

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

EXTRACCIÓN, EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL Y LOS CONSTITUYENTES VOLÁTILES DE
LA PLANTA *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O

DAVID GUILLERMO PIEDRAHITA MÁRQUEZ

CODIGO: 200811140

ASESORES: Dra. CLARA QUIJANO

Dr. ANDREAS REIBER

BOGOTA D.C

10 DE DICIEMBRE DE 2012

CONTENIDO

I.	Introducción	Pag
	1.1 Antecedentes	5
	1.2 Justificación	7
	1.3 Marco Teórico	8
	1.3.1 Aceites esenciales	8
	1.3.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	9
	1.3.3 Método de extracción y equipo de hidrodestilación (HD)	11
	1.3.4 Método y equipo para Destilación Extracción Simultánea (DES) para obtención de volátiles.	12
	1.3.5 Equipo concentrador para el extracto obtenido por DES	13
	1.3.6 Cálculo de los Indices de Kovats	14
II	Objetivos	14
	2.1 Objetivos generales	14
	2.2 Objetivos específicos	14
III	Materiales y métodos	16
	3.1 Recolección de muestras	16
	3.2 Extracción del aceite esencial por hidrodestilación	16
	3.3 Extracción de volátiles por Destilación-Extracción Simultáneas (DES)	17
	3.4 Determinaciones fisicoquímicas: Índice de refracción (IR), Densidad (d) e Índice de acidez (IA)	17
	3.5 Condiciones Cromatográficas	19
	3.5.1 Cromatografía Gases con detector de llama GC-FID	19
	3.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	20
	3.5.3 Identificación de compuestos y abundancia	20
	3.6 Estudio de actividad antimicrobiana del aceite esencial	20
IV	Resultados y Discusión	21
V	Conclusiones	41
VI	Referencias	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Rendimiento del proceso de extracción de los aceites esenciales de la planta <i>Myrica parvifolia</i>	22
Tabla 2	Valores promedio y manejo estadístico de las constantes físicas del aceite de <i>Myrica Parvifolia</i>	22
Tabla 3	Composición de los compuestos encontrados en el aceite de la <i>Myrica parvifolia</i> (Benth.) Parra-O para las hidrodestilaciones a un tiempo de 1, 2 y 3 horas respectivamente.	24
Tabla 4	Constituyentes mayoritarios del aceite en los tres tiempos de extracción	26
Tabla 5	Constituyentes volátiles de la <i>Myrica parvifolia</i> (Benth.) Parra-O y su porcentaje por DES	28
Tabla 6	Constituyentes mayoritarios del aceite en los tres tiempos de extracción	29
Tabla 7	Actividad antibacterial del aceite esencial de la planta <i>Myrica parvifolia</i> (Benth.) Parra-O	37

INDICE DE GRÁFICAS

Gráf. 1	Porcentaje de los compuestos identificados por grupo funcional a 1, 2 y 3 horas de extracción por hidrodestilación	26/27
Gráf. 2	Porcentaje de los compuestos identificados por grupo funcional en el extracto de volátiles obtenido por destilación-extracción simultáneas (DES)	30

INDICE DE FIGURAS

Fig.1	Hojas de la planta <i>Myrica parvifolia</i> (Benth.) Parra-O	6
Fig.2	Localización de los blancos celulares y mecanismos de acción en el proceso de acción de los aceites esenciales	10
Fig.3	Equipo empleado en el proceso de Hidrodestilación (HD)	12
Fig.4	Equipo empleado para la Destilación-Extracción simultáneas	13
Fig.5	Estructura de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial y el extracto proveniente de las hojas de la planta <i>Myrica parvifolia</i>	32
Fig. 6	Espectros de masas y fragmentación del α -zingibireno y α -pineno	33/34
Fig. 7	Ruta biosintética para la transformación del 5-farnesil difosfato a ar-curcumeno, β -bisaboleno y α -bisabolol	35
Fig. 8	Biosíntesis de α -zingibereno, ar-curcumeno y β -bisaboleno	36
Fig. 9	Resultados de pruebas antimicrobianas de <i>Staphylococcus aureus</i> CAMP	38
Fig. 10	Resultados de pruebas antimicrobianas en una cepa de <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	39

DEDICATORIA

A mis padres Guillermo Piedrahita Rozo y Lucrecia Cecilia Márquez Veloza quienes siempre han estado conmigo y gracias a ellos pude concluir satisfactoriamente mis estudios de pregrado. Igualmente a todos los miembros de mi familia (Hermano, abuelos, tíos y primos) nunca me faltó el apoyo económico, psicológico y moral, sin ello no hubiera podido culminar mis estudios como químico.

A mi asesora de tesis la doctora Clara Elizabeth Quijano Celis por su apoyo incondicional, por su paciencia y haberme enseñado varios aspectos útiles tanto para mi formación académica como para mi formación personal.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.

Colombia es un país con una gran diversidad en plantas aromáticas ricas en aceites esenciales alrededor de unas 45.000 plantas crecen en los diferentes pisos térmicos. En las últimas décadas, el estudio por la composición y bioactividad de los aceites esenciales ha tomado una gran importancia pero aún así, estos son insuficientes. Los aceites esenciales se pueden encontrar en diferentes partes de la planta: en hojas (cidrón, eucalipto, limoncillo, menta, romero entre otras), en el pericarpio de frutos cítricos (limón, naranja, mandarina), en semillas (anís, eneldo, comino, etc.), en flores (arrayán, manzanilla, rosas, lirio), en raíces como azafrán y en tallos como la canela (Martínez, 2003).

Alrededor de unas 60 familias, exhiben una riqueza en aceites esenciales entre las que se pueden encontrar las Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas y en especial algunas Miricáceas que se ubican en la cordillera de los Andes, se destacan especialmente por un aroma agradable, con un alto potencial desde el punto de vista industrial. Algunos estudios sobre plantas como la Miricáceas, se han orientado hacia el campo de la ecología química, otros científicos la recomiendan como contribuyentes importantes para la reforestación de suelos altamente erosionados y que contengan bajo contenido de nitrógeno (Aldana *et al.*, 2001), otras investigaciones se han orientado desde el punto de vista taxonómico del género *Morella* (Parra-O, 2002).

Acerca de las Miricáceas podemos encontrar un género conocido como *Myrica*, que comprende un gran número de arbustos y árboles caducifolios los cuales tienen una altura variable (de 1 a 20 m), pueden crecer en suelos con poco nitrógeno y poseen hojas simples en forma de espiral que van de 2 a 12 cm, (Vargas, 2012). las flores crecen como amentos, con estambres (2 a 22), el fruto en forma de drupa (globoso a ovoide), capaz de secretar una capa de cera que le brinda protección contra depredadores como aves, para quienes los frutos de esta planta no son digeribles (Parra-O., 2002).



Figura 1. Hojas de la planta *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O

Puede a su vez producir una amplia gama de constituyentes volátiles y metabolitos que se caracterizan por presentar una actividad biológica notoria, la cual protege la planta de posibles depredadores y algunos patógenos (Gentry, 1996).

Un ejemplo muy común y ampliamente estudiado es el de la planta *Myrica gale*, más conocida como Mirto de Brabante (Skene *et al.*, 2000). Estudios efectuados en esta *Miricaceae* (del hemisferio norte), muestran que las hojas, flores y frutos de esta planta presentan una mezcla compleja de terpenos, hidrocarburos, aldehídos; cetonas, alcoholes, ácidos y ésteres, que exhiben una inhibición de procesos oxidativos, combaten diversos microorganismos y hongos (Popovici *et al.*, 2008), repelen insectos e inclusive otros depredadores que se alimentan de estas plantas. El alto contenido de α -pineno, germacreno, 1,8-cineol y β -elemoneno, presentes en el aceite le permiten actuar contra las bacterias debido a que incide en la disrupción de la pared celular (Skene *et al.*, 2000).

Igualmente, se ha comprobado que sustancias identificadas en los aceites esenciales de esta planta como algunos sesquiterpenos, presentan una marcada actividad anticancerígena (Carlton *et al.*, 1992). Aparte de los compuestos mayoritarios mencionados anteriormente, podemos encontrar otros terpenoides como el limoneno, mirceno y 4-terpineol (Bélanger, 1997), que se caracterizan por presentar una actividad como repelente de animales herbívoros y parásitos, destacándose además por tener un alto grado de toxicidad contra los artrópodos y microorganismos de carácter patógeno (Skene *et al.*, 2000).

Otro caso similar al del mirto es el de la *Myrica esculenta* Buch; ésta planta crece en algunos países de Asia como India y Nepal. El aceite esencial es rico en alcoholes como el n-hexadecanol, ácidos alifáticos como el ácido palmítico y sesquiterpenos como el *cis-β*-cariofileno y el acetato de *α*-eudesmol, los cuales confieren a esta planta una actividad antimicrobiana contra bacterias como la *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli*, (Supriya *et al.*, 2012). también se menciona la marcada actividad antiinflamatoria, así como muestra una reparación excelente de tejidos dañados y se recomienda para aliviar diversas clases de reumatismos (Agnihotria *et al.*, 2012),.

No obstante, el caso más notorio es el de la *Myrica pubescens* Humb. & Bonpl. ex Willd, ésta planta desde hace 5 años es objeto de estudio de su aceite esencial y composición de volátiles por hidrodestilación (Sandoval *et al.*, 2010) y DES, gracias a las características interesantes del mismo. Los resultados de estos estudios, destacan como constituyentes mayoritarios al *trans*-cariofileno y al *β*-germacreno, como los responsables de las excelentes propiedades antimicrobianas y al *γ*-cadineno y los isómeros *α* y *β*-selineno con un marcado carácter antimalárico e insecticida (Arango *et al.*, 2009).

Para la extracción de compuestos volátiles de las hojas se han usado técnicas como: la hidrodestilación (HD), la destilación por arrastre con vapor, la destilación-extracción simultáneas (DES), la extracción con fluidos supercríticos (EFS), por microondas, la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) y algunas variantes a las técnicas mencionadas (Jaeson *et al.*, 2005).

1.2. Justificación

Debido a la biodiversidad de la flora que se encuentra en el territorio colombiano y lo poco valorada, se escogió la *Myrica parvilofia* por su exquisito aroma la cual puede ser una fuente de aceite esencial cuyas propiedades pueden llegar a tener uso en la industria farmacéutica (medicamentos), cosmecéutica (aromas y perfumes), nutracéutica (condimentos y saborizantes). Sin embargo no se cuenta con la información necesaria que

permita conocer el potencial que pueda tener esta planta. El presente estudio busca caracterizar la composición de volátiles y el perfil cromatográfico del aceite de *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O, de la Sabana de Bogotá, conocida como Cruz de Mayo, y contribuir al conocimiento de esta planta y su aceite esencial. Además determinar el valor de algunas propiedades de carácter fisicoquímico y actividad biológica del aceite contra algunos microorganismos, de esta forma se impulsaría la importancia el cultivo de la planta y su industrialización.

1.3. Marco Teórico

1.3.1. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales, son mezclas líquidas de lípidos apolares, lípidos, normalmente con coloración leve a incolora, presentan olor fuerte y una nota olfativa alta. Se componen principalmente de compuestos terpénicos (Aldana *et al.*, 2001) y sustancias de carácter aromático y alifático. Entre los compuestos más comunes que se pueden identificar en esta clase de aceites se encuentran los monoterpenos (C₁₀), los sesquiterpenos (C₁₅) y diterpenos (C₂₀). Estas mezclas se caracterizan por presentar composición variada como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, cumarinas, isómeros de fenil propanoides y algunos compuestos nitrogenados y azufrados (Dorman *et al.*, 2000).

Los aceites esenciales se han estudiado en hojas, semillas y troncos en cantidades cuantificables. El número de compuestos y su composición varía dependiendo de la familia a la que pertenece y de factores como la composición del suelo, la frecuencia de las lluvias y la edad de la planta. Los constituyentes mayoritarios no necesariamente presentan las mejores propiedades antibacterianas, sino que en muchos casos la bioactividad es mayor en los componentes a nivel de trazas (Ryman, 1995).

Los aceites esenciales presentan efecto alelopático, pueden ser capaces de proteger la planta contra agentes patógenos y depredadores, también pueden atraer insectos o repeler

otros no deseables. Además presentan propiedades antiparasitarias, antisépticas y antimicóticas, esto hace que los aceites tengan aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia, agrícola, en perfumería y en cosmetología, también son ampliamente usados en aromaterapia donde constituyen el 2% del mercado internacional. (Bakkali *et al.*, 2008).

Igualmente muchas plantas ricas en estos aceites se usan en la alimentación como es el caso del tomillo, laurel y orégano entre otros, que otorgan un sabor característico a los alimentos y en muchos casos se sintetizan para usar en la industria alimenticia (Burt, 2004).

1.3.2. Actividad Antimicrobiana de los aceites esenciales

Actualmente, diferentes investigadores están buscando nuevos compuestos con un espectro más amplio contra microorganismos, así como impulsar nuevas sustancias que mejoren las propiedades farmacológicas de medicamentos tradicionales (Knobloch *et al.*, 1989).

Los aceites esenciales se han propuesto como una alternativa a largo plazo respecto de los antibióticos y como aditivos en alimentos debido a que reducen los riesgos genotóxicos. Estas sustancias se caracterizan por su citotoxicidad, su fitotoxicidad y por la acción mutagénica que poseen contra virus, insectos y bacterias (Kalemba *et al.*, 2003). Esta mezcla lipídica es conocida por su actividad antimicrobiana, pese a que se tiene conocimiento de la capacidad bactericida, no se sabe con certeza el mecanismo de acción que permite la eliminación de las bacterias mediante el uso de aceites esenciales. De los estudios realizados hasta ahora no existe un mecanismo específico del modo como actúan los aceites esenciales en la célula, probablemente se debe al número y variedad de compuestos que conforman el aceite de acuerdo con su grupo funcional. Se conocen los resultados de inhibición del crecimiento de algunas bacterias pero el mecanismo no es bien conocido, la dificultad radica principalmente en la amplia variedad de compuestos donde puede existir una cooperación entre varios de ellos (Burt, 2004).

Entre los blancos que podemos encontrar (sitio activo de la célula) se halla el citoplasma y la membrana celular, tal y como se puede ver en la figura 2, así como también en las mitocondrias (Knobloch *et al.*, 1989).

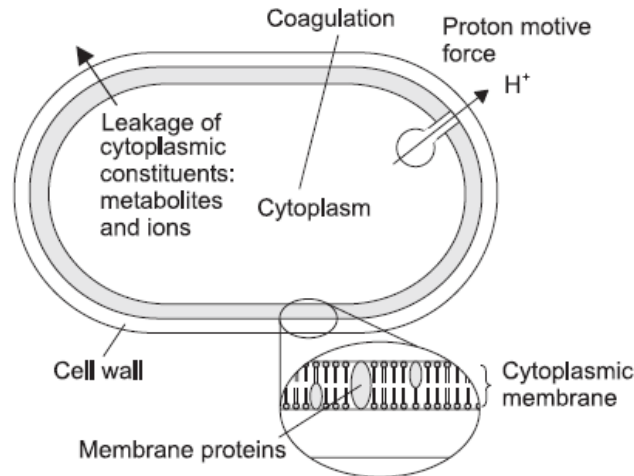


Figura 2. Localización de los blancos celulares y mecanismos de acción en el proceso de acción de los aceites esenciales (Burt, 2004).

Vale la pena destacar acerca de los aceites esenciales es su hidrofobicidad (la mayoría son terpenos), que le permiten interactuar con la capa lipídica de la pared celular y de la mitocondria de las bacterias. Al darse esta interacción los lípidos de la membrana celular se alteran la estructura de la pared haciéndola más permeable, lo que conlleva a que ocurra un escape de metabolitos vitales, iones y protones del citoplasma, alterando de esta forma la pared celular.

Una salida excesiva de estos componentes y especies conduce a la muerte celular de las bacterias y posteriormente se daría una lisis celular (Knobloch *et al.*, 1989). En otros casos los compuestos lipofílicos se acumulan en la membrana citoplasmática, distorsionando el enlace entre el lípido y la proteína y alterando el funcionamiento normal de enzimas involucrada en la regulación de energía y en la síntesis de componentes estructurales como las ATPasas, conduciendo a la muerte del organismo unicelular (Gustafson *et al.*, 2006).

La acción de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos depende de la estructura de los componentes individuales hallados en éste, del sinergismo existente entre ciertas sustancias contenidas, así como del tipo de membrana citoplasmática y de pared celular del microorganismo contra el que se hacen las pruebas. Un ejemplo claro de como la estructura individual incide en este tipo de actividad biológica, es el de los compuestos fenólicos, entre los que se encuentran el carvacrol, el eugenol y el timol al tener el grupo fenol como parte de su estructura, pueden alterar fácilmente la membrana citoplasmática, impidiendo así el flujo de protones y electrones así como la coagulación del contenido celular. Con respecto a la influencia de la composición de la capas que recubren a la bacteria, se sabe que varía la acción antibacteriana entre las gram positivas (+) y bacterias gram negativas (-), siendo las gram negativas más resistentes a la acción del aceite debido a que tienen una membrana lipídica adicional lo cual restringe o impide la difusión de los compuestos hidrofóbicos. Por último en lo referente al sinergismo, se puede ver que en ciertos casos hay moléculas potenciadoras las cuales posibilitan la acción de otras sustancias halladas en la matriz líquida, como en el caso de los aceites del orégano en donde los componentes como el *p*-cimeno que se encuentran en concentraciones pequeñas tienen un efecto sinérgico, el cual consiste en hinchar la membrana celular permitiendo que el carvacrol (un componente mayoritario del aceite de orégano) pueda unirse la membrana celular, distorsionando la parte lipofílica de la membrana, alterando el transporte de iones y metabolitos causando la muerte del microorganismo (Ultee *et al.*, 2000).

1.3.3. Método de extracción y equipo de hidrodestilación (HD)

Los aceites esenciales se pueden extraer mediante diversos métodos como son: destilación por arrastre con vapor cuya variante es la hidrodestilación (HD), la extracción con disolventes volátiles y también con fluidos supercríticos, como se mencionó anteriormente. El aceite presente en el material vegetal, es arrastrado por el vapor de agua y después de condensarse (agua y aceite), se depositan en la trampa de Clevenger donde se forman las 2 fases debido a la diferencia de densidades e inmiscibilidad de las mismas. Después de terminado el proceso de hidrodestilación, se deja en reposo el sistema bajo refrigeración (4 °C) para permitir la condensación de los vapores restantes e impedir que se

pierdan algunos compuestos volátiles, finalmente las dos fases son separadas (Maheshwari, 2010).

La hidrodestilación es un procedimiento clásico y fácil de manejar para la obtención de aceites esenciales, no obstante presenta alguna desventaja a nivel industrial debido a la alta cantidad de energía utilizada y al tiempo de extracción prolongado en la obtención del aceite. A la hora de hacer el proceso se debe controlar muy bien la cantidad de calor suministrado debido a que se pueden presentar problemas como un sobrecalentamiento del balón que contiene la muestra lo cual traería como consecuencia la pérdida de sustancias aromáticas y la posible formación de artefactos por efecto de la temperatura (Houghton *et al.*, 1998).



Figura 3. Equipo empleado en el proceso de Hidrodestilación (HD)

1.3.4. Método y Equipo de Destilación-Extracción Simultáneas (DES) en la obtención de volátiles.

La destilación-extracción simultáneas conocida como el método de Lickens-Nickerson es un método de extracción muy usado en la química de aromas, para extraer los compuestos más volátiles en colaboración con un disolvente en fase de vapor. Los volátiles provenientes de la ebullición del material vegetal inmerso en agua (balón de mayor

capacidad en A), con el sistema de disolventes también en esta misma fase (balón pequeño en B). Los vapores que arrastran los volátiles del agua con el material en ebullición (89 °C) ascienden por el tubo A y los vapores generados por la fase orgánica (40 °C) que ascienden por el tubo B, son conducidos cada uno por separado a la cámara superior C, donde se encuentran y mezclan ambas fases que son condensadas por un refrigerante a 4 °C. La fase orgánica y acuosa se recolectan en el tubo en U donde se coloca una pequeña cantidad de agua y por diferencia de densidades se separan. Debido al efecto de sifón, cada fase cae en su respectivo matraz, de esta forma, el disolvente se enriquece con los volátiles extraídos, repitiéndose el proceso descrito durante el tiempo deseado (Pawliszyn, 2002).

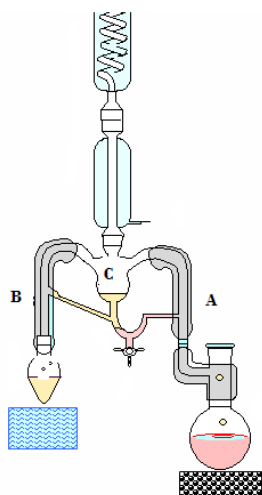


Figura 4. Equipo empleado para la Destilación-Extracción simultáneas

Normalmente los disolventes usados deben ser menos densos que el agua, no obstante hay aparatos modificados de Lickens-Nickerson que permiten obtener aceites con mayor densidad (Pawliszyn, 2002).

1.3.5. Equipo concentrador para el extracto obtenido por DES

El equipo concentrador es una variante de Kuderna-Danish, que se usa para sistemas Líquido-Líquido (L-L) y DES, consta de un sistema de destilación fraccionada que permite retirar el disolvente del matraz (25 mL) de forma aperada y de esta manera obtener el extracto que contiene los volátiles. El equipo está formado por una columna Vigreux, un

matraz de fondo redondo donde se recolectan los disolventes, el matraz de forma aperada que se calienta en baño de agua a una temperatura no superior a los 37 °C hasta obtener de 0,1 a 0,2 mL del extracto.

1.3.6 Cálculo de los índices de Kovats.

Los índices de retención se calcularon de acuerdo a la ecuación I mostrada como apoyo en la identificación de los compuestos (Aguilar, *et al.*, 1998).

$$I = \left[\frac{t_{r(u)} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 * z) + (100 * n) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

I = Índice de retención de Kovats para un compuesto u.

n = número de carbonos de la parafina con tiempo de retención anterior.

N = número de carbonos de la parafina con tiempo de retención posterior.

t_r' = Tiempo de retención ajustado

t_r = Tiempo de retención normal para N, n y u (desconocido).

z = diferencia de carbonos entre las parafinas N y n.

II. OBJETIVOS

2.1 .Objetivo General

- Extraer y caracterizar el perfil de volátiles y el aceite esencial de las hojas de la *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O.

2.2. Objetivos Específicos

- Extraer los constituyentes volátiles de las hojas de la planta por Destilación-Extracción simultáneas (DES).

- Obtener mediante el método de hidrodestilación el aceite esencial de las hojas de *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O.
- Separar e identificar los extractos por medio de métodos cromatográficos como: cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS).
- Conocer algunas propiedades fisicoquímicas de los aceites mencionados entre las que se destaca el índice de refracción, la densidad, el índice de acidez etc.
- Obtener los porcentajes de los compuestos extraídos y elucidados con anterioridad.
- Analizar la influencia del tiempo de destilación en la extracción de los aceites esenciales.
- Establecer similitudes y diferencias en la composición del aceite y volátiles de las hojas de la planta.
- Contribuir conocimiento de la actividad antimicrobiana del aceite en estudio.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Recolección y tratamiento del material vegetal

Se recolectaron 2 Kg de material vegetal en el cerro de la Juaica localizado entre los valles de Tabio y Subachoque en el departamento de Cundinamarca. Se hicieron varias colectas en el mismo sitio a una altura de 2749 m y con las siguientes coordenadas: Norte 4° 54' 0,28 minutos y Oeste 74° 7,128 minutos. La muestra se limpió y dejó en reposo a temperatura ambiente por un periodo de 12 horas y luego se procedió a obtener los extractos. Un ejemplar fue enviado al Jardín Botánico José Celestino Mutis para confirmar su clasificación botánica.

3.2. Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación (HD)

Se pesaron 100 g de hojas limpias y secas, las cuales fueron cortadas en trozos pequeños para colocarlas en un balón con una capacidad 3 L, se le agregó aproximadamente 1 L de agua para asegurar la inmersión de las hojas, se conectó el balón a la trampa de Clevenger y ésta a un refrigerante que contenía agua a una temperatura no superior a los 4 °C. La muestra se calentó hasta ebullición, controlando la temperatura de la manta para evitar un sobrecalentamiento. La extracción se realizó a tres tiempos diferentes: 1, 2 y 3 horas. Estas extracciones se realizaron con el fin de determinar la influencia del tiempo en la calidad y composición del aceite (Sylvestre *et al.*, 2005).

Una vez terminado el tiempo de extracción se enfrió el montaje hasta temperatura ambiente con el fin de permitir la condensación del aceite restante y se separó la fase orgánica en un vial de 2 mL con la ayuda de una pipeta Pasteur. Al aceite se le agregó Na₂SO₄ anhidro para remover las trazas de agua. Posteriormente se colocó el aceite en un vial seco previamente pesado de 2 mL y se dejó bajo congelación hasta que se inyectó en el

cromatógrafo (Bastos *et al.*, 2006). Se calcularon los rendimientos por cada extracción de acuerdo con la fórmula (Ec. 2), en base seca.

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{gramos del extracto}}{\text{gramos del material vegetal}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

3.3. Extracción de volátiles por Destilación-Extracción Simultaneas (DES)

Para la extracción por DES se siguió la metodología propuesta en los artículos citados (Flath and Forrey, 1977). Se usaron 2 balones, uno de 3 L y otro de 200 ml, al balón de mayor volumen se le agregó 100 g de material vegetal y en el segundo balón se colocó 30 ml de pentano:éter etílico 1:1 v/v y unas perlas de ebullición. Como patrón interno se adicionó 2 mg de nonanoato de metilo. Una vez que comenzó la ebullición en el balón que contenía la muestra, se prendió la manta de calentamiento donde se encuentra el balón que contiene la mezcla de disolventes.

Después de 1 hora de mantenerse en ebullición ambos balones, se dejó enfriar para obtener la fase orgánica. El extracto después de congelado y seco con sulfato de sodio anhidro se concentró mediante una columna Vigreux hasta 0,2 mL, en baño de María a una temperatura de 37 °C. Los extractos se analizaron por GC-FID y GC-MS.

3.4 Determinaciones Fisicoquímicas: Índice de refracción, densidad y acidez del aceite esencial.

Un total de tres propiedades físicas fueron medidas: la densidad, el índice de refracción, y el índice de acidez. La densidad relativa se calculó determinando el peso de 1 mL de aceite respecto a 1 mL de agua a 18 °C, empleando la siguiente fórmula:

$$\rho_{\text{aceite}} = \rho_{\text{agua}} * \left(\frac{M_{\text{Picnómetro+aceite}} - M_{\text{Picnómetro}}}{M_{\text{Picnómetro+agua}} - M_{\text{Picnómetro}}} \right) \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

$$\rho_{\text{Aceite}} = \text{Densidad del aceite esencial}$$

ρ_{Agua} = Densidad del agua a la temperatura ambiente (18 °C)

$M_{\text{Picnómetro + Aceite}}$ = Masa del picnómetro lleno con aceite

$M_{\text{Picnómetro + Agua}}$ = Masa del picnómetro lleno con agua

$M_{\text{picnómetro}}$ = Masa del picnómetro vacío

Para medir el índice de acidez, se pesó 1 g del aceite en un erlenmeyer y se diluyó en 10 ml de una mezcla de etanol-éter etílico (1:1) neutralizado, a ésta mezcla se le agregó 1 gota de fenoftaleína y se tituló con KOH 0,1 N hasta llevar a un punto final de pH 8,1. La valoración se hizo por triplicado (Molales, 2009).

Para hallar el índice de acidez del aceite esencial se usó la siguiente fórmula, (Pearson, 1986)

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{G \cdot N \cdot 56,1}{W} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

G = Volumen de KOH usado para titular

N = Normalidad de la solución de KOH (0,1 N)

W = Masa de aceite pesada

56,1 = equivalente de KOH (1 N)

El porcentaje de ácidos grasos libres, se determinó de acuerdo con la ecuación (Ec 5) (Pearson, 1986):

$$\% \text{ de ácidos grasos libres} = \frac{G \cdot N \cdot 282}{W} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

G = Volumen de NaOH usado para titular

N = Normalidad de la solución de NaOH (0,1 N)

W = Masa de aceite pesada.

282 = Equivalente de ácido oleico

Para medir el índice de refracción del aceite extraído se colocó una gota de aceite en un refractómetro Schmidt+Hanesch Gmb & Co. Berlín Serial No 27992100 a 18 °C, cada propiedad fue medida tres veces con el fin de obtener un triplicado, se hicieron los cálculos para obtener el promedio así como la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD).

3.5 Condiciones Cromatográficas

3.5.1. Cromatografía de alta resolución GC-FID.

Los componentes volátiles fueron analizados por cromatografía de gases de alta resolución con equipo HP 6890 GC Series II (Agilent Technologies, California EE.UU) provisto con un detector de llama de hidrógeno FID. Una columna cromatográfica de polaridad media fue usada HP-5Ms de sílica fundida (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm de espesor de película).

La temperatura del inyector y del detector se mantuvo a 220 °C, con una relación de caudal (*Split/splitless*) de 1:10 y el volumen de inyección fue de 0,2 μL. El programa de temperatura con el cual se trabajó la columna fue el siguiente: isotérmicamente se mantuvo por 4 min a 70 °C, luego se incrementó la temperatura a razón de 4 °C/min hasta 220 °C e isotérmicamente se mantuvo a esta durante 10 minutos. Como gas de arrastre se usó helio a un flujo de 1 ml/min y como gas auxiliar nitrógeno a 30 mL/min. En las mismas condiciones se inyectó una mezcla de parafinas normales C₈ a C₃₂ con el fin de calcular para cada constituyente los índices de retención relativos (Índices de Kovats).

Para la facilitar la comparación de los métodos de extracción, los resultados se expresaron como porcentaje del área del cromatograma obtenido por GC-FID sin tener en cuenta los factores de respuesta para cada constituyente. Las cantidades relativas de los compuestos fueron expresadas como porcentaje de pico de área en el cromatograma de GC-FID y relacionando el área del patrón y su concentración con el área obtenida por GC-FID para cada compuesto (en la extracción por DES).

3.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

En el análisis de los extractos se usó un cromatógrafo HP 6890 GC Series II (Agilent Technologies, California EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas HP-5973 para obtener los espectros de masas de cada componente. Las columnas y condiciones cromatográficas fueron las mismas descritas para GC-FID, el detector operó en modo de ionización electrónica a 70 eV por 1,8 scan/s y con la fuente a 230 °C. La detección se realizó en modo *scan* entre 35 y 400 uma.

3.5.3. Porcentaje relativo e identificación de compuestos

Para cuantificar y comparar la composición de volátiles por cada método se sumaron las áreas de los compuestos obtenidos por GC-FID y se expresaron como porcentaje de área cromatográfica, respecto de la suma total de los compuestos (área total). La identificación de los compuestos se realizó para cada constituyente por comparación de los espectros de masas a partir de 6 librerías (NIST 2005/2006, EPA/NIH Mass Spectral Library, Willey and EPA/NIH, Adams, 2001). Además de los incluidos en el sistema de manejo de datos del equipo en la biblioteca NIST,MS y los existentes en el archivo de espectros del grupo de investigación de Ciencias Agroalimentarias y del aroma (CALIM).

3.6 Ensayos sobre actividad antimicrobiana de los-aceites esenciales.

Se utilizaron 46 cepas de diferentes especies de bacterias aisladas de alimentos y heces de neonatos colombianos, también se utilizaron cepas pertenecientes al American Type Culture Collection (ATCC). Específicamente un total de 30 cepas se usaron de *E. coli*; de las cuales 29 fueron aisladas y una fue una cepa ATCC25922. Once cepas de *Listeria monocytogenes*; 10 serotipos 4b y un serotipo 1/2a. Dos cepas de *Salmonella sp.*, fueron aisladas de productos cárnicos comercializados y una de *Salmonella enteritides* ATCC 13076. Además se usó otra de *Staphylococcus aureus*, multiresistente y una de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

Para el análisis microbiológico se realizó la prueba de difusión en disco. Ajustando las cepas al patrón de McFarland 0.5 para la siembra por el método de Kirby-Bauer, tras lo cual se puso en contacto con discos de papel de filtro impregnados con 8 μ L de cada uno de los aceites extraídos. Las cajas se incubaron por 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, en el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* a 25°C \pm 2; *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* a 35°C \pm 2. Para la lectura de resultados se observó la presencia del halo alrededor del papel filtro (Gaviria *et al.*, 2011).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con la literatura (Pino *et al.*, 2004) el tiempo de extracción más adecuado fue de 3 horas. Por tanto se efectuaron para este tiempo 3 hidrodestilaciones, ver tabla 1. Igualmente se realizó una extracción con un tiempo de 3,5 h que fue descartada por la tonalidad del color café y presentaba olor a quemado, nuevamente se repitió la extracción con mayor cantidad de agua, presentándose el mismo resultado, razón por la que se desechó este último tiempo.

Con base en esta experimentación se calculó el rendimiento promedio, el cual fue aproximadamente de 0,3422 g de aceite por 100 gramos de material vegetal. La desviación estándar aproximada de la muestra fue de \pm 0,003 respecto de las tres réplicas lo cual equivale a un porcentaje de SD relativa igual al 0,8728 % (Tabla 1).

Los resultados muestran, que la hidrodestilación efectuada a las 3 horas es el proceso más adecuado para la extracción del aceite.

En la gráfica 1, se puede observar la relación entre el tiempo y el porcentaje de aceite extraído, en la primera hora de extracción se recogió el 66,91 % del aceite esencial, durante la segunda hora el porcentaje de aceite se incrementó a 85 % y en la tercera hora se obtuvo el 100% referido al 0,3422 g de la tercera extracción.

Tabla 1. Rendimiento del proceso de extracción de los aceites esenciales de la planta *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O

Tiempo (horas)	3
(g aceite/ 100 g hojas) con 1 hora de extracción	0,2289
(g aceite/ 100 g hojas) con 2 horas de extracción	0,2907
Rendimiento promedio(g aceite/ 100 g hojas) con 3 horas de extracción	0,3422
Número de extracciones	3
Desviación Estándar	±0,003
% RSD	0,87

Se observa que más de la mitad del volumen del aceite esencial salió a una hora y que la diferencia entre la cantidad de aceite esencial extraído a las 2 y 3 horas como era de suponerse aumentó. A raíz de estos datos, no se tuvo en cuenta el rendimiento de las 3½ h, como se discutió anteriormente, por ello se fijó las 3 horas como el 100%.

Tabla 2. Valores promedio y manejo estadístico de las constantes físicas del aceite de *Myrica Parvifolia* (Benth.) Parra-O a 18 °C

Variable	Valor promedio	Desviación estándar	% RSD
Densidad	0,9148	0,0009	0,0953
Índice de refracción	1,49	0,0005	0,0336
Ácidos grasos libres (%)	0,611	0,0814	13,3235
Indice de acidez (mg base/ g. aceite)	1,2155	0,1619	19,6846

En la tabla 2, se muestran los valores obtenidos de densidad, índice de refracción e índice de acidez con sus desviaciones estándar efectuados por triplicado. De acuerdo con la literatura los valores de densidad para un aceite esencial entre 0,842 a 1,172, para el índice de refracción entre alrededor de 1,45 a 1,52, muestran que el aceite de *Myrica* muestra un comportamiento de un “aceite fluido” (Atti-Santos *et al.*, 2005). De otro lado el bajo porcentaje de desviación estándar para ambos valores indica una medición confiable.

El índice de acidez (1,21 mg de base/gramo de aceite) y el porcentaje de ácidos grasos (0,61%), presentan valores muy bajos comparados con la de otros aceites comerciales, como el aceite de oliva (6,66 y 3,33%) (Alimentaus, 2011), aceite de girasol (2,6 - 5,0 y 1,3 - 2,5%) (Gustone, 2011), aceite de palma (4,77 y 2,39%) (SON, 2000) etc.

El aceite extraído de las hojas de la *Myrica parvifolia*, tiene pocos ácidos grasos libres, posiblemente a que la acción de procesos hidrolíticos y oxidativos es mínima, debido a que no hay suficientes precursores lipídicos que puedan formar grupos acil-CoA que posibilita ciertas reacciones de carácter degenerativo (Kolmann *et al.*, 2004) y por ende la producción de ácidos grasos y glicerol es muy pequeña. Debido a estos factores podemos concluir que el aceite proveniente de las hojas de la *Myrica parvifolia*, se caracteriza por su alta calidad y por ser poco propenso a procesos de rancidez (Atti-Santos *et al.*, 2005).

Respecto a los compuestos identificados del aceite de *Myrica*, se muestran tabulados en la Tabla 3, durante 1, 2 y tres horas, junto con los índices de retención teóricos y experimentales para una columna HP-5Ms. Como se puede observar, el número de compuestos permanece constante para cada tiempo. Se identificaron 51 constituyentes de un total de 57, la mayoría de carácter terpénico. De estos 27 fueron monoterpenos 15 de ellos oxigenados, 20 sesquiterpenos de estos 7 son oxigenados y 4 constituyentes presentan composición variada. Con respecto a los tiempos de extracción no hay una linealidad ascendente en el porcentaje de algunos compuestos de tipo monoterpénico. A 1 hora de extracción como se puede observar en la tabla, se favorece el porcentaje de algunos de los compuestos mayoritarios como el α -*trans*-bergamoteno, el β -acoradieno y el α -zingibireno.

Otros compuestos a 1 hora de extracción con menor porcentaje, incrementan la concentración a las 2 horas, como es el caso de los monoterpenos no oxigenados y de algunos sesquiterpenos, dentro de ellos se encuentra el *ar*-curcumeno y el β -bisaboleno. Mientras que a 3 horas el α -bisabolol se incrementa a 35,93%, lo cual incide sobre el porcentaje de los demás constituyentes disminuyéndolos, excepto del γ -terpineno (4,26%). Puede observarse que dependiendo del tiempo de extracción se favorece el porcentaje del uno u otro constituyente, de esta forma se puede escoger el aceite enriquecido según el

compuesto que desee que predomine, por ejemplo para α -zingibireno el tiempo óptimo sería de 1 hora, mientras que para el α -bisabolol sería de 3 horas. Otro caso ocurre con el sesquiterpeno β -acoradieno, el cual mostró más del 11% por ciento en la composición porcentual del aceite obtenido a 1 hora, mientras que a 2 y 3 horas se vió disminuido el porcentaje. Compuestos como el α -bisabolol, el β -bisaboleno, α -*trans*-bergamoteno y el α -zingibireno presentan porcentajes altos a los 3 tiempos y el porcentaje del ar-curcumeno es significativamente más alto para el aceite obtenido a las 2 horas.

Tabla 3. Composición de los compuestos encontrados en el aceite de la *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O para las hidrodestilaciones de 1, 2 y 3 horas respectivamente.

Compuesto	IR _(Ex)	IR _(T)	Porcentaje		
			(1 h)	(2 h)	(3h)
(Z)-3-hexenol	901	859	0,09	0,11	tr
α -tujeno	930	930	0,19	0,31	0,09
α -pineno	938	939	4,47	5,21	4,42
canfeno	954	954	0,24	0,23	0,1
β -pineno	985	979	0,68	0,41	0,43
mirceno	995	991	0,34	0,57	0,19
α -felandreno	1018	1003	0,05	0,26	0,02
α -terpineno	1029	1017	0,27	0,14	0,16
<i>p</i> -cimeno	1040	1025	1,78	1,06	1,32
limoneno	1044	1029	tr	tr	tr
1,8-cineol	1044	1031	tr	tr	0,76
γ -terpineno	1075	1060	3,9	2,28	4,26
<i>cis</i> - óxido de linalool (furanóide)	1085	1073	0,02	0,01	0,01
terpinoleno	1100	1089	0,49	0,27	0,33
linalool	1115	1097	3,05	1,66	2,45
nonanal	1126	1101	tr	0,04	tr
endo-fenchol	1134	1117	0,15	0,1	0,07
α -camfelenal	1155	1126	0,09	0,08	0,02
<i>trans</i> -pinocarveol	1159	1139	0,07	0,08	0,01
hidrato de camfeno	1171	1150	0,08	0,07	0,02
borneol	1188	1169	0,5	0,43	0,24
terpinen-4-ol	1206	1177	0,54	0,4	0,33

Tabla 3. ... (continuación)

Compuesto	Porcentaje				
	IR _(Ex)	IR _(T)	(1 h)	(2 h)	(3h)
<i>p</i> -cimen-8-ol	1217	1183	0,98	0,84	0,01
α -terpineol	1223	1189	tr	tr	tr
salicilato de metilo	1226	1192	tr	tr	tr
acetato de endo-fenchilo	1229	1220	tr	0,04	tr
<i>cis</i> -carveol	1232	1229	0,04	0,01	tr
acetato de bornilo	1298	1289	0,06	0,02	tr
timol	1302	1290	0,02	0,04	0,01
carvacrol	1326	1299	0,07	tr	0,01
α -ylangeno	1387	1375	0,05	0,03	0,01
α -copaeno	1394	1377	0,14	0,08	0,05
α - <i>cis</i> -bergamoteno	1423	1413	0,04	0,03	0,02
β -cariofileno	1441	1419	0,03	0,02	0,01
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1446	1435	7,3	5,62	5,35
(<i>Z</i>)- β -farneseno	1461	1443	0,55	0,46	0,39
(<i>E</i>)- β -farneseno	1471	1457	0,73	0,54	0,4
α -acoradieno	1481	1466	1,04	0,9	0,6
β -acoradieno	1496	1471	11,16	0,9	3,02
ar-curcumeno	1503	1481	4,52	12,06	6,89
α -zingibereno	1521	1494	14,71	14,07	12,98
β -bisaboleno	1533	1506	8,41	9,87	8,75
δ -amorfenol	1548	1512	1,4	2,77	2,08
No identificado 1	1561		1,4	2,1	2,04
No identificado 2	1565		1,93	0,08	1,49
(<i>E</i>)-nerolidol	1576	1563	0,73	0,77	0,33
benzoato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo	1598	1567	tr	0,01	tr
ar-turmerol	1610	1583	0,13	0,27	0,04
óxido de cariofileno	1625	1583	0,26	0,2	0,11
Mezcla de 2 sesquiterpenos	1641		0,7	1,17	0,31
α -eudesmol	1665	1654	0,55	0,81	0,38
No identificado 3	1686		0,15	0,11	0,1
No identificado 4	1694		1,71	3,03	1,77
α -bisabolol	1742	1686	21,94	27,77	35,93
1-hexadecanol	1894	1876	0,44	0,93	0,27

tr = Concentración en trazas < 0,01, Espectro de masa de los compuestos desconocidos: No Identificado 1. Mw: 220, (picos de mayor a menor intensidad): 93, 119, 80, 79, 67, 109, 91. No Identificado 2. Mw: 204 o 222, (picos de mayor a menor intensidad): 109, 127, 43, 69, 41, 119. No Identificado 3. Mw: 222 (picos de mayor a menor intensidad): 43, 161, 105, 81, 119. No Identificado 4. Mw: 222, (picos de mayor a menor intensidad): 43, 143, 105, 85, 59, 93.

Los constituyentes mayoritarios prácticamente se conservan durante los 3 tiempos de extracción tal como se ve en la tabla 4, aunque sus porcentajes varían.

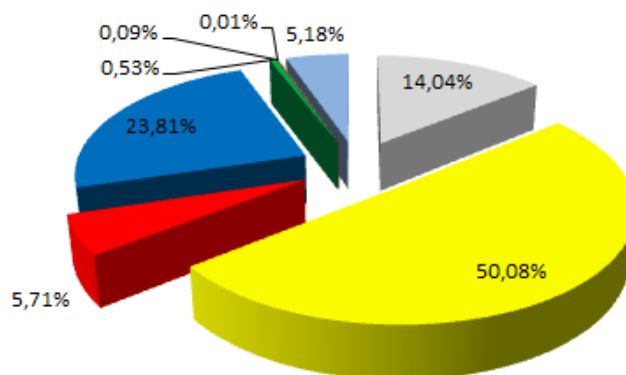
Tabla 4. Constituyentes mayoritarios del aceite en los 3 tiempos de extracción

Compuesto	IR _(Ex)	IR _(T)	Porcentaje		
			(1 h)	(2 h)	(3h)
α -bisabolol	1742	1686	21,94	27,77	35,93
α -zingibereno	1521	1494	14,71	14,07	12,98
β -bisaboleno	1533	1506	8,41	9,87	8,75
β -acoradieno	1496	1471	11,16	0,9	3,02
ar-curcumeno	1503	1481	4,52	12,06	6,89
α -trans-bergamoteno	1446	1435	7,3	5,62	5,35

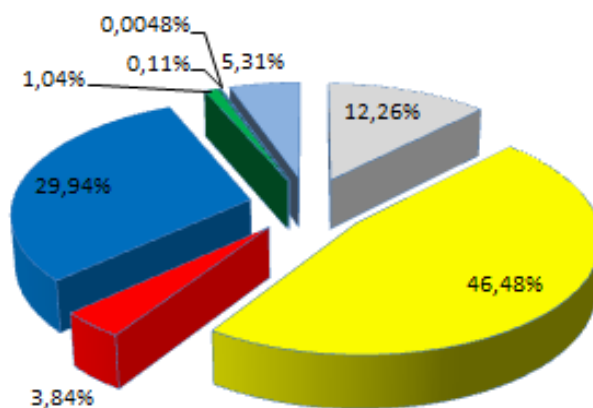
IR_(Exp) e IR_(T): Índices de retención experimental y teórico para una columna cromatográfica con fase HP- 5Ms

Con el fin de facilitar la comparación por grupo funcional, a continuación se representan los porcentajes a los tres tiempos de extracción, tomando como 100% la suma de todas las áreas de todos los compuestos para cada tiempo:

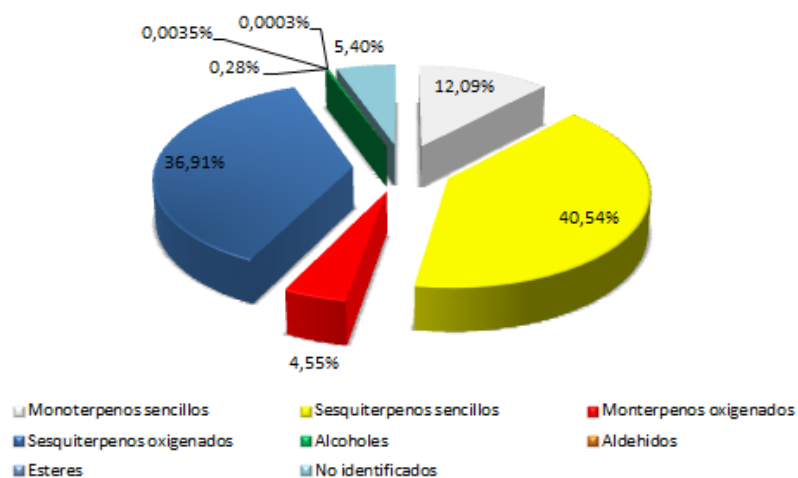
a) Con una hora de extracción



b) Con dos horas de extracción



c) Con 3 horas de extracción



Grafica 1. Porcentaje de los compuestos identificados por grupo funcional a 1, 2 y 3 horas de extracción por HD.

Los constituyentes mayoritarios que se encuentran en los aceites esenciales son compuestos sesquiterpénicos sencillos, de ellos el α -bisabolol es un sesquiterpeno oxigenado. Los sesquiterpenos predominan sobre los demás compuestos constituyendo un porcentaje que va del 74 al 77%, para los monoterpenos el valor es entre un 15 a un 19% y menos del 1% corresponden a volátiles de variada composición.

A medida que va transcurriendo el tiempo se puede apreciar una disminución en la composición porcentual de estos dos tipos de compuestos y va aumentando el porcentaje del α -bisabolol, el cual no se ha destilado en su totalidad en las dos primeras horas, a medida que aumenta el tiempo de extracción, una mayor cantidad de este compuesto es

recolectada lo cual conlleva a la disminución de la composición porcentual relativa de compuestos como el β -acordieno, el α -zingibireno y el α -curcumeno, incidiendo en el porcentaje total, como se mencionó anteriormente. En la tabla 5, se muestra la composición de volátiles libres obtenidos por DES, en las hojas de *Myrica*, esta extracción se efectuó para observar si existen diferencias en la clase y número de compuestos extraídos por HD. Igualmente la **gráfica 2**, ilustra los porcentajes obtenidos por grupo funcional, en la DES y para facilitar la comparación con el porcentaje de compuestos obtenidos por HD.

Tabla 5. Constituyentes volátiles de la *Myrica parvifolia* (Benth.) Parra-O y su porcentaje por DES.

Compuesto	IR_(Ex)	IR_(T)	(Porcentaje)	Cantidad (mg/100g)
hexanal	820	802	0,04	0,03
(Z)-3-hexenol	868	859	0,11	0,08
1-hexanol	882	871	0,15	0,1
α -tujeno	901	930	tr	tr
α -pineno	939	939	21,48	14,60
canfeno	951	954	0,76	0,53
benzaldehído	992	960	0,32	0,22
β -pineno	981	979	1,11	0,76
6-metil-5-hepten-2-ona	1004	986	0,03	0,03
mirceño	994	991	0,4	0,27
α -felandreno	1015	1003	Tr	0,04
α -terpineno	1027	1017	0,42	0,28
<i>p</i> -cimeno	1041	1025	5,19	3,53
limoneno	1044	1029	4,52	3,07
1,8-cineol	1042	1031	Tr	Tr
alcohol bencílico	1064	1032	0,02	0,01
γ -terpineno	1075	1060	0,02	0,01
<i>cis</i> - óxido de linalool furanoide	1085	1073	0,07	0,05
terpinoleno	1098	1089	0,6	0,40
linalool	1116	1097	5,33	3,62
nonanal	1127	1101	0,09	0,06
endo-fenchol	1134	1117	0,26	0,18
α -camfolenal	1156	1126	0,09	0,06
<i>trans</i> -pinocarveol	1160	1139	0,07	0,05
hidrato de canfeno	1171	1150	0,12	0,08
borneol	1189	1169	0,9	0,61
terpinen-4-ol	1206	1177	0,62	0,42
<i>p</i> -cimen-8-ol	1218	1183	0,06	0,04
α -terpineol	1225	1189	1,53	1,04
salicilato de metilo	1227	1192	tr	tr
acetato de endo-fenchilo	1230	1220	0,12	0,08
<i>cis</i> -carveol	1251	1229	0,04	0,02
geraniol	1270	1253	0,02	0,03
acetato de boronilo	1300	1289	0,08	0,06
timol	1315	1290	0,03	0,02
carvacrol	1324	1299	tr	tr

Tabla 5. (continuación)

Compuesto	IR (Ex)	IR(T)	(Porcentaje)	Cantidad (mg/100g)
α -ylangeno	1375	1375	0,05	0,04
α -copaeno	1382	1377	0,34	0,23
α -cis-bergamoteno	1434	1413	0,02	0,01
β -cariofileno	1457	1419	Tr	tr
α -trans-bergamoteno	1457	1435	2,63	1,79
(Z)- β -farneseno	1476	1443	0,18	0,12
(E)- β -farneseno	1490	1457	0,25	0,17
α -acoradieno	1503	1466	0,58	0,39
β -acoradieno	1518	1471	2,67	1,81
ar-curcumeno	1502	1481	5,18	3,52
α -zingibereno	1517	1494	9,2	6,26
β -bisaboleno	1530	1506	6,55	4,45
δ -amorfenol	1548	1512	2,41	1,64
No identificado 1	1559		1,04	0,72
(Z)-nerolidol	1566	1533	0,94	0,64
(E)-nerolidol	1576	1563	0,25	0,17
benzoato de (Z)-3-hexenilo	1603	1567	tr	tr
óxido de cariofileno	1628	1583	0,18	0,12
mezcla de 2 sesquiterpenos	1628		0,19	0,13
α -eudesmol	1668	1654	0,24	0,17
No identificado 2	1694		0,61	0,42
<i>epi</i> - α -bisabolol	1697	1685	0,41	0,28
α -bisabolol	1668		18,77	12,75

tr = Concentración en trazas < 0,01, E. de masas de los compuestos desconocidos: No Identificado 1. Mw: 220, (picos de mayor a menor intensidad):93, 119, 80, 79, 67, 109, 91. No Identificado 2. Mw: 204, (picos de mayor a menor intensidad): 109, 127, 43, 69, 41, 119.

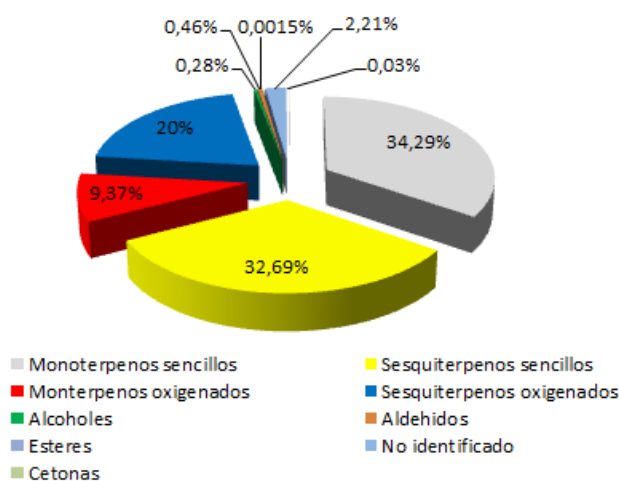
En la tabla 6, se aprecian los constituyentes mayoritarios de la muestra con su respectivo porcentaje y la cantidad de cada uno de ellos expresada en miligramos/100 g de muestra vegetal.

Tabla 6. Constituyentes mayoritarios del aceite de *Myrica*

Compuesto	IR (Ex)	IR(T)	(Porcentaje)	Cantidad (mg/100g)
α -pineno	939	939	21,48	14,5976
α -bisabolol	1668	1686	18,77	12,7594
α -zingibereno	1517	1494	9,2	6,255
β -bisaboleno	1530	1506	6,55	4,4535
Linalool	1116	1097	5,33	3,6201

IR_(Exp) e IR_(T): Índices de retención experimental y teórico para una columna cromatográfica con fase HP- 5Ms

De acuerdo con la tabla de los volátiles obtenidos vía DES se identificaron 56 de un total de 59 compuestos. Al igual que en las muestras de aceite la mayoría de estos fueron de carácter terpénico, se encontraron 28 monoterpenos, 18 de ellos oxigenados, 19 sesquiterpenos, de estos 6 son oxigenados y 9 fueron compuestos volátiles de bajo peso molecular (alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas). El compuesto mayoritario fue α -pineno (21,48%), seguido por el α -bisabolol (18,77%), α -zingibereno (9,2%), β -bisaboleno (6,55%) y por el linalool (5,33%). Acerca de los constituyentes mayoritarios tres fueron sesquiterpenos, de ellos uno oxigenado, respecto a los monoterpenos se presentó la misma similitud.



Gráfica 2. Porcentaje de los compuestos identificados por grupo funcional en el extracto de volátiles obtenido por destilación-extracción simultánea (DES).

Con respecto a la composición obtenida por DES, el 50% corresponde a los sesquiterpenos (oxigenados y no oxigenados), no obstante en la gráfica 2 se aprecia que los compuestos con mayor porcentaje son los monoterpenos y sesquiterpenos sencillos, seguidos por los sesquiterpenos y monoterpenos oxigenados en ambos casos.

En relación a los demás constituyentes obtenidos por DES se observa la presencia de volátiles de bajo peso molecular, como son: el hexanal y el hexanol (nota sensorial a verde), el benzaldehído (almendra), el geraniol (floral), el *Z*-nerolidol, el epi- α -bisabolol y el 6-metil-5-hepten-2-ona aportan indudablemente al aroma de los llamados constituyentes

volátiles de la planta. De otro lado el acetato de endo-fenchilo y el acetato de boronilo, presentes en los dos métodos de extracción son probablemente contribuyentes al aroma del aceite y de la planta en general.

Comparando los resultados obtenidos por ambos métodos de extracción se puede apreciar algunas diferencias, una de ellas es que el compuesto mayoritario obtenido por DES fue el α -pineno (21,48%), no exhibe un porcentaje tan alto por HD, a los tres tiempos de extracción, en tanto que el α -bisabolol (35,93%) a las 3 h de extracción por HD, alcanzó el mayor porcentaje figurando como el constituyente mayoritario; en la extracción por DES el porcentaje fue mejor pero no menos importante (18,77%), es interesante observar que dependiendo del tiempo de extracción y según la técnica usada se puede obtener un aceite rico en determinados constituyentes. De otro lado los monoterpenos como los 2 isómeros del pineno, el *p*-cimeno, el linalool, el canfeno y el limoneno en su mayoría muestran porcentajes más altos por DES que por HD, en parte puede deberse al sistema de extracción y a la polaridad de los disolventes usados, otros compuestos como el terpinen-4-ol y el terpinoleno entre otros mantienen un porcentaje no muy diferente por los dos métodos de extracción. Se puede deducir que para obtener un mayor porcentaje de sesquiterpenos en esta planta el sistema de HD es el más aconsejable y en el caso de los monoterpenos la extracción por DES.

Pese a que las diferencias entre ambas muestras son marcadas, hay similitudes bastante notorias, la primera consiste en que gran parte de los compuestos elucidados en la muestra de aceites esenciales pudieron ser hallados en el extracto de volátiles. Otra característica que se observa es que en los aceites provenientes de la HD, como en el extracto de volátiles obtenido por DES, figuran como constituyentes mayoritarios el α -bisabolol, α -zingibereno y el β -bisaboleno, no obstante la proporción en la muestra de volátiles obtenida por DES es menor que la obtenida en las mezclas lipídicas obtenidas HD. Además de esto, los extractos obtenidos por ambos métodos son similares en cuanto al número de compuestos y el grupo funcional. Sin embargo ocho compuestos fueron identificados por DES, entre ellos están el hexanal, hexanol, benzaldehído, 6-metil-5-hepten-2-ona, alcohol bencílico, geraniol, (*Z*)-nerolidol y epi- α -bisabolol, que posiblemente contribuyen al aroma típico de la planta,

mientras que por HD, solo el ar-turmenol y el hexadecanol no fueron detectados por HD. A continuación se muestran algunas de las estructuras de compuestos identificados en la *Myrica*.

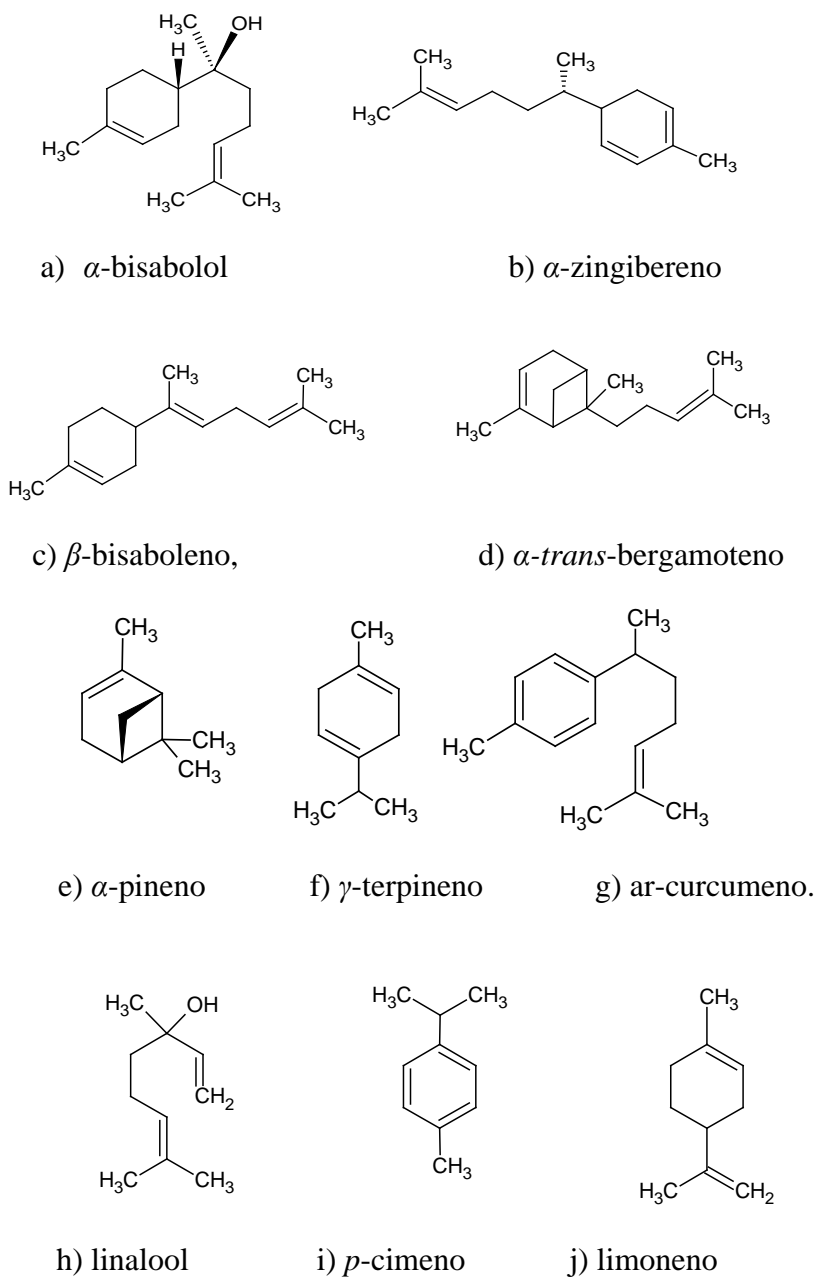
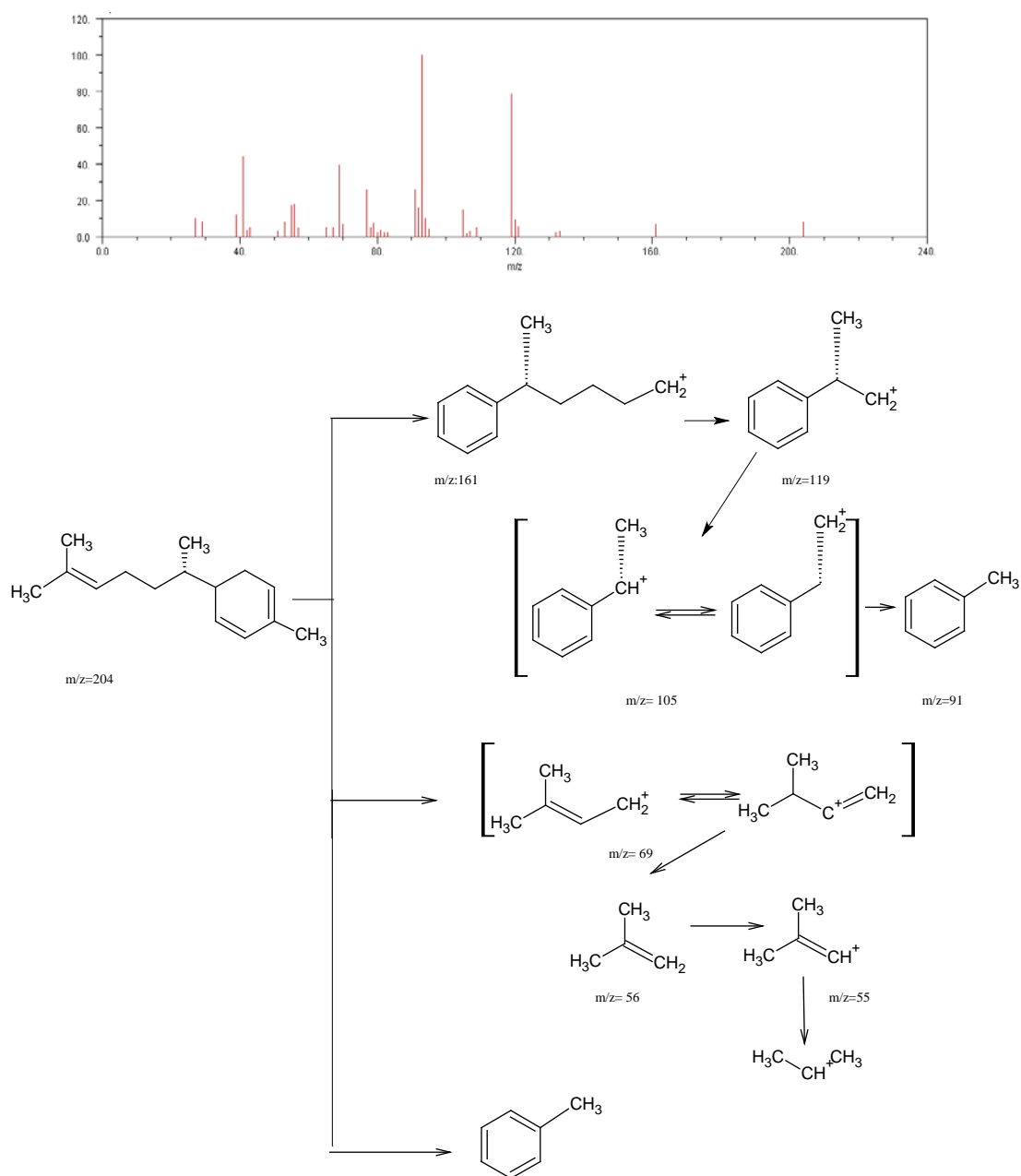


Figura 5. Estructura de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial y el extracto proveniente de las hojas de la planta *Myrica parvifolia* (Benth.).

Patrones de fragmentación de algunos compuestos identificados.

Como se explicó anteriormente algunos compuestos se identificaron por comparación de los espectros de masas, obtenidas por diferentes bibliotecas, apoyado por los Ik, también se analizaron algunos manualmente basándonos en los espectros y patrones de fragmentación, como se muestran a continuación obtenidos del NIST: Ver **Figura 6**.

a) Espectro y fragmentación del α -zingibireno (Davies, 2011).



b) Espectro y fragmentación del α -pineno. (Keller, 2011).

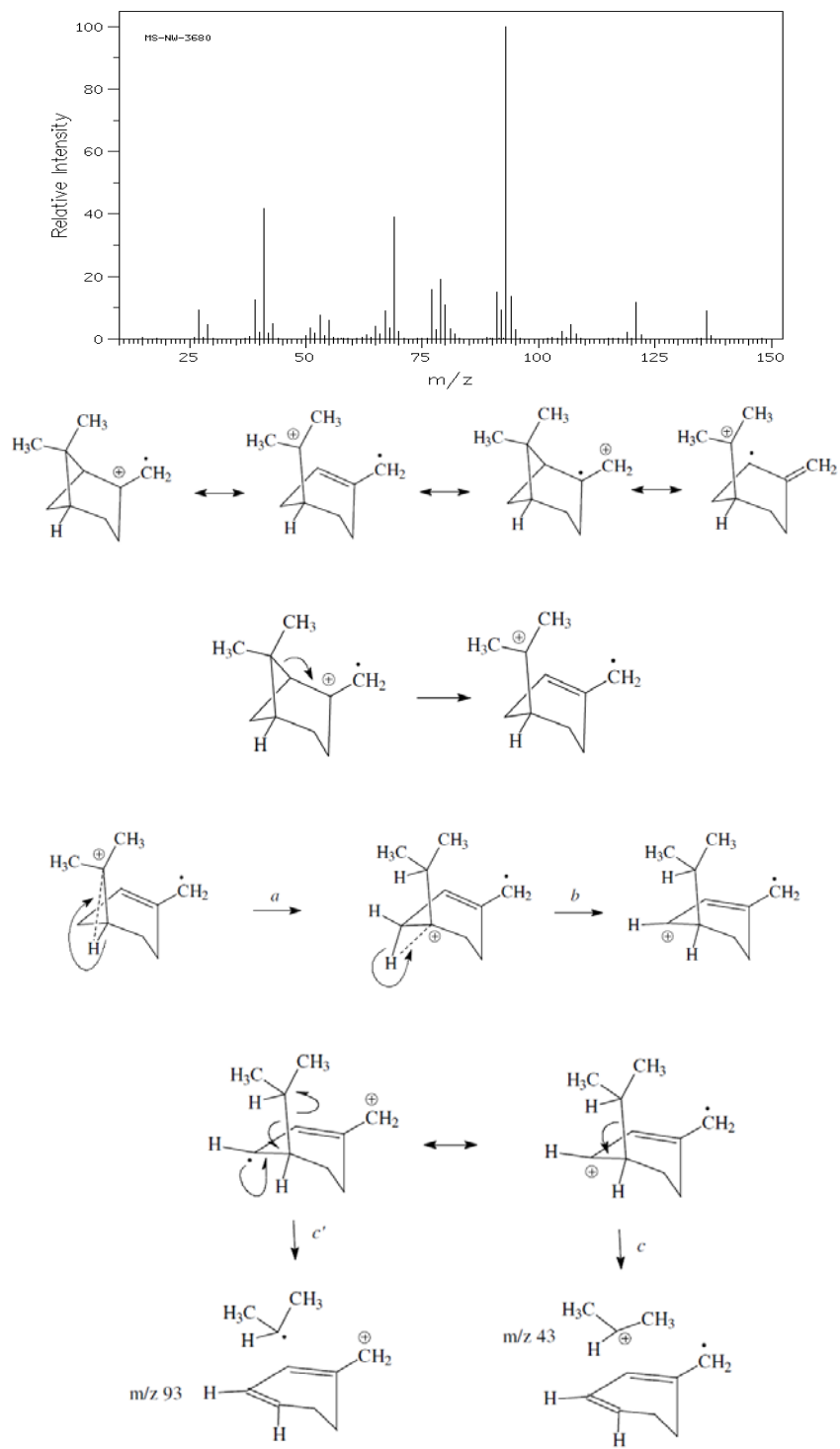


Figura 6. Espectros de Masas y fragmentación de α -zingibireno y α -pineno

Durante la biosíntesis de las plantas, ocurren reacciones de isomerización debidas a procesos enzimáticos, la posible ruta metabólica de formación de algunos compuestos identificados en el aceite de *Myrica*, se muestra a continuación de acuerdo con la literatura.

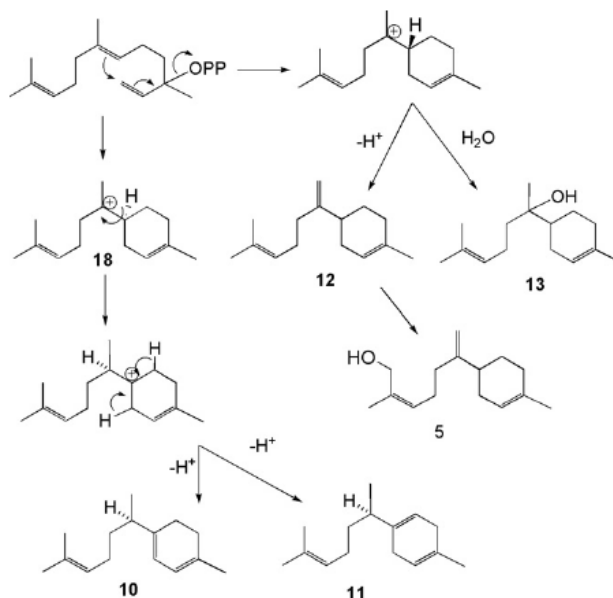


Figura 7. Ruta biosintética para la transformación del 5-farnesil difosfato a ar-curcumeno, β -bisaboleno (12) y α -bisabolol (13) (Jones *et al.*, 2006)

La presencia de compuestos isoméricos por ejemplo del ar-curcumeno en sus isómeros γ -curcumeno (10) y β -curcumeno (11), el β -bisaboleno (12) y el α -bisabolol (13), se deben a la presencia de ciertas enzimas. Las primeras son las ciclasas, estos catalizadores permiten la formación de ciclos de carbonos de 6 miembros los cuales se obtiene a partir del farnesil difosfato presente en las hojas de la *Myrica parvifolia*, lo cual conduce a la aparición de intermediarios enantioméricos del ión bisabolil (18). Las segundas unidades enzimáticas que permiten la aparición de las constituyentes son las sintetasas respectivas del ar-curcumeno, α -bisabol y del β -bisaboleno (**Fig. 7**). Las estructuras proteicas previamente mencionadas catalizan procesos de desprotonación de un carbono específico e hidrólisis conduciendo a la formación de los sesquiterpenos. Las condiciones existentes en la matriz de la planta tales como el pH, la concentración de sales adecuadas en el suelo, la temperatura y demás factores climáticos según la literatura (Rani, 1999), permiten

posiblemente que la enzima α -bisabol-sintetasa tuviera una mayor actividad enzimática formando un sesquiterpeno oxigenado. El incremento del compuesto mayoritario es el efecto de la temperatura sobre algunos compuestos en el cual puede ocurrir un proceso hidrolítico que conduzca a la formación del α -bisabolol a partir del intermediario del ión bisabolil (Jones *et al.*, 2006).

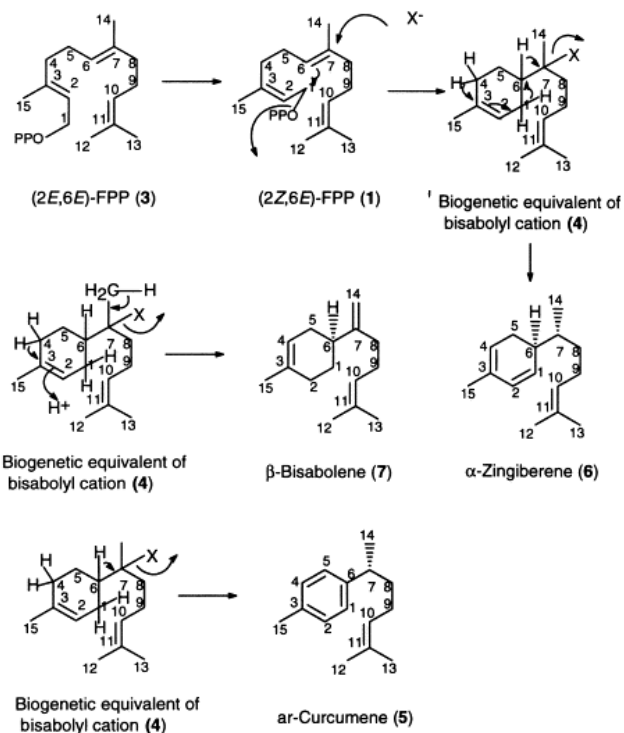


Figura 8. Biosíntesis de α -zingibereno, ar-curcumeno y β -bisaboleno (Rani, 1999).

Algo similar sucede con el α -zingibereno (6), para que la formación de esta sustancia primero pueda ocurrir la ciclación de una molécula de farnesil-pirofosfato (3 y 1) que presenta cierta isomería y luego se da la eliminación de un protón en la estructura (**Fig.8**). La principal diferencia que hay en todo proceso que conlleve a la formación de sesquiterpenos simples es que las sintetasa catalizan la eliminación de un protón hallado en determinada posición, mientras que para el curcumeno (5), la eliminación se da en el carbono 14, y para el zingibereno (6) la eliminación ocurre en los carbonos 1 y 4 (Rani, 1999).

Los resultados de bioactividad de los extractos frente a algunos microorganismos son mostrados en la **Tabla 7**. El presente estudio fue elaborado por el Laboratorio de Ecología Microbiana de Alimentos (LEMA), siguiendo el protocolo establecido por ellos. Una cantidad de 10 mL de aceite seco fue usada para este análisis.

Tabla 7. Actividad antibacterial del aceite esencial de la planta *Myrica parvifolia* (Benth) obtenido por HD con tiempo de extracción de 3 h.

Cepa Bacteriana	Sensibilidad	Diámetro(mm) halo de inhibición
<i>E. coli</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC	+	9
<i>Salmonella sp</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CAMP	+	10

+: Sensible,-: No hay actividad

En general se puede afirmar que el aceite esencial mostró un actividad antibacterial moderada frente a la cepa *Staphylococcus aureus* CAMP así como contra *Salmonella enteritidis* ATCC. Con respecto a las otras cepas entre las que se encuentran variantes de *E. coli* y *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* no hubo actividad biológica.

Este aceite mostró actividad antimicrobiana contra la cepa de *Staphylococcus aureus* CAMP debido a que la mezcla lipofílica contiene nerolidol (*E*) y α -bisabolol, estos sesquiterpenos oxigenados tienen la capacidad de inhibir la actividad de la enzima lipasa, lo cual altera la digestión de grasas y el metabolismo de las lipoproteínas (Kuroda *et al.*, 2007). También dichos compuestos pueden actuar como potenciadores de la actividad antimicrobiana ya que tienen la capacidad de alterar el funcionamiento normal de la membrana celular de la bacteria permitiendo así la entrada de sustancias exógenas a la bacteria las cuales conducen a la muerte celular, la interacción entre estos sesquiterpenoides oxigenados se da gracias a que el nerolidol y el α -bisabolol tienen una estructura similar a la de la capa fosfolipídica que constituye la membrana celular de esta bacteria.

En la **Fig. 9**, se puede observar que el halo de inhibición fue muy pequeño lo cual se traduce en que pese a darse actividad antimicrobiana, la sensibilidad de la cepa al agente bactericida fue mínima. No hubo mayor inhibición del aceite sobre la procariota debido posiblemente a que la cadena tan pequeña del α -bisabolol es muy pequeño (de 7 carbonos) y eso pudo hacer poco efectivas las interacciones entre la membrana de las bacterias gram positivas y el agente antimicrobiano. Otra posible justificación de este fenómeno pudo darse por la baja concentración del nerolidol (0,33%), componente que permite una unión efectiva con la capa protectora de acuerdo con la literatura lo cual incidió en el resultado final (Brehm-Stecher *et al.*, 2003).



Figura 9. Resultados de pruebas antimicrobianas en una cepa de *Staphylococcus aureus* CAMP

La actividad antibacteriana que tienen el aceite esencial de la planta cruz de mayo contra la bacteria *Salmonella enteritidis* ATCC se debe posiblemente a la presencia de dos monoterpenos como α -pineno y el *p*-cimeno y a algunos terpenos oxigenados como el carvacrol y el timol, aquí se da un sinergismo entre el monoterpeno simple y el fenólico en donde el hidrocarburo interactúa con la membrana por su alta lipofilidad para así alterar la permeabilidad de la capa lipídica, luego el compuesto oxigenado se encarga de romper la membrana permitiendo la salida de ATP y liposacáridos conduciendo así a la muerte celular, tal y como se puede ver en la figura 8, la cepa de salmonella apenas fue sensible al aceite esencial, esto fue debido a que la concentración de los compuestos encargados de la

ruptura de la membrana (timol y carvacol) fue del 0,01% lo que se traduce en que apenas una pequeña porción de las cepas sufrieron una lisis celular (Nada *et al.*, 2005).

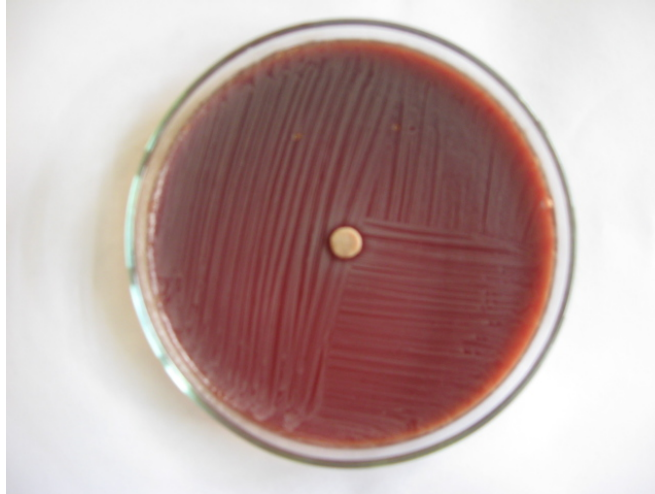


Figura 10. Resultados de pruebas antimicrobianas en una cepa de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076

En el caso de bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella sp* no hubo inhibición debido a que estas bacterias son gram-negativas, estas bacterias tienen una capa hidrofílica de peptidoglicano la cual impide la penetración de los compuestos hidrofílicos dentro del blanco que en este caso es la membrana celular (Nada *et al.*, 2005). En el caso de la cepa de *Listeria monocytogenes* la ausencia de inhibición fue debido posiblemente a la ausencia de germacreno-D en los aceites extraídos, este sesquiterpeno tiene una estructura que le permite tener una interacción efectiva con la membrana celular y posibilita la distorsión estructural, sin la presencia de este compuesto no es posible una alteración de la membrana celular y por ende no hay manera de que un compuesto fenólico pueda disolverse dentro de la membrana, penetrar en el interior de la célula procariota y alterar el mecanismo celular conduciendo a la muerte del microorganismo (Marino *et al.*, 2001), por ende no hay un sinergismo que permita combatir la infección bacteriana.

Algunos autores han elaborado trabajos experimentales con el α -bisabolol y lo recomiendan como fitopesticida, para tratar larvas de varios insectos y organismos como y el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), el cual supone un riesgo para la salud

humana (Kamatou *et al.*, 2010) y como insecticida en el caso de la mosca blanca de la fruta (*Bemisia argentifolii*), responsable de la devastación de las cosechas de algodón así como la de algunas frutas como el melón y la sandía en países tropicales (De Andrade *et al.*, 2004).

Al ser la *Myrica* una buena fuente de α -bisabolol, el aceite esencial de esta planta se convierte en un potente biopesticida. Otro uso que puede tener este aceite, es en la industria farmacéutica contra mareo, neuralgias, dolores de cabeza y calambres debido a que el α -bisabolol posee una notoria actividad antiplasmodial (Panten *et al.*, 2006). Los aceites con alto contenido de este sesquiterpeno poseen además una marcada actividad antiinflamatoria y antioxidante (De Andrade *et al.*, 2004).

También está comprobado que los aceites ricos en bisabolol, son capaces de mejorar la absorción precutánea de algunas moléculas, estos factores hacen que este aceite pueda ser considerado como materia prima en la elaboración de cosméticos, así como en la fabricación de productos para el cuidado de la piel, contribuyendo a prevenir la excesiva pigmentación y la melanogénesis de la dermis (Kamatou *et al.*, 2010).

V. CONCLUSIONES

La composición de los volátiles del *Myrica* se caracterizó por el contenido de monoterpenos y sesquiterpenos sencillos y oxigenados, además por la presencia de algunos constituyentes importantes para el aroma, pero están en baja concentración.

1. El valor de la densidad del aceite esencial obtenido por hidrodestilación fue de 0,9148 y el de índice de refracción fue de 1,49; ambos valores demuestran que el aceite clasifica como un aceite fluido, aromático y con compuestos volátiles que caracterizan el aroma de esta planta.
2. El bajo índice de acidez y de ácidos grasos que caracteriza el aceite de *Myrica* sugieren que puede ser de gran utilidad a nivel industrial debido a que es poco susceptible a procesos degenerativos.
3. Se identificaron 51 constituyentes de un total de 57, por HD a tres tiempos de extracción la mayoría de carácter terpénico. De estos 27 fueron monoterpenos 15 de ellos oxigenados, 20 sesquiterpenos de estos 7 son oxigenados y 4 constituyentes que presentan composición variada.
4. Por DES, se identificaron 56 de 59 compuestos de estos, 28 fueron monoterpenos, 18 de ellos oxigenados, 19 sesquiterpenos, de estos 6 oxigenados, además de 3 aldehídos, 3 alcoholes una cetona y 2 esterés, para un total de 67,974 mg de volátiles por 100 g de muestra.
5. El aceite esencial de la *Myrica* obtenida a diferentes tiempos de extracción se caracteriza por presentar un alto contenido de sesquiterpenos representados por más del 75 % de la composición total y tienen como compuesto mayoritario el α -bisabolol.
6. Para obtener el extracto de volátiles especialmente rico en monoterpenos, de carácter no oxigenado como es el caso del α -pineno se recomienda usar el método de extracción DES.
7. Tanto el extracto de volátiles (DES), como el aceite esencial (HD) se caracterizaron principalmente por la presencia de compuestos terpénicos con

respecto a otros constituyentes de grupo funcional diferente (alcoholes, aldehídos, ésteres, etc.) los cuales fueron muy escasos.

8. El número y la concentración de constituyentes volátiles de composición variada fue mayor en el extracto de volátiles (DES) que en el aceite esencial (HD)
9. A mayor tiempo de destilación, el contenido del compuesto mayoritario (α -bisabolol) aumenta y por ende crece la fracción de los sesquiterpenos oxigenados.
10. La presencia de compuestos como nerolidol, α -bisabolol, *p*-cimeno, α -pineno, timol y carvacol posiblemente contribuyen a la inhibición de actividad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus* CAMP y de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.
11. El aceite esencial no pudo inhibir la actividad antimicrobiana de las bacterias gram- negativas.
12. La ausencia de actividad antimicrobiana con respecto a la bacteria *Listeria monocytogenes* pudo deberse a la ausencia de un compuesto que pudiera tener la interacción adecuada con la membrana celular.

VI. REFERENCIAS

- Adams, R.P. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th. Allured Publishing Co., Carol Stream, 803 p
- Agnihotri, S., Wakode, S., and Ali, M. (2012). Essential oil of *Myrica esculenta* Buch.Ham: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26(23), 1-4.
- Aguilar, R., Domínguez, A., and Lopez J.E. (1998). Hold up time in gas Chromatography. Improved determination of Kovats retention indices. *J. of Cromatography A.*, 805(1-2), 161-168.
- Aldana E., I., Forero Báez, R., Izquierdo F., P., and Lozano, A. R. (2001). *Prácticas agrosostenibles para el Departamento de Cundinamarca. Bogotá: Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura.*
- Alimentarius, C. (2001). Codex standard for olive oil, virgin and refined, and for refined olive-pomace oil. Recuperado el 12 de Junio de 2013, de http://ro.unctad.org/infocomm/anglais/olive/doc/Cxs_033e.pdf
- Arango, O., Hurtado, A., Castillo, P., and Santacruz, M. (2009). Estudio de las condiciones de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de laurel de cera (*Morella pubescens*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 40-48.
- Atti-Santos, A., Rosatto, M., Fernandes Pauletti, G., Duarte Rota, L., Juarez, C., Pansera, M., y otros. (2005). Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. *Brazilian archives of biology and technology*, 48(6), 1035-1039.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Bastos, D., Fornari, A., Queiroz, Y., and Torres, E. (2006). Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(3).
- Bélanger, A., Dextraze, L., Isnardi., M., Chalchat, J., Garry, R., and Collin, G. (1997). Chemical Composition of Essential Oil and Headspace of the Quebec “*Myrique baumier*” Wax Myrtle (*Myrica gale* L.). Influence of Extraction Process. *Journal Of Essential Oil Research*, 9(6), 657-662.
- Brehm-Stecher, B. F., and Johnson, E. A. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3335-3360.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Carlton, R., Waterman, P., and Gray, A. (1992). Variation of leaf gland volatile oil within a population of sweet gale (*Myrica gale*) (Myricaceae). *Chemoecology*, 3(1), 45-54.
- Dorman, D. H., and Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Davies, N. (2011). *The Nist WebChembook*. (NIST Mass Spectrometry Data Center) Recuperado el 2013 de Junio de 17, tomado de <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C495603&Mask=200#Mass-Spec>.
- De Andrade, I. L., S. Bezerra, J. N., A. Lima, M. A., P. G. de Faria, R. A., S. Lima, M. A., and Andrade-Neto, M. (2004). Chemical Composition and Insecticidal Activity of Essential Oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. *J. Agricultural of Food Chemistry*, 19, 5879–5881.
- Flath, R., & Forrey, R. (1977). Volatile Components of Papaya (*Carica papaya* L., Solo Variety). *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 25(1), 103-109.
- Gaviria, M., Quijano, C., Pino, J., and Madriñan, S. (2011). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Drimys granadensis* L.f. Leaves from Colombia. *Chemistry and Biodiversity*, 3, 532–539.
- Gentry, A. (1996). *A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru), with supplementary notes on herbaceous taxa*. Chicago; London: University of Chicago Press.
- Gunstone, F. (2011). *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Use*. West Sussex: John Wiley and Sons.
- Gustafson, J., Liew, Y., Chew, S., Markham, J., Bell, H., Wyllie, S., y otros. (1998). Effects of tea tree oil on *Eschericia Coli*. *Lettes in Applied Microbiology*, 26(3), 194-198.
- Houghton, P., and Raman, A. (1998). *Laboratory Handbook for Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman & Hall.
- Jaenson, T., Palsson, K., and A.-K., B.-K. (2005). Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. *Medical and Veterinary Entomology*, 19(4), 345-352.
- Jones, C., Ghisalberti, E., Plummer, J., and Barbour, E. (2006). Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes; a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood, *Santalum album*. *Phytochemistry*, 67(22), 2463–2468.

- Kalembe, D., and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kamatou, P. G., and M. Viljoen, A. (2010). A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich Oils. *Journal American Oil Chemistry Society*, 87(1), 1–7.
- Keller, J. (2011). *Electron Impact (EI) Fragmentation Mechanisms: The Case of Pinene*. Recuperado el 2013 de 06 de 17, de: <http://chem.uaf.edu/keller/Courses/324Sp11/PDF/PineneFragmentation.pdf>.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., and Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
- Koolman, J., and Röhm, K.-H. (2004). *Bioquímica: textos y atlas*. Madrid: Edición Médica Panamericana.
- Kuroda, M., Nagasaki, S., Ito, R., and Ohta, T. (2007). Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 273(1), 28-34.
- Maheshwari, D. (2010). *Industrial Exploitation of Microorganisms*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
- Marino, M., Bersani, C., and Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 187-195.
- Martinez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Recuperado el 17 de Junio de 2013, de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias>. 2001b.pdf
- Molares, S., Beatriz Gonzalez, S., Ladio, A., and Agueada Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (*Asteraceae: Astereae*). *Acta botanic. Bras.*, 23(2), 578-589.
- Nada, B., Mirjana, S., and Valerija, D. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils. *Acta Botanic. Croat.*, 96(1), 313-322.
- Panten, J., & Surburg, H. (2006). *Common Fragrance And Flavor Materials: Preparation, Properties And Uses*. Heppenheim: Wiley-VCH.
- Parra-O., C. (2002). New combinations in South American *Myricaceae*. *Brittonia*, 54(4), 322-326.

- Pawliszyn, J. (2002). *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Pearson, D. (1986). *Técnicas de Laboratorio para el Análisis de los Alimentos*. Zaragoza:España. Editorial Acribia.
- Pino, J., Bello, A., Urquiola, A., Marbot, O., & Marti, M. (2004). Leaf Oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 4.
- Popovici, J., Bertand, C., Baganarol, E., & P., F. (2008). Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. *Natural Product Research*, 22(11), 1024-1032.
- Rani, K. (1999). Cyclization of farnesyl pyrophosphate into sesquiterpenoids in ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Fitoterapia*, 70(6), 568–574.
- Ryman, D. (1995). *Aromaterapia: enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. Barcelona: Editorial Kairos.
- Sandoval, J., Quijano, C., Morales, G., & Pino, J. (2010). Composition of the Essential Oil From the Leaves and Fruits of *Morella pubescens* (Humb.et Bonpl. Willd.) ex Grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 133-134.
- Skene, K., Sprent, J., Raven, J., & Herdman, L. (2000). *Myrica gale* L. *Journal of Ecology*, 88(6), 1079-1094.
- SON. (2000). Standards for edible refined palm oil and its processed form. *Standard Organization of Nigeria*, 2-5.
- Supriya, A., Sharad, W., and Alib, M. (2012). Essential oil of *Myrica esculenta* Buch.Ham.: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 26(23), 1-4.
- Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., and Pichette, A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12(4), 299–304.
- Ultee, A., Slump, R., Steging, G., and Smid, E. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Journal of Food Protection*, 174(4), 620-624.
- Vargas, W. G. (2002). *Guía Ilustrada de Las Plantas de Las Montañas del Quindío y Los Andes Centrales*. Universidad de Caldas: Centro Editorial. I^a. Edición. Manizales, Colombia. P. 503.