flavour and Fragrance (pp.269-272). New York: Mutation Res.

Martínez, G., Delgado, R., Garrido, G., Guevara, M., Pérez, G., Candelario, E., León, O.S., Rastrelli, L., Morales, M.A., García, D., GII del valle, L., Díaz de la Rocha, A., Pérez, J., Paéz, E. y Núñez, A.J. (2003). Mitos y realidades de la terpia antioxidante. VIMANG nuevo producto natural antioxidante. La Habana: Academia.

Maure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., SIneiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M.J. y Parajo, J. C.(2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chem, 72, 145-171.

Mayne, S.T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure andoxidative stress status in epidemiologic research. New York: Mutation Res.

Meireles, A. (2009). Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications. Dublin Irlanda: CRC Press.

Morin, J. y Bastide, P. (1983). Aromatherapy. Londres: Pharmacie Hospitaliere Francaise.

Navarro, C. (2000). Uso racional de las Plantas Medicinales. Madrid: Pharmaceutical Care, 2, 9-19

Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteo, M., Caceres, A. ,Morales, C. y Berger, I. (2003). Faculty of Pharmacy. Granada: University.

Nurmi, K., Ossipov, V., Haukioja, E. y Pihlaja, K. (1996). Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics. En foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa).* (pp. 2023 – 2040). New York: Mutation Res.

OMS. (2008). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines. Madrid: Pharmaceutical Care.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications; CRC Press, Woodhead Publishing Limited. Londres: Cambridge.

Prior, R.L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En *J Agric Food Chem*. (pp. 4290 – 4302). Londres: Cambridge.

Quert, R., Martínez, J. y Gelabert, F. (1998). Contenido de los aceites esenciales. Revista Cubana de Farmacia, 32, 63-66.

Ramos, S. Alia, M. Bravo, L. y Goya, L. (2005). Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). En J Agric Food Chem. (pp. 1271-1280). Granada: University.

Ranilla, L.G. Kwon, Y.I. Apotolidis, E. y Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America, 12, 76-89.

Raven, PH., Evert, R.F. y Eichhorn, S. E. (1999). Biology of Plants. New York: Freeman.

Reddy, S. V. Srinivas, P. V. y Praveen, B. (2004). Antibacterial constituents from the berries of Piper nigrum. Phytomedicine. (pp. 697-700). New York: Freeman.

Revalorización del uso de plantas medicinales en América. (*2002*). Boletín de plantas medicinales y aromáticas, 6, 38-41.

Robard, K., Prentzler, P.D.Tucker, G. Swatsitang, P. y Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem, 66, 401-436.

Salle, J.L. y Pelletier, J. (1991). Les huiles essentielles. Chicago : Frison. Roche.

Sánchez, C. y Larrauri, J.A. (1998). Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. FoodSci.Technol.Int, 6, 391-399.

Scherer, R. y TeixeirA, H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Chicago: Food Chemistry.

Schwarz, K , Bertelsen, G., Nissen, L., Gardner, P., Heinonem, M., Hopia, A., Huynht; Lambelet, P., Mcphail, D., Skibsted, L., y Tijburg, L. (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. Londres: Food Res.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. y Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. En Journal of Agriculture and Food Chemistry. (pp. 945–948). New York: Freeman.

Silva, F.A., Boryer, F., Guimaraes, C., Lima, J.L.., Matos, C. y Reis, C. (2000). Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. J. Agric. Food Chem. (p. 2122). Granada: University.

Singh, G., Kapoor, I.P., Singh, P., De Heluani, C.S., De Lampasona, M.P., Catalan, C.A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale. Food Chem Toxicol, 102, 95-302.

Singh,S. P., Rao, G.P., Upadhyaya, P. P.(1998). Fungitoxicity of essential oils of some aromatic plants against sugarcane pathogens. Sugar-Cane, 2, 14-17.

Skala, E. Kalemba, D., Wajs, A., Rozalski, M., Krajewska, U.,Rozalska, B. C., Wieckowska, M. y WysokinskA, H. (2007). Iin vitro propagation and chemical and biological studies of the essential oil of Salvia przewalskii Maxim**.** Z. Naturforsch, 62**,** 11-12.

Smith, M. D. (1996). A new protocol for antimicrobial testing of oils. Acta Horticult, 426, 31-37.

Su, S., Hua, Y., Duan, J., Shang, E., Tang, Y., Bao, X., Lu, Y. y DIng, A. (2008). Hypothesis of active components in volatile oil from a Chinese herb formulation, 'Shao-Fu-Zhu-Yu decoction', using GC-MS and chemometrics J Sep S*ci*, 31, 6-7.

Tabanca, N. Demirci, B., Crockett, S.L. y Baser, K.H. (2007). Chemical composition and antifungal activity of Arnica longifolia, Aster hesperius, and Chrysothamnus nauseosus essential oils. J Agric Food Chem. *(*pp. 84-305). Granada: University.

Vander, A. y Put, A. (1972). Plantas medicinales. Barcelona: Síntesis.

Vaya, J. y Aviram, M. (2001). Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. Curr. Med. Chem, 1, 99-117.

Wimalaratne, P.D. C., Slessor, K. N., Borden,J. H. Chong, L. J. y Abate,T .(1996)**.** Isolation and identification of house fly, Musca domestica L., repellents from pepper tree, Schinus molle L. Journal of chemical ecology, 1, 49-59.

Wood, J., Senthilmohan, S. y Peskin, A. (2001). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different PHS. En Food Chemistry. (155-161). Granada: University.

Yang, J. H., Mau, J. L., Ko, P.T. y Huang, L.Ch**.** (2000). Antioxidants properties of fermented soybean broth. New York: Freeman.

Yen, G. CH., Chang, Y. CH. y Su,y S.W. (2003). Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with Aspergillus candidus. Food Chemistry. New York: Freeman.

Yousefzadi, M. Sonboli, A., Karimic, F., Ebrahimi, S. N., Asghari, B. y Zeinalia, A. (2007). Antimicrobial activity of some Salvia species essential oils from Iran. En Z Naturforsch [C]. (pp. 514-618). Londres: Food Res.

Zhang, C. Lib, H. Yun, T. Fu, Y. Liu, C. y Neng, B**. (**2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of Tibetan herbal medicine Dracocephalum heterophyllum Benth. Nat Prod Res, 22, 11-11.

Zhang, Y. y Wang, Z. Z. (2007). Comparative analysis of essential oil components of three Phlomis species in Qinling Mountains of China. En Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (pp. 213-217). Londres: Food Res.