

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



BUSQUEDA DE ESPECIES AROMATICAS DE LA FLORA SALVADOREÑA
FUENTES DE ACEITES ESENCIALES

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACION
PRESENTADO POR

MARIA CONCEPCION GUINEA LUNA
SANDRA MARICELA HENRIQUEZ MARQUEZ
MARIA GABRIELA MENA MENDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

MAYO 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL EVALUADOR

**ASESORAS DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES:**

MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

INVESTIGADOR TITULAR

Dr. Marvin José Núñez Rivas

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, por brindarme la vida, la fortaleza para afrontar cada momento y la sabiduría para culminar mi etapa profesional.

A mis padres, Concepción Luna y Antonio Guinea, por ser los primordiales promotores de mis sueños, gracias por todos los días confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, por sus consejos y enseñanzas que me han guiado hasta este momento.

A mi hermano, Roderico Guinea, a quien amo y admiro mucho, gracias por ser mi apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, por ser mi ejemplo de fortaleza en la vida y por motivarme a seguir adelante en todo momento.

A mi incondicional apoyo, mi novio, Francisco Ortiz, por no ser solo mi novio, ser mi mejor amigo, por confiar en mí y apoyarme en cada paso de mi vida, por tu paciencia y amor en todo momento.

Agradezco al personal del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Dr. Marvin José Núñez Rivas, por dirigir este trabajo de graduación, por su tiempo y apoyo durante todo el todo el proyecto y por su confianza en cada una de nosotras, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza, Lic. Ulises Guardado Castillo e Ing. Sergio Maravilla por brindarme cariño y apoyo, por cada uno de sus consejos y enseñanzas en todo este proceso, pero sobre todo gracias por siempre recibirme con una sonrisa y hacerme sentir en casa.

A MSc. Cecilia Gallardo, por ser parte fundamental de este proceso, con cada una de sus críticas para la mejora de nuestro trabajo. Gracias por el apoyo y colaboración de ADEL Sonsonate a lo largo de todo este proyecto.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Maricela Márquez y Gabriela Mena, por su apoyo, confianza y cariño en este camino y por cada uno de los momentos de risas que pasamos juntas.

A todos, muchísimas gracias por formar parte de este gran paso en mi vida, que Dios los Bendiga mucho.

Conny

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la sabiduría y el entendimiento desde el comienzo de mis estudios, por darme la oportunidad de tener salud y protegerme durante todo este tiempo.

Agradezco a mis padres que han sido no sólo un aporte económico sino un apoyo emocional todas las veces que los he necesitado, por apoyarme en cada una de mis decisiones y por aconsejarme en cada momento.

Le agradezco a mi hermano por ayudarme a solucionar mis problemas cuando lo necesité, por su paciencia y su apoyo incondicional.

Agradezco a cada uno de los docentes del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales por haberme compartido tanto conocimiento, gracias a Msc. Morena Lizette Martínez de Díaz, Dr. Marvin José Núñez Rivas y Lic. Ulises Guardado Castillo por enseñarme durante todo el tiempo que me permitieron compartir con ellos, por corregirme y por darme su amistad. Gracias a Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos por enseñarme con amor y darme su apoyo cuando lo necesitaba, gracias a Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza por ser parte de nuestra investigación. Gracias al Ing. Sergio Maravilla por haber compartido tiempo de calidad, buenos recuerdos durante la estancia de investigación y por haber creído en nuestro potencial. Gracias por el apoyo y colaboración de ADEL Sonsonate a lo largo de todo este proyecto.

Le agradezco a mi mejor amigo Dennis Rivera por acompañarme desde el inicio hasta el final de este gran logro, por escucharme en cada momento y apoyarme cuando nadie más estuvo.

Gracias a cada docente, a mis compañeras y buenas amigas que tuve la oportunidad de conocer no solamente a través de este trabajo sino durante estos años de estudio.

Maricela

AGRADECIMIENTOS

A la Santísima Trinidad por darme la vida y concederme la vocación de la ciencia.

A Nuestra Señora del Sagrado Corazón de Jesús, por interceder incansablemente ante su hijo para mi protección y por guiarme en los caminos del día a día.

A mis padres, por apoyarme toda la vida, brindarme su confianza, sabiduría y consejo para lograr las metas que ahorita estoy alcanzando. Sin ellos, nada de esto fuera posible.

A mis hermanos, que aún en mis días de desvelo o estrés, estuvieron para apoyarme, darme ánimos y fuerzas.

A mi abuelita Tere, sus incontables oraciones por mí siempre han sido escuchadas, los consejos que me ha dado los guardo en mi corazón como uno de los más preciados tesoros.

A mis tíos Edgardo y Claudia, considerados como mis segundos padres, que desde pequeña me brindaron palabras de ánimos, consejos y ayuda. Siempre han estado presentes para cualquier necesidad que mis hermanos o yo tuviéramos.

A la cátedra de Botánica General y Farmacognosia, por darme la oportunidad y el voto de confianza de trabajar con ellos y saber apreciar la flora, tanto conocida como desconocida, que nos rodea. Gracias por el apoyo y colaboración de ADEL Sonsonate a lo largo de todo este proyecto.

A mis compañeras de Trabajo de Graduación, Maricela y Conny, por ser personas muy especiales para mí, por estar para mí cuando más lo necesitaba y hacer de este trabajo una experiencia que recordaré por siempre.

Gaby

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, quien me ha dado más de lo que merezco, por su fidelidad y misericordia conmigo, por darme fuerzas y sabiduría para salir adelante y por ser mi amigo y confidente fiel.

A mis padres, Vilma Concepción Luna de Guinea y José Antonio Guinea Monge, a quienes amo profundamente, les dedico este trabajo de graduación por haberme brindado su comprensión y apoyo incondicional durante mi carrera, por su gran esfuerzo, sacrificio y amor, por ser mi inspiración en todo momento.

A mi hermano Roderico Guinea, por los innumerables momentos felices juntos, por el apoyo que siempre me has brindado, el amor y la comprensión a lo largo de esta etapa.

A mis abuelos por enseñarme a luchar por mis sueños en todo momento, por haberme asesorado con sus conocimientos, y por motivarme con sus enseñanzas que siempre estarán en mí, por cada palabra de aliento y motivación en mi vida, agradezco su amor, comprensión y cada una de las oraciones que hicieron por mí.

A mis tíos y primos, por nunca dejar de confiar en mí y brindarme todo su apoyo, porque este triunfo se los debo a ustedes y cada una de sus oraciones.

A mi novio, Francisco Ortiz quien siempre me apoyo, motivo y confío en mi en cada paso en esta etapa, muchas gracias por tu paciencia, generosidad y aliento cuando veías que no podía más. A su familia, por siempre apoyarme y hacerme sentir especial en todo momento.

A mis amigas Clarissa Gálvez, Tatiana Caballero y Karla Cruz, por brindarme su amistad y apoyo sincero, por cada uno de los momentos bonitos y únicos vividos a lo largo de la carrera, las quiero mucho.

A mis compañeras y amigas, Maricela y Gaby, quienes fueron las personas que Dios escogió para que compartiera este gran logro, gracias por su apoyo incondicional.

Conny

DEDICATORIA

A mis padres Sandra de Henríquez y Héctor Henríquez por haberme dado la oportunidad de terminar mis estudios y por siempre darme el apoyo y alentarme en todo momento a seguir adelante sin importar las dificultades.

A mi hermano Benjamín Henríquez porque fue mi apoyo en muchas ocasiones sin pedir nada a cambio, por desvelarse junto a mí cuando solicitaba su ayuda y por siempre estar para mí en todo momento.

A mis amigos Josué Isaac Jiménez y Christian Eduardo García que estuvieron conmigo desde el primer año en la universidad, por ayudarme a estudiar, aportar de sus conocimientos y sus habilidades en cada trabajo que hicimos juntos y por demostrarme el verdadero significado de una amistad.

A mi mejor amigo Dennis Rivera porque siempre me animó cuando más lo necesité, porque a pesar de la distancia me hizo sentir su amor y apoyo incondicional durante tantos años.

A mis compañeras Gabriela Mena y Concepción Guinea por su ayuda en este trabajo, porque aprendimos juntas y más que la experiencia, me llevo muchos recuerdos buenos junto a ellas.

“Porque Jehová da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.” **Proverbios 2:6**

Maricela

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado para Dios Padre, Hijo y Espíritu Santo que me concedieron la vida, salud e inteligencia a lo largo de mi vida de colegio y carrera universitaria.

A mis padres, Raúl Mena y Sonia de Mena les dedico este trabajo. Sólo ellos y Dios saben el sacrificio y esfuerzo que hicieron para que yo pudiera culminar mis estudios en la carrera que escogí. No me alcanzarán los días ni los años para pagarles todo lo que hicieron por mí. Cada viaje de los domingos y viernes para la universidad y para mi casa, cada comida preparada con amor para la semana, son una de infinitos detalles que me demostraron lo mucho que me apoyan y lo bendecida que soy por tenerlos como padres. Los amo mucho.

A mis hermanos Raúl y Eduardo Mena les dedico este trabajo porque ellos estuvieron al pendiente siempre, me hacían reír para perder el estrés, me atendían en aquellas noches cuando me tocaba trabajar hasta tarde. Gracias por ser los mejores hermanos que Dios me regaló

A mi abuela Tere, mis tíos Edgardo y Claudia les dedico también este trabajo, ustedes, al igual que mis padres, han sido un pilar muy importante en mi formación académica y personal. Siempre han estado a nuestra disposición y muy pendientes de todo lo que necesitáramos y espero regresarles al menos un poco de todo lo que me han dado.

Sancta Maria Cordis Iesu Iter Para Et Serva Tutum

“Santa María del Corazón de Jesús prepáranos y reservanos un camino seguro”

Gaby

INDICE GENERAL

	Pag N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xvii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GENERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	22
3.1 Plantas aromáticas	22
3.1.1 Especies vegetales aromáticas de la flora salvadoreña como fuentes de aceites esencial.	23
3.2 Aceites esenciales	26
3.2.1 Concepto y generalidades	26
3.2.2 Propiedades	28
3.2.3 Composición	29
3.2.4 Métodos de extracción	31
3.3 Radicales libres	32
3.4 Estrés oxidativo	33
3.5 Antioxidantes	33

3.6 Ventajas o beneficios de los antioxidantes	34
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	37
4.1 TIPO DE ESTUDIO	37
4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	38
4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO	38
4.4 PARTE EXPERIMENTAL	42
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	51
5.1 Recolección de especies vegetales.	51
5.2 Extracción de aceites esenciales	52
5.3 Cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Vis empleando el método de DPPH.	54
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	63
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pag N°
1	Especies vegetales aromáticas de la flora salvadoreña fuentes de aceite esencial (a) <i>Piper standleyi</i> Trel., detalle de hojas. (b) <i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez, detalle de hojas. (c) <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl., detalle de corteza.	26
2	Equipo de destilación por arrastre de vapor.	32
3	Especies vegetales fuentes de aceites esenciales. <i>Piper standleyi</i> (a) detalle de hojas; y <i>Ocotea veraguensis</i> (b) detalle de hojas y fruto	52
4	Curva de calibración de estándares utilizando Trolox	56

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pag N°
1	Especies vegetales de la flora salvadoreña como fuente de aceite esencial.	40
2	Especies vegetales aromáticas ubicadas en el Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.	41
3	Especies vegetales aromáticas seleccionadas para la extracción de aceites esenciales.	42
4	Especies vegetales aromáticas ubicadas en el Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.	51
5	Valores de rendimiento de extracción de aceites esenciales del material vegetal seleccionado.	53
6	Comparación de porcentajes de rendimientos de extracción de aceite esenciales entre metodologías utilizadas en laboratorio e investigadas en bibliografías.	54
7	Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH.	56
8	Resultados de determinación de la actividad antioxidante en <i>Piper standleyi</i> .	58
9	Resultados de determinación de la actividad antioxidante en <i>Ocotea veraguensis</i> .	58
10	Resultados de determinación de la actividad antioxidante en aceite esencial de <i>Piper standleyi</i> , <i>Ocotea veraguensis</i> y <i>Cinnamomum verum</i> .	59
11	Comparación de la varianza de la actividad antioxidante entre <i>Piper standleyi</i> y <i>Ocotea veraguensis</i> .	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Descripción de reactivos, cristalería, material y equipo utilizados en la determinación de actividad antioxidante
- 2 Métodos de extracción
- 3 Cálculos para preparación de soluciones estándar para la realización de la curva de calibración.

RESUMEN

En la presente investigación se realizó una bioprospección para seleccionar dos especies vegetales fuente de aceite esencial, para llevar a cabo la extracción de los mismos por medio del método arrastre de vapor para posteriormente cuantificar la actividad antioxidante utilizando el método DPPH en las especies *Piper standleyi* (Hojas) y *Ocotea veraguensis* (Corteza). Dichas especies fueron recolectadas en los departamentos de Ahuachapán y Sonsonate y debidamente identificadas por un profesional botánico del Museo de Historia Natural de El Salvador. La extracción del aceite esencial y el ensayo de la actividad antioxidante también se realizó con corteza de *Cinnamomum verum*, esto con el propósito de validar dichos métodos. A partir de los resultados se realizó el análisis de varianza para determinar si existe diferencia entre la actividad antioxidante de las especies en estudio. La investigación de laboratorio fue llevada a cabo durante los meses de agosto del 2021 a febrero del 2022. El tratamiento de resultados terminó de realizarse en diciembre de 2021 siendo realizado en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales ubicado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Según los resultados obtenidos, la especie *Cinnamomum verum*, exhibe mayor actividad antioxidante con un IC_{50} de 1,700 $\mu\text{g/mL}$, por otra parte, *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*, presentaron un IC_{50} de 11,969.2 y 12,859.8 respectivamente, exhibiendo así, una menor actividad antioxidante. Al comparar la actividad antioxidante reportada en Olivero et al, 2010 con nuestros resultados experimentales, estos no sugieren una remarcada actividad antioxidante, debido a que el efecto antioxidante está ligado a la composición química de la especie, es importante ampliar la información obtenida de las mismas especies vegetales.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Las especies aromáticas han sido utilizadas desde los tiempos antiguos por sus propiedades medicinales, conservantes de alimentos, su importante aroma y sabor en las comidas. Las propiedades farmacéuticas de las plantas aromáticas se atribuyen parcialmente a sus aceites esenciales, ya que son complejos y multicomponentes, formados por moléculas terpénicas y no terpénicas.

El propósito de la investigación fue coleccionar 2 especies vegetales fuentes de aceites esenciales, de las cuales no existían estudios previos a nivel nacional reportados y que posteriormente se les cuantificó la actividad antioxidante para contribuir con la investigación y el desarrollo de fitofármacos para atenuar las diferentes patologías provocadas por el estrés oxidativo, así como también en el desarrollo de fitocosméticos que ayuden a disminuir visiblemente el envejecimiento. La propiedad antioxidante ya se ha estudiado anteriormente en melaza, azúcar blanco y moreno por lo que ensayar la misma propiedad en especies vegetales aromáticas de la flora salvadoreña va aportar información nueva para poder atenuar todas las enfermedades que se desarrollan por el estrés oxidativo. Se realizó una búsqueda bibliográfica de especies vegetales aromáticas en la Sección de Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES), para corroborar potenciales especies aromáticas en los Departamentos de Sonsonate y Ahuachapán. Al momento de la recolección de las especies seleccionadas nos acompañó un experto botánico del MUHNES con el propósito de identificarlas, luego estas especies fueron utilizadas para la extracción de aceites esenciales haciendo uso del método por arrastre de vapor y posteriormente se ensayó la actividad antioxidante de cada uno de los aceites esenciales extraídos utilizando el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). La extracción del aceite esencial y su respectiva actividad antioxidante se estandarizó mediante el uso de la corteza de *Cinnamomum verum* "Canela" ya que es una especie que tiene previos estudios sobre su porcentaje de

extracción del aceite esencial y su actividad antioxidante. Según los resultados obtenidos, la especie *Cinnamomum verum*, exhibe mayor actividad antioxidante con un IC₅₀ de 1,700 µg/mL, por otra parte, *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*, presentaron un IC₅₀ de 11,969.2 y 12,859.8 respectivamente, exhibiendo así, una menor actividad antioxidante.

Se llevaron a cabo diferentes variantes del aparato de extracción por arrastre de vapor. Al no contar con un equipo estandarizado para esta técnica, se obtuvo un bajo rendimiento en la extracción de aceites esenciales. Los resultados de la actividad antioxidante en los aceites extraídos no fueron favorables, pudiéndose deber a la composición química de dichos aceites, o a la época del año donde se recolectaron las especies vegetales. Es necesario repetir las extracciones de los aceites esenciales en las especies estudiadas utilizando un aparato estandarizado, recolectar nuevas especies vegetales aromáticas en la búsqueda de nueva fuente de aceites esenciales y ensayar de nuevo la capacidad antioxidante.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, entre los meses de agosto del año 2021 y febrero del año 2022.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una búsqueda de especies aromáticas salvadoreñas fuente de aceites esenciales.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Realizar la bioprospección de especies vegetales en el departamento de Sonsonate y Ahuachapán.

2.2.2 Seleccionar especies aromáticas como potenciales fuentes de aceites esenciales.

2.2.3 Extraer los aceites esenciales de especies vegetales por medio de arrastre de vapor.

2.2.4 Determinar la capacidad antioxidante de aceites esenciales de las especies vegetales seleccionadas por medio del método DPPH.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Plantas aromáticas

Las definiremos como aquellas que pueden generar por algún proceso fisicoquímico un producto aromático, entendiéndose por productos aromáticos a los que tienen un olor o un sabor determinado, sin evaluar su calidad comercial o estética. Son productos para una muy amplia variedad de industrias, actividades y usos; y lo que puede ser inútil, estar en desuso o desconocerse en un ámbito, puede ser la bendición o la solución para otras circunstancias ⁽¹⁾.

Las plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (PAMC) se han utilizado desde hace 60.000 años aproximadamente. Son reconocidas como un recurso importante a nivel mundial, dado que contribuyen al desarrollo de la economía, desde la etapa de cultivo y pos-cosecha en el sector agrícola hasta el procesamiento de productos en la industria y la comercialización ⁽¹⁾.

Las principales ramas de la industria que más consumen plantas aromáticas o aceites esenciales son:

Industria cosmética: Para la elaboración de perfumes. Su importancia comercial resulta singularmente relevante, pues muchos cosméticos tienen un posicionamiento en el mercado debido casi exclusivamente a la fragancia que contienen. Y en forma especial merece destacarse el mercado de las fragancias: perfumes, aguas de tocador, colonias, extractos, etc. Otro rubro sobresaliente es el de los dentífricos, por su gran consumo de derivados de la menta ⁽²⁾.

Industria alimenticia: Para la elaboración de sabores, salsas, aditivos, bebidas colas y otras. Muchas de estas plantas son usadas como especias ("Clavo", "Canela", "Jengibre", "Nuez moscada", "Vainilla", "Coriandro", "Comino", "Ajo",

etc.). Otras, tienen una aplicación muy específica, como el “Lúpulo” en la industria cervecera, o la “Mostaza” y el “Azafrán”. En apicultura se ha extendido en los últimos años la demanda de calidades tipificadas de mieles, y muchas de éstas provienen de cultivos de plantas aromáticas, como el eucalipto, el orégano o la salvia (2).

Industria farmacéutica: Productos como el eugenol que actúa como analgésico tópico, el eucaliptol y el timol como antisépticos, el mentol como antipruriginoso, o el α -bisabolol como antiinflamatorio local. También son utilizadas en aromaterapia, rama de la medicina que tiene una destacada trascendencia en los últimos años en todo Occidente. También conviene recordar el uso en veterinaria de algunos productos aromáticos, como piojicidas (limoneno y mentas), repelentes de insectos (citronela), en la forma de extractos para distintas dolencias de animales de cría (romero, tomillo, menta), etc (2).

Lo anterior indica que las PAMC representan un importante recurso para la producción de materias primas y productos novedosos con alto valor agregado, pues son de creciente interés en diferentes industrias para la producción de aceites esenciales, productos farmacéuticos, tintes, colorantes, cosméticos, productos fitosanitarios, sustancias biocidas y otros bioinsumos (2). Constituyen, entonces, una oportunidad para incursionar en mercados más sofisticados, de productos innovadores y con precios más atractivos, en los cuales los productos a partir de la flora salvadoreña pueden marcar la diferencia.

3.1.1.1 Especies vegetales aromáticas de la flora salvadoreña como fuentes de aceites esencial.

Dentro de las familias botánicas donde se encuentran mayoritariamente especies vegetales fuente de especies aromáticas en la Flora Salvadoreña, tenemos:

Labiatae, Apiáceae, Asteráceae, Mirtáceae, Lauráceae, Pináceae, Piperáceae, Boragináceae, etc Las familias botánicas de interés para esta estancia de investigación son las Lauráceas y Piperáceas, representadas por los géneros *Ocotea* y *Piper*, respectivamente.

El género *Piper* contiene alrededor de 200 especies, siendo así el más representativo y el más distribuido en la región pantropical. Las plantas del género *Piper* se reconocen fácilmente por sus características físicas y el típico olor “picante” o aromático. El género *Piper* consta de Arbustos o sufrútices terrestres. Hojas alternas, enteras, pero a menudo lobulados basalmente tallos solitarios o con frecuencia plantas cespitosas. Inflorescencias terminales, opuestas y solitarias, las flores con frecuencia formando bandas alrededor de la espiga, brácteas florales, cuculadas o triangulares distalmente en forma de U o V, flores sésiles o pediceladas; estambres 2–4 (–8), los filamentos a menudo persistentes en el fruto, anteras ditecas; pistilo 3–4-carpelar con igual número de estigmas, sésiles o sobre un estilo prominente. Fruto al madurar ligeramente distorsionado por compresión de los frutos adyacentes, basalmente fijados o parcialmente inmersos en el raquis (3).

El género *Piper* entre ellos *Piper standleyi* (Figura N° 1a), contiene aceites esenciales los cuales están constituidos principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos cíclicos y acíclicos oxigenados (4). Algunas especies tropicales de *Piper* han presentado un alto rendimiento de aceites esenciales y propiedades biológicas interesantes como: antimicrobianos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, antinociceptivos, antiinflamatorios y citotóxicos frente a diferentes líneas de células tumorales (5).

El género *Ocotea* contiene alrededor de 350 especies vegetales, las cuales su gran mayoría se encuentran en el Neotrópico (6). El género *Ocotea*, pertenece a la Familia Lauráceae la cual está compuesta por 52 géneros y casi 3000 especies,

se conoce que este género es conocido por su gran diversidad química y así mismo por los componentes de cada una de las especies (7). Los miembros del género *Ocotea* son generalmente aromáticos y se utilizan mayoritariamente en perfumería y como aromatizante (8). En el caso de *Ocotea veraguensis* este es un árbol pequeño, máximo de 15m de alto; ramitas teretes o angulares, sólidas; plantas hermafroditas. Hojas elípticas, 8–15 cm de largo y 3–5 cm de ancho, ápice y base agudos, cartáceas, glabras. Inflorescencias 5–12 cm de largo, pubérulas, flores blancas; tépalos 3 mm de largo, patentes en la antesis; estambres exteriores lanceolado-foliosos, papilosos, con ápice estéril, los 3 internos similares, anteras papilosas con ápice estéril, estaminodios presentes. Frutos elipsoides, 2.5 cm de largo y 1.8 cm de ancho; cúpula con borde doble en el margen, 15 mm de diámetro y 5 mm de profundidad (9)

Ocotea veraguensis (Figura N° 1b) pertenece a este amplio género, el aceite esencial de dicha especie está constituido principalmente por los sesquiterpenoides oxigenados (58.8%), el resto del aceite está compuesto por pequeñas cantidades de hidrocarburos monoterpeno y sesquiterpeno (27.5% y 10.1%, respectivamente), monoterpenoides oxigenados (2.3%) y compuestos derivados de ácidos grasos (1.1%). El aceite esencial de *O. veraguensis* contiene principalmente bulnesol (29.5%) y *p*-cimeno (19.8%) (10).

Cinnamomum verum (Figura N° 1c) pertenece a la familia de las Lauráceas, alcanza una altura de 10-15 m de largo. Sus hojas son opuestas, de forma ovalada a oblongada, suelen tener una textura coriácea en ambas caras. Las hojas de color verde oscuro miden entre 7 cm y 18 cm de largo con puntas puntiagudas. La lámina es de color blanco verdoso y verde brillante. Las flores, de color verdoso o blanco amarillento, están dispuestas en 5 panículas con un olor único. Su fruto es una baya de 1 cm de largo que contiene una sola semilla. El momento adecuado para pelar la corteza es cuando el rubor rojo de las hojas jóvenes se vuelve verde. (11)

(a) *Piper standleyi* Trel.(b) *Ocotea veraguensis* (Meisn) Mez(c) *Cinnamomum verum* J. Presl

Figura N°1. Especies vegetales aromáticas de la flora salvadoreña fuentes de aceite esencial (a) *Piper standleyi* Trel., detalle de hojas. (b) *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez, detalle de hojas. (c) *Cinnamomum verum* J. Presl., detalle de corteza.

3.2 Aceites esenciales

3.2.1 Concepto y generalidades

Los aceites esenciales, aceites volátiles, o simplemente esencias, son las sustancias aromáticas naturales responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales. Actualmente, sólo se emplea esta definición si se obtienen mediante arrastre en corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio en el caso de los cítricos. Son sintetizadas y segregadas por determinadas estructuras histológicas especializadas, frecuentemente localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta: células oleíferas, conductos o cavidades secretoras, o en pelos glandulosos ⁽¹²⁾.

Pueden, asimismo, estar depositadas en tejidos específicos como en el pericarpio de los frutos cítricos; en los pétalos de las rosas; en la corteza, tallo y hojas de la “Canela”; en las maderas del “Alcanforero” y “Sándalo”; en los pelos glandulares

de hojas, tallos y flores de la menta; en las raíces de la valeriana, etc. Con frecuencia están asociadas con otras sustancias, como gomas y resinas, y tienden a resignificar por exposición al aire ⁽¹²⁾.

En el mundo vegetal están muy extendidas en numerosas especies botánicas. Son especialmente abundantes en las Coníferas, Lamiáceas, Apiáceas, Mirtáceas, Lauráceas, Piperáceas, Rutáceas y Asteráceas ⁽¹²⁾. Se le atribuyen varias funciones en las plantas como protección frente a insectos y herbívoros, adaptación frente al estrés hídrico y son de gran importancia en la polinización, debido a que constituyen elementos de comunicación química por su volatilidad y marcado olor ⁽¹²⁾. Los aceites esenciales, en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos. Cuando están frescos, a temperatura ambiente, son incoloros, ya que al oxidarse se resinifican y toman un color amarillento oscuro (lo que se previene depositándolos en recipientes de vidrio de color topacio, totalmente llenos y cerrados perfectamente) ⁽¹²⁾.

La mayoría de los aceites son menos densos que el agua (salvo excepciones como los aceites esenciales de “Canela”, “Sasafrás” y “Clavo”) y con un alto índice de refracción ⁽¹²⁾. Los aceites esenciales, en cuanto a su composición química, a excepción de las esencias derivadas de heterósidos (como la de las “Almendras amargas” y “Mostaza”), son generalmente mezclas complejas de constituyentes muy variables que pertenecen, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos y, en menor medida, al grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano ⁽¹²⁾. Por tanto, al referirse a los componentes de los aceites esenciales; hay dos clases químicas distintas: terpenoides y fenilpropanoides. Los terpenoides son los más comunes y abundantes, están formados por unidades de isopreno (5 carbonos), que pueden ser monoterpenos (10 carbonos) y sesquiterpenos (15 carbonos) ⁽¹²⁾. Son extremadamente

variables, presentando diferentes esqueletos de carbono y una amplia variedad de derivados oxigenados entre los que se encuentran alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, peróxidos y fenoles. Los fenilpropanoides son el grupo menos común de compuestos aromáticos y cuando estos compuestos están presentes, imparten un olor y sabor específicos a las plantas ⁽¹³⁾.

3.2.2 Propiedades

Algunas de sus propiedades fisicoquímicas destacables son, volatilidad, inestabilidad ante la luz y del oxígeno, ante la presencia de oxidantes, reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición.

En cuanto a su solubilidad, tiene la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar (son más liposolubles cuanto mayor contenido de monoterpenos tengan), también suelen tener una alta solubilidad en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética. Para estos fines también suele aprovecharse su solubilidad en agua: agua de rosas, de azahar.

Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos.

Poseen una densidad normalmente menor que la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo, y en general son líquidos (la esencia de “Palo santo” *Bulnesia sarmientoi*, es una excepción) traslúcidos y amarillentos o pardo amarillento (algunas esencias poseen un color muy particular, como el azul de la “Manzanilla alemana” *Matricaria recutita*, o el verde de la bergamota) ⁽²⁾.

3.2.3 Composición

Los aceites esenciales, están compuestos por una gran cantidad de componentes, entre 60 y 200 compuestos distintos, es por ello que se les conocen como mezclas complejas y muy variables de componentes. Los compuestos principales constituyen un aproximado del 85% del aceite esencial, mientras que los otros compuestos están presentes únicamente en trazas ⁽¹⁴⁾. Los aceites esenciales contienen principalmente compuestos líquidos y más o menos volátiles de distintas clases de sustancias orgánicas, entre los cuales se encuentran mono y sesquiterpeno y varios derivados oxigenados como alcoholes, aldehídos alifáticos y ésteres ⁽¹⁴⁾. Por otro lado, del 1 al 10% en peso del aceite se encuentran los carotenoides, ácidos grasos, flavonoides y ceras, los cuales son clasificados como residuos no volátiles.

Hidrocarburos: Son la molécula constituida por H y C dispuestos en cadenas, estos hidrocarburos pueden ser acíclicos, alicíclicos (monocíclico, bicíclico o tricíclico) o aromáticos ⁽¹⁵⁾.

Terpenos: Son la clase más común de compuestos químicos que se encuentran en los aceites esenciales, constituyen un grupo de metabolitos secundarios formados por unidades de 5 átomos de carbono o unidades de “isopreno” ⁽¹⁶⁾, por lo que también se conocen como isoprenoides. Los mono, sesqui y diterpenos, se clasifican bajo los terpenos ⁽¹⁷⁾.

Sesquiterpenos: Se aíslan biogénicamente del pirofosfato de farnesilo, su estructura puede ser lineal, monocíclico o bi y tricíclico, las estructuras lineales de los sesquiterpenos son denominados farnesenos, los cuales son hidrocarburos ramificados con cuatro dobles enlaces ⁽¹⁸⁾, estos se encuentran generalmente en los aceites esenciales, en las estructuras monocíclicas se encuentran grupos

bisobolenos con estructuras de anillo C6 y sus isómeros, como por ejemplo, *Z*- α -bisaboleno, β - bisaboleno, *E*- γ -bisaboleno y *Z*- γ - bisaboleno los cuales se encuentran en varios aceites esenciales ⁽¹⁹⁾.

Diterpenos: Estos son combinación de cuatro unidades de isopreno, se consideran componentes pesados, los cuales no se evaporan fácilmente durante el proceso de extracción mediante destilación al vapor; estos se encuentran en todas las familias de plantas con la sustancia química C20 ⁽²⁰⁾.

Alcoholes: Los alcoholes le proporcionan propiedades como antiséptico, antiviral, antibacteriano y germicida a los aceites esenciales, los alcoholes son formados en una combinación de terpenos con átomos de oxígeno e hidrógeno, el término monoterpenol, es utilizado para describir un monoterpeno que contiene grupos hidroxilo en el interior de su estructura de hidrocarburo ⁽²¹⁾.

Monoterpenos: Los monoterpenos es el resultado de combinar dos unidades de isopreno, mediante la unión cabeza-cola, y las principales propiedades de estos son: estimulante, expectorante, antibacteriano, analgésico ⁽²²⁾, la mayoría de los monoterpenos son hidrocarburos insaturados (C10), y como sustituyentes en los derivados oxigenados se pueden tener alcoholes, cetonas y ácidos carboxílicos⁽¹⁵⁾.

Ésteres: Los ésteres se forman entre una interacción entre alcoholes y ácidos, los ésteres brindan propiedades como calmantes y equilibrantes dentro de los aceites esenciales, debido a la presencia de grupo alcohólicos, pueden proporcionar propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y sedantes, los ésteres que se encuentran comúnmente en los aceites esenciales son acetato de linilo y formiato de geranilo los cuales están presentes en bergamota y lavanda ⁽¹⁹⁾.

Cetonas: Los aceites esenciales que contienen grupos cetona tienen propiedades como anticatarrales, proliferantes celulares, expectorantes y propiedades vulnerables, sirven para la cicatrización de heridas y mejoran el tejido de la piel ⁽¹⁹⁾

3.2.4 Métodos de extracción

Los aceites esenciales se pueden extraer de diversas partes del material vegetal y esto se puede lograr mediante diferentes métodos de extracción, los cuales dependen del material vegetal a utilizar, la composición, la estabilidad de cada uno de los componentes y la especificación del producto final deseado ⁽²³⁾. El método es uno de los factores principales que determina la calidad del aceite esencial, un método inadecuado puede provocar o dañar la composición del aceite esencial, puede generar cambios físicos como una decoloración, mal olor, aumento de viscosidad ⁽²⁴⁾.

Existen diversos métodos para la extracción de aceites esenciales, a continuación, se describe el método convencional que se utilizará en nuestra estancia.

Destilación por arrastre de vapor:

La extracción por medio del método de destilación al vapor (Figura N°2) es la técnica más amplia aplicada, el porcentaje de aceites esenciales extraídos por esta técnica es del 93% y el 7% restante puede ser extraído por otros métodos⁽²⁵⁾. El proceso inicia calentando el material vegetal utilizando vapor que se suministra del generador de vapor. El calor es el principal factor determinante para la eficacia con la que se rompen y revientan las estructuras del material vegetal y de esta manera liberan los componentes aromáticos o aceites esenciales ⁽²⁶⁾. Masango en el año 2004 desarrolló una innovadora técnica por destilación a vapor para aumentar los rendimientos de aceites esenciales aislados y reducir la cantidad

de agua residual, se utiliza un lecho empacado de muestra de plantas, el cual es colocado sobre la fuente de vapor, de esta manera se permite que el vapor pase a través de las plantas y el agua hirviendo no se mezcle con el material vegetal⁽²¹⁾.

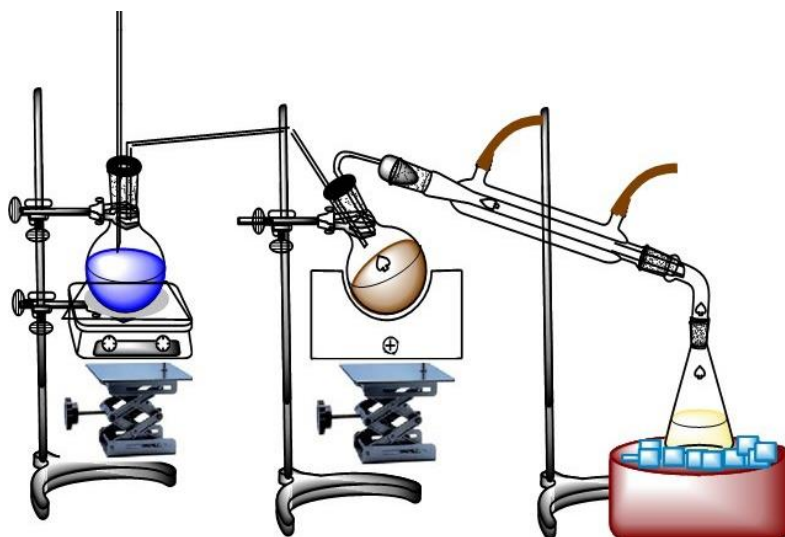


Figura N°2. Equipo de destilación por arrastre de vapor.

3.3 Radicales libres

Un radical libre es por definición toda especie química capaz de una existencia independiente, que contenga en su capa electrónica más externa uno o más electrones no apareados, es decir que se encuentren solos en un orbital. Los radicales libres, por contener electrones no apareados son inestables y más reactivos que los no-radicales. Un radical libre es una molécula que carece de un electrón para obtener estabilidad electroquímica, por lo que se vuelve altamente reactivo, los electrones tienden a emparejarse para lograr estabilidad, una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que donan el electrón (oxidación) se convierten en un nuevo radical libre, iniciando así una reacción en cadena ⁽²⁷⁾.

3.4 Estrés oxidativo

Los radicales libres (RL), entre ellos las formas reactivas del oxígeno (ROS) se generan constantemente en el organismo, en muchos casos para cumplir funciones fisiológicas; no obstante, cuando se producen en exceso pueden provocar estrés oxidativo (28). El estrés oxidativo es una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres, principalmente las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno, y los mecanismos de defensa antioxidantes (29).

El exceso de ROS puede producir daño a lípidos de las membranas celulares o lipoperoxidación de proteínas, carbohidratos y ADN (30). Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son altamente reactivas debido a que presentan un número dispar de electrones de valencia. El primer radical libre que se forma por reducción del oxígeno molecular es el anión superóxido (O_2^-), cuya toxicidad es moderada. Este, de forma espontánea o a través del superóxido dismutasa mitocondrial (SOD), se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se transforma en el radical hidroxilo (OH), altamente tóxico (29).

3.5 Antioxidantes

El término “Antioxidante” puede definirse de diversas formas: Desde el punto de vista químico un antioxidante es una sustancia que se opone a la oxidación o inhibe reacciones promovidas por oxígenos o peróxidos (30).

El Instituto de Medicina los define como: “Una sustancia que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas, como el oxígeno y el nitrógeno, sobre la función fisiológica normal de los seres humanos”(31). Los antioxidantes combaten los radicales libres para mantener las

células sanas y resistir el daño celular al reducir la incidencia de enfermedades crónicas mediante la prevención de la degradación celular causada por el estrés oxidativo⁽³²⁾.

Los sesquiterpenos son terpenoides de 15 carbonos que comprenden principalmente dos tipos, sesquiterpenos oxigenados y sesquiterpenos de hidrocarburos. Las formas oxigenadas se presentan en la naturaleza portando grupos funcionales tales como alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos o lactonas. Debido a su pequeño peso molecular, son partes orgánicas volátiles importantes, especialmente de los aceites esenciales, que tienen un gran potencial medicinal⁽³³⁾. Se han informado casi 5000 lactonas sesquiterpénicas. Entre ellos, se ha informado que del 60 al 65% están presentes como aceites esenciales ⁽³³⁾.

3.6 Ventajas o beneficios de los antioxidantes

Se han estudiado alrededor de 100 enfermedades y su relación con el desbalance del sistema oxidativo, entre otras: cardiovasculares, cáncer, gástricas, respiratorias, neurológicas y del sistema endocrino. Entre éstas las de tipo cardiovascular tienen amplia evidencia ⁽³⁴⁾.

En el caso de la diabetes los posibles mecanismos de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, en particular la glucosa, de la cual también se modula su liberación por el hígado. Podrían también estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de la misma y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en los tejidos blanco para la hormona ⁽³⁴⁾.

Respecto al cáncer se señala que si los radicales libres afectan el ADN (ácido desoxirribonucleico) pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas. Se señala la relación entre cáncer gástrico

derivado de la presencia de *Helicobacter pylori*, bacteria que causa gastritis crónica y que puede conducir a lesiones precancerosas relacionadas con el estrés oxidativo ⁽³⁴⁾. En el caso del cáncer de mama aumenta la evidencia de que el riesgo de esta enfermedad, asociada con los genotipos humanos relacionados al estrés oxidativo, pueden modificarse con el consumo de frutas y vegetales ⁽³⁴⁾.

De igual manera se ha estudiado la relación de los antioxidantes con la artritis reumatoide, anemia, síndrome metabólico, esclerosis múltiple, trastornos nefrológicos, pancreatitis, arrugas prematuras, resequedad de la piel, dermatitis y asma entre otros padecimientos que en la actualidad abordan las investigaciones en curso ⁽³⁵⁾.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

4.1.1 Estudio Bibliográfico

Se realizó una investigación del material bibliográfico existente con respecto al tema de interés, utilizando para ello, diferentes fuentes de información como el sistema bibliotecario de la Universidad de El Salvador y diversas bases de datos en internet que cuentan con artículos científicos o investigaciones relacionadas al tema.

4.1.2 Estudio Experimental

El procesamiento y análisis que se le aplicó a las especies vegetales seleccionadas *Piper standleyi*, *Ocotea veraguensis* y a la especie con la cual se realizó la validación del método a utilizar, "Canela", se llevó a cabo en el Laboratorio de investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.1.3 Estudio prospectivo

Con los resultados de esta investigación se sentará la base para futuras investigaciones en la línea de investigación sobre extracción y ensayo de capacidad antioxidante en aceites esenciales.

4.1.4 Estudio exploratorio

Actualmente en el país no se contaba con una investigación científica sobre la extracción de aceites esenciales y la cuantificación de la capacidad antioxidante de *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*. Esta investigación servirá como un punto de partida para futuras investigaciones en la línea de aceites esenciales de la flora salvadoreña.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se recopiló información de especies vegetales fuente de aceites esenciales de publicaciones científicas, en ResearchGate, Google académico, ScienceDirect, Academia.edu, PubMed, y en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet (Journal of Natural Products, Journal of Agricultural and Food Chemistry, entre otras)

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

4.3.1 Universo:

Especies aromáticas de la flora salvadoreña fuentes de aceites esenciales.

4.3.2 Muestra:

Tres especies aromáticas de la flora salvadoreña fuentes de aceites esenciales (Ver Tabla N°1), en donde se tomó en consideración la disponibilidad, el acceso al lugar, el estado de la planta y la delimitación de las zonas seleccionadas.

En la búsqueda de información botánica de las especies seleccionadas, se llevaron a cabo visitas al Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) para realizar la respectiva identificación de cada especie.

4.3.3 Tipo de muestreo

4.3.3.1 Método No Probabilístico

La muestra es seleccionada en función de criterios establecidos por el individuo; en nuestro caso, se establecieron criterios tales como: disponibilidad de la especie vegetal, el acceso al lugar de la recolecta, el estado de la planta y la delimitación de las zonas seleccionadas.

4.3.3.2 Muestreo por Conveniencia

Las muestras que fueron seleccionadas cumplían con las consideraciones que se plantearon anteriormente. Cabe destacar que este tipo de muestreo no probabilístico es de gran utilidad para estudios piloto o de sondeo.

4.3.4 Especies vegetales fuentes de aceites esenciales

Se desarrollaron 6 viajes de bioprospección, en la búsqueda de especies novedosas fuentes de aceites esenciales, en los Departamentos de Sonsonate y Ahuachapán; en el caso de *Cinnamomum verum* “Canela”, fue adquirida

directamente de un comercio de San Salvador y utilizada para la extracción del aceite esencial y la validación del método DPPH para la cuantificación de la actividad antioxidante (Ver Tabla N°1).

4.3.5 Recolección e identificación de las especies vegetales

Se recolectó la parte aérea de la especie *Piper standleyi*, y corteza de *Ocotea veraguensis* y *Cinnamomum verum*, cada una de las especies vegetales se presentaron en el Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador para su identificación por el curador del Herbario, siendo el profesional apto para realizar la confirmación de la especie, contribuyendo así a la veracidad de los datos obtenidos. Cada una de las especies recolectadas se identificaron por el profesional experto, quien además asignó un número de voucher para la especie vegetal, que permitirá establecer la trazabilidad si se desea continuar con el estudio. Se registraron los siguientes datos: nombre común, nombre científico, fecha de recolecta, lugar de recolecta, persona que recolectó, ubicación por GPS y nombre del botánico responsable de la identificación.

Tabla N°1. Especies vegetales de la flora salvadoreña como fuente de aceite esencial.

Espece vegetal	Familia	Sitio de recolección
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez	Lauráceae	Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate
<i>Piper standleyi</i> Trel.	Piperáceae	Cerro Las Antenas, Apaneca, Ahuachapán
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl. "Canela"	Lauráceae	Mercado Central, San Salvador

4.3.6 Bioprospección y recolecta

Dentro de las actividades de bioprospección se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica científica de Familias botánicas y especies vegetales con presencia

de aceites esenciales, así como la visita al Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador, para corroborar sitios donde se pudieran localizar estas especies en los departamentos de Sonsonate y Ahuachapán. Así, en el año 2021 se ejecutaron 6 viajes de bioprospección y/o recolección de especies vegetales en los departamentos de Sonsonate y Ahuachapán, de donde surgieron 8 especies aromáticas sujetas a ser, probablemente, estudiadas en un futuro como potenciales fuentes de aceites esenciales (Ver Tabla N°2). Las especies vegetales pertenecen a las Familias Myrtáceae, Lauráceae, Verbenáceae, Cupressáceae, Pináceae, Piperáceae y Rutáceae.

Tabla N°2. Especies vegetales aromáticas ubicadas en el Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.

Especie vegetal/Familia/Parte de la planta	Sitio de recolección/Fecha
<i>Eugenia</i> sp./ Myrtáceae/hojas y corteza <i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez/ Lauráceae/hojas y corteza	Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate/7 Sept/23 Nov
<i>Citharexylum donnell-smithii</i> Greenm. /Verbenáceae/flores, hojas, corteza y raíz <i>Cupressus lusitanica</i> Mill. /Cupressáceae/hojas y corteza <i>Pinus oocarpa</i> Schiede ex Schlttdl. /Pináceae/hojas y corteza	Laguna Verde, Apaneca, Ahuachapán/10 Feb
<i>Piper standleyi</i> Trel. /Piperáceae/hojas	Laguna Las Ninfas, Apaneca/27 Jul Cerro Las Antenas, Apaneca, Ahuachapán/21 jul/16 Nov
<i>Lippia cardiostegia</i> Benth/Verbenáceae/hojas <i>Zanthoxylum</i> sp./Rutáceae/hojas, frutos y flores	Hoyo del Cuajusto, Apaneca, Ahuachapán/27 Jul

Las especies vegetales que fueron recolectadas en 2021 para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales fueron *Ocotea veraguensis* y *Piper standleyi*, fueron seleccionadas por su facilidad de recolección, su abundancia en la zona delimitada, y por sus antecedentes previos que indican que las familias de éstas

contienen aceites esenciales con una remarcada actividad antioxidante (Ver Tabla N°3).

Tabla N°3. Especies vegetales aromáticas seleccionadas para la extracción de aceites esenciales.

Especie vegetal/Familia/Órgano utilizado	Nombre común	Sitio de recolección/Coordenadas
<i>Piper standleyi</i> Trel/ Piperáeeae/Hojas		Cerro Las Antenas, Apaneca, Ahuachapán/13°50'19"N, 89°48'10", 1726 msnm, N° Voucher: GC-4917
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez/ Lauráceaea / Corteza	"Canela Montés"	Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate/7 Sept/23 Nov. 13°40'36"N, 89°34'52" O, 655 msnm, N° Voucher: GC5042
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl/ Laurácea/ Corteza	"Canela"	Mercado Central de San Salvador/13.694381,-89.195173, 620 msnm, N° Voucher: CM-0121

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Todo el proceso experimental del laboratorio se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C) y en los ensayos de actividad antioxidante, en oscuridad, debido a que el entorno fisicoquímico como la luz, el oxígeno y la temperatura afecta los resultados de la actividad antioxidante. Materiales, reactivos y equipos utilizados se encuentran en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.4.1 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

4.4.1.1 Procesamiento de muestras

Los resultados de cuantificación de actividad antioxidante se realizaron por triplicado respecto a cada solución de trabajo, se procedió a tabular los datos

utilizando el programa Microsoft Excel 2019, con el cual se diseñó una hoja de cálculo para obtener los valores de CV, tomando en cuenta los valores que presentaron un CV menor al 10%

4.4.1.2 Procesamiento de estándares

El espectrofotómetro UV brinda una concentración en μM equivalentes de Trolox, se realizó un promedio de las curvas de calibración que presentaron un CV menor al 10%, a partir de la ecuación de línea recta obtenida se calcula la concentración en μM equivalentes de Trolox utilizando los valores de absorbancia exhibidas para cada celda.

Haciendo uso de la nueva concentración encontrada para cada celda, se realizaron los cálculos que determinan la capacidad antioxidante expresada en el promedio de μmol equivalente de Trolox por cada 100 g de muestra.

4.4.2 Obtención del aceite esencial de *Cinnamomum verum*, *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis* por medio de arrastre de vapor.

- 1) Fraccionar cada una de las especies vegetales aromáticas con ayuda de tijeras.
- 2) Anotar el peso total de la muestra fraccionada.
- 3) Colocar 2.5 litros de agua en un balón de fondo plano de 5,000 mL.
- 4) Armar el equipo de arrastre de vapor (Ver Anexo N°2).
- 5) Mantener la extracción durante 30 minutos después de observar la destilación de la primera gota de agua aromática.
- 6) Recibir el total de agua aromática de la extracción en un balón de fondo redondo de 100 mL.

4.4.3 Separación del aceite esencial de *Cinnamomum verum*, *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis* del agua aromática.

- 1) Decantar el agua aromática obtenida en una ampolla de separación.
- 2) Añadir 25 mL de éter dietílico en porciones de 5 mL liberando la presión generada por los gases, abriendo el robinete de la ampolla.
- 3) Recoger la fase acuosa en un beaker de 250 mL.
- 4) Recoger la fase oleosa en un beaker de 250 mL con sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de agua.
- 5) Repetir por triplicado los pasos 1-4 para obtener un mejor rendimiento del aceite esencial.

4.4.4 Eliminación del solvente mediante el equipo de rotaevaporación.

- 1) Transferir la fase oleosa a un balón en forma de corazón.
- 2) Rotaevaporar hasta concentrar el aceite esencial y lograr la eliminación casi total del solvente.
- 3) Transferir el aceite esencial concentrado a un tubo eppendorf con ayuda de una pipeta.
- 4) Llevar a refrigeración el aceite esencial obtenido hasta el momento de su utilización.

4.4.5 Cuantificación de la capacidad antioxidante en aceites esenciales por el método del DPPH.

Reactivos a utilizar:

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, CAS: 1898-66-4); Metanol; Etanol; Aceite esencial de *Cinnamomum verum*, *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*; DMSO 10%; Estándar de Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic

acid, CAS: 53188-07-1). Descripción del equipo, cristalería y material a utilizar (Ver Anexo N°1)

4.4.6 Preparación de la curva de calibración con estándar Trolox.

- 1) Pesar aproximadamente 5 mg del estándar de Trolox en un beaker de 100mL.
- 2) Disolver con DMSO 10% hasta una concentración de 500 μ M.
- 3) Preparar la línea de calibración a partir de la solución anterior, en orden creciente de concentraciones: 6.25 μ g/mL, 12.50 μ g/mL, 25.00 μ g/mL, 50.00 μ g/mL, 100.00 μ g/mL, 250.00 μ g/mL, 500.00 μ g/mL.

4.4.7 Preparación de la solución de DPPH [50 μ M]

- 1) Pesar aproximadamente 5 mg de DPPH en un vial de 10 mL.
- 2) Diluir con un volumen igual de metanol.
- 3) Tomar una alícuota de esta solución.
- 4) Adicionar la alícuota en un beaker de 400 mL con etanol, hasta obtener una concentración final de 50 [μ M] de DPPH.

4.4.8 Preparación de las soluciones de trabajo.

- 1) Pesar en un vial de 10 mL aproximadamente 6 mg de aceite esencial.
- 2) Diluir la muestra con DMSO 10% hasta una concentración de 3 mg/mL
- 3) Realizar diluciones seriadas hasta concentraciones finales de 1.5 mg/mL y 0.75 mg/mL.

4.4.9 Preparación de las celdas para la curva de calibración con Trolox.

- 1) Agregar con ayuda de una micropipeta a las celdas para espectrofotómetro UV-vis los siguientes reactivos:
 - 950 μL de solución de DPPH [50 μM].
 - 50 μL de cada concentración del estándar de Trolox.
- 2) Realizar este procedimiento por triplicado para cada concentración de la curva de calibración.

4.4.10 Preparación de las celdas con la solución de trabajo.

- 1) Agregar con ayuda de una micropipeta a las celdas para espectrofotómetro UV-vis los siguientes reactivos:
 - 950 μL de solución de DPPH [50 μM].
 - 50 μL de las soluciones de trabajo.

4.4.11 Preparación de blanco de reactivo.

- 1) Agregar con micropipeta a una celda para espectrofotómetro UV-vis los siguientes reactivos:
 - 950 μL de solución de DPPH [50 μM]
 - 50 μL de solución de DMSO 10%

4.4.12 Preparación de blanco de solvente:

- 1) Agregar con micropipeta a una celda para espectrofotómetro UV-vis los siguientes reactivos:
 - 18.73 μL de metanol
 - 931.27 μL de etanol
 - 50 μL de DMSO 10%

Nota: Todas las celdas deben homogenizarse evitando la formación de burbujas e incubarlas por 30 minutos en ausencia de fuentes de luz

4.4.13 Lectura de celdas en equipo UV:

- 1) Encender el Espectrofotómetro UV - Vis mínimo 30 minutos antes de utilizarlo.
- 2) Programar la longitud de onda según la determinación a realizar.
- 3) Ingresar las unidades y las concentraciones de las soluciones estándar.
- 4) Tomar las cubetas del lado que no estará en contacto con el haz de luz.
- 5) Colocar el blanco y las soluciones estándar dentro de las celdas correspondientes en el equipo, de manera que la parte transparente y lisa quede en posición para que el haz de luz la atraviese.
- 6) Leer la absorbancia del blanco seleccionando "Auto Zero" desde el programa.
- 7) Leer las absorbancias de los estándares.
- 8) Guardar los datos de las absorbancias del blanco y los estándares.
- 9) Sacar las cubetas que contienen soluciones estándares, pero no la que contiene el blanco.
- 10) Ingresar al equipo las cubetas de las soluciones de trabajo y asignarles su respectivo código en el programa.
- 11) Medir las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 515nm.

4.4.14 Procesamiento de datos.

4.4.14.1 Procesamiento de muestras

Los resultados de cuantificación de actividad antioxidante se realizaron por triplicado respecto a cada solución de trabajo, se procedió a tabular los datos

utilizando el programa Microsoft Excel 2019, con el cual se diseñó una hoja de cálculo para obtener los valores de CV, tomando en cuenta los valores que presentaron un CV menor al 10%.

4.4.14.2 Procesamiento de estándares

El espectrofotómetro UV - Vis brinda una concentración en μM equivalentes de Trolox, se realizó un promedio de las curvas de calibración que presentaron un CV menor al 10%, a partir de la ecuación de línea recta obtenida se calcula la concentración en μM equivalentes de Trolox utilizando los valores de absorbancia exhibidas para cada celda.

Haciendo uso de la nueva concentración encontrada para cada celda, se realizaron los cálculos que determinen la capacidad antioxidante expresada en el promedio de μmol equivalente de Trolox por cada 100 g de muestra.

4.4.14.3 Comparación de resultados

Una vez obtenidos los resultados sobre la capacidad antioxidante presentes en las especies de *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*, haciendo uso del método StatGraphics versión 16.2.04, se realizó el análisis para verificar si existe diferencia estadísticamente significativa en la actividad antioxidante exhibida por las especies.

Se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una sola vía, que hace posible determinar si la diferencia que existe entre los datos es suficiente para poder diferenciarlos o relacionarlos entre sí, evaluando la dispersión que existe entre los resultados.

En ANOVA de un factor existen ciertas condiciones a cumplir:

Sólo se relacionan dos variables: Una variable dependiente y una independiente (factor).

La variable dependiente es cuantitativa, mientras que la variable independiente es categórica (nominal u ordinal)

4.4.14.4 Prueba F para la diferencia de más de dos medias

Al aplicar ANOVA de un factor, se calculó un estadístico o test denominado F. En el cálculo del estadístico F se divide la variación entre los grupos por la variación dentro de los grupos.

Si las medias entre los grupos varían mucho y la media dentro de un grupo varía poco, es decir, los grupos son heterogéneos entre ellos y similares internamente, el valor F será más alto y, por tanto, las variables estarán relacionadas, lo que significa que las medias de la variable dependiente difieren o varían mucho entre los grupos de la variable independiente.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Recolección de especies vegetales.

Dentro de las actividades de bioprospección se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica científica de Familias botánicas y especies vegetales con presencia de aceites esenciales, así como la visita al Herbario del Museo de Historia Natural (MUHNES) de El Salvador, para corroborar sitios donde se pudieran localizar estas especies en los Departamentos de Sonsonate y Ahuachapán. Así, en el año 2021 se ejecutaron 6 viajes de bioprospección y/o recolección de especies vegetales, donde surgieron 2 especies aromáticas sujetas a ser estudiadas como potenciales fuentes de aceites esenciales (Ver Tabla N°4, y Figura N°3). Se colectó la parte aérea de la especie *Piper standleyi*, y corteza de *Ocotea veraguensis* y *Cinnamomum verum*. Cada especie vegetal se presentó en el Herbario del MUHNES para su identificación por el curador del Herbario, siendo el profesional idóneo para realizar la confirmación de la especie, contribuyendo así a la veracidad de los datos obtenidos. Las especies vegetales pertenecen a las Familias Piperáceae y Lauráceae. A cada especie recolectada se le asignó un número de voucher, que permitirá establecer la trazabilidad si se desea continuar con el estudio. Se registraron los siguientes datos: nombre común, nombre científico, fecha de recolecta, lugar de recolecta, persona que recolectó, ubicación por GPS y nombre del botánico responsable de la identificación.

Tabla N°4. Especies vegetales aromáticas ubicadas en el Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.

Especie vegetal/Familia/Parte de la planta	Sitio de recolección/Fecha
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez/ Lauráceae/hojas y corteza	Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate/7 Sept/23 Nov, N°. Voucher GC-5042

Tabla N°4. Especies vegetales aromáticas ubicadas en el Departamento de Sonsonate y Ahuachapán. (Continuación)

Especie vegetal/Familia/Parte de la planta	Sitio de recolección/Fecha
<i>Piper standleyi</i> Trel./Piperáceae/hojas	Cerro Las Antenas, Apaneca, Ahuachapán/21 jul/16 Nov, N°. Voucher GC-4917
<i>Piper standleyi</i> Trel./Piperáceae/ hojas	Laguna Las Ninfas, Apaneca, Ahuachapán/27 jul, N° Voucher GC-4937



(a) *Piper standleyi* Trel.



(b) *Ocotea veraguensis* (Meisn) Mez

Figura N°3. Especies vegetales fuentes de aceites esenciales. *Piper standleyi* (a) detalle de hojas; y *Ocotea veraguensis* (b) detalle de hojas y fruto.

5.2 Extracción de aceites esenciales

Para este apartado se utilizaron 3 especies vegetales, 1 de ellas fue utilizada únicamente para desarrollar y afinar los métodos empleados, la cual fue *Cinnamomum verum* “Canela”.

Los ensayos para la validación del método de “arrastre de vapor” tradicional se realizaron con la corteza de “Canela” (*Cinnamomum verum*). Se adquirieron entonces, 3 libras de “Canela” en el Mercado Central de San Salvador y la obtención de aceite esencial se realizó bajo el método de “Arrastre de vapor” tradicional, ver Anexo N°2 (a).

Para la extracción de aceites vegetales de las plantas *Piper standleyi* se utilizó el equipo de arrastre de vapor vertical con doble trampa, ver Anexo N°2 (b), y para *Ocotea veraguensis* se armó el arrastre de vapor vertical, ver Anexo N°2 (c).

El aparato de arrastre de vapor vertical con doble trampa, Ver anexo N°2 (b), a diferencia del arrastre de vapor utilizado en “Canela”, cuenta con una doble trampa con la que se permitió una mejor separación de los compuestos aromáticos debido a la diferencia de volatilidad entre ellos.

Para la extracción del aceite esencial de *Ocotea veraguensis* se utilizó el aparato de arrastre de vapor vertical (Ver Anexo N°2 (c)).

Los valores de rendimiento de extracción de aceite esencial del material vegetal se presentan en la Tabla N°5.

Tabla N°5. Valores de rendimiento de extracción de aceites esenciales del material vegetal seleccionado

Especie vegetal	Gramos de aceite esencial obtenidos	Porcentaje de rendimiento	Método de extracción
<i>Cinnamomum verum</i>	1.2262 g	0.090%	Arrastre de vapor tradicional
<i>Piper standleyi</i>	0.0257 g	0.1285%	Arrastre de vapor vertical con doble trampa
<i>Ocotea veraguensis</i>	0.0669 g	0.099 %	Arrastre de vapor vertical

Se tomó a bien realizar un cuadro en el que se detallan los rendimientos de las especies aromáticas ensayadas en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPN), con su respectivo método de extracción, comparándolas con

rendimientos de especies aromáticas reportados en investigaciones de terceros^(36,37). Ver Tabla N°6

Tabla N°6. Comparación de porcentajes de rendimientos de extracción de aceite esenciales entre metodologías utilizadas en laboratorio e investigadas en bibliografías.

	Resultados experimentales			Resultados bibliográficos	
	Arrastre de vapor tradicional	Arrastre de vapor vertical	Arrastre de vapor vertical con doble trampa	Arrastre de vapor tradicional	Arrastre de vapor vertical
<i>Piper standleyi</i>	-	-	0.1285%	-	-
<i>Ocotea veraguensis</i>	-	0.099%	-	-	-
<i>Cinnamomum verum</i>	0.090%	-	-	-	-
<i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	-	0.6581%	-
<i>Matricaria recutita L.</i>	-	-	-	-	0.1775%

El rendimiento de extracción de una especie aromática va a depender de diversos factores, tales como el tamaño de partícula del material vegetal, el tiempo de extracción, hora de la colecta, lugar de la colecta, y otros múltiples factores.

5.3 Cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Vis empleando el método de DPPH.

La curva de calibración del estándar, se preparó con Trolox, partiendo de una solución madre de 500.00 μM , se prepararon las soluciones estándar a 250.00 μM y 100.00 μM de Trolox. A partir de la solución al 100.00 μM se hicieron por

casca de dilución las soluciones estándar al 50.00 μM , 25.00 μM , 12.50 μM y 6.25 μM de Trolox. Las curvas de calibración de las muestras se prepararon con los aceites esenciales extraídos y DMSO al 10%, partiendo de una solución madre de 3 mg/mL, se prepararon las soluciones de 1.5 y 0.75 mg/mL por cascada de dilución.

Para la lectura en el Espectrofotómetro UV-Vis se preparó para cada concentración de estándar 3 cubetas, las cuales al momento de realizar la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis contenían: 50 μL de Trolox diluido en DMSO 10% y 950 μL de la solución de DPPH.

Las cubetas de la muestra contenían: 50 μL de solución de muestra y 950 μL de DPPH. El blanco contenía 50 μL de DMSO 10% y 950 μL de mezcla de alcoholes, la cual contenía 931.27 μL de etanol absoluto y 18.73 μL de metanol.

Cada muestra fue codificada con la inicial del nombre científico de cada especie vegetal analizada, seguido del número de muestra, seguido la concentración de trabajo (A, B o C) y por último el número de repetición (1, 2 o 3), por ejemplo, P1A1 correspondería a Muestra 1 de *Piper standleyi*, concentración de trabajo A y repetición 1.

El tiempo de reacción de 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (25°C), después de esto se midieron las absorbancias de cada cubeta en el espectrofotómetro UV-Vis, comenzando con los estándares.

En el momento de realizar la cuantificación de la actividad antioxidante se elaboró una curva de calibración con el mismo número de estándares a las concentraciones establecidas (Ver Anexo N°3).

Tabla N°7. Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH.

Estándar μM Trolox	Curvas de calibración			Promedio	S	CV
	Std 1	Std 2	Std 3			
250	0.07	0.083	0.072	0.0750	0.007	9.33333333
100	0.319	0.326	0.338	0.3277	0.00960902	2.93256059
50	0.412	0.416	0.423	0.4170	0.00556776	1.33519529
25	0.452	0.461	0.457	0.4567	0.00450925	0.98742695
12.5	0.469	0.485	0.47	0.4747	0.00896289	1.88824855
6.25	0.485	0.487	0.492	0.4880	0.00360555	0.73884247

Al terminar la cuantificación de todos los estándares, se promediaron las absorbancias de cada estándar en las diferentes curvas (Ver tabla N°7) y se omitieron las lecturas que no respetaban la tendencia para un mismo estándar, para ello se utilizó el coeficiente de variación como parámetro, debiendo ser menor al 10% para aceptar el valor de absorbancia.

El resultado fue una curva de calibración promedio de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta (Ver figura N°4).

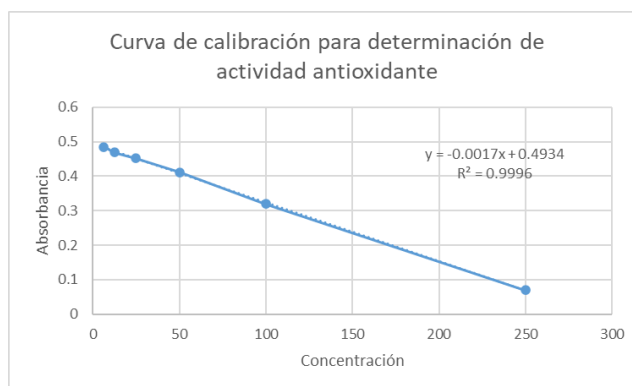


Figura N°4. Curva de calibración de estándares utilizando Trolox para la determinación de actividad antioxidante.

Por cada muestra de aceite esencial obtenido, se prepararon 2 soluciones de trabajo y a cada una de estas le correspondieron 3 concentraciones, en total por muestra se utilizaron 3 cubetas UV-Vis por concentración que contaron como repeticiones.

En el momento de realizar la cuantificación de la actividad antioxidante de las muestras se elaboraron curvas de calibración con las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro UV-Vis de cada repetición realizada por muestra (Ver tabla N°8 y N°9), en cada una de las curvas de calibración se generó la ecuación de línea recta, la cual se utilizó para obtener el IC₅₀ de cada repetición con la siguiente fórmula:

$$IC_{50} = \frac{\left(\frac{\sum a}{2}\right) - b}{m}$$

Donde:

a: Lectura de blanco

b: Intercepto

m: Pendiente

Tabla N°8. Resultados de determinación de la actividad antioxidante en *Piper standleyi*.

Lecturas	<i>Piper standleyi</i> (mg/mL)			IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	Promedio	S	CV
	3	1.5	0.75					
1	0.451	0.468	0.479	19.81	19810.32	11969.21	1317.09	11.00
2	0.438	0.476	0.491	11.18	11183.49			
3	0.479	0.463	0.488	13.64	13638.01			
MUESTRA 2								
1	0.442	0.479	0.487	12.64	12640.92			
2	0.441	0.476	0.489	12.16	12160.51			
3	0.427	0.466	0.484	10.22	10223.11			

Tabla N°9. Resultados de determinación de la actividad antioxidante en *Ocotea veraguensis*.

Lecturas	<i>Ocotea veraguensis</i> (mg/mL)			IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	Promedio	S	CV
	3	1.5	0.75					
1	0.434	0.469	0.48	12.14	12137.12	1294.23	694.78	5.38
2	0.437	0.452	0.479	13.95	13946.38			
3	0.435	0.472	0.479	12.50	12495.91			
MUESTRA 2								
1	0.440	0.470	0.487	12.77	12769.84			
2	0.434	0.440	0.469	13.17	13171.82			
3	0.502	0.505	0.504	15.06	1506.30			

Para realizar los cálculos de promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación, se utilizó el programa Microsoft Excel 2019.

El resultado final se expresó como el promedio de los IC₅₀ obtenidos para cada uno de los aceites esenciales (Ver Tabla N°10)

Tabla N°10. Resultados de determinación de la actividad antioxidante en aceite esencial de *Piper standleyi*, *Ocotea veraguensis* y *Cinnamomum verum*.

Aceite esencial	IC ₅₀ [µg/mL]
<i>Cinnamomum verum</i>	1,700 ± 2.1
<i>Piper standleyi</i>	11,969.2 ± 1317.1
<i>Ocotea veraguensis</i>	12,904.2 ± 694.8
Trolox	37.5 ± 0.7
BHT	6,800 ± 0.0

En la actividad antioxidante de los aceites esenciales extraídos (Ver Tabla N°10), se observa que el aceite de *Cinnamomum verum* mostró la mayor actividad antioxidante (IC₅₀= 1,700.0 ± 2.1 µg/mL).

Los aceites en estudio presentaron IC₅₀ mayor a 1,000 µg/mL según bibliografía, estos resultados no sugieren una remarcada actividad antioxidante (38).

Es necesario recordar que los antioxidantes previenen la oxidación de la cadena de radicales que destruye la integridad de la membrana, resultando más a menudo en lisis de células.

En los aceites esenciales del género *Piper*, usualmente se encuentran compuestos fenólicos como estragol y eugenol (39).

En los aceites esenciales de *Cinnamomum verum* se encuentra en gran cantidad el compuesto de cinamaldehído y el ácido cinámico, los cuales según bibliografía contienen una marcada actividad antioxidante(40), mientras que algunos

monoterpenos como α -terpineno, y el terpinoleno presentes en el aceite del género *Ocotea* solo tienen una modesta actividad antioxidante⁽⁴¹⁾, sin embargo, es importante mencionar que diferentes componentes en el mismo aceite esencial pueden generar interacciones sinérgicas.

Por lo tanto, será necesario realizar más estudios fitoquímicos con métodos de extracción por arrastre de vapor que estén estandarizados (como por ejemplo el aparato Clevenger), para confirmar los resultados al verificar la composición de metabolitos secundarios de los aceites esenciales.

ANALISIS ESTADISTICO

Análisis estadístico para comparar la actividad antioxidante presentado por los 2 aceites esenciales en estudio.

Se realizó la comparación entre los promedios obtenidos de la muestra de *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*, para poder establecer un criterio sobre cual extracto es más conveniente que otro en cuanto a la cantidad de actividad antioxidante.

Se realizó ANOVA de un solo factor con un nivel de confianza del 95%, en el programa Stargraphics Centurion (Ver Tabla N°11).

Tabla N°11 Comparación de la varianza de la actividad antioxidante entre *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*.

Especie Vegetal	<i>Piper standleyi</i>	<i>Ocotea veraguensis</i>
Recuento	5	5
Promedio	11969.2	12904.2
Desviación estándar	1317.09	694.772
Coefficiente de variación	11.00%	5.38%
Mínimo	10223.1	12137.2
Máximo	13638	13946.4
Rango	3414.9	1809.2
Razón F	3.59374	
Valor P	0.243065	

El análisis de varianza de un factor compara los valores medio de las muestras y mediante la prueba F en la tabla de ANOVA, determina la existencia de diferencias significativas entre ellas.

La tabla N° 9 representa la varianza de la actividad antioxidante, muestra que el valor P de la prueba F es mayor que 0.05, por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula, ya que ambos aceites esenciales no son significativamente diferentes, son estadísticamente iguales en un nivel de 95.0% de confianza.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las especies vegetales *Ocotea veraguensis* (Familia Lauráceae; ubicada en Finca San Jorge) y *Piper standleyi* (Familia Piperáceae; ubicada en Cerro Las Antenas) fueron las elegidas para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales, ya que luego de llevar a cabo la bioprospección de distintas especies vegetales, se determinó bibliográficamente que dicho género al que pertenecen cada una de ellas posee una actividad antioxidante alta.
2. La especie vegetal de la cual se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción de su aceite esencial, es *Piper standleyi* con un porcentaje de 0.1285%.
3. La especie de *Cinnammomum verum* exhibió mayor capacidad antioxidante con un IC₅₀ de 1,700 µg/mL, seguido por *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis* con IC₅₀ de 11,969.2 y 12,859.8 µg/mL, respectivamente, presentando la menor capacidad de captación de radicales libres.
4. La baja actividad antioxidante en las especies de *Piper standleyi* y *Ocotea veraguensis*, se podría relacionar a su contenido de metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y monoterpenos regulares, aunque también a la falta del equipo adecuado para la extracción de aceites esenciales (Clevenger).

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Mantener las condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, debido a la inestabilidad de los reactivos y extractos, que en solución se vuelven más vulnerables al ataque de oxígeno, temperatura y luz.
2. Utilizar papel aluminio para cubrir por completo la cristalería a utilizar, desde la toma de las muestras hasta la finalización en la determinación de la actividad antioxidante.
3. Utilizar equipo de bioseguridad para la parte experimental de este trabajo, ya que los solventes son tóxicos y volátiles, trabajar en cámara de gases.
4. El método de extracción “Doble trampa” permitió coleccionar el aceite esencial de *Piper standleyi* con mayor pureza y se obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento, por lo que esta técnica puede ser utilizada a nivel de docencia universitaria para la extracción de aceites esenciales.
5. Realizar la extracción de aceites esenciales utilizando el aparato Clevenger, ya que permite realizar la cuantificación de extracciones por ser un método oficial.
6. Retomar los resultados de esta investigación como referencia, pero en caso sea posible, someter los extractos nuevamente a la determinación de actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFIA

1. Tofiño-Rivera AP, Ortega-Cuadros M, Melo-Ríos A, Mier-Giraldo HJ. Vigilancia tecnológica de plantas aromáticas: de la investigación a la consolidación de la agrocadena colombiana. *Cienc. tecnol. agropecu.*; 2017. 353-377.18(2): 353-375 DOI: 10.21930/rcta.vol18_num2_art:636.
2. Bandoni, A.L. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Argentina. 2a.ed. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; 2000.
3. *Piper*trópicos: 1. PIPERACEAE C. Agardh [Internet]. Tropicos.org. Durant-Archibold A.A., Santana A.I., Gupta M.P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama. *J. Ethnopharmacol.* 2018; 217:63-82, DOI: 10.1016/j.jep.2018.02.008.
4. Da Silva, J.K., Da Trindadade, R., Alves, N.S., Figueiredo P.L., Maia, J.G.S., Setzer, W.N. Essential Oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. Review. *Int.J.Mol.Sci.* 2017; 18(12), 2571. DOI:10.3390/ijms18122571.
5. Mabberley, D.J. The plant book: A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge New York: *Fedes repertorium*,1998 109(5-6),378.
6. Chaverri C., Ciccío, J.F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauráceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. *Rev. biol. trop* [Internet]. 2005.

7. Gottlieb, O.R Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*. 1972 11(5): 1537-1570. DOI: 10.1016/0031-9422(72)85001-5.
8. *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez [Internet]. Tropicos.org.
9. Takaku, S., Haber, W.A, Setzer, W.N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem.Syst.Ecol.* 2007;35(8):525-532. DOI: 10.1016/j.bse.2007.02.003.
10. Piña Garza, E. Los radicales libres. Beneficios y problemas. *Gac Méd Méx.* 1996; 2 (132): 183-207. ID: lil-202890.
11. López Luegon M.T. Los aceites esenciales. Offarm [Internet] 2004.
12. Barbouchi M.; Benzidia B.; Choukrad M. Chemical variability in essential oils isolated from roots, stems, leaves and flowers of three *Ruta* species growing in Morocco. *J. King Saud Univ. Sci.* 2021; 8 (33). DOI: 10.1016/j.jksus.2021.101634.
13. Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales. 2ª ed. *Editorial Acribia*; 1993.pp 482.
14. Espina, L.; Somolinos, M.; Lorán, S.; Conchello, P.; García, D.; Pagán, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control.* 2011; 22 (6):896–902. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.11.021.
15. Lichtfouse, E. Sustainable agriculture reviews. *Springer Nature.* 2013; 12:233 DOI: 10.1007/978-3-030-73245-5_1.

16. Bowles, E.J; The chemistry of aromatherapeutic oils 3^a Edición. *Routledge*. 2003:236, 2003 DOI: 10.4324/9781003115151.
17. Fornari, T.; Vicente, G.; Vázquez, E.; Garcia-Risco, M.R.; Reqlero, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, 2012; 1250, 34–48. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.051.
18. Rao, V.P.S; Pandey, D. Extraction of essential oil and its applications, National Institute of Technology Rourkela. Rourkela,India: National Institute of Technology; 2006.
19. Caniard, A.; Zerbe, P.; Legrand, S.; Cohade, A.; Valot, N.; Magnard, J.-L.; Bohlmann, J.; Legendre, L. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *Plant Biol.* 2012; DOI: 10.1186/1471-2229-12-119.
20. Bou, D.D.; Lago, J.H.G.; Figueiredo, C.R.; Matsuo, A.L.; Guadagnin, R.C.; Soares, M.G.; Sartorelli, P. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound -zingiberene and derivatives molecules. *Braz. J. Pharmacogn.* 2013; 18(8): 9477– 9487. DOI: 10.3390/molecules18089477.
21. Wang L, Well CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Food Sci. Technol.* 2006; 17 (6): 300-312. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.
22. Tongnuanchan, P.; Benjakul, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.* 2014; 79(7): R1231–R1249.

DOI: 10.1111/1750-3841.12492.

23. Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food. Chem.* 2006; 54 (12): 4364–4370. DOI: 10.1021/jf0603329.

24. Masango, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean Prod.* 2005; 13(8): 833–839. DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2004.02.039.

25. Babu, K.G.D.; Kaul, V.K. Variation in essential oil composition of rose scented geranium (*Pelargonium sp.*) distilled by different distillation techniques. *Flavour Fragr. J.* 2005; 20: 222–231. DOI: 10.1002/ffj.1414.

26. Piña Garza, E. Los radicales libres. Beneficios y problemas. *Gac. Med. Méx.* 1996; 2 (132): 183 – 203. ID: lil-202890.

27. Márquez, Y.C.; Márquez, A.; Fuentes, M.; Salas, Y.; López–Ortega, A. Estado Oxidativo en cuerpos lúteos maduros y regresivos en bovinos. *Rev. Vet.* 2011; 22(1):25-31. DOI: 10.30972/vet.22117.

28. Viñas, G.; Puig, T.; Porta, R. Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Rev. Med. Clin;* 2012. 139(4), 171-175. DOI: 10.1016/j.medcli.2011.11.021.

29. Halliwell, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Path [Internet]* 1989; 7: 737-757.

30. Huang,D.; Ou,B.; Prior, R.L.The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53 (6): 1841-1856. DOI:10.1021/jf030723c.
31. Lü, J.M.; Yao, Q.; Chen, C. *Ginseng* Compounds: An Update on their Molecular Mechanisms and Medical Applications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2009; 7(3): 293-302. DOI: 10.2174/157016109788340767.
32. Khan, A.L, Khan,H., Hussain, J., Adnan, M., Hussain, I., Khan, T., Khan, A.R. Sesquiterpenes: The Potent Antioxidants *Rev.Pak. J. Sci. Ind. Res.* [Internet] 2008; 51(6):343-350.
33. Coronado H, Marta, Vega y León, Salvador, Gutiérrez T, Rey, Vázquez F, Marcela, & Radilla V, Claudia. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev. chil. nutr.* 2015; 42(2), 206-212. DOI: 0.4067/S0717-75182015000200014.
34. Silva, J.k. Chemical diversity, biological activity, and genetic aspects of three *Ocotea* species from the Amazon. *Int. J.Mol.Sci.* 2017; 18(5): 206-212. DOI: 10.3390/ijms18051081.
35. Alvarado Pineda, G.R. Determinación del rendimiento del aceite esencial de las flores de manzanilla (*Matricaria recutita* L.) en función de la altura sobre el nivel del mar en que está cultivada, aplicando el método de extracción por arrastre con vapor a nivel laboratorio. Tesis de pregrado. Universidad de San Carlos, Guatemala; 2007.
36. Cedeño, A.,Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., Riera, M.A. Comparación de métodos de destilación para la obtención de aceite esencial de eucalipto. *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios.* 2019; 6(1):1-13.

37. Olivero-Verbel, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-Colorado, B., Stashenko, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Rev.Bras.Farmacogn.* 2010; 20(4), 568–574. DOI: 10.1590/s0102-695x2010000400016.
38. Da Silva, J.K., Da Trindade, R., Alves, N.S., Figueiredo, P.L., Maia, J.G., Setzer, W.N. Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(12), 2571. DOI:10.3390/ijms18122571.
39. Osuna-Torres, L., Tapia-Pérez, M.E, Aguilar-Contreras, A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Universidad de Barcelona, España; 2005, 175.
40. Takaku, S., Haber, W.A., Setzer, W.N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica, *Biochem. Syst.Ecol.* 2007;35(8):525-532. DOI: 10.1016/j.bse.2007.02.003.

ANEXOS

ANEXO N° 1

**DESCRIPCION DE REACTIVOS, CRISTALERIA, MATERIAL Y EQUIPO
UTILIZADOS EN LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

- **Reactivos:**

- Reactivo Trolox
- Reactivo DPPH
- Agua Bidestilada
- Metanol
- Etanol

- **Cristalería:**

- Beaker capacidad de 250 mL
- Beaker capacidad de 50 mL
- Beaker capacidad de 10 mL
- Pipeta pasteur

- **Material:**

- Papel aluminio
- Papel Parafilm
- Micro espátula
- Puntas descartables para micropipetas
- Cubetas descartables para UV-Vis
- Papel toalla
- Guantes descartables

- **Equipo:**

- Ultra congelador
- Balanza analítica 5 dígitos
- Micropipeta capacidad 30-300 μ L
- Micropipeta capacidad 100-1000 μ L
- Espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis

ANEXO N°2 METODOS DE EXTRACCION.

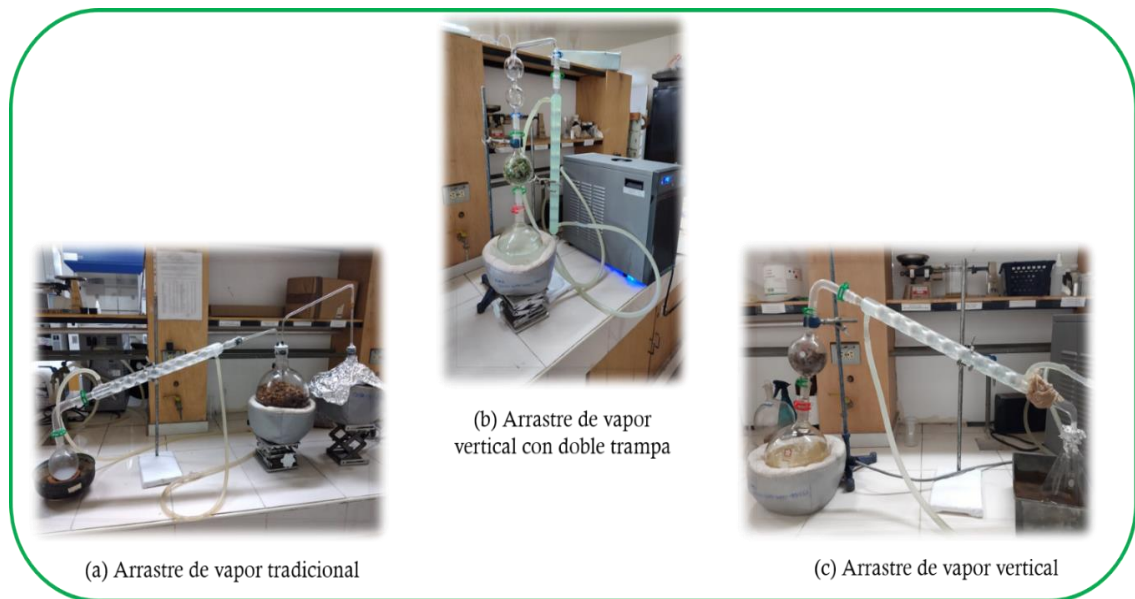


Figura N°5. Métodos de arrastre de vapor empleados para la obtención de aceites esenciales.

ANEXO N°3

**CALCULOS PARA PREPARACION DE SOLUCIONES ESTANDAR PARA LA
REALIZACION DE LA CURVA DE CALIBRACION.**

Cálculo para determinar volumen de solución madre a utilizar para preparar soluciones estándar.

Para preparar las soluciones estándar, se parte de una solución madre cuya concentración de Trolox es 500 µM.

Las soluciones por preparar serán con las siguientes concentraciones de Trolox: 500.0 µM, 250.0 µM, 100.0 µM, 50.0 µM, 25.0 µM, 12.50.0 µM, 6.25.0µM.

Disolver 5 mg de Trolox en 39 mL de DMSO 10% (500.0 µM)

Para calcular la cantidad de solución madre a utilizar para cada solución estándar, se hace uso de la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde:

V_1 = Volumen de solución de Trolox 500.0 µM a utilizar

C_2 = Concentración de solución estándar a preparar

V_2 = Volumen de solución estándar a preparar

C_1 = Concentración de la solución madre Trolox (500.0 µM)

Ejemplo de cálculo para la preparación de solución estándar de 250.0 µM

$$V_1 = \frac{(250.0\mu\text{M})(1000.0\mu\text{L})}{(500.0\mu\text{M})}$$

$$V_1 = 500.0 \mu\text{L}$$

Obteniendo como resultado los siguientes datos:

Tabla N°12. Datos para la preparación de la curva de calibración.

Concentración de Trolox (μM)	Alícuota de sln. madre (μL)	Alícuota de DMSO 10% (μL)	Volumen total (μL)
500	500	500	1000
250	500	800	1000
100	500	500	1000
50	500	500	1000
25	500	500	1000
12.5	500	500	1000
6.25	500	500	1000