UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE ISHPINK (*Ocotea quixos*) EN FUNCIÓN DEL TIPO DE SUELO, EL ÁREA GEOGRÁFICA, Y DE FACTORES AMBIENTALES DENTRO DE LAS ZONAS DE CULTIVO DE LA ESPECIE VEGETAL, EN LA REGIÓN ORIENTAL DEL ECUADOR

AUTORES:
OMAR ALEXANDER CARRASCO LÓPEZ
MARCO ALEXANDER SIMBAÑA SARMIENTO

TUTOR:
CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Omar Alexander Carrasco López, con documento de identificación N° 1716779564, y Marco Alexander Simbaña Sarmiento, con documento de identificación N°0401349840, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud somos autores del trabajo de titulación intitulado: "Variación de la composición química del aceite esencial de hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*) en función del tipo de suelo, el área geográfica, y de factores ambientales dentro de las zonas de cultivo de la especie vegetal, en la región oriental del Ecuador", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

.....	.....
Carrasco López Omar Alexander	Simbaña Sarmiento Marco Alexander
Cédula de ciudadanía: 1716779564	Cédula de ciudadanía: 0401349840

Quito, marzo de 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, Christian Fabricio Larenas Uría MSc, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Variación de la composición química del aceite esencial de hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*) en función del tipo de suelo, el área geográfica, y de factores ambientales dentro de las zonas de cultivo de la especie vegetal, en la región oriental del Ecuador, realizado Carrasco López Omar Alexander y Simbaña Sarmiento Marco Alexander, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo 2016

Quim. Christian Fabricio Larenas Uría

CI: 170558604-6

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi familia, es especial a quien me enseñó el valor de una promesa.

Y a mis amigos y compañeros, cuyas palabras me dieron ánimos en los momentos necesarios.

Omar Carrasco

La presente investigación la dedico a Dios, a mis padres, hermano y familia, de manera especial a mi madre por enseñarme y guiarme para que día a día siga creciendo como persona.

Y agradezco a mis amigos y compañeros, que me ayudaron acrecen como persona.

Marco Simbaña

Agradecimiento

Agradecemos a nuestro querido tutor, Químico Christian Larenas, que nos ha ofrecido guía en esta travesía.

A nuestros profesores, que nos dieron las herramientas para enfrentar los retos del día. A nuestras familias, que nos apoyaron a cada paso y en cada viaje.

Índice

Introducción 1

1. Marco conceptual 4

1.1 Aceite esencial 4

1.2 Variación química 7

1.3 Análisis de suelo 10

1.4 Descripción de *Ocotea quixos* 18

1.5 Región oriental 20

2. Metodología 21

2.1 Localización geográfica 21

2.2 Diseño experimental 21

2.3 Lugares de muestreo 22

2.4 Variables y métodos de evaluación 22

2.5 Métodos 23

2.6 Aceite esencial 27

2.7 Cromatografía de gases acoplada a masas 28

3. Resultados y discusión. 29

3.1 Lugares de muestreo 29

3.2 Extracción y rendimiento del aceite esencial. 30

3.3 Análisis de suelo 32

3.4 Aceites esenciales 34

3.5 Análisis estadístico 34

Conclusiones 42

Recomendaciones 44

Referencias 45

Índice de tablas

Tabla 1. Interpretación de lecturas de conductividad (uS/cm) en lecturas 2:1 agua suelo 15

Tabla 2. Datos ambientales de los lugares de muestreo con codificación. 29

Tabla 3. Coordenadas UTM y geográficas de los lugares de muestreo 30

Tabla 4. Rendimiento de aceite esencial por lugar de muestreo 32

Tabla 5. Características físico químicas del suelo. 33

Tabla 6. Características físicas de los aceites esenciales 34

Tabla 7. Área de pico de detección de los componentes del aceite esencial 35

Tabla 8. Resumen de la prueba honesta de Tukey 41

Índice de figuras

Figura 1. Mapa georeferencial de presencia de O.quixos registrado en Ecuador 31

Figura 2. Análisis de correspondencia canónica de las características de suelo, bioclimáticas y de aceites esenciales..... 37

Figura 3. Análisis clúster..... 38

Figura 4. Análisis de componentes principales de las características de suelo, bioclimáticas y de aceites esenciales..... 40

Índice de anexos

Anexo 1. Niveles de pH de suelo en relación a la disponibilidad de elementos..... 50

Anexo 2. Condiciones del método usado en GCMS..... 51

Anexo 3. Sitios de recolección..... 52

Anexo 4. Figuras de prueba Honesta de Tukey 58

Resumen

Dentro de los metabolitos secundarios provenientes de la diversidad vegetal, los aceites esenciales se caracterizan por su fácil obtención y purificación, además de ser potenciales fuentes de productos útiles a nivel doméstico e industrial. La composición del aceite esencial de una misma especie vegetal puede ser diversa y dependiente de los factores ambientales asociados al desarrollo de la misma, lo que origina diferentes quimiotipos, siendo importante investigar la correlación entre composición del aceite esencial y las variables ambientales de crecimiento de las plantas.

El árbol de canela amazónica o Ishpink (*Ocotea quixos*) es una planta nativa de la región oriental del Ecuador, su distribución y crecimiento en diferentes condiciones ambientales puede propiciar la generación de quimiotipos, los cuales pueden perderse por deforestación de la zona. El presente estudio se enfocó en la búsqueda e identificación de quimiotipos de *O. quixos* a través de la caracterización de la composición del aceite esencial de sus hojas. Para ello fue necesario realizar la georreferenciación de cada muestra colectada de hojas y suelos; para luego registrar los datos bioclimáticos. Se realizó análisis de suelos, análisis de composición del aceite esencial por GCMS, además de análisis estadísticos multivariados para determinar si existe relación entre los factores ambientales y la variación química del aceite esencial. Los resultados muestran que existe variación química en la composición del aceite esencial de las diversas plantas colectadas en diferentes locaciones, que señala la existencia de quimiotipos y por ende una probabilidad de asociación de la composición del aceite esencial a los factores ambientales.

Palabras clave: *Ocotea quixos*, quimiodiversidad, aceite esencial, análisis de suelos.

Abstract

Among the secondary metabolites from plant diversity, essential oils are noted for their easy extraction and purification, as well as being potential sources of useful products to domestic and industrial level. The composition of the essential oil of the same plant species can be diverse and dependent of environmental factors associated with development of itself, resulting in different chemotypes, being important to investigate the correlation between essential oil composition and environmental variables of growth plants.

Amazon tree cinnamon or Ishpink (*Ocotea quixos*) is a native plant to the eastern region of Ecuador, its distribution and growth in different environmental conditions can lead to the generation of chemotypes, which may be lost due to deforestation in the area. This study focused on the search and identification of *O. quixos* chemotypes through the characterization of its leaves' essential oil composition. It was necessary to make georeferencing of each leaves and soil collected sample and bioclimatic data record. Soil, essential oil composition by GCMS and Multivariate statistical analysis was performed in order to determine whether there is a relationship between environmental factors and essential oil chemical variation. The results show that there is variation in the essential oil chemical composition of several plants collected in different locations, which indicates the existence of chemotypes and therefore a likelihood of association of the composition of essential oil to environmental factors

Keywords: Ocotea quixos, chemodiversity, essential oil, soil analysis.

Introducción

Los aceites esenciales son fuentes botánicas potenciales para encontrar o desarrollar nuevos agroquímicos, pues se caracterizan por presentar baja toxicidad para animales de sangre caliente, alta volatilidad y toxicidad para plagas de granos almacenados y microorganismos que afectan las plantas (Prieto, 2010, pág. 2). Son económicamente importantes para la industria cosmética debido a su uso en jabones, lociones, perfumes y demás, un ejemplo es el uso de quimiotipos específicos de salvia (*Salvia officinalis*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en el desarrollo de nuevos perfumes finos que eleva los precios de estos aceites esenciales en el mercado (Rios, 2016, pág. 8). En la industria farmacéutica y en la medicina también tienen especial importancia por su potencial, como agentes medicinales, que han sido ancestralmente usados como expectorante para el tratamiento de tos y bronquitis (*Eucaliptus globulus*), como agente antibacteriano (*Melaleuca alternifolia, Syzygium aromaticum)*, como descongestionante (*Mentha×piperita*); los métodos de administración han ido cambiando desde las formas diluidas de los aceites esenciales a compresas, cremas y nebulización de los mismos por medio de agua como medio conductor, pero en la actualidad se han introducido métodos de aplicación oral a través de la encapsulación, sin embargo hay que tener en cuenta que existe niveles de toxicidad que debe tomarse en cuenta en la dosis de administración (Rios, 2016, pág. 9). En el industria alimenticia, los aceites esenciales son usados como saborizantes para productos alimentarios, bebidas saborizadas y productos a base de alcohol; es además usados como antibacteriano, antifúngico, antiviral, nematicida, insecticida y antioxidativo, usados en la agricultura y en productos nutricionales (Rios, 2016, pág. 9) (Asbahanii, y otros, 2015, pág. 220). Debida al interés económico en las diferentes industrias que existe

varias investigaciones que apuntan al descubrimiento de nuevos principios activos dentro de estos aceites esenciales (Bruni , y otros, 2004, pág. 1)

En el Ecuador se tiene registros de la presencia de *Ocotea quixos* a los largo de la región oriental (Torres Espinoza, 2013, pág. 2); por diferentes motivos, las poblaciones de la especie se han reducido paulatinamente, por lo que son inciertos los lugares donde se puede encontrar actualmente este árbol, siendo necesario una nueva búsqueda y registro.

Se ha demostrado que plantas cultivadas en diferentes sitios presentan variación química entre individuos de la misma especie, lo que indicaría un desarrollo diverso en la composición de metabolitos secundarios observados dentro de la evolución de la especie (Jones & Firn, 1991, pág. 274). Las diferentes zonas en donde se cultive Ishpink (*Ocotea quixos*) pueden mostrar quimio diversidad; por ello es necesario analizar la variación de la composición química del aceite esencial de hojas de la planta en función del tipo de suelo, área geográfica y factores ambientales dentro las zonas de cultivo de la especie, en la región oriental del Ecuador. Por tanto, el estudio se enfoca hacia la caracterización de la composición de los aceites esenciales, para que pueda utilizarse como información de línea base en programas de conservación de los posibles diferentes quimiotipos y variedades de la especie, así como sus posibles usos en las industrias de cosméticos, fármacos y alimentos.

Para ello es necesario determinar la existencia de poblaciones o individuos de la especie dentro de la región oriental del Ecuador, ubicando y seleccionando los posibles proveedores del material vegetal necesario para la extracción del aceite esencial. Para el momento de la recolección es necesario georreferenciar la posición de la planta y así generar un mapa con la ubicación geográfica de las zonas de cultivo

de la especie vegetal. En paralelo a la recolección se debe tomar datos de temperatura, humedad, altitud y presión para determinar las variables bioclimáticas de las zonas de cultivo y, a través de la toma de muestras de suelo de los cultivos, realizar los análisis químicos para determinar la composición de los mismos; por último se tomará muestras de material vegetal para la extracción de aceites esenciales; a estos se realizará análisis físicos y químicos, así como el perfil cromatográfico. De esta manera se podrá comparar por métodos estadísticos multivariados, si existen correlación entre estos parámetros ambientales y las características físico-químicas de los aceites esenciales.

1. Marco Conceptual.

1.1 Aceite esencial.

Los aceites esenciales son líquidos volátiles aceitosos de olores característicos, que son extraídos de plantas aromáticas. Estos pueden ser sintetizados como metabolitos secundarios, hallándose en diversas partes de las plantas como flores, hojas, frutos, corteza, semillas, madera y raíces. Pueden ser extraídos de varias maneras, pero debido a su naturaleza hidrofóbica, lipofílica y al ser inmiscible en agua, además de su densidad menor al agua con muy raras excepciones, se suelo utilizar métodos de destilación para su obtención (Asbahanii, y otros, 2015, pág. 221) (Rios, 2016, pág. 3). A temperatura ambiente, pueden estar en color entre lo incoloro a un tenue amarillo, cuando están destilados recientemente, con un olor aromático característico de la planta de donde se extrajo, muy limpio al tacto, fácil de absorber en la piel, tiene un alto índice de refracción que puede ser útil para la identificación y control de calidad; pero debe tomarse con precaución este parámetro, pues existen diferentes codificaciones en el mundo actual (Rios, 2016, pág. 4)

1.1.1 Composición del aceite esencial.

Están compuestos por mezclas complejas de componentes volátiles extraídos de una variedad de partes de la planta, representan menos del 5% de material vegetal seca de las plantas, estos se derivan de la vía de síntesis del acetato y llegan a tener una masa debajo del peso molecular de 300, y está compuesto mayormente por terpenos hidrocarbonados (isoprenos) y terpenoides (Asbahanii, y otros, 2015, pág. 222) (Rios, 2016, pág. 5), además presentan otros compuestos como los alil fenoles e isoalil fenoles; estos compuestos mencionados son en la mayoría derivados de carbohidratos, compuestos oxigenados y (aunque en menor número de especies) hay

dominancia en la composición de derivados aromáticos como timol y carvacrol (Rios, 2016, pág. 4).

La unidad estructural llamada isopreno se describe como 2-metil-1,3-butadieno con su fórmula general estructural $(C_5H_8)_n$ donde N es el número de enlaces de la "cabeza a la cola" que se dan para formar los terpenos y terpenoides. Los terpenos pueden estar divididos en monoterpenos y sesquiterpeno. (Anaya Lang, 2003). Además de eso existen plantas que contienen entre sus constituyentes a elementos derivados:

Los Monoterpenos: Son productos típicos de las plantas superiores, aunque se encuentra también en animales y algunos insectos, cuentan con dos unidades de isopreno. Entre los compuestos más comunes de este grupo están geraniol, timol, cineol, 3- pineno, alcanfor y limoneno (Anaya Lang, 2003, pág. 52).

Sesquiterpenos: Son terpenos alifáticos o cíclicos que pueden tener dobles ligaduras o estar saturados con tres unidades de isopreno; contienen grupos oxo, hidroxi, aldehído, acido carboxílico y lactonas, por lo que presentan gran variedad. Son muy volátiles y se encuentran formando parte de muchos aceites esenciales en las plantas superiores (Anaya Lang, 2003, pág. 53).

Terpenoides: Son derivados de los terpenos y se clasifican en monoterpenoides y sesquiterpenoides, que pueden ser alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, fenoles, éteres y esteres (Asbahanii, y otros, 2015, pág. 223).

Alil fenoles: Estos compuestos reportados se agrupan los derivados de alil fenoles e isoalil fenoles, estos se encuentran en pocas plantas como el anís (*Pipinella anisum*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y anís estrellado (*Illicum verum*) (Lopez Ritas, 1972, pág. 6).

Otros compuestos: Pueden estar presentes en el aceite esencial, y es un caso especial los aceite esenciales que no son obtenidos por destilación, enfleurage (método de extracción en seco por grasa de animal) u extracción con solventes, compuestos no volátiles pueden aparecer en el producto; estos compuestos pueden ser sequiterpenos lactonas, glucosidos, cumarinas ligustilida, furanocomarina, salicilatos, amigdalina (la cual libera benzaldehído y Cianamida hidrogenada), los cuales se encuentran en bajas cantidades en algunas plantas, mientras que en otras están presentes como característica principal (Rios, 2016, pág. 7).

1.1.2 Métodos de extracción.

Los aceites esenciales son obtenidos de material vegetal fresco por diversos métodos extractivos, que son clasificados en dos categorías: métodos convencionales y métodos avanzados. De los métodos utilizados uno de los más utilizados por su simpleza y costos bajos es el métodos de destilación por arrastre de vapor es una de los métodos oficiales para la obtención de aceites esenciales, está basado en el principio de la inmisibilidad de los aceites esenciales con el agua, lo que permite que este sea arrastrado por el vapor, extrayéndolo de los órganos que lo almacena y siendo conducido hacia la parte superior de una alambique, donde es enfriado y condensado para formar un producto destilado con dos fases, esta se diferencia de la hidrodestilación en que una parrilla o reja que separa al material vegetal y el agua, permitiendo que solo el vapor este en contacto con el material. Es mejor en varios sentidos debido a que disminuye el tiempo de extracción y por ende disminuye la degradación de los componentes del aceite esencial. (Asbahanii, y otros, 2015)

1.1.3 Quimiotipo.

En los aceites esenciales existe también variabilidad, no solo entre varias plantas, sino también entre los productos extraídos de diversos individuos o sectores, por lo

cual la industria farmacéutica y cosmética los denomino variedades o quimiotipos (Bagnoli, Loreto, & Fineschii, 2009, pág. 1).

Alrededor de 3000 diferentes aceites esenciales ha sido descritos, de los cuales 300 son usados comercialmente en el mercado de fragancias y esencias; sin embargo es por esta variabilidad que se presenta un problema para la industria y al mismo tiempo una oportunidad para otras aplicaciones, como la medicina y esta es la razón por la que se invierte un gran esfuerzo en identificar estos cambios en factores no genético (Rios, 2016, pág. 4). Estos cambios son identificados entonces por los cambios en el perfil químico de los metabolitos secundarios para ser explicados luego por clima, lluvia u origen geográfico de la planta o también perfil genético de la misma. (Bagnoli, Loreto, & Fineschii, 2009, pág. 2)

1.2 Variación química.

El concepto fue introducido por primera vez en 1882 por Moens, quien aseveraba que existían dos variedades químicas en *Cinchona ledgendariana,* una de las cuales presentaba el alcaloide quinidina, mientras la otra presentaba cinchonidina, siendo reportada como diversidad intraespecífica (IsCh) por primera vez (Tétényi, 2002, pág. 15), con la cual la define como la capacidad de las plantas para diferenciarse, no solo por su genotipo, sino por la variación química.

Desde la década del 60, se ha desarrollado un especial interés por conocer IsCh en varias plantas, este fenómeno se da de forma más evidente en las plantas con aceites esenciales y entre estas se estudió las familias Araceae, Apiaceae, Chenopodiaceae, Lamiaceae, Asteraceae y Laureacea (Tétényi, 2002). Esta última es estudiada por sus utilidad, pues dentro de ella se encuentra *Cinnamomum verum* (Canelo*), Persea*

americana (Aguacate) y varias especies de Ocotea como *Ocotea quixos* (Ríos, Koziol, Perdersen, & Granda, 2007).

El fenómeno IsCh puede ser explicado de forma inmediata por un factor genético (Jones & Firn, 1991) (Tétényi, 2002), sin embargo, sería apresurado clasificarlo de esta manera, puesto que existen otros factores que afectan a la planta y a la producción de aceites esenciales, tal como las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios, que a su vez están regidas por el ambiente de la planta; este ambiente incluye tanto factores bióticos como abióticos (Anaya Lang, 2003).

De forma que la simple existencia de parentesco químico entre varias plantas por estudio de cromatografía no implica que exista relación directa genética implícita en la misma; por ejemplo cineol 1-8 puede ser sintetizado por tres rutas diferentes dependiendo de la familia Asteraceae, Verbenaceae o Lamiaceae-Lauraceae-Myrtaceae (Tétényi, 2002, pág. 17). Es una ley en ecología que todo organismo intenta adaptarse al medio para sobrevivir de forma que "cualquier factor ambiental puede ser limitante o determinante de la síntesis de uno o varios metabolitos secundarios en una planta" (Anaya Lang, 2003, pág. 65).

1.2.1 Factores extrínsecos en la variabilidad química en las plantas.

Entre las variables ambientales que más afectan a la producción de metabolitos secundarios, entre estos a los terpenoides son: los nutrimentos del suelo y la intensidad de luz. Para aceites esenciales es importante hablar de la sequía y salinidad (Anaya Lang, 2003, pág. 66).

1.2.1.1. Nutrimentos del suelo.

Se debe tomar en cuenta que cada especie de planta reacciona distinto a los niveles de los nutrimentos del suelo dependiendo de la adaptación que tenga a la región específica; por ejemplo, la reducción de fósforo disminuye la producción de

glucosilatos en *Brassica nigra*, mientras que la disminución de Nitrógeno, Fósforo, Azufre y Potasio aumenta la producción de metabolitos no-nitrogenados (ácidos cinámicos simples, taninos hidrosolubles, lignina y taninos condensados) (Anaya Lang, 2003, pág. 67). Como postuló la teoría Daniel Janzen en 1974, que "la inversión total de una planta en la producción de metabolitos secundarios podría ser mayor en los sitios pobres de nutrimentos, ya que el costo de reemplazar las pérdidas debidas a la herbivoría en estos sitios podría ser mayor que en los sitios ricos en nutrimentos" (Anaya Lang, 2003, pag. 68), que en conjunto con la teoría de la evolución química de los metabolitos secundarios, publicados en 1991 por Jones y Firn, que propone que la variabilidad en las condiciones ambientales sumada a la presión por la supervivencia crean un ambiente donde los organismos cambian sus vías metabólicas para producir metabolitos secundarios que les ayuden a sobrevivir (Jones & Firn, 1991) siendo esta variación las que nos lleva a pensar a los autores que existe variedades en plantas o subespecies en ciertos animales basado en la producción de metabolitos secundarios. Teóricamente, si aceptamos estos conceptos, se produciría mejor calidad de metabolitos secundarios en sitios donde la competencia es más agresiva, pero que el rendimiento total se mejora por la disponibilidad de nutrimentos (Anaya Lang, 2003) (Bruni , y otros, 2004) (Jones & Firn, 1991).

En general se sabe que una mayor cantidad de nitrógeno en el suelo de da como resultado mayor biomasa además de que aumenta la cantidad de aceite esencial, pero dependiendo de la temporada climática sea seca, con menor producción, que en la época húmeda, con mayor producción (Bhattacharya, 2015, pág. 21)

1.2.1.2. Salinidad y sequía.

Ante la sequía, la reacción observada en la mayoría de plantas suele ser la acumulación de aminoácidos, poliaminas, azúcares, ciclitoles, betaínas, colina e iones inorgánicos. Esto para mantener el balance osmótico y suelen aumentar las características organolépticas de productos; se puede así mismo presentar un incremento de varios tipos de metabolitos secundarios ente los que están los terpenoides. Este incremento se da siempre y cuando exista periodos cortos de sequía que produzcan este estrés, ya que periodos prolongados tiene el efecto contrario (Anaya Lang, 2003, pág. 69).

En la salinidad tiene en cambio un efecto contrario como factor de estrés pues afecta a los terpenos disminuyendo su síntesis, debido a que la planta produce otros como ácidos fenólicos simples y alcaloides (Anaya Lang, 2003, pág. 70).

1.2.1.3. Lluvia.

Puede existir un efecto de lixiviación si las lluvias son prolongadas, lo que afecta la cantidad de aceite esencial, sin embargo, ausencia de lluvia combinado con días cálidos pueden también llevar a la perdida de aceite esencial por evaporación (Bhattacharya, 2015, pág. 19).

1.3 Análisis de suelo.

Las características del suelo habitualmente exploradas en la agricultura, son de igual importancia para todo estudio que se relacione con plantas o animales, que básicamente se refiere a la mayoría de las industrias actuales y también a temas de conservación.

1.3.1 Materia orgánica.

La materia orgánica en el suelo se puede clasificar como dos aspectos claramente diferenciados: el material originario (composición y degradación) y las fracciones coloidales resultantes o humus (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 109).

La descomposición de residuos de plantas y animales en el suelo es parte de un proceso biológico básico en el cual el carbono es recirculado hacia la atmósfera, como dióxido de carbono (CO_2), mientras el nitrógeno es mineralizado a ion amoniaco (NH_4^+), para ser luego oxidado a nitrato (NO_3^-). Otros elementos asociados como fósforo, azufre y otros micro-nutrientes aparecen como la forma requerida por las plantas resultado de este proceso que provienen de los azucares, los aminoácidos y los fosfolípidos (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 111) (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2006). Esta forma parte estructural del suelo, especialmente el humus, siendo su abundancia en polisacáridos lo que permite que exista una compactación en los cultivos y el crecimiento de las plantas en general (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2006, pág. 18).

1.3.1.1. Degradación de materia orgánica.

Es importante la relación C/N en materiales vegetales, ya que si esta es menor a 25 y el material vegetal no es fibroso, la descomposición de materia orgánica por microorganismo se lleva a la máxima velocidad posible en condiciones ambientales existentes, pero si la relación es superior a 25-30, la descomposición puede ser inicialmente lenta. Si la una relación es muy alta y se suma pH bajo, conductividad baja o fosfatos insuficientes, se diagnosticará poca habilidad para producir nitratos (Lopez Ritas, 1972, pág. 68) (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2006).

La temperatura afecta la velocidad de descomposición de materia orgánica y por ende en la disponibilidad en los análisis, por lo que se conoce, que al pasar de un clima cálido a otro más frío, la materia orgánica total tiende a aumentar. Esto se debe a que en climas cálidos los microorganismos encuentran temperaturas más apropiadas para su desarrollo, dentro de zonas con humedad uniforme y vegetación semejantes, por esto, la materia orgánica total aumenta dos a tres veces más, cada 10 ºC que disminuye la temperatura. La humedad por otra parte es directamente proporcional a la cantidad de materia orgánica disponible, dado que la cantidad de agua cambia la presión osmótica y dificulta la absorción de nutrientes, además que esta propicia la intervención de organismos propios de la micro fauna, como son los nemátodos que contribuyen a la degradación (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 137) (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2006).

En la planta la materia orgánica y su degradación tiene las siguientes funciones en la planta: acción rizógena que favorece la formación y desarrollo de las raíces principales y secundarias, acción estimulante dando una mayor absorción de nutrientes acompañada de una mejor utilización por parte de la planta; además es importante para el caso del nitrógeno por su absorción conjunta (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 139).

1.3.2 Humedad.

El agua del suelo disponible para la planta está influenciado por las características del suelo como: textura del suelo, pues los suelos de textura fina retienen más agua que los de textura gruesa; la estructura del suelo, pues un suelo más suelto es más accesible para la planta, una alta cantidad de materia orgánica facilita la retención del agua disponible, especialmente en suelos arenosos (Navarro García & Navarro

García, 2013, pág. 140). Además está influenciada por la intensidad de las lluvias en las temporadas, ya que a mayor intensidad de lluvia aumenta la intensidad de infiltración del agua en el suelo, que se refiere a la velocidad con que el agua de lluvia se mueve dentro del suelo; que debe diferenciarse de la permeabilidad, que es la velocidad de movimiento a través del suelo, que es influenciada por la textura como ya se mencionó (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2006).

La transferencia de agua del suelo a la planta está marcada, tanto por los aspectos mencionados anteriormente, como por la presión osmótica que existe en el ambiente del perfil de suelo, esto definido por la cantidad de sales que existe alrededor de las raíces, por lo que la planta hace esfuerzos adicionales para tomar el agua. (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 141)

1.3.3 Potencial Hidrógeno (pH).

El pH tiene una relación indirecta con los efectos de solubilidad y disponibilidad de los macro y micronutrientes para la planta; pues afecta además las propiedades físicas del suelo y la vida microbiana. El pH, donde normalmente se desarrolla una planta está entre 4 y 9, aunque el pH ideal en plantas está comprendido entre 5.8 y 7. El nivel de pH igual o inferior a 5,7 indica que el contenido de bases es bajo (excepto si es rico en materia orgánica) y puede haber deficiencias de calcio, magnesio, fosfatos, molibdeno y boro; así mismo puede provocar toxicidades de manganeso, cinc, aluminio, hierro y níquel. (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 152)

Un valor de pH elevado puede provocar un desequilibrio del magnesio, además de una deficiencia del hierro, manganeso, cobre y zinc debido a que se forma hidróxidos y su utilización se hace extraordinariamente escasa (Lopez Ritas, 1972). En la práctica estos valores son determinantes, puesto que se considera un pH óptimo entre

5.2 y 8, dado que ahí la mayoría de plantas obtienen la mayoría de nutrientes; sin embargo un pH entre 5 y 7 permite mayor calidad del suelo pues las bacterias pueden reproducirse mejor (New South Wales Agriculture, 2000). Una explicación más detallada de la relación de pH y los nutrientes se encuentra en el anexo 1.

1.3.4 Conductividad eléctrica.

Al interpretar los resultados de determinaciones de conductividad eléctrica se debe tomar en cuenta, que la conductividad de una solución depende del número de iones activos que contiene (Jones J. B., 2001, pág. 152). A medida que la concentración iónica disminuye, la conductividad eléctrica en menor; esta medida no nos revela las características o naturaleza de los iones o sales que intervienen en la variación de trasmisión eléctrica, sin embargo podemos afirmar que una conductividad alta revela una concentración de sales elevada, mientras que la conductividad baja revela que los elementos nutritivos son bajos o están ausentes. (Lopez Ritas, 1972) Se debe tomar en cuenta la relación entre pH y conductividad, considerando que existe una liberación de ciertos elementos en forma de iones, que son parte de la conductividad total del suelo, debido a la energía que circula a través de ellos (New South Wales Agriculture, 2000).

A continuación se muestra la relación entre niveles de conductividad y sus efectos.

Tabla 1.

Interpretación de lecturas de conductividad (uS/cm) en lecturas 2:1 agua suelo

Conductividad (uS/cm)	**Efecto**
< 400	**No salino:** Efectos de salinidad insignificantes, a excepción de cultivos sensibles
400 – 800	**Salinidad muy ligera**: Suelos con cultivos muy sensibles a la salinidad como cebollas, tréboles, linaza, zanahoria, pimienta, lechuga y patata dulce pueden redecirse de un 25% a 50%
810 -1200	**Salinidad moderada:** Suelo con restricción a cultivos de cultivos sensibles a la salinidad; los brotes pueden ser dañados.
1210 – 1600	**Suelos salinos:** Especializados en cultivo que soportan tal salinidad (herbáceas en general); no para hortalizas. Gran cantidad de solutos.
1610 – 3200	**Salinidad fuerte:** Se requiere de adición de agua para que el suelo sea apropiado para cultivo, excepto cultivos tolerantes
> **32000**	**Salinidad muy fuerte:** Solo árboles, herbáceas y cultivos muy tolerantes pueden crecer allí

Nota: Los niveles de salinidad presentados corresponden a un rango general de plantas dependerá de la adaptación de las mismas.

Nota 2: Modificado del original por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016. Se elimina niveles para solución 1:1 y se añade la conversión de la unidad de dS/cm a µS/cm. Fuente: Jones J. B.(2001). Laboratory guide for conducting soil test and plant analysis. New York: CRC. Pág. 153.

1.3.5 Potasio (K).

El potasio (K) es un elemento, cuya absorción en la planta es altamente selectiva y está asociada a la actividad metabólica (por ejemplo la activación de la sacarosa sintetasa y otras enzimas para producción de glucósidos dando su forma correcta) (Anaya Lang, 2003) (International Plants Nutrition Institute, 1998), regulación de potencial osmótico en plantas y turgencia (la deficiencia de potasio disminuye la

turgencia), neutraliza los compuestos solubles (aniones y ácidos orgánicos) y estabiliza el pH entre 7 y 8 en estos compartimentos (Lopez Ritas, 1972).

La falta de potasio, por lo tanto, causa un retraso general del crecimiento, que se hace sentir en los órganos de reserva, por ejemplo los tallos suelen ser más delgados y si se agudiza se apreciará en las hojas un moteado de manchas cloróticas y prosigue con el desarrollo de áreas con necrosis en la punta y los bordes de la hoja (Lopez Ritas, 1972). Otro síntoma característico es la prolongación del estado vegetativo, el retraso del crecimiento radicular, la tendencia al marchitamiento y la falta o deficiencia de características organolépticas; en cambio el exceso causa un desbalance de la absorción de otros elementos como magnesio (Mg), hierro (Fe) y zinc (Zn) (Navarro García & Navarro García, 2013) (International Plants Nutrition Institute, 1998).

1.3.6 Hierro (Fe).

Tiene especial importancia entre los elementos debido a que interviene en diversos fenómenos fisiológicos, está formando parte de varias enzimas, en las que se destaca las que forman la estructura porfirínica de las enzimas hemínicas (enzimas, donde se encuentra inserto un átomo de hierro en el núcleo, para formar la estructura Hierro-porfirina) (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 89), que está fielmente relacionado con la respiración celular de las plantas, ya que forman parte de los citocromos, los cuales son parte esencial en el proceso de oxidación y reducción reversible durante el proceso de trasporte electrónico (Lopez Ritas, 1972).

Aun así existen otras enzimas no porfirínicas como la nitrogenasa (que fija el nitrógeno en la planta), NADH-citocromo c-reductasa (flavoproteina que contiene 0.27% de hierro en peso), la ferrodoxina (sirve para la transferencia electrónica desde

la clorofila para trasferir dos al NAD^+) (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 92).

Es importante mencionar que un pH elevado disminuye la disponibilidad del hierro y la presencia de calcio, tanto dentro como fuera de la planta, es un factor que evita la absorción y el uso del hierro; y dado que el pH cambia con la humedad del suelo, no es extraño que el hierro se precipite como óxido férrico e hidróxidos (Kumar Fageria, Baligar, & Wright, 1990). Varios experimentos demuestran, así mismo, que existe relación directa entre el hierro y la síntesis de clorofila, aunque no se ha determinado con precisión el papel que desempeña, ni la vía exacta de síntesis (Lopez Ritas, 1972) (Navarro García & Navarro García, 2013).

1.3.7 Fosforo (P).

El fósforo es uno de los elementos esenciales en las funciones bioquímicas de la planta, puesto que es parte constitutiva de varios componentes esenciales de la misma. Entre las funciones que interviene el fósforo se encuentran: La biogénesis de glucósidos, biosíntesis de los lípidos, la síntesis de clorofilas y compuestos carotenoides (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 215) (Lopez Ritas, 1972).

La biogénesis de glucósidos se da por el proceso de la fotosíntesis, que surge en los cloroplastos, en dos partes:

En la parte cíclica de las reacciones fotoquímicas: la energía luminosa se absorbe por la clorofila, que provoca la expulsión de un electrón energético de su molécula, por lo cual la ferrodoxina, a través de un proceso REDOX, se forma la molécula de Adenosin Tri Fosfato (ATP), que es la moneda energética común de los procesos bioquímicos.

En el caso de la parte no cíclica de las reacciones bioquímicas la planta no solo almacena la energía en ATP, sino en Nicotin Adenin Dinucleótido o NADPH (Navarro García & Navarro García, 2013, pág. 216).

Para la biosíntesis de lípidos se genera a partir del trifosfato obtenido como intermediario de un producto de la glicolisis y la acetil-coenzima A, producida por descarboxilación oxidativa. La síntesis de clorofilas y compuesto carotenoides se da a partir del isopropil pirofosfato (lpPP), cuyo precursor es el ácido mevalónico. (Lopez Ritas, 1972) (Navarro García & Navarro García, 2013).

1.3.8 Nitrógeno (N).

La función del nitrógeno dentro de la planta es amplia, pues se debe considerar que este elemento forma parte constituyente en varios compuestos orgánicos, que son esenciales para el metabolismo de la planta. Se encuentra constituyendo los ácidos nucleicos, es parte de la clorofila y enzimas del grupo de los citocromos (que siendo una porfirina se habló de su importancia) y además forma parte de las moléculas energéticas NAD y NADP.

1.4 Descripción de Ocotea quixos.

Ocotea quixos

Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauráceae

Género: Ocotea

Especie: *O. quixos* (Cazorla Martinez, 2013, pág. 29).

1.4.1 Descripción botánica de *Ocotea quixos.*

Árbol ramificado de 2 a 5 m , las hojas presentan peciolo de 0,9 - 1,5 cm de longitud, láminas de 14,5-23.5 cm por 3,5 – 6,0 cm de ancho ,base cuneada, ápice apiculado, presenta márgenes enteros , haz verde oscuro y envés verde claro , con flores blanco verdosa , escamas del disco pardo – negras , cáliz de 6 sépalos , fruto de 4cm de forma oval, fructifica cada dos años pero con un mínimo de 20 años de crecimiento (Noriega & Dacarro, 2008, pág. 2).

"El cáliz de la flor tiene la forma de una pequeña copa o sombrerillo, que cuando está seca es bastante consistente y muy aromática" (Estrella, 1998, pág. 49).

Con el paso del tiempo llegan a producir una madera de color oscuro, compacta e incorruptible lo que la convierte en ser muy valorada y consumida excesivamente sin control (Cárdenas Lopez & Salinas R, 2007, pág. 34).

1.4.2 Origen y distribución.

Presente en la región oriental del Ecuador, conocido comúnmente como Ishpink; su hábitat es el bosque húmedo tropical primario, a una altura de 310 a 1200 msnm con la particularidad, además de ser nativa, existe gran cantidad de esta en la provincia de Napo (Ríos, Koziol, Perdersen, & Granda, 2007, pág. 35).

Actualmente hay registros de presencia de esta planta en la cuenca amazónica del Ecuador y Colombia, no hay registros en el resto de Sudamérica (Cárdenas Lopez & Salinas R, 2007, pág. 36).

1.4.3 Descripción etnobotánica de *Ocotea quixos.*

"Además de su madera, su corteza es utilizada, como medicina para el tratamiento de la artritis, los resfriados severos, la hidropesía y también para extraer esencias" (Cárdenas Lopez & Salinas R, 2007, pág. 56).

Anestésico local, antidiarreico, antigripal. En la gastronomía sus flores se usan como condimento en la colada morada, sus hojas y corteza son base para la elaboración del tradicional canelazo (etnia Imbabura, Pichincha, Cofan Kichwa del oriente de Sucumbíos, Napo), pero cuando están frescas son usadas para las ensaladas y elaboración de sopas (De la Torre, Navarrete, Muriel, J, & Balskev, 2008, pág. 213). "En la provincia de Tungurahua la chicha a la que se añade Ishpingo se llama << alajua>> y es una bebida ceremonial" (Estrella, 1998, pág. 55).

1.5 Región oriental

"La Región Amazónica del Ecuador cuenta con 131.137 km2, lo que corresponde al 49% del territorio nacional y aproximadamente al 1,67% de toda la cuenca amazónica" (Contreras Morales, 2014, pág. 85). "Se desarrolla a partir de los 1000 m.s.n.m. De la cordillera Oriental hacia el este hasta los límites fronterizos con Colombia y Perú" (Barros López & Troncoso Salgado, 2010). "Está dividida en seis provincias: Sucumbíos, capital Nueva Loja; Orellana, capital Francisco de Orellana; Napo, capital Tena; Pastaza, capital Puyo; Morona Santiago, capital Macas; Zamora Chinchipe, capital Zamora" (Tamayo, Andrade, & Alvarado, 2004, pág. 158).

2. Metodología

La presente investigación se clasificó como: experimental, correlacional, inductiva-deductiva y mixta.

Una primera parte de la investigación fue documental, usando de apoyo investigaciones anteriores para identificar posibles lugares donde existía *O. quixos,* además de contactar a habitantes de la zona para recopilar información. La segunda parte se realizó en el campo, al recolectar muestras de suelo y materia vegetal (hojas) en los puntos seleccionados y se anotó las variables bioclimáticas en un cuaderno de campo.

En paralelo a la investigación en campo se realizó la parte experimental, la que comprende el análisis físico-químico del suelo muestreado y análisis de composición de aceite esencial.

2.1 Localización geográfica.

Para esta investigación se recolectó muestras de suelo y material vegetal (hojas) en la región amazónica del Ecuador y se eligió las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza, Zamora y Francisco de Orellana para la búsqueda e identificación de la planta. Además se tomó datos de posición geográfica y altura en coordenadas de proyección UTM a través de un GPS GARMIN Oregon 550T.

2.2 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental simple, no probabilístico debido a la escasez de la planta, lo que hizo difícil dejar al azar la elección de los puntos de muestreo, tanto de *Ocotea quixos* como del punto de suelo. Posterior a esto, los datos fueron sometidos

a análisis estadísticos para determinar su correlación (como análisis de correspondencia canónica), análisis estadísticos multivariados clúster y de análisis de componentes principales para ver la relación que existe entre lugares de muestreo. Además se realizó análisis de varianza (ANOVA) y post hoc de Tukey en los casos que fueron necesarios para ver la diferencia de cada variable con relación al lugar de muestreo.

2.3 Lugares de muestreo

Los lugares de muestreo fueron evaluados tomando en cuenta variación de posición geográfica y características ambientales, diferentes entre sí.

Las pruebas de laboratorio en las muestras de suelo fueron realizadas por triplicado, para disminuir probabilidad de error experimental.

2.4 Variables y métodos de evaluación.

Debido a la naturaleza del trabajo, las variables seleccionadas corresponden a la variabilidad de la composición del aceite esencial en contraste con las variables ambientales de la zona de recolección. Se modifica la variable dependiente al cambiar el área de recolección.

2.4.1 Variables dependientes.

Rendimiento y composición del aceite esencial

2.4.2 Variables independientes.

Factores ambientales: temperatura, humedad, presión, altitud; factores de suelo: análisis mecánico (textura), factores físicos (materia orgánica, humedad, pH y conductividad, factores químicos, (N, P, K, Fe).

2.5 Métodos.

La etapa experimental fue realizada en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.5.1 Medición de datos ambientales.

Posterior a la localización de la planta se realizó una identificación del lugar, tomando en cuenta las características de los alrededores, de acuerdo con la norma de muestreo de suelo aceptado por la FAO (Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2009). Se tomó mediciones de humedad, temperatura y presión por medio de un sensor de datos atmosféricos ADC- PROS Marca BURTON.

2.5.2 Muestreo de hojas de la planta.

Localizada la planta, se procedió a tomar las hojas del árbol, las más jóvenes y en mejor estado, descartando aquellas con marcas de clorosis, necrosis o marcas de enfermedades, hasta tener una cantidad entre 4 y 10 kg de material vegetal. Este debió ser almacenado en sacos de yute previamente lavados para evitar el secado excesivo de la hoja y mantenido en un clima templado entre 20 y 25 ºC, por un máximo de 2 días de almacenamiento, antes de proceder a destilar el aceite esencial.

2.5.3 Muestreo de suelo.

Alrededor de la planta se seleccionó un área en forma de Z, donde se saca al menos 2 puntos a una distancia de 2 metros una de otra, donde se escarbó un agujero de 25 cm de profundidad, de los cuales se extrajo suelo y se mezcló hasta obtener una muestra homogénea de 1 kg, que fue almacenada en fundas de sellado. Se eliminó sustancias impropias del suelo, como piedras demasiado grandes, así mismo, raíces o materia orgánica no perteneciente al suelo.

2.5.4 Destilado del aceite esencial por arrastre de vapor.

En un destilador por arrastre de vapor de 10 kg de capacidad, se colocó agua en la base de forma que no sobrepase la malla de separación, se cerró herméticamente la tapa y se conectó las mangueras a la toma de agua, para que sirva de refrigeración al reflujo y la condensación subsiguiente. Se encendió el sistema y se mantuvo con una llama baja, alimentado por gas. Se abrió la toma de agua, cuando se desprendieron los primeros vapores y se mantuvo vigilada la destilación por un lapso de 4 horas tomando en cuenta, que los mejores resultados se obtienen con baja temperatura y menor tiempo.

Al finalizar, se extrajo en un embudo de separación el producto destilado. Se dejó reposar en el embudo de separación por 10 minutos, hasta que las fases se separen completamente; para eliminar el agua aun presente en el producto se añade sulfato de sodio anhidro en cantidad suficiente para que el agua sea absorbida por la sal; se filtra por medio de una jeringa y un micro filtro acoplado y se deposita en un frasco ámbar de 10 ml o 30 ml de acuerdo al volumen extraído.

2.5.5 Tratamiento previo del suelo.

En una bandeja se colocó el suelo, extendiéndolo en el mayor área posible y se colocó en la estufa a 100 º C, por 1 día o hasta que el suelo mostró una pérdida casi total de humedad. Terminado el secado, se molió con un mortero hasta reducirlo a su mínima expresión, se utilizó para esto un tamiz de 2 mm de separación en la malla. Se almacenó en bolsas plásticas de sellado guardadas con cuidado en un lugar seco y templado para los demás análisis.

2.5.6 Humedad.

Para determinar el grado de humedad se utilizó un método gravimétrico, se taró cápsulas sometiéndolas a 120º C, en una estufa por 2 horas y controlando el peso

en periodos de 30 minutos hasta llegar a una constante, se colocó 10 g de muestra húmeda, sin tamizar en la estufa a 120°C, por 16 horas al inicio y con intervalos de una hora para comprobar peso constante; se enfrió la muestra en el desecador por al menos 15 minutos para evitar variación del peso de la muestra por presión del aire aumentada por el calor. Transcurrido el tiempo, se tomó la medida del peso nuevamente, repitiendo el proceso hasta tener un peso constante con una diferencia de no más 0.01 g entre una y otra medición.

2.5.7 Materia orgánica.

Se empleó el mismo método (gravimétrico), anteriormente mencionado. Se taró crisoles sometiéndolas a 500º C en una mufla por 2 horas, luego de lo cual se comprobó el peso después de 1 hora más; se colocó 10 g de muestra en la estufa a 500°C por 8 horas al inicio y con intervalos de una hora para comprobar pesa constante; se enfrió la muestra en el desecador por al menos 30 minutos para evitar variación del peso de la muestra por presión aumentada por el calor. Transcurrido el tiempo se tomó la medida del peso nuevamente, repitiendo el proceso hasta tener un peso constante con una diferencia de no más 0.01 g entre una y otra medición.

2.5.8 pH y conductividad.

Se tomó 10g de muestra agregando 20 mL de agua destilada con lo que se obtuvo una solución pastosa 2:1 la cual se agitó por 5 min y se dejó en reposo en 30 minutos. Se procedió a medir el pH con un pHmetro, y conductividad con un conductímetro en unidades de µS/cm.

2.5.9 Digestión de suelo por microondas para suelos.

Se pesó la 3 .00 gramos de muestra de suelo tamizado (malla de 2 mm de ancho) y se añadió 10 ml de ácido nítrico para eliminar la materia orgánica existente, se dejó reposar 20 minutos en tubos para digestión por microondas; se colocó en el equipo

de digestión por microondas por 40 minutos a 120 ºC. Posterior a la digestión se filtró en un Erlen Meyer de 100 ml con ayuda de una bomba de vacío y papel filtro libre de carbono en un embudo de vidrio asegurándose que no queden partículas de suelo en el tubo de digestión. Finalizada la filtración se aforó con agua destilada en un balón de vidrío aforado de 250 ml.

2.5.10 Lectura de concentración de hierro por espectrometría de absorción atómica.

Se preparó estándar de hierro de 1, 2.5, 5 y 10 ppm para realizar la curva de calibración, verificando que el índice de correlación de Pearson sea mayor a 0.9 y se cumpla ley de Beer-Lambert. Una vez realizado este procedimiento, se realizó una dilución 1:100 para continuar con la lectura de las muestras por absorción atómica con una longitud de onda de 248 nm en el equipo Varian SPECTRAA-55. Posterior a esto se transformó las concentraciones dadas por el equipo en P/V a P/P por

$$\frac{P}{P} = \frac{ppm\ equipo * volumen\ conocido(0.250\ L)}{peso\ suelo\ real} * dilución\ (100)$$

Fuente: Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña (2015).

2.5.11 Lectura de concentración de potasio por espectrometría de emisión atómica

Se preparó estándar de potasio de 2.5, 5, 10 y 15 ppm para realizar la curva de calibración verificando que el índice de correlación de Pearson sea mayor a 0.9 y se cumpla ley de Beer-Lambert. Se realizó la lectura por emisión atómica con una longitud de onda de 348 nm en el equipo Varian SPECTRAA-55. Posterior a esto se transformó las concentraciones dadas por el equipo en P/V a P/P por

$$\frac{P}{P} = \frac{ppm\ equipo * volumen\ conocido(0.250\ L)}{peso\ suelo\ real} * dilución\ (1)$$

Fuente: Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña (2015).

2.5.12 Determinación de fósforo por espectrofotometría visible

Se determinó el procedimiento por colorimetría con un kit comercial de fosfatos. Para ello se estandarizó el método, por lo cual se prepara varios estándar de 0.5, 1, 2 y 4 ppm, además de un blanco; a todos ellos se añadió el reactivo comercial de la siguiente manera: 5 gotas de reactivo A y 9 gotas de reactivo B. Se dejó reposar por 15 minutos hasta que generó color. Se hizo un barrido de espectro de luz para encontrar un pico de lectura que permita tener lectura para cumplir la ley de Beer-Lambert, el cual resultó en 725 nm. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0. 99 con un error Standard de 0.19 por lo cual demuestra su validez.

Con el mismo método descrito anteriormente se repitió en las muestras, posterior a las digestiones por microondas del suelo, y se cuantificó con disoluciones 1:25 y de ser necesario se disuelve a 1:50.

2.5.13 Nitrógeno

La cantidad de nitrógeno se lo determinó usando el método Kjeldahl, realizado en el Laboratorio de suelos en la Universidad Politécnica Salesiana-sede Cayambe usando el método ISO 11261:1995 (International Organization for Standarization, 1995)

2.6 Aceite esencial

Para el análisis de aceite esencial se utilizó los siguientes métodos de análisis físicos y químicos.

2.6.1 Índice de refracción

Se hizo uso de un refractómetro de Abbe colocando 3 gotas de aceite en el prisma a una temperatura de 20 ºC para evitar pérdida de material y variación de resultados.

Este método se basó en la norma ISO 280:1998 (International Organization for Standarization, 1998)

2.6.2 Densidad

Se empleó la técnica de picnometría, usando un picnómetro de 1ml. Para ellos se realiza una medición de peso seco del picnómetro, una medición de peso con agua destilada y la medición de aceite esencial por triplicado. Este método se basó en la norma ISO 279:1998 (International Organization for Stardarization, 1998)

2.7 Cromatografía de gases acoplada a masas

Se preparó la muestra con 1 mL de dicloro metano y 10 µL de aceite esencial, se procedió a inyectar 2 µL en el equipo de cromatografía Varian 3900 acoplado a un espectofotómetro de masas Varian 2100 y se espera los resultados tras un recorrido de 90 minutos. Los datos de las condiciones del método usado están detallados en el anexo 2.

3. Resultados y discusión.

3.1 Lugares de muestreo

Se localizó 10 sitios de presencia de *Ocotea quixos* en diferentes provincias de la región oriental del Ecuador Las muestras se codificaron de acuerdo a la tabla 2. En total se recolectó entre 4 a 10 Kg de hojas junto con 2 Kg de suelo en el área circundante de la planta por punto de muestreo.

Tabla 2.

Datos ambientales de los lugares de muestreo con codificación.

Provincia	Lugar	Código	temperatura ºC	altura (m)	Humedad %	presión mmHg
Morona Santiago	Valle de upano	M001upa	30,06	993,00	60,00	678,18
Morona Santiago	Monte Quilamo	M001qla	29,67	1116,00	63,00	669,54
Morona Santiago	Misión Salesiana Sevilla	M002upa	29,39	1119,00	64,00	675,39
Napo	Archidona	Archi	29,89	567,84	68,00	711,96
Napo	Misahualli	Misa	32,11	406,91	60,00	724,15
Pastaza	Canelos	Cane1	27,78	482,80	79,00	615,95
Pastaza	Puerto Auca	Cane2	25,56	449,88	82,00	618,74
Morona Santiago	Huamboya	M003g	25,00	913,79	67,00	681,23
Zamora Chinchipe	Canela	Zamo	29,56	1529,79	48,00	631,95
Francisco de Orellana	Coca	Ore	38,06	288,95	51,00	734,82

Nota: Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

Con los datos obtenidos por GPS de las coordenadas UTM se elaboró la tabla 3, que muestran además las coordenadas geográficas en un sistema XY, para permitir una ubicación exacta de los lugares de muestreo, además se hizo un registro fotográfico para un record posterior como se aprecia en el anexo 3.

Tabla 3.

Coordenadas UTM y geográficas de los lugares de muestreo

Código	UTM				Coordenadas geográficas	
	Numero de Zona	Letra de banda	Distancia hacia el Este	Distancia hacia el norte	Latitud	Longitud
Upa1	17	M	821364	9746166	-78,11091228	-2,293568053
Quilamo	17	M	819260	9745347	-78,12979661	-2,301006597
Upa2	17	M	822405	9744486	-78,10153097	-2,308728691
Archi	18	M	187770	9900077	-77,80514999	-0,902943585
Misa	18	M	293196	9886039	-76,858466	-1,030493922
Cane1	18	M	193309	9823423	-77,75614757	-1,595683879
Cane2	18	M	193416	9824769	-77,7551706	-1,583521756
M003G	18	M	172144	9776418	-77,94687349	-2,020117375
ZAMO	18	M	727761	9889343	-72,95329746	-1,000504711
Ore	18	M	277844	9948216	-76,99611952	-0,468219789

Nota: Proyección de elipsoide basado en sistema WGS84. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña (2016)

Con estas coordenadas geográficas se elaboró el mapa georeferencial de presencia de *O. quixos* en Ecuador en la presente investigación que se observa en la figura 1.

3.2 Extracción y rendimiento del aceite esencial.

Los resultados de la extracción de aceite esencial se muestran en la tabla 4. Los sitios de mayor rendimiento son Archidona, seguido de Misahualli, en tanto que el de menor rendimiento corresponde a Misión Salesiana-Sevilla.

Mapa georeferencial de presencia de *O.quixos* registrado en Ecuador

Figura 1. El mapa muestra los puntos de recolección de la planta usados en la investigación, además del relieve geográfico, hidrográfico y político de la región Oriental de Ecuador

Mapa referencial creado por Marc Souris, IRD. Elaborado en QGIS por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

Tabla 4.

Rendimiento de aceite esencial por lugar de muestreo

Punto	Masa de hojas (Kg)	Volumen de aceite esencial (ml)	Rendimiento
M001upa	9,00	32	0,35%
M001qla	7,00	15	0,21%
M002upa	4,00	4,5	0,10%
Archi	8,00	52	0,64%
Misa	8,00	35	0,43%
Cane1	8,00	25	0,30%
Cane2	7,00	24	0,33%
M003g	7,00	26	0,33%
Zamo	5,00	18	0,36%
Ore	8,00	30	0,36%

Nota: Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

3.3 Análisis de suelo

Los resultados promedios están expuestos en la tabla 5. Se observa que Zamora tiene el mayor porcentaje de humedad y Archidona tiene la menor cantidad de humedad. En materia orgánica, la mayor cantidad fue encontrada en Huamboya, y el menor encontrado en Canelos y Puerto Auca. En pH el suelo más acido fue encontrado en 4,41 y el suelo más cercano a neutro o ideal fue encontrado en Misahualli. La mayor conductividad fue encontrada en Coca y la menor fue encontrada en Huamboya. La mayor concentración de K fue encontrada en Misahualli y la menor concentración de K fue encontrada en de Puerto Auca. En Hierro se encontró cantidades altas que corresponden a Quilamo y la menor cantidad fue en Archidona.

Tabla 5.

Características físico químicas del suelo.

Código	humedad %	Materia orgánica %	pH	Conductividad uS/cm	ppm Elemento:Suelo			
					K	Fe	P	N
M001upa	45,02%	24,75%	6,14	223,33	308,07	25903,52	7204,13	6166,67
M001qla	39,76%	13,05%	4,34	299,78	418,18	53752,66	3599,64	2750,00
M002upa	49,76%	23,49%	6,16	168,76	654,43	33402,75	6124,82	3600,00
Archi	21,71%	10,58%	5,53	235,11	533,95	17096,22	4736,17	3250,00
Misa	25,87%	22,10%	7,13	187,76	822,59	26093,40	5311,33	833,33
Cane1	41,11%	9,41%	4,51	176,58	238,69	23406,11	2223,44	2300,00
Cane2	37,82%	8,01%	4,41	181,73	217,46	27946,20	2088,68	1666,67
M003g	63,31%	45,21%	4,90	145,26	234,08	34777,75	5577,15	8400,00
Zamo	69,38%	36,90%	5,27	261,11	402,46	40340,78	4787,78	8266,67
Ore	31,51%	7,38%	5,40	310,44	415,60	35013,01	2642,21	1666,67

Nota: Valores promedios a partir de tres replicas y tres repeticiones de cada ensayo. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

3.4 Aceites esenciales

Las propiedades físicas correspondientes a densidad e índice de refracción se muestran en la tabla 6. La composición cuantitativa del aceite esencial obtenida a través de análisis por GCMS se muestra en la tabla 7 donde se expresa como área absoluta de los componentes mayoritarios para cada muestra. Se debe señalar la ausencia de Eucaliptol tanto en Archidona como en Misahualli.

Tabla 6.

Características físicas de los aceites esenciales

Código	densidad	Índice de refracción
M001upa	0,974608855	1,521
M001qla	0,960709759	1,523
M002upa	0,933140314	1,513
Archi	0,983459544	1,525
Misa	0,979196826	1,522
Cane1	0,964774007	1,523
Cane2	0,97157257	1,534
M003g	0,883727414	1,494
Zamo	0,986995559	1,53
Ore	0,97157257	1,51

Nota: Valores promedios obtenidos a partir de tres replicas y tres repeticiones. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña (2015).

3.5 Análisis estadístico

Las pruebas multivariadas de Análisis de Correspondencia Canónica (CCA), Análisis de clúster de Gower y Análisis de Componentes Principales (PCA) fueron realizadas en el programa estadístico PAST.

Tabla 7.

Área de pico de detección de los componentes del aceite esencial

Código	T.R	8,2	10,5	14,2	49,8	51,3	53,01	55,8	57,5	58,3
		Alfa-pineno	Beta pineno	Eucaliptol	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-met	Cariofileno	Alfa cariofileno	Metano azuleno	oxido de cariofileno	Caryophyllene oxide
M001upa		1,7E+11	2,82E+11	5,3E+11	3,89E+09	4,09E+10	2,5E+11	3,1E+09	6,33E+09	7,01E+09
M001qla		1073753	1514553	859332	4,04E+08	1,71E+10	2,3E+10	1,2E+09	1,39E+09	4,71E+08
M002upa		4E+09	9,55E+09	1,1E+10	1,48E+10	1,19E+11	1,6E+11	4,6E+08	5,53E+10	2,56E+10
Archi		4,6E+09	5,77E+09	0	1,19E+10	2,43E+11	2,5E+10	502058	1,47E+10	2,28E+09
Misa		1,2E+10	1,49E+10	0	3,78E+10	3,93E+11	3,4E+11	1,2E+10	4,55E+08	4,23E+08
Cane1		2,6E+10	7,34E+09	2,6E+09	1098591	3,67E+10	1,1E+10	1,7E+10	2,4E+09	266124,9
Cane2		5,8E+09	3,03E+09	2,6E+09	575425,4	1,91E+10	6,2E+09	1,3E+10	3,53E+09	664806,2
M003g		1E+11	7,33E+10	6,8E+09	2703791	2,08E+11	2,4E+10	7,8E+10	3,76E+10	4,44E+09
Zamo		1,9E+09	1,52E+09	9,4E+09	1,83E+09	5,14E+10	3,9E+09	5,4E+10	1,48E+10	777610,6
Ore		1,1E+09	1,83E+09	6,3E+09	4,07E+08	1,04E+10	3,1E+09	8,3E+09	1,62E+09	273127,3

Nota: T.R.=Tiempo de retención en la cromatografía de gases acoplada a masas. Los nombres de los compuestos son los reportados por el equipo. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

Según la prueba de permutación de Montecarlo del Análisis de Correspondencia Canónica CCA (Figura 2) el valor obtenido es de $p < 0.05$; lo cual indica correspondencia entre la composición del aceite esencial y las variables bioclimáticas y composición del suelo.

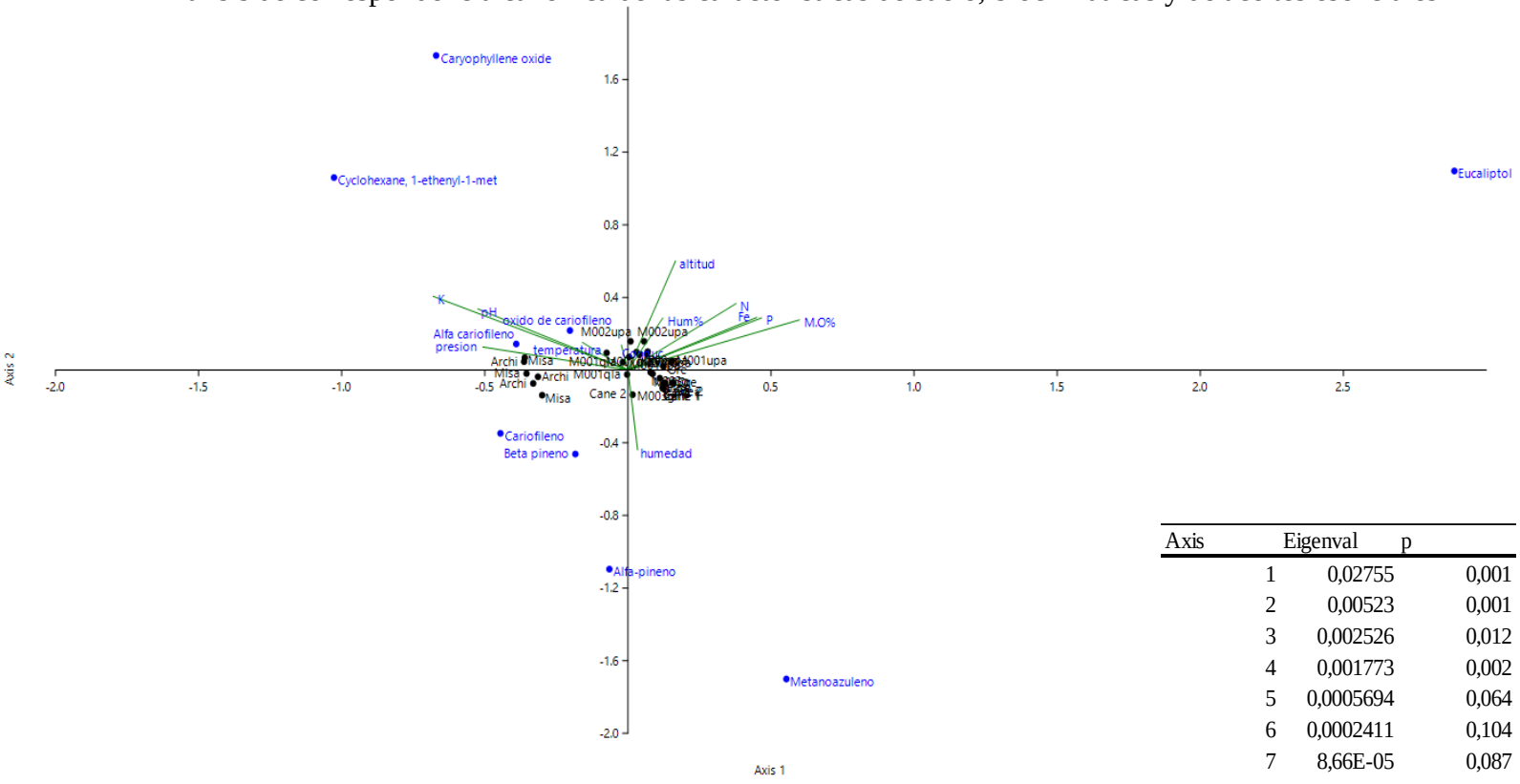
Se realizó 3 análisis de clúster con el algoritmo de Gower (figura 3), tanto de los componentes ambientales, componentes del suelo y componentes del aceite esencial.

Se observa que no existe una correspondencia en las distancia o en la distribución de los lugares de muestreo entre los 3 clúster. En el clúster de componentes bioclimáticas, que el Coca está separado del resto de los lugares seleccionados, mostrando mayor diferencia debido tener la menor altura de todos los puntos muestreados; el resto de lugares se agruparon por cercanía geográfica como se esperaba; existe también una diferencia entre Huamboya con Valle Upano, Quilamo y Misión Salesiana, esto puede deberse a variaciones en los microclimas por estar en diferentes cantones.

Este patrón de distribución no corresponde al clúster de condiciones de suelo, que muestra a Coca relacionado con Quilamo, a pesar de no estar cercanos geográficamente. Así mismo Huamboya y Canela están relacionados entre sí y alejados el resto de lugares de muestreo. Además vemos como las características de suelo de Misahualli se relaciona con las muestras tomadas del valle de Upano en Macas, y un poco más lejano con Archidona.

Para aceites esenciales existe dos grandes grupos: Archidona y Misahualli por un lado probablemente por la ausencia de Eucaliptol de ambas muestras; y el resto de puntos forman otro grupo. Las relaciones que parecen conservarse en los tres clúster son: Valle Upano con Misión Salesiana y Canelos con Puerto Auca.

Análisis de correspondencia canónica de las características de suelo, bioclimáticas y de aceites esenciales



Axis	Eigenval	p
1	0,02755	0,001
2	0,00523	0,001
3	0,002526	0,012
4	0,001773	0,002
5	0,0005694	0,064
6	0,0002411	0,104
7	8,66E-05	0,087
8	6,94E-08	0,92

Figura 2. El CCA usado muestra la cercanía de las variables en los diferentes lugares de recolección. El cuadro anexo muestra la prueba de permutación de Montecarlo donde $p<0.05$ =variables relacionadas o con correspondencia canónica. Resultados obtenido a través del paquete estadístico PAST. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2015.

Análisis clúster

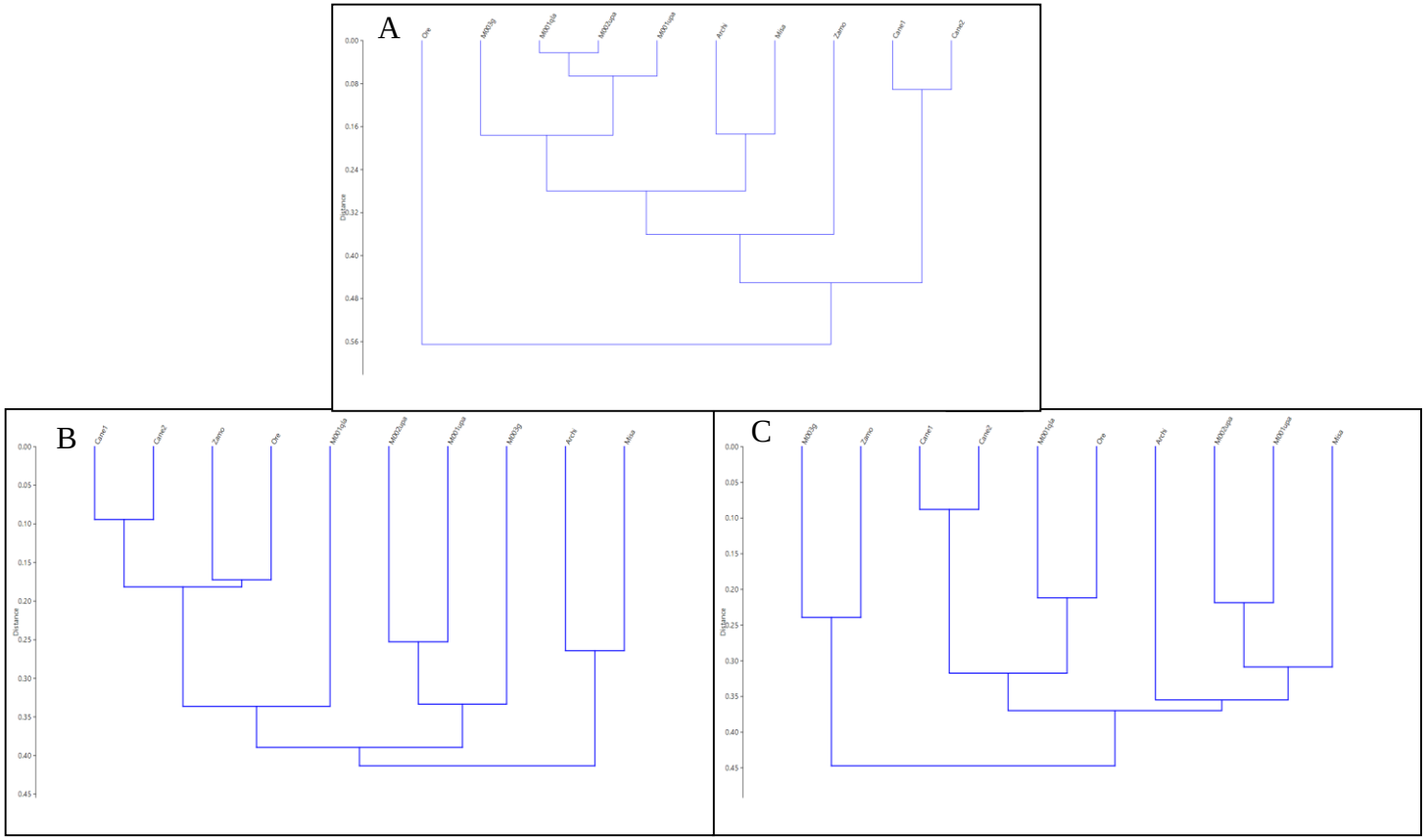


Figura 3. Conjunto de clúster correspondientes a: A) componentes bioclimáticos; B) Componentes de aceite esencial; C) Resultados obtenido a través del paquete estadístico PAST. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

Además que Archidona y Misahualli coinciden en el clúster A y clúster B. En estos tres casos la geografía puede tener incidencia en esto.

Para complementar, esto se puede diferenciar estos grupos en el PCA (figura 4) que está basado en el componente 1 y componente 2, donde se muestra a Archidona y Misahualli están distantes en el grupo (grupo azul), esto debido a la ausencia de Eucaliptol, como ya se mencionó, que se encuentra en mayor o menor medida en otras muestras, este compuesto no fue reportado en análisis anteriores (Sacchetti, Guerrini, Noriega, Bianchi, & Bruni, 2006). También está en otro grupo en el cuadrante positivo, que significa que tiene mayores valores absolutos en la mayoría de características de PCA, que corresponde a Valle Upano, Misión Salesiana y Huamboya (grupo rojo). El tercer grupo está compuesto por Canela, Coca, Canelos y Puerto Auca (grupo verde). El grupo más diferente entre ellos es Quilamo, que está en el cuadrante inferior izquierdo, que muestra puntos con características con menor valor en general.

En el anexo 4 se puede observar los gráficos de análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de honestidad de Tukey, realizados en el software libre R-Project. Por la cual podemos observar que no existe diferencia significativa entre las medias de cariofileno, y óxido de cariofileno, esto dado que en la prueba de ANOVA aparecen los valores $p>0.05$ que confirman la hipótesis nula de que no hay diferencia significativa entre las medias de estos componentes. En la tabla 8 se puede observar un resumen de los resultados de la prueba honesta de Tukey.

Análisis de componentes principales de las características de suelo, bioclimáticas y de aceites esenciales

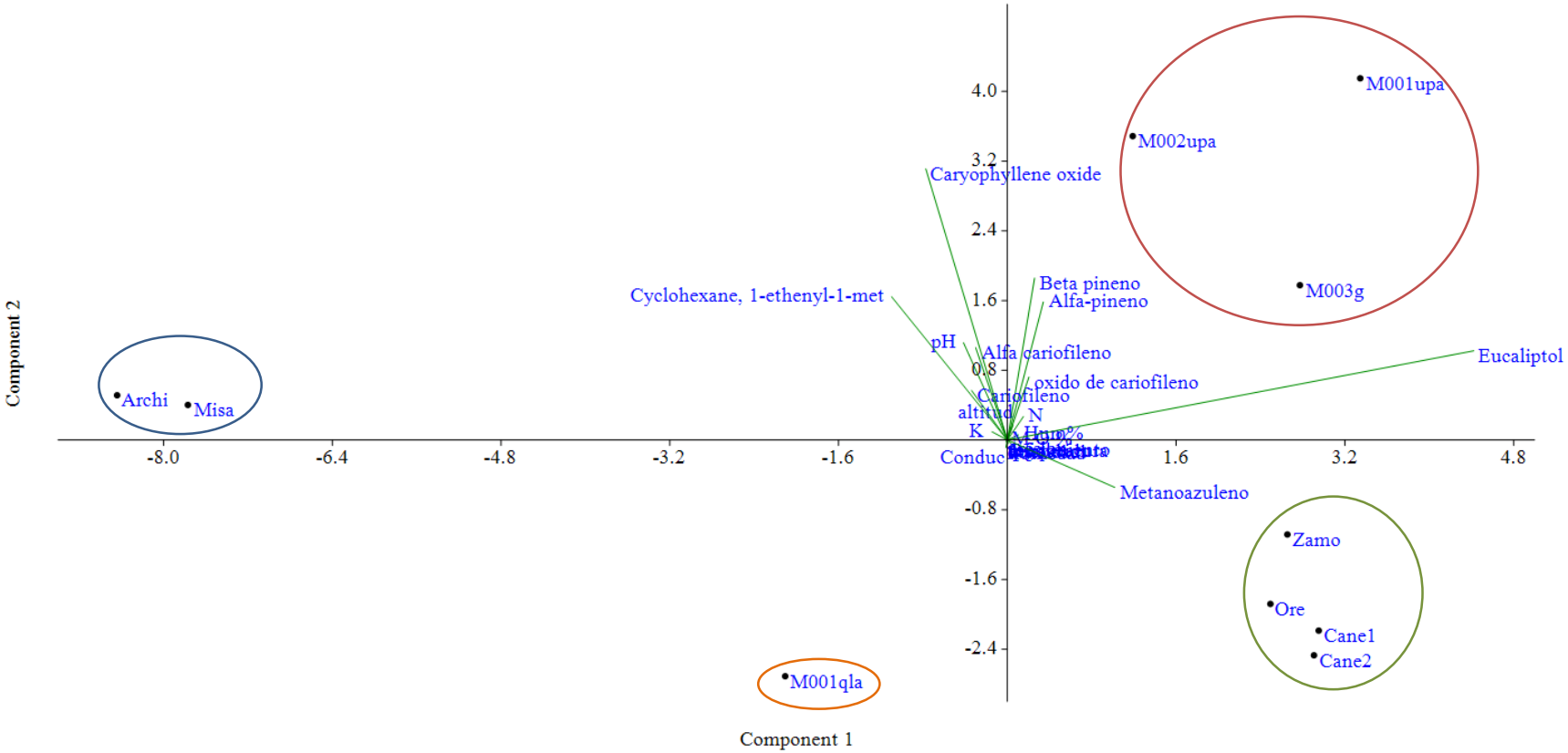


Figura 4. PCA Que muestra la relación entre los lugares de muestreo con las características analizadas separando en 4 grupos
Nota: Resultados obtenido a través del paquete estadístico PAST. Elaborado por Carrasco y Simbaña, 2016.

Tabla 8.

Resumen de la prueba honesta de Tukey

	M001upa	M001qla	M002upa	Archi	Misa	Cane1	Cane2	M003g	Zamo	Ore
humedad	c	e	cd	f	d	fg	gh	a	b	h
M.O	cd	e	cd	g	g	de	e	b	a	f
pH	b	f	b	c	a	f	f	e	d	cd
Conductividad	c	a	e	c	d	de	d	f	b	a
K	e	d	b	c	a	f	f	f	d	d
Fe	d	a	c	f	d	e	d	c	b	c
P	d	a	c	f	d	e	d	c	b	c
N	b	de	c	cd	g	e	f	a	a	f
α-pineno	ab	b	ab	ab	ab	a	ab	a	ab	ab
β-pineno	ab	b	a	ab	ab	a	ab	a	ab	ab
eucaliptol	a	b	a	c	c	a	ab	a	ab	a
ciclohexano	ab	ab	ab	ab	a	ab	b	ab	ab	ab
cariofileno	no existe diferencia significativa									
α-cariofileno	a	ab	a	ab	a	ab	ab	ab	b	ab
Metanozuleno	ab	ab	ab	b	ab	ab	ab	a	ab	ab
Oxido de cariofileno	no existe diferencia significativa									
cariophillene oxide	ab	ab	a	ab	ab	b	b	ab	b	b

Nota: Los colores indicas cuando existe asociación entre los elementos. Verde es un valor más alto y rojo el valor más bajo. Amarillo y naranja son valores medios. Los componentes con dos letras simbolizan medias que tienen intervalos de confianza superpuestos y no se toman como grupos independientes. Resultados obtenidos con partir de programa R-proyecto, librería agricolae. Elaborado por O. Carrasco y M. Simbaña, 2016.

Conclusiones

Se determinó que existe una variación química del aceite esencial de las hojas de Ishpink (*Ocotea quixos*), en especial de las muestras recolectadas de Archidona Misahualli, que muestran variaciones, tanto en rendimiento como en ausencia de Eucaliptol, lo cual puede sugerir que debido a la cercanía de las muestra existe una variación genética, debido a que no hay evidencia estadística para sustentar la variación por factores ambientales.

Se observó que en los puntos muestreados, el árbol de *O. quixos* existe de forma escasa y puntual, se lo encuentra de forma aislada entre árboles de otras especies, esto debido a la destrucción por la construcción de diferentes infraestructuras, relegándolo a uso ornamental.

Se determinó que no existe relación directa entre el tipo de suelo, variables climáticas y composición del aceite esencial extraído de hojas de *O.quixos,* al procesar los datos de los análisis físicos químicos de suelo y aceite esencial.

La ausencia de Eucaliptol, uno de los terpenos detectados en GCMS, en las muestras de Archidona y Misahualli puede deberse a una escasa humedad en el suelo, que se determinó en los análisis; lo que es apoyado por la bibliografía consultada.

El rendimiento en aceite esencial, de 0.64%, encontrado en la muestra de Archidona, es mayor con relación al resto de lugares de muestreo, puede deberse a un pH cercano al neutro que permite mayor absorción de nutrientes y a la escasa humedad, esto apoyado por la teoría de la evolución química de metabolitos secundarios.

Recomendaciones

Debido a la falta de evidencia estadística, es necesario estudiar la variación del quimiotipo, con herramientas de genética molecular como RAPD, que permita verificar los polimorfismos que exista entre las plantas de los lugares muestreados que pueda explicar la variabilidad química del aceite esencial.

Se necesita aumentar las zonas de muestreo en regiones más remotas de la selva amazónica para encontrar otros lugares con *O. quixos* y así conseguir muestras con menos intervención humana, además añadir datos para confirmar si existe variación química por aislamiento geográfico.

Referencias

Anaya Lang, A. L. (2003). *Ecología quimica* (Primera ed.). México D.F., México: Palaza y Valdés S.A. de C.V.

Asbahanii, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, W., Aït Addi, E. H., Casabianca, H., . . . Elaissari, A. (2015). Essential oil: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 220-243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069

Bagnoli, F., Loreto, F., & Fineschii, S. (2009). One species, many terpenes:matching chemical and biological diversity. *Cell press*, 5. doi:10.1016/j.tplant.2009.06.003

Barros López, J. G., & Troncoso Salgado, A. Y. (2010). *Atlas climatológico del Ecuador.* Quito: CEC-EPN.

Bhattacharya, S. (2015). Chapter 3 – Cultivation of Essential Oils. En Elsevier, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (págs. 19-29). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00003-1

Bruni , R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzolli, M., Dehesa, M., . . . Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food chemestry*, 415-421. Recuperado el 17 de Abril de 2015, de http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603003698

Cárdenas , D. L., & Salinas , N. R. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia* (Vol. 1). (D. L. Cárdenas, & S. R. Nelson, Edits.) Bogotá , D.C.,.

Cárdenas Lopez, D., & Salinas R, N. (2007). *Libro rojo de plantas de Colombia* (Vol. IV). Bogota: SINCHI.

Cazorla Martinez, M. P. (2013). *Actividad fotoprotectora de la maracuyá (Passiflora edulis), Ishpingo (Ocotea quixos) Enfototipos iii (Homo sapiens) para elaboración de un protector solar.* Escuela Superior politecnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba: Escuela de Bioquímica y Farmacia. Recuperado el 15 de Diciembre de 2015, de dspace.

Contreras Morales, C. C. (2014). *El Parque etnobotánico Omaere: Aplicación de conocimientos tradicionales y la revitalización de los espacios en la provincia de Pastaza, Ecuador.* Quito: Flacsoandes.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P. M., J, M., & Balskev, H. M. (2008). *Enciclopedia de las plantas utiles del Ecuador.* Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Estrella, E. (1998). *El Pan de America: Etnohistoria de los alimentos aborigenes en el Ecuador* (Tercera ed.). Quito: FUNDACYT.

International Organization for Standarization. (1995). *ISO 11261:1995 Soil quality-- Determination of totol nitrogen-- Modified Kjeldahl method* (Primera ed.). ISO/TC 190/SC Chemical method and soil characteristics. doi:13.080.10

International Organization for Standarization. (1998). *Iso 280:1998(en Esential oil --- Determination of refractive index* (Segunda ed.). ISO/TC 54 Esential Oil. doi:71.100.60

International Organization for Stardarization. (1998). *ISO 279:1998(EN) Essential oil --- Determination of relative density at 20 degrees C* (Segunda ed.). ISO/TC 54 Essential oil. doi:71.100.60

International Plants Nutrition Institute. (1998). Funtions of potassium in plants. *82, 3*. Estados Unidos de Norteamerica: Better Crops. Obtenido de https://www.ipni.net/ppiweb/bcrops.nsf/$webindex/84CBB51751971AB3852568F000673A10/$file/98-3p04.pdf

Jones, C. G., & Firn, R. D. (1991). On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions: Biological Sciences, 333*(1267), 273-280. Recuperado el 16 de Mayo de 2015, de http://www.jstor.org/stable/55613

Jones, J. B. (2001). *Laboratory guide for conducting soil test and plant analysis.* New York: CRC.

Kumar Fageria, N., Baligar, V. C., & Wright, R. J. (abril de 1990). Iron nutrition of plants: An overview on the chemestry and phisiology of its deficiency and toxicity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, 25*(4), 553-570.

Lopez Ritas, J. (1972). *El Diagnostico de suelos y plantas* (Segunda ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa. Recuperado el 25 de Noviembre de 2015

Navarro García, G., & Navarro García, S. (2013). *Quimica del suelo de los nutrientes esenciales para las plantas* (tercera ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa. Recuperado el 25 de Noviembre de 2015

New South Wales Agriculture. (2000). Understanding Soil pH. *Leaflet Nº 2*. Yanco, New South Wales: Acid Soil Action. Obtenido de http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/167187/soil-ph.pdf

Noriega , P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. *La granja* (3), 2-8.

Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. (2006). Manejo de la humedad del suelo. *COnservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible*, 2-18. Obtenido de http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/sm/soil_moisture.pdf

Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. (2006). Materia orgánica y actividad biológica. *Conservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible*. Obtenido de http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/ba/organic_matter.pdf

Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. (2009). *Guía para la descripcion de suelos* (cuarta ed.). (R. V. Rojas, Trad.) Roma: Division de información de FAO. Obtenido de http://www.fao.org/3/a-a0541s.pdf

Prieto, J. (2010). Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género Ocotea (Lauraceae). *Revista Colombiana de Química*, 2. Recuperado el 9 de Abril de 2015, de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309026684004

Rios, J.-L. (2016). Chapter 1 – Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. En Elsevier, & V. Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (págs. 3-10). Elsevier. doi:doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8

Ríos, M., Koziol, M. J., Perdersen, H. B., & Granda, G. (2007). *Plantas utiles del Ecuador.* Quito: Abya - Yala.

Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., & Bruni, R. (2006). Essential oil of wild Ocotea quixos (Lam.) Kostern. (Lauracea) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavor and Frangance Journal*(21), 1-4. doi:10.1002/ffj.1648

Tamayo, M. L., Andrade, A. S., & Alvarado, M. (2004). *Historia del Ecuador* (Segunda ed.). Madrid: CULTURAL,S.A.

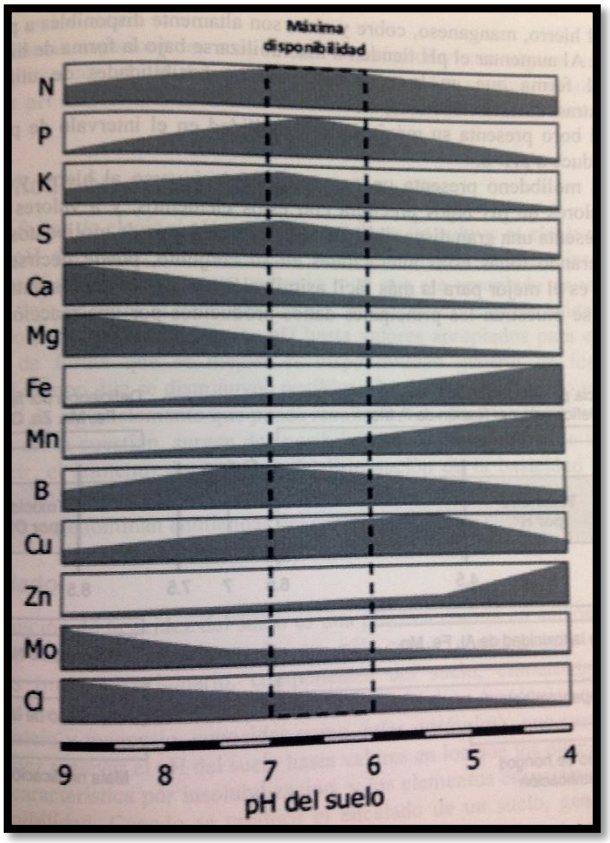
Tétényi, P. (2002). Chemical Variation (Chemodifferentiation) in Medicinal and Aromatic. *Acta Hortic. 576* (págs. 15-23). Budaka: Budakalász. doi:http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.576.1

Torres Espinoza, G. J. (2013). *Chankuap.* Recuperado el 25 de marzo de 2015, de Chankuap: http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Ishpink.pdf

Anexos

Anexo 1.

Niveles de pH de suelo en relación a la disponibilidad de elementos.



Fuente: Navarro García & Navarro García(2013). Quimica de suelos de los jutriantes esenciales para plantas. Pag. 152.

Anexo 2.

Condiciones del método usado en GCMS

Condiciones del método para GCMS			
Temperatura	variación (C/min)	Espera (min)	Total (min)
55	0	0	0
100	1	0	45
250	3	15	90
Split: 50			

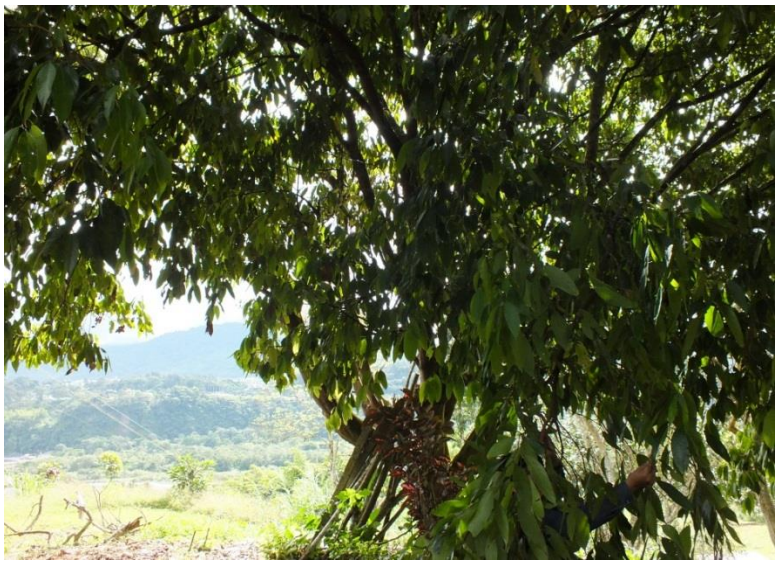
Anexo 3.

Sitios de recolección

Valle Upano

Monte Quilamo

Huamboya



Sevilla Don Bosco

Archidona

Archidona

Misahualli

Puerto Auca

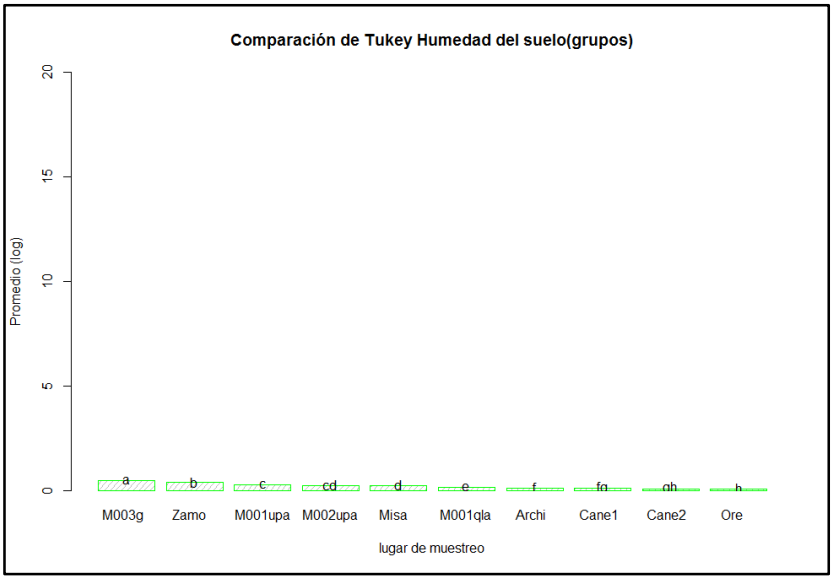
Canela

Orellana

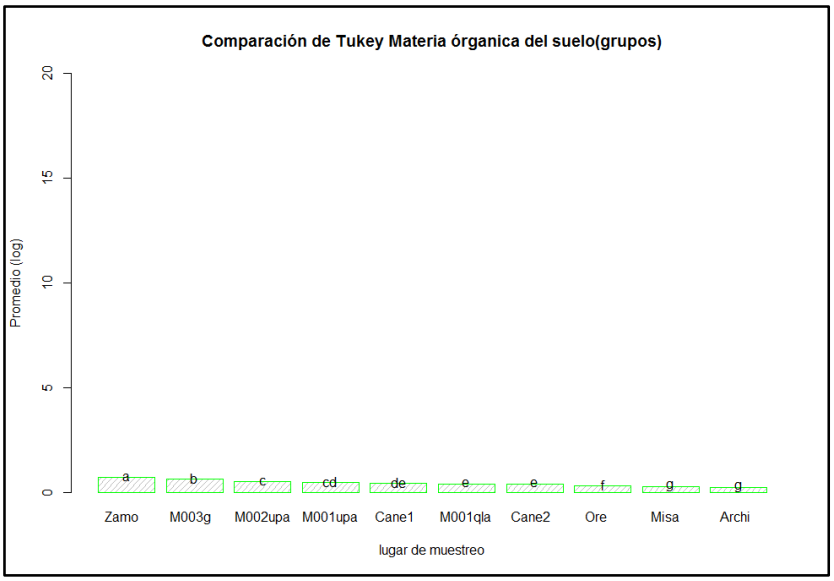
Orellana

Anexo 4.

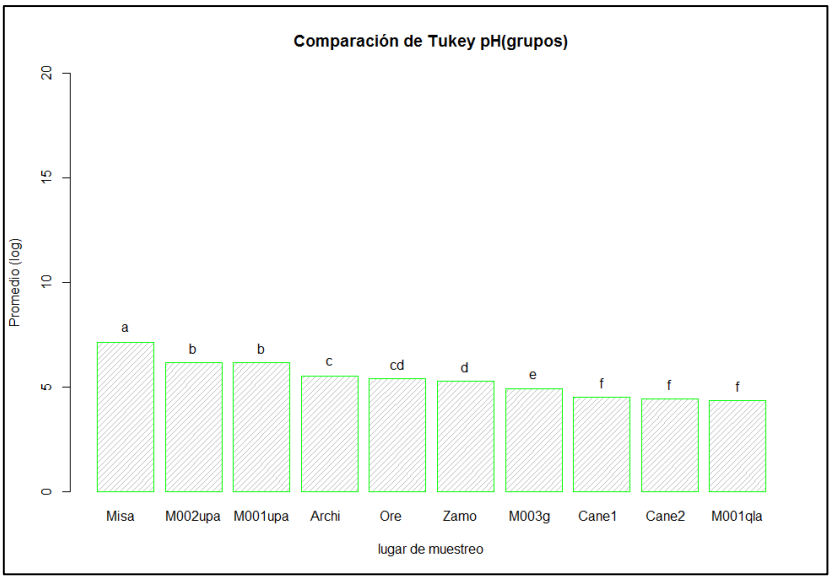
Figuras de prueba Honesta de Tukey



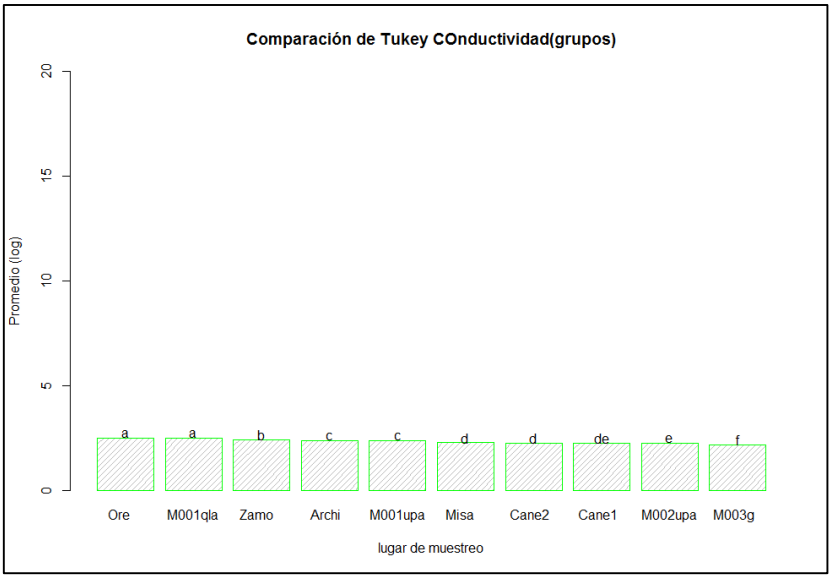
Prueba honesta de Tukey para humedad de suelos



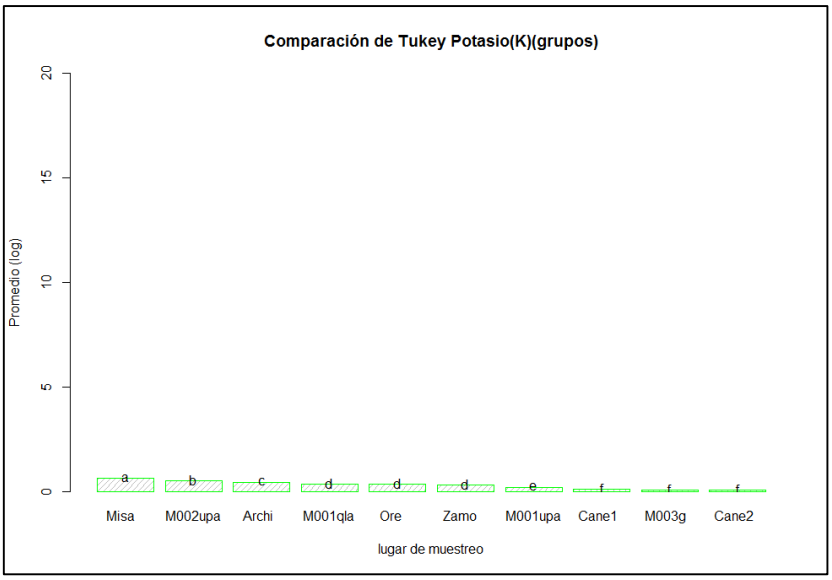
Prueba honesta de Tukey para materia orgánica



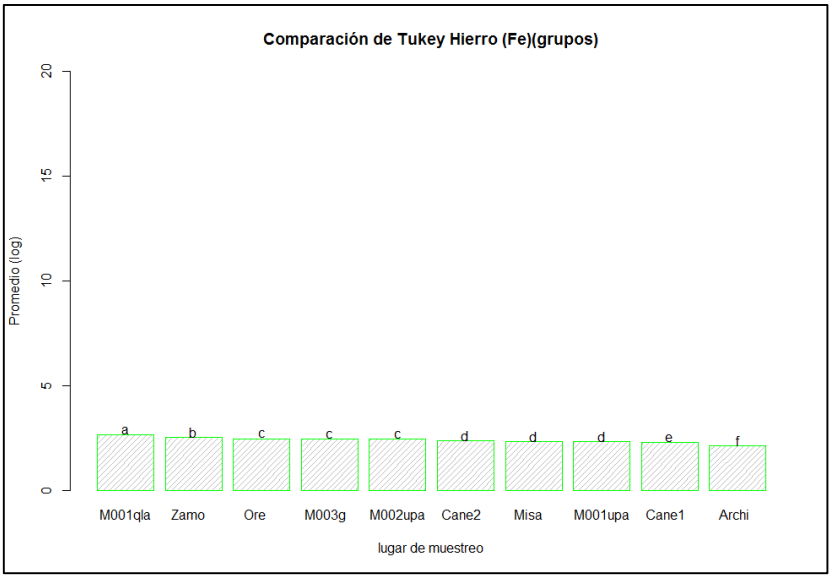
Prueba honesta de Tukey para pH



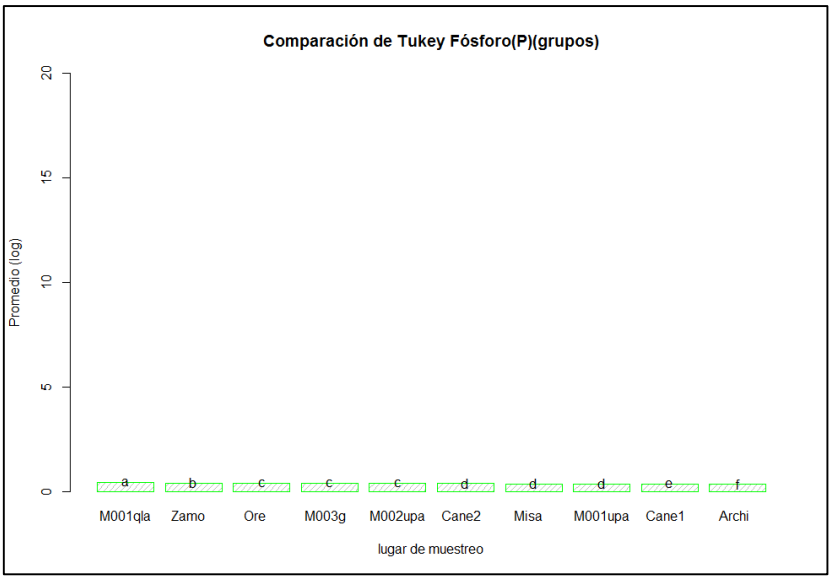
Prueba honesta de Tukey para conductividad



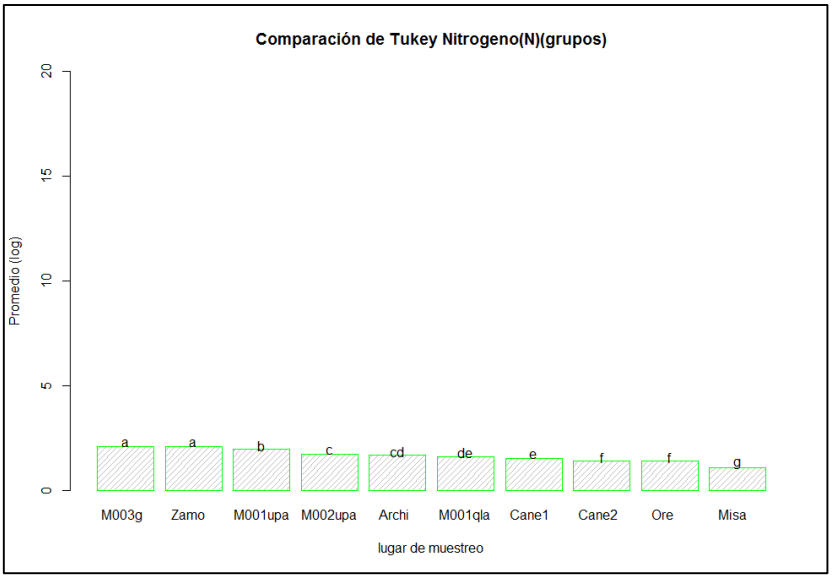
Prueba honesta de Tukey para Potasio



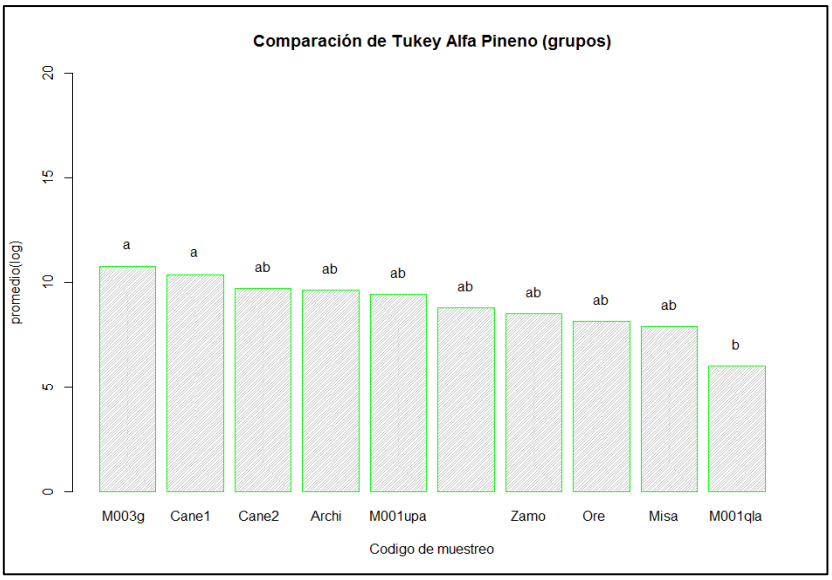
Prueba honesta de Tukey para Hierro



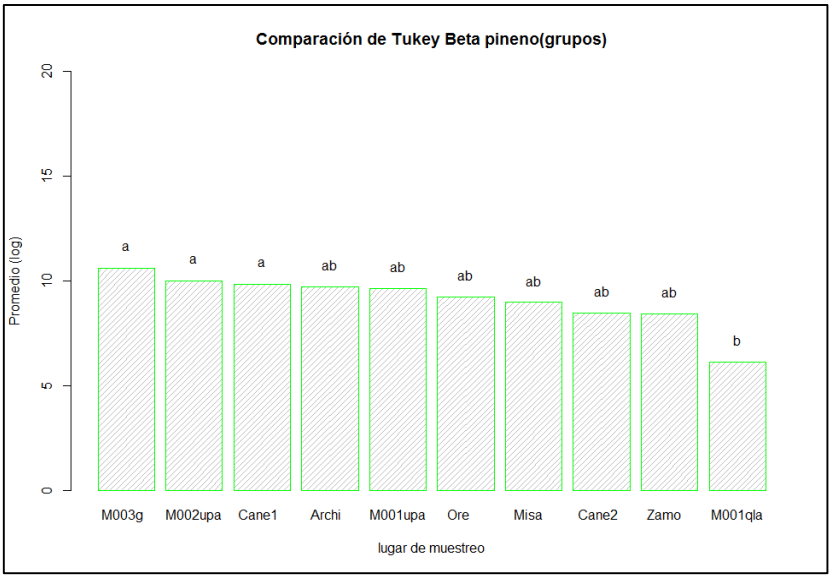
Prueba honesta de Tukey para Fosforo



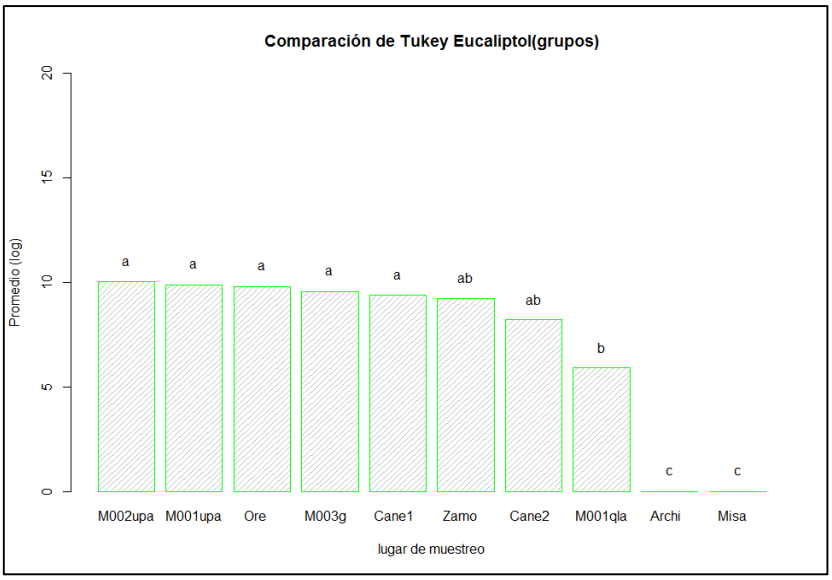
Prueba honesta de Tukey para Nitrógeno



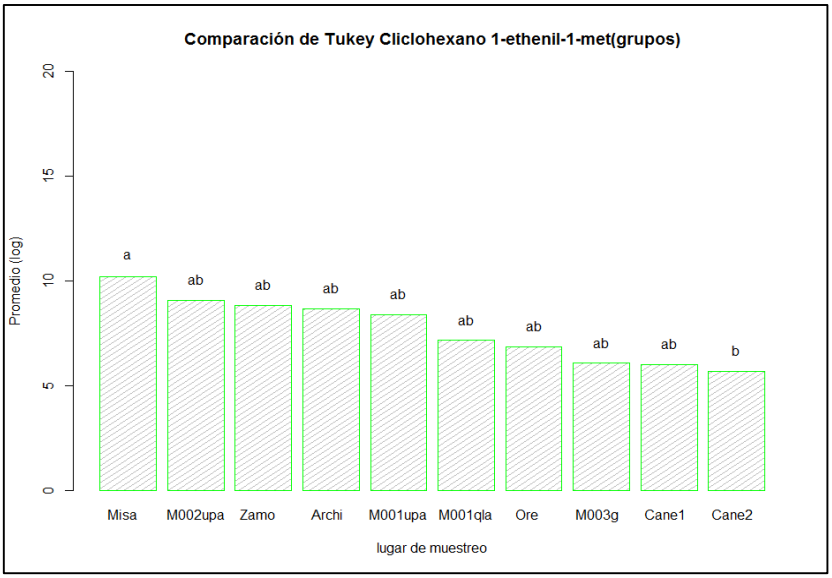
Prueba honesta de Tukey para α-pineno



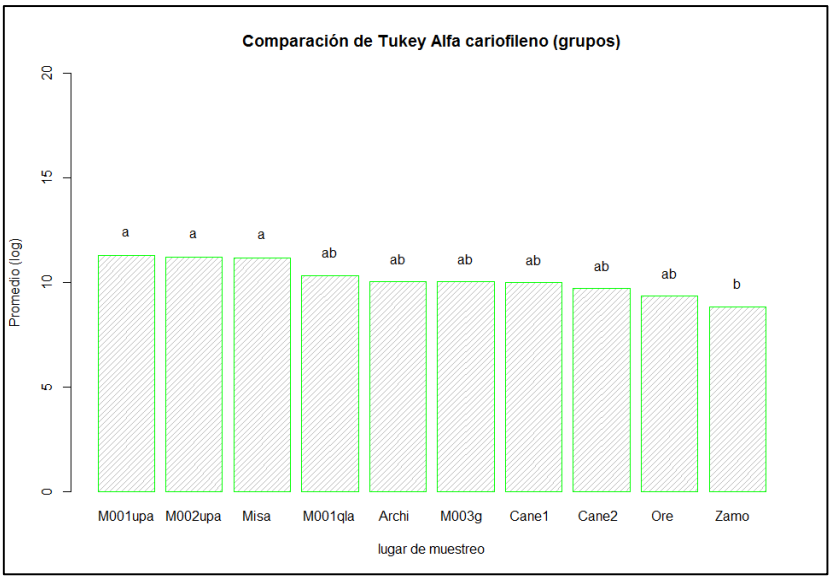
Prueba honesta de Tukey para β-pineno



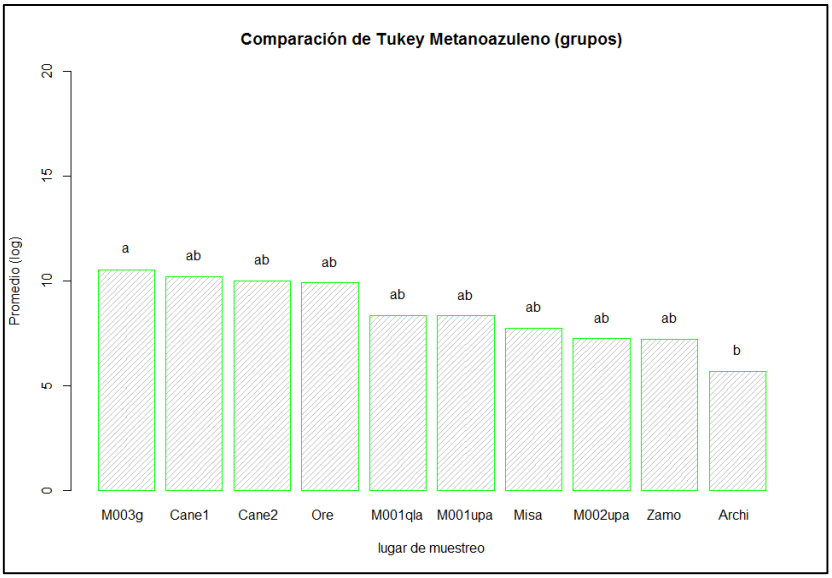
Prueba honesta de Tukey para Eucaliptol



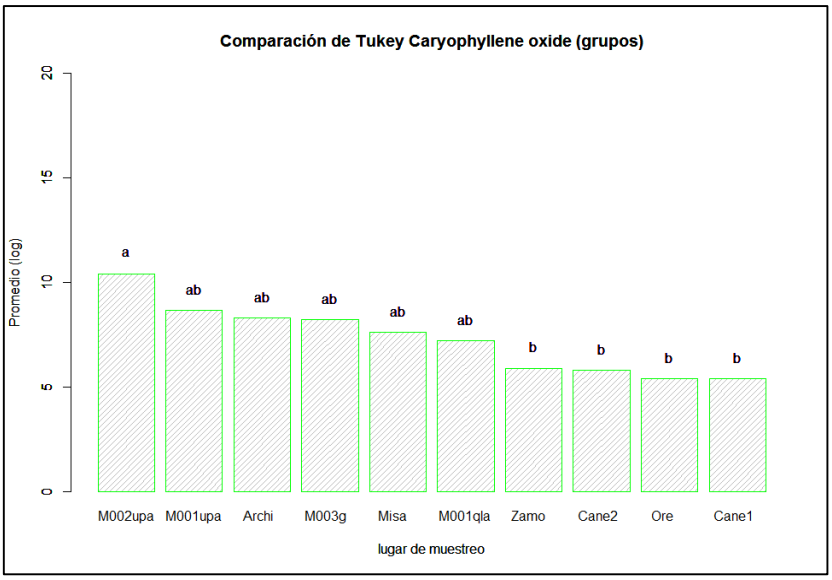
Prueba honesta de Tukey para 1-etenil-1metil Ciclohexano



Prueba honesta de Tukey para α-cariofileno



Prueba honesta de Tukey para Metanoazuleno



Prueba honesta de Tukey para óxido de cariofileno