

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES DE LA FLORA
SALVADOREÑA: *O. veraguensis*, *N. martinicensis*, *P. americana* y *C. arábica*

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR:

JORGE ERNESTO ARAUJO MONTOYA

FATIMA VANESSA CHAVEZ CUELLAR

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITES

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. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

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

MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos

**ASESORIA DE AREA EN INDUSTRIA FARMACEUTICA, COSMETICA Y
VETERINARIOS:**

Lic. Moisés Atonalt Guerra Avilés

INVESTIGADOR TITULAR

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme sabiduría, protegerme y darme fuerzas en cada una de las etapas de la vida.

Agradezco a mi madre María Dolores Montoya por su apoyo y amor incondicional y brindarme sus consejos en cada momento para superar obstáculos que se presentan en el camino.

Agradezco a mi familia por ayudarme y estar animándome a no darme por vencido.

Agradezco a cada uno de los docentes del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, MSc. Morena Martínez por su paciencia, tiempo, comprensión y dedicación al asesorar este trabajo de investigación, Dr. Marvin Núñez, MSc. Ana Miriam Santamaría, Lic. Ulises Guardado e Ing. Sergio Maravilla por apoyarnos durante este trabajo y consejos útiles para el ámbito profesional como personal.

Agradezco a Jennifer Hernández y Mabel Bonilla por ayudarme, animarme y acompañarme durante la carrera, a mis compañeros de laboratorio Mónica Fuentes y Vanessa Chávez por tantas experiencias, aventuras y confiar en mi trabajo, a mis amigos, compañeros y catedráticos por hacer la carrera agradable y fácil de comprender.

De igual manera agradecer a ADEL Sonsonate por la oportunidad de ser parte de esta investigación y así poder brindar aspectos positivos a la sociedad.

Jorge Araujo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme otorgado la paciencia, fortaleza y sabiduría para afrontar cada momento dentro de cada etapa vivida y formarme como profesional.

Agradezco a mi familia maravillosa especialmente a mis padres, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo y por apoyarme en cada etapa de mi vida no solo de forma económica sino también emocionalmente.

Agradezco a mis seres queridos, por su apoyo emocional que me ha brindado en toda mi carrera como profesional, por su confianza brindada en cada momento.

Agradezco a cada docente del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, por su paciencia, tiempo, apoyo y dedicación al dirigir este trabajo de graduación, Dr. Marvin José Núñez Rivas, MsD. Ana Miriam Santamaría de Campos, Lic. Ulises Guardado Castillo e Ing. Sergio Maravilla por brindarnos su apoyo incondicional y consejos que fueron aplicados durante todo el proyecto, por su cariño y enseñanzas brindadas que nos hacen crecer como personas y profesionales.

Gracias por el apoyo y colaboración de ADEL Sonsonate a lo largo de todo este proyecto. Y a mis compañeros de laboratorio por su apoyo y confianza depositada en mí en cada análisis.

Vanessa Chávez

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi madre por darme la oportunidad de culminar con mis estudios y seguir adelante, abuela Rosa, por aconsejarme e impulsarme a estudiar, además de no rendirme por más cosas que obstaculizan el camino y a mi familia por estar siempre apoyándome. Y ayudándome también a ser la persona que soy hoy en día, por llevarme siempre por el camino del bien, forjando mis valores y principios.

Dedicado también para todas las personas que creyeron en mí, confiando en mi trabajo y conocimientos.

Jorge Araujo

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón este trabajo a mis padres, que sin ellos no lo habría logrado, gracias a su bendición a lo largo de mi vida, que me han protegido y llevado por el camino del bien, y por eso doy mi trabajo en ofrenda a su paciencia y amor incondicional. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño. Todo esto con una enorme dosis de amor y sin pedir nada a cambio.

También quiero dedicar este trabajo a mi ser querido, por tu paciencia, por tu comprensión en momentos de crisis, por tu fuerza, por tu amor y por tu apoyo por recibir el impacto directo de las consecuencias del trabajo realizado, por ayudarme alcanzar el equilibrio que me permite dar todo mi potencial.

A mis hermanos, por sentar en mí las bases de responsabilidad y deseo de superación, por apoyarme incondicionalmente en la parte moral que me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera Universitaria.

También quiero dedicar este trabajo a mis sobrinos, por ser una motivación más para este sacrificio realizado, por ser el último empujón que me faltaba para culminar este proyecto.

Vanessa Chávez.

“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”.

Leonardo Da Vinci

INDICE GENERAL

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xvi

Capítulo II

2.0 Objetivos

Capítulo III

3.0 Diseño metodológico 22

3.1 Tipo de estudio 23

3.1.1 Estudio Experimental 23

3.1.2 Estudio Prospectivo 23

3.2 Investigación bibliografica 23

3.3 Investigación de campo 24

3.3.1 Universo: 24

3.3.2 Muestra: 24

3.4 Especies vegetales aromáticas fuentes de aceites esenciales 25

3.4.1 Bioprospección y recolecta 25

3.4.2 Recolección de las especies vegetales aromáticas. 32

3.5 Parte experimental. 33

3.5.1 Obtención de los aceites esenciales de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, *Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill) por medio de Clevenger⁽³²⁾ (Ver Figura, N°1). 33

3.6 Preparación de extracto de la pulpa de café fresco	35
3.6.1 Preparación del extracto acuoso de “Café Pacamara” ⁽³¹⁾ .	36
3.7 Estandarización de la actividad antioxidante por el método DPPH con el aceite esencial de “Limón”	37
3.8 Cuantificación de la capacidad antioxidante en aceites esenciales y pulpa de café por el método del DPPH. ⁽³¹⁾	43
3.9 Analisis estadístico	44
3.9.1 Procesamiento de muestras	44
3.9.2 Procesamiento de estándares	44
3.9.3 Comparación de la actividad antioxidante por medio del Análisis de varianza (ANOVA)	44
Capitulo IV	
4.0 Resultados y discusión de resultados	49
4.1 Bioprospección	49
4.2 Extracción de aceites esenciales	49
4.2.1 Cuantificación de aceites esenciales en especies aromáticas seleccionadas	51
4.3 Puesta a punto del método para determinar actividad antioxidante con el aceite esencial de “Limón”	54
4.4 Cuantificación de la capacidad antioxidante por Espectrofotometría UV-Vis empleando el método DPPH.	56
4.4.1 Ensayo antioxidante en extracto liofilizado de café (<i>Coffea arabica</i> L. variedad “Pacamara”)	58
4.4.2 Capacidad antioxidante en aceite esencial de <i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez y <i>Persea americana</i> Mill,	59

4.5 Analisis estadístico de la capacidad antioxidante entre <i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez Y <i>Persea amaericana</i> Mill.	63
---	----

Capitulo V

5.0 Conclusiones	65
------------------	----

Capitulo VI

6.0 Recomendaciones	67
---------------------	----

Bibliografía

Anexos

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Extracción de aceites esenciales utilizando el aparato Clevenger	35
2	Preparación de la curva de calibración con estándar de Trolox	38
3	Preparación de la solución stock	39
4	Preparación de la solución de trabajo para aceites esenciales	40
5	Preparación de la solución de trabajo para extracto liofilizado de Café	40
6	Curva de calibración con Estándar de Trolox para la determinación de capacidad antioxidante	58
7	Comparación de los IC ₅₀ de las especies vegetales analizadas	61

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Listado de especies vegetales observadas en la Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate.	26
2	Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	30
3	Especies vegetales de la flora salvadoreña como fuente de aceite esencial	32
4	Resultados de los ensayos de extracción y rendimiento de las hojas de “Limón” mediante el aparato Clevenger	50
5	Resultados de la cuantificación de aceites esenciales de especies vegetales por medio del Método Clevenger	52
6	Cantidad de aceite esencial extraído en 1Kg muestra de especies vegetales	54
7	Determinación de la capacidad antioxidante en aceite esencial de “Limón”.	55
8	Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH	57
9	Antioxidantes contenidos en fruto de café (<i>Coffea arabica</i> L.variedad Pacamara) expresado en ug Equivalentes de Trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca	59
10	Resultados de la Actividad antioxidante en aceite esencial de <i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez y <i>Persea americana</i> Mill	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Método de extracción
- 2 Desarrollo del método de actividad antioxidante
- 3 Antioxidantes contenidos en fruto de "Café" (*Coffea arabica* L. variedad Pacamara)

RESUMEN

Para realizar la investigación se hicieron viajes de bioprospección a fin de seleccionar cuatro especies vegetales de la flora salvadoreña para verificar el potencial antioxidante, eligiendo a *Coffea arabica* L. (para preparar una extracción acuosa sometiendo posteriormente a liofilización) y adicionalmente *Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill, estas tres últimas, elegidas como fuente de aceites esenciales, los cuales fueron obtenidos por el método de Hidrodestilación utilizando el aparato Clevenger para posteriormente cuantificar la actividad antioxidante utilizando el método DPPH. Las especies vegetales fueron recolectadas en los departamentos de Ahuachapán y Sonsonate e identificadas por un profesional experto botánico del Museo de Historia Natural de El Salvador. También se realizaron pruebas de extracción de aceite esencial y cuantificación de actividad antioxidante con hojas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck con el fin de validar los métodos a utilizar. La investigación científica se realizó entre los meses de mayo a noviembre de 2022 en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. El procesamiento de los resultados finalizó en noviembre de 2022. De acuerdo a los resultados obtenidos, en el caso de la especie *Coffea arabica* L. el contenido de antioxidantes para la pulpa fresca fue de 44.98 μmol Equivalente de Trolox/g de FF (no se realizó IC_{50} ya que se trabajó con una sola concentración) considerándose excelente si lo comparamos con los resultados de capacidad antioxidante del "Árbol de pan". Con los resultados obtenidos de los aceites esenciales, la especie *Persea americana* Mill presentó la mayor capacidad antioxidante con un $\text{IC}_{50}=138.65 \pm 1.15\text{mg/mL}$, por otro lado, *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez presentó un $\text{IC}_{50}=310.25 \pm 1.8\text{mg/mL}$, en consecuencia, exhibiendo una menor actividad antioxidante. En el caso de la especie *Nectandra martinicensis* Mez no se obtuvo aceite esencial.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Los antioxidantes, por su estructura química, frenan la formación de radicales libres (RL), por lo que previenen o permiten tratar las enfermedades causadas por el estrés oxidativo al contrarrestar de una manera directa o indirecta los efectos nocivos que estos provocan, tales como, oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares. Por tanto, el consumo de antioxidantes contenidos en frutas, verduras y subproductos puede tener un efecto benéfico en la salud.

Las especies vegetales, producen metabolitos secundarios que son muy útiles como estrategia de defensa contra condiciones de estrés, heridas por el daño mecánico de factores físicos, depredación de insectos o microorganismos patógenos, los cuales proveen compuestos que poseen actividades antimicrobianas y antioxidantes que contribuyen al mantenimiento del estado redox de la célula vegetal, entre ellos tenemos los terpenoides o isoprenoides, los alcaloides, los fenilpropanoides, y los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes partes de las plantas y cumplen un papel muy significativo, pues ayudan en la reproducción y dispersión de las especies vegetales permitiendo atraer a los insectos polinizadores. Así mismo, tienen numerosas propiedades medicinales que les son comunes, y poseen efecto antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, además de propiedades biológicas entre las que se destacan acciones anti-apoptóticas, anti-envejecimiento, anti-carcinogénico, anti-inflamatorio, anti-aterosclerosis, protección cardiovascular y mejora de la función endotelial, así como, la inhibición de la actividad de la angiogénesis y proliferación celular. En la actualidad, en el mundo se desarrolla intensamente la investigación con uso de aceites esenciales de plantas, así mismo, la demanda

de productos a base de especies vegetales aromáticas en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética, está creciendo y se espera que lo haga en el futuro.

El propósito de la investigación fue encontrar especies vegetales en las zonas de Laguna Verde y Finca El Carajo en Apaneca, Finca San Jorge en San Julián, localizadas en los departamentos de Ahuachapán y Sonsonate, donde se realizó la bioprospección, en la búsqueda de las especies vegetales, principalmente aquellas especies fuente de aceite esencial pertenecientes a la familia Lauraceae, para posteriormente cuantificar su actividad antioxidante, que puede permitir el futuro desarrollo de fitofármacos para atenuar las diferentes patologías provocadas por el estrés oxidativo, así como también fitocosméticos que ayuden a disminuir visiblemente el envejecimiento. La bioprospección se llevó a cabo acompañados de un experto botánico del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES), quién identificó las especies vegetales que se colectaron.

La recolección se realizó en las primeras horas de la mañana y posteriormente se procedió a trasladar aproximadamente 1 Kg del material vegetal para la extracción de los aceites esenciales haciendo uso del método Hidrodestilación por medio del aparato Clevenger, repitiendo el método hasta obtener el volumen de aceite esencial requerido para el cálculo de rendimiento del aceite esencial y la determinación de la actividad antioxidante de cada una de éstas, utilizando el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). La extracción de aceites esenciales y sus respectivas actividades antioxidantes se estandarizaron utilizando hojas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck "Limón", por ser una especie que se ha estudiado previamente el porcentaje de extracción de aceite esencial y actividad antioxidante.

Adicionalmente, como parte del cumplimiento de un objetivo del proyecto

Seguridad Alimentaria Sostenible en el Occidente de El Salvador: agroecología, empoderamiento, participación e Innovación administrado por la Asociación Agencia para el Desarrollo Económico Local del Departamento de Sonsonate (ADEL Sonsonate), en colaboración con la Universidad de El Salvador (UES) y financiado por la Unión Europea, el cual trata de la determinación de la actividad antioxidante de pulpa del fruto de café fresco (*Coffea arabica* L.) variedad Pacamara, que se recolectó en la Finca El Carajo en Apaneca, que además serán la base para la producción de fitocosméticos a partir de un desecho de la cadena de transformación del grano de café, contribuyendo a la economía circular de los pequeños cafetaleros de la zona.

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 mayo a noviembre del año 2022.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la actividad antioxidante de especies de la flora salvadoreña: *O. veraguensis*, *N. martinicensis*, *P. americana* y *C. arabica*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 2.2.1 Realizar la selección y bioprospección de especies vegetales de las familias Lauraceae como potenciales fuentes de aceites esenciales en el Departamento de Ahuachapán y Sonsonate.
- 2.2.2 Extraer los aceites esenciales de especies vegetales por el método Clevenger.
- 2.2.3 Efectuar la bioprospección de la especie *Coffea arabica* L. variedad Pacamara en la Finca El Carajo en Apaneca en el Departamento de Ahuachapán.
- 2.2.4 Determinar la capacidad antioxidante de la pulpa de café y aceites esenciales extraídos de las especies vegetales aromáticas recolectadas en la zona de Sonsonate y Ahuachapán, mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

CAPITULO III

DISEÑO METODOLOGICO

3.0 DISEÑO METODOLÓGICO

Se investigó, seleccionó, recolectó y analizaron tres especies vegetales de la familia Lauraceae (*Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill) fuente de aceites esenciales con capacidad antioxidante provenientes de las zonas de Laguna Verde y Finca El Carajo en Apaneca y Finca San Jorge en San Julián, en los departamentos de Ahuachapán y Sonsonate.

Adicionalmente, como parte del cumplimiento de un objetivo del proyecto Seguridad Alimentaria Sostenible en el Occidente de El Salvador: agroecología, empoderamiento, participación e Innovación administrado por la Asociación Agencia para el Desarrollo Económico Local del Departamento de Sonsonate (ADEL Sonsonate), Asociación El Bálsamo, Asociación Nuevo Amanecer (ANADES), Universidad de El Salvador (Facultad de Química y Farmacia: Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y Laboratorio de Tecnología Farmacéutica), Movimiento África 70 y Universidad Bicocca de Milán Italia, que han sido seleccionados por la Delegación de la Unión Europea en El Salvador para la ejecución del trabajo, se realizó la recolección, extracción y cuantificación de la actividad antioxidante de la pulpa de café fresco (*Coffea arabica* L.) variedad Pacamara, que se recolectó en la Finca El Carajo en el municipio de Apaneca, departamento de Ahuachapán, incorporando estos resultados al trabajo que se realiza en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica para el desarrollo y producción de fitocosméticos a partir de un desecho de la cadena de transformación del grano de café, contribuyendo a la economía circular de los pequeños cafetaleros de la zona.

3.1 TIPO DE ESTUDIO

3.1.1 Estudio Experimental

En base a la investigación bibliográfica realizada y al análisis de estos datos, se seleccionaron 4 especies vegetales con potencial antioxidante: *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez, *Persea americana* Mill, *Nectandra martinicensis* Mez y *Coffea arabica* L. variedad Pacamara.

Adicionalmente, se validó el método de extracción para aceites esenciales por medio del aparato Clevenger y el análisis por el método DPPH para cuantificarla capacidad antioxidante, empleando una especie vegetal muy abundante, con buen porcentaje de rendimiento del aceite esencial y con datos reportados previos de actividad antioxidante, eligiendo la especie *Citrus x limon* (L.) Osbeck “Limón”.

La determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH, 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.

3.1.2 Estudio Prospectivo

Con los resultados de la investigación y análisis realizados en este trabajo puedan ser utilizados como antecedente para futuras investigaciones sobre extracción y pruebas de las propiedades antioxidantes en especies vegetales de la flora salvadoreña.

3.2 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:

- Central de la Universidad de El Salvador
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet

3.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

3.3.1 Universo:

Especies vegetales de la flora salvadoreña de la familia Lauraceae (*Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill.) fuente de aceites esenciales y la especie *Coffea arabica* L. variedad Pacamara de los Departamentos de Ahuachapán y Sonsonate.

3.3.2 Muestra:

Tres especies aromáticas de la flora salvadoreña, fuentes de aceites esenciales de la familia Lauraceae (*Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill) colectadas en la Laguna Verde y Finca El Carajo, ambas en el municipio de Apaneca del departamento de Ahuachapán y Finca San Jorge en San Julián en el municipio de San Julián del departamento de Sonsonate, tomando en consideración la disponibilidad, el acceso al lugar, el estado de la planta y la delimitación de las zonas seleccionadas.

Además, la pulpa del fruto de *Coffea arabica* L. de la familia Rubiaceae, colectada en la Finca “El Carajo”, municipio de Apaneca del Departamento de Ahuachapán, debido a que estudios previos ha demostrado su capacidad antioxidante, para el estudio se recolectaron aproximadamente 1 Kg de hojas de las especies *Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill y extrayendo 40 mg de aceite esencial y en el caso del

Café variedad Pacamara se recolectó aproximadamente 500 g de fruto y se utiliza 7.5 g de pulpa.

3.4 ESPECIES VEGETALES AROMÁTICAS FUENTES DE ACEITES ESENCIALES.

Las especies vegetales aromáticas seleccionadas son pertenecientes a la familia Lauraceae, también se estudió no como fuente de aceite esencial, sino por su propiedad antioxidante la especie vegetal *Coffea arabica* L. de la familia Rubiaceae.

Se llevaron a cabo 5 viajes de investigación biológica llamados viajes de bioprospección para reconocer la flora de los lugares, acompañado de un botánico experto, en la búsqueda de especies novedosas fuentes de aceites esenciales, en los Departamentos de Ahuachapán y Sonsonate delimitando el estudio a los lugares: Laguna Verde en Apaneca y Finca San Jorge en San Julián; en el caso del “Limón”, fue recolectada en Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque en el Departamento de Santa Ana y utilizada para la extracción del aceite esencial y la validación del método DPPH para la cuantificación de la actividad antioxidante.

3.4.1 Bioprospección y recolectas

Los viajes de bioprospección, se realizaron con objetivo de búsqueda de especies vegetales fuente de aceites esenciales en fincas privadas y áreas naturales del Departamento de Sonsonate y Ahuachapán. Los viajes de bioprospección se llevaron a cabo en compañía del MSc. Gabriel Cerén, Curador del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES), quien desarrolló la identificación del material vegetal.

Como resultados de dichos viajes, se crearon listados de especies vegetales a las que posteriormente se les realizó una revisión bibliográfica, para seleccionar las especies vegetales aromáticas.

3.4.1.1 Listado de especies vegetales identificadas

La Finca San Jorge, que es una finca agroecológica administrada por la Asociación Nuevo Amanecer (ANADES), que se encuentra a 6 Km de la Ciudad de San Julián, en el Cantón El Balsamar. Se produce principalmente café orgánico, cultivos orgánicos y resina de Bálsamo, además de poseer cabañas y caminatas para llevar a cabo ecoturismo.

De los tres viajes de bioprospección realizados se identificaron 63 especies vegetales pertenecientes a 36 familias botánicas.

A continuación, se presentarán las especies vegetales identificadas en cada viaje de bioprospección: Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate (Ver Tabla N°1).

Tabla N°1. Listado de especies vegetales observadas en la Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate (28 junio, 26 de julio y 26 de octubre). Elaboración propia.

No	Nombre científico	Familia	Nombre común
1	<i>Lonchocarpus phaseolifolius</i>	Fabaceae	“Sangre de perro”
2	<i>Machaerium kegelii</i>	Fabaceae	“Uña de gato”
3	<i>Machaerium pittieri</i>	Fabaceae	“Paternillo”
4	<i>Bauhinia cf guianensis</i>	Fabaceae	“Escalera de mono”
5	<i>Indeterminada</i> (Posible <i>Myrospermum frutescens</i>)	Fabaceae	“Balsamito”

Tabla N°1 (continuación).

6	<i>Miroxylon pereirae</i>	Fabaceae	“Bálsamo”
7	<i>Vigna sp.</i>	Fabaceae	“Frijol mono”
8	<i>Calycophyllum candidissimum</i>	Rubiaceae	“Sálamo”
9	<i>Randia cf monantha</i>	Rubiaceae	“Crucito”
10	<i>Coffea arabica</i>	Rubiaceae	“Café”
11	<i>Exostema mexicanum</i>	Rubiaceae	“Quina”
12	<i>Pogonopus exsertus</i>	Rubiaceae	“Chorcha de pava”
13	<i>Geophyla repens</i>	Rubiaceae	“Oreja de ratón”
14	<i>Indeterminada*</i>	Rubiaceae	*
15	<i>Croton sp.</i>	Euphorbiaceae	“Copalchi Montes”
16	<i>Cnidioscolus tubulosus</i>	Euphorbiaceae	“Chichicastón”
17	<i>Omphalea oleifera</i>	Euphorbiaceae	“Tambor”
18	<i>Croton sp.</i>	Euphorbiaceae	“Copalchi de monte”
19	<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Bixaceae	“Tecomasuche”
20	<i>Peperomia sp.</i>	Piperaceae	-----
21	<i>Piper tuberculatum</i>	Piperaceae	-----
22	<i>Peperomia sp.</i>	Piperaceae	“Galecita”
23	<i>Cyperus hermaphroditus</i>	Cyperaceae	-----
24	<i>Gonolobus taylorianus</i>	Apocynaceae	-----
25	<i>Matelea quirosii</i>	Apocynaceae	-----
26	<i>Bomarea edulis</i>	Alstroemeriaceae	“Duerme culebra”

Tabla N°1 (continuación)

27	<i>Solanum diphyllum</i>	Solanaceae	“Hoja del golpe”
28	<i>Rivina humilis</i>	Phytolaccaceae	“Hierba del pobre”
29	<i>Petiveria alliacea</i>	Phytolaccaceae	“Epacina”
30	<i>Eugenia sp.</i>	Myrtaceae	“Cacho de novio” “Incienso”
31	<i>Xanthosoma sp.</i>	Araceae	-----
32	Indeterminada	Urticaceae	-----
33	<i>Ficus sp.</i>	Moraceae	“Amate”
34	<i>Erythroxylum mexicanum</i>	Erythroxylaceae	“Pergamino”
34	<i>Erythroxylum mexicanum</i>	Erythroxylaceae	“Pergamino”
35	<i>Coccoloba sp.</i>	Polygonaceae	“Papaturo”
36	<i>Ocotea veraguensis</i>	Lauraceae	“Canelo montes”
37	<i>Dioscorea mexicana</i>	Dioscoreaceae	“Barbasco”
38	<i>Capraria biflora</i>	Scrophulariaceae	-----
39	<i>Thelypteris sp.</i>	Thelypteridaceae	-----
40	Indeterminada	Annonaceae	-----
41	<i>Ipomoea wolcottiana subsp. wolcottiana</i>	Convolvulaceae	“Siete pellejos”
42	<i>Bursera graveolens</i>	Burseraceae	“Copalillo”
43	<i>Costus sp.</i>	Costaceae	“Caña de cristo”
44	<i>Drymonia serrulata</i>	Gesneriaceae	“Planta Milagrosa”
45	<i>Luehea speciosa</i>	Malvaceae	“Cabo de hacha”
46	<i>Sideroxylon capiri subsp. tempisque</i>	Sapotaceae	“Tempisque”
47	<i>Manilkara chicle</i>	Sapotaceae	“Nispero”
48	<i>Stenocereus eichlamii</i>	Cactaceae	“Órgano”

Tabla N°1 (continuación)

49	<i>Stigmaphyllon ellipticum</i>	Malphigiaceae	“Flor amarilla”
50	<i>Justicia carthaginensis</i>	Acanthaceae	“Hierba del susto”
51	<i>Hechtia guatemalensis</i>	Bromeliaceae	“Vaca gorda”
52	<i>Sapranthus microcarpus</i>	Annonaceae	“Asta de bajo”
53	<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae	“Achote”
54	<i>Passiflora sp.</i>	Passifloraceae	“Granadilla de hormiga”
55	<i>Pogonopus exsertus</i>	Rubiaceae	“Chorcha de pava”
56	<i>Rauvolfia tetraphylla</i>	Apocynaceae	“Amatillo”
57	<i>Aristolochia salvadorensis</i>	Aristolochiaceae	“Guaco”
58	<i>Pisonia macranthocarpa</i>	Nyctaginaceae	“Espuela del diablo” “Tinterillo negro”
59	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Malvaceae	“Caulote”
60	<i>Evolvulus sp.</i>	Convolvulaceae	“Velazquina”
61	<i>Leucaena shannoni</i>	Fabaceae	“Contamal”
62	<i>Lippia cardiostegia</i>	Verbenaceae	“Oregano silvestre”
63	<i>Ageratum salvanaturae</i>	Asteraceae	-----

*No se ha identificado a la fecha cuál es el nombre científico y nombre común de la especie vegetal.

Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán

La Laguna Verde, pertenece a la Cordillera de Apaneca-Illamatepec y se considera un humedal de altura, por encontrarse entre los 1605 msnm, en el borde más alto del cráter. La vegetación existente es la característica de los bosques nebulosos alterados con la ocurrencia de especies típicas de la zona, como el Roble (*Quercus sp.*).

En los viajes de bioprospección que llevamos a cabo, se identificaron 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas (Ver tabla N°2).

Tabla N°2. Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (10 febrero y 19 julio). Elaboración propia.

No	Nombre científico	Familia	Nombre común
1	<i>Neobrittonia acerifolia</i>	Malvaceae	-----
2	<i>Triumfetta lappula</i>	Malvaceae	-----
3	<i>Solanum appendiculatum</i>	Solanaceae	-----
4	<i>Solanum sp.</i>	Solanaceae	-----
5	<i>Palicourea padifolia</i>	Rubiaceae	“Flor de cera”
6	<i>Arachnothryx laniflora</i>	Rubiaceae	-----
7	<i>Rondeletia sp.</i>	Rubiaceae	— - - - -
8	<i>Fuchsia microphylla subsp. tetradactyla</i>	Onagraceae	“Sietío”
9	<i>Citharexylum donnell-smithii</i>	Verbenaceae	“Cordoncillo”
10	<i>Peperomia sp.</i>	Piperaceae	-----
11	<i>Piper amalago</i>	Piperaceae	“Cordoncillo”
12	<i>Piper standleyi</i>	Piperaceae	“Lima de montaña”
13	<i>Anthurium obtusum</i>	Araceae	-----
14	<i>Scutellaria longifolia</i>	Lamiaceae	-----
15	<i>Cyclopogon elatus</i>	Orchidaceae	-----
16	<i>Castilleja arvensis</i>	Orobanchaceae	“Flor de gato”
17	<i>Phytolacca rugosa</i>	Phytolaccaceae	-----
18	<i>Rubus niveus</i>	Rosaceae	-----
19	<i>Gnaphallium attenuatum</i>	Asteraceae	-----
20	<i>Saurauia kegeliana</i>	Actinidiaceae	-----
21	<i>Desmodium uncinatum</i>	Fabaceae	-----
22	<i>Passiflora adenopoda</i>	Passifloraceae	-----
23	<i>Plumbago auriculata</i>	Plumbaginaceae	“Jasmín azul”
24	<i>Dendropanax arboreus</i>	Araliaceae	“Mano de León”

Tabla N°2 (continuación)

25	<i>Casimiroa edulis</i>	Rutaceae	"Matasano"
26	<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	Rutaceae	"Cedro-espino"
27	<i>Ensete cf ventricosum</i>	Musaceae	-----
28	<i>Cupressus lusitanica</i>	Cupressaceae	"Ciprés"
29	<i>Pinus oocarpa</i>	Pinaceae	"Pino"
30	<i>Echeveria chiapensis</i>	Crassulaceae	-----
31	<i>Ocotea effusa</i>	Lauraceae	"Canelito" "Pimiento"
32	* <i>Persea americana</i>	Lauraceae	"Aguacate de olor"
33	<i>Citharexylum donnell-smithii</i>	Lauraceae	"Canelón"
34	<i>Peperomia sp.</i>	Rhamnaceae	"Duraznillo"
35	<i>Piper amalago</i>	Convolvulaceae	"Campanilla morada"

*Colectada en Finca El Carajo, Apaneca.

3.4.1.2 Selección y recolección de especies vegetales aromáticas

En base al número de especímenes identificados en campo, posible domesticación de la especie, novedad de la especie vegetal en la búsqueda de aceites esenciales, duración del proyecto de investigación, se seleccionaron 3 especies aromáticas para desarrollar trabajo experimental, las cuales fueron: *Ocotea veraguensis* "Canela de monte" Lauraceae (Finca San Jorge), *Nectandra martinicensis* "Canelón" Lauraceae (Laguna Verde) y *Persea americana* "Aguacate de olor" (Finca El Carajo) para calcular el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales y determinar de la actividad antioxidante.

3.4.2 Recolección de las especies vegetales aromáticas.

Se recolectaron las hojas de las especies vegetales ya que los metabolitos secundarios (antioxidantes), se encuentran mayormente en este órgano vegetal debido a que juegan un papel muy importante en las plantas encontrándose en dicho órgano la defensa frente a posibles depredadores y patógenos, se realizaron 4 viajes de campo, las especies seleccionadas son: *Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill (Ver Tabla N°3).

Cada una de las especies recolectadas se identificó por un profesional experto, quien además les asignó un número de Voucher para la especie vegetal, que permitió establecer la trazabilidad si se desea continuar con el estudio. Y 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.

Las especies vegetales fueron recolectadas e identificadas por el experto botánico Msc. Gabriel Cerén curador del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) (Ver Tabla N°3).

Tabla N°3. Especies vegetales de la flora salvadoreña como fuente de aceite esencial. Elaboración propia.

Espece vegetal	Sitio de recolección	Número de Voucher	GPS	Altitud (msnm)
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meinz.) Mez	Finca San Jorge, San Julián, Ahuachapán	GC 5042	13 40 57.3,-89 35 17.4	665
<i>Nectandra martinicensis</i> Mez	Laguna Verde, Apaneca, Ahuachapan	GC 3012	13 53 28;- 84 47 07	1619
<i>Persea americana</i> Mill	Finca El Carajo, Apaneca, Ahuachapán	GC 5090	13 51 46. 79;- 89 47 51. 42	1447

3.5 PARTE EXPERIMENTAL

3.5.1 Obtención de los aceites esenciales de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, *Ocotea veraguensis* (Meinz.) Mez, *Nectandra martinicensis* Mez y *Persea americana* Mill) por medio de Clevenger⁽³²⁾ (Ver Figura, N°1).

Para realizar las extracciones de aceites esenciales de las especies vegetales seleccionadas, se realiza una prueba del método de extracción, el que llamamos "puesta a punto", el cual ayuda a ver el comportamiento de las muestras (hojas), el proceso de extracción con respecto a técnica y tiempo de extracción y del aceite esencial extraído.

La puesta a punto del método Clevenger se realiza con hojas del "Limón" (*Citrus x limon* (L.) Osbeck, Rutaceae), que fueron recolectadas a tempranas horas de la mañana en la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana. Para la recolección se toma en cuenta que el material vegetal esté sano, libre de enfermedades, insectos, o materias extrañas, luego las hojas se trasladaron en hieleras hacia el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia (LIPN).

En el LIPN, se procede a la extracción y cuantificación por medio del método de hidrodestilación por aparato Clevenger, donde se realizaron al menos 3 extracciones diarias, verificando el rendimiento de aceites esenciales obtenidos.

Procedimiento para extracción de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas es el siguiente:

- Colocar el material vegetal en el área de trabajo previamente limpio.
- Fraccionar el material vegetal con ayuda de tijeras.
- Anotar el peso del material vegetal en un beaker previamente tarado.
- Colocar el material vegetal fraccionado en el balón de fondo plano de capacidad 1000 mL.
- Agregar aproximadamente 300 mL de agua destilada en el balón que contiene la muestra fraccionada.
- Proceder a armar el equipo de destilación de aceites esenciales (Aparato de Clevenger)
- Conectar las mangueras al refrigerante y conducto de paso de agua.
- Abrir el conducto de paso de agua, de tal manera que circula el agua a través del enfriamiento del refrigerante.
- Encender la manta de calentamiento y destilar a temperatura constante durante 90 minutos
- Recolectar el aceite obtenido en tubos eppendorf previamente esterilizados y rotulados.
- Colocar el aceite obtenido en refrigeración y en ausencia de luz.
- Determinar el porcentaje de rendimiento a partir del volumen obtenido.
- Lavar el equipo completamente para evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida.
- Repetir el proceso de extracción hasta obtener el volumen deseado de aceite esencial.



Figura N°1. Extracción de aceites esenciales utilizando el aparato Clevenger. Elaboración propia.

3.6 PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE LA PULPA DE CAFÉ FRESCO.

Se realiza la muestra de "Café Pacamara" la cual se despulpa de manera manual y la extracción se realiza de la pulpa, la cual fue llevada a cabo por medio de agua, debido a la solubilidad de sustancias aromáticas que poseen actividad antioxidante en ese medio polar. Para dicha extracción se toma en cuenta la recolección del fruto, el transporte, la extracción ultrasónica en ausencia de la luz, la congelación del extracto acuoso y por último la liofilización. Esto permite obtener un extracto de calidad que contiene sustancias aromáticas que poseen las propiedades antioxidantes, anti-edad, etc.

3.6.1 Preparación del extracto acuoso de “Café Pacamara” ⁽³¹⁾.



Colectar el café fresco, en las primeras horas del día en la Finca El Carajo en Apaneca, se cortaron y se colocaron en una hielera para luego ser trasladado al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (LIPN-FQF-UES).

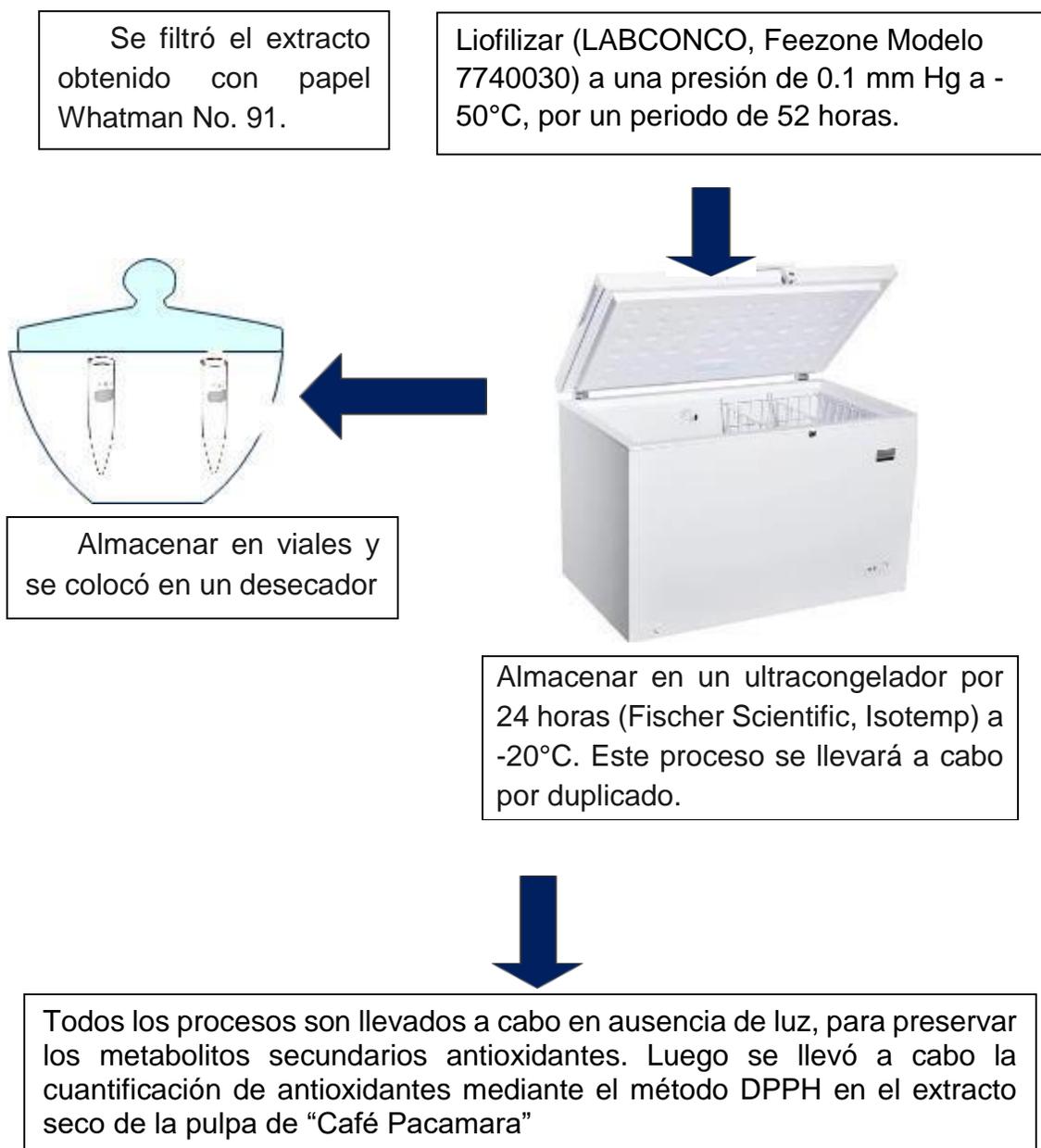


Lavar y remover la pulpa de café dicho proceso se realizó sin luz.



La pulpa de café es extraída con agua en un baño ultrasónico por 30 minutos a 20°C en ausencia de luz, a una concentración de 10% m/v.





3.7 Estandarización de la actividad antioxidante por el método DPPH con el aceite esencial de “Limón”

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) fue realizado mediante la técnica modificada por Magoni y col. (Magoni et al., 2015)³⁹

Todo el proceso experimental del cual se le realiza la actividad antioxidante en el laboratorio se lleva a cabo a una temperatura ambiente de 25°C y en oscuridad, debido a que el entorno físicoquímico como la luz, el oxígeno y la temperatura afecta los resultados de la prueba actividad antioxidante.

Reactivos a utilizar: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, CAS: 1898-66-4); Metanol; Etanol; Aceite esencial de las especies vegetales seleccionadas; Estándar de Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, CAS: 53188-07-1).

3.7.1 Preparación de la curva de calibración con estándar Trolox (Ver Figura N°2).

- Pesar aproximadamente 5 mg del estándar de Trolox en un beaker de 100 mL.
- Disolverlo con metanol hasta una concentración de 500 μM .
- Preparar la línea de calibración de Trolox entre 6.25 a 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$, con al menos 5 puntos.

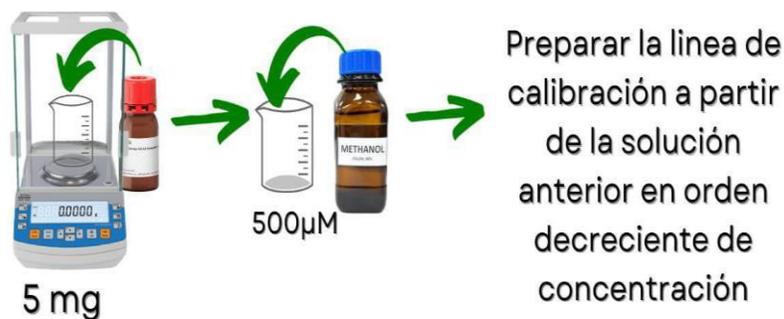


Figura N°2. Preparación de la curva de calibración con estándar de Trolox. Elaboración propia.

3.7.2 Preparación de la solución de DPPH [50 μ M] (Ver Figura N°3).

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



Figura N°3. Preparación de la solución stock. Elaboración propia.

El DPPH determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso. Y a mayor captación del radical libre por parte del antioxidante, habrá una mayor disminución de la absorbancia inicial del radical DPPH.

3.7.3 Preparación de las soluciones de trabajo.

3.7.3.1 Preparación de las soluciones de trabajo para aceites esenciales

- Pesar en un vial de 10 mL aproximadamente 40 mg de aceite esencial.
- Diluir la muestra con metanol hasta una concentración de 20 mg/mL
- Realizar diluciones hasta concentraciones finales de 15 mg/mL y 10

mg/mL (Ver Figura N°4).



Figura N°4. Preparación de la solución de trabajo para aceites esenciales. Elaboración propia.

3.7.3.2 Preparación de la solución de trabajo para extracto liofilizado de “Café Pacamara” (*Coffea arabica* L.)

- Pesar una cantidad adecuada de extracto liofilizado de café para preparar una solución de 0.2 mg/mL en etanol al 5%.
- Preparar 3 soluciones de cada extracto liofilizado (Ver Figura N°5).

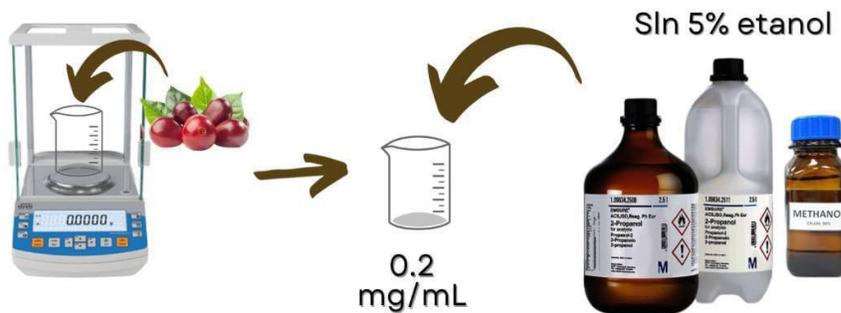


Figura N°5. Preparación de la solución de trabajo para extracto liofilizado de Café. Elaboración propia.

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

- Agregar con micropipeta a una celda para espectrofotómetro UV-Vis los siguientes reactivos:
950 μL de solución de DPPH [50 μM].
50 μL de cada concentración del estándar de Trolox.
- Realizar este procedimiento para cada concentración de la curva de calibración.

3.7.5 Preparación de las celdas con la solución de trabajo.

- Agregar con micropipeta a una celda para espectrofotómetro UV-Vis los siguientes reactivos:
950 μL de solución de DPPH [50 μM].
50 μL de las soluciones de trabajo.

3.7.6 Preparación de blanco de reactivo.

- 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 metanol

3.7.7 Preparación de blanco de solvente:

- Agregar con micropipeta a una celda para espectrofotómetro UV-Vis los siguientes reactivos:
68.73 μL de metanol

931.27 μL de etanol

Nota: Todas las celdas se homogeneizaron evitando la formación de burbujas y se incubaron por 30 minutos en ausencia de fuentes de luz.

3.7.8 Lectura de celdas en equipo UV-Vis:

- Encender el Espectrofotómetro UV - Vis mínimo 30 minutos antes de utilizarlo.
- Programar la longitud de onda según la determinación a realizar.
- Ingresar las unidades y las concentraciones de las soluciones estándar.
- Tomar las cubetas del lado que no esté en contacto con el haz de luz.
- 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.
- Leer la absorbancia del blanco seleccionando "Auto Zero" desde el programa
- Leer las absorbancias de los estándares.
- Guardar los datos de las absorbancias del blanco y los estándares.
- Retirar las cubetas que contienen soluciones estándares, pero no la que contiene el blanco.
- Ingresar al equipo las cubetas de las soluciones de trabajo y asignarles su respectivo código en el programa.
- Medir las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 515 nm.

3.8 Cuantificación de la capacidad antioxidante en aceites esenciales y pulpa de café por el método del DPPH. ⁽³¹⁾

Sobre el ensayo de la capacidad antioxidante de la pulpa de café, es de hacer notar que los principios y reacciones químicas que se desarrollan son las mismas que se llevaron a cabo con los aceites esenciales, la única diferencia se centra en los solventes utilizados para disolver las muestras, en ambos métodos, esto es debido a las polaridades contrapuestas que presenta tanto el extracto acuoso de pulpa de café (polar) vs los aceites esenciales (no polares).

Así, la determinación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales, sigue las siguientes metodologías:

3.8.1 Preparación de la curva de calibración con Estándar de Trolox

- Proceder como indica el apartado 3.7.1.

3.8.2 Preparación de la solución DPPH [50 µM]

- Proceder como indica el apartado 3.7.2.

3.8.3 Preparación de la solución de trabajo

- se procedió como indica el apartado 3.7.3.

3.8.4 Preparación de las celdas

- Proceder como indican los apartados del 3.7.4 al 3.7.7.

3.8.5 Lectura de celdas en equipo UV-Vis

- Realizar las lecturas a una longitud de onda de 515 nm, con un espectrofotómetro UV-Vis, modelo GENESYS 10S UV-Vis como indica el apartado 3.7.8

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.9.1 Procesamiento de muestras

Los resultados de cuantificación de actividad antioxidante se realizaron por triplicado respecto a cada solución de trabajo, se procede a tabular los datos utilizando el programa Microsoft Excel 2019, con el cual se diseñará una hoja de cálculo para obtener los valores de CV, tomando en cuenta los valores que presentaron un CV menor al 10%

3.9.2 Procesamiento de estándares

El espectrofotómetro UV brinda una concentración en μM Equivalentes de Trolox, se realizaron un promedio de las curvas de calibración que presenten 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 realizan los cálculos para determinar la capacidad antioxidante expresada en IC_{50} mg/mL, en el caso del café variedad Pacamara los resultados se expresaron en μmol Equivalente de Trolox por gramo de Fruta fresca.

3.9.3 Comparación de la actividad antioxidante por medio del Análisis de varianza (ANOVA)

3.9.3.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía.

La determinación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos de las especies vegetales *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez y *Persea americana* Mill, se hizo por triplicado y en base al promedio se verificó si existe

diferencia significativa entre las especies vegetales recolectadas mediante la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA)

Fundamento teórico de la prueba ANOVA: Con frecuencia se requiere evaluar diferencias entre varias poblaciones, en este caso es la diferencia de la capacidad antioxidante de las diferentes especies vegetales recolectadas, a las que para este caso se asignará el nombre de “grupos”, estos grupos en ciertas ocasiones pertenecen a un factor de interés (variable independiente), los grupos se definen asignando diferentes niveles (variable dependiente) al factor, por ejemplo: Un factor como “Temperatura de secado” tendrá diferentes niveles numéricos (40°, 39°, 43°, 41° C), por lo tanto el análisis de varianza en un sentido señalará si las medias entre dos o más grupos son similares o diferentes, que en nuestro caso es la capacidad antioxidante de cada especie.⁽³¹⁾

En ANOVA de un factor existen ciertas condiciones que deben cumplirse:

- Solo 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)

3.9.3.2 Prueba F para ver la variación de la capacidad antioxidante entre las especies vegetales.

La prueba F sirve para verificar cual es la variación que existe de la capacidad antioxidante entre las especies vegetales recolectadas, donde la diferencia se considerará estadísticamente significativa al nivel de $F < 0.05$.

Al aplicar ANOVA de un factor, se calcula un estadístico o test denominado F y su significación. El cálculo del estadístico F es algo complejo de entender, lo que

hace es dividir 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.

La interpretación de la prueba de F se realiza de la siguiente manera: Si es menor de 0.05 es que las variables están relacionadas y, por lo tanto, hay diferencias significativas entre las especies vegetales. Cuanto más alto sea F, más están relacionadas la capacidad antioxidante de las especies, lo que significa que las medidas de la variable dependiente difieren o varían mucho entre las especies vegetales de la variable independiente.

Si en algún caso, existe un valor de F mayor a 0.05 es posible determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, utilizando el Método de Múltiples Rangos o también conocido como Método de Tukey- Kramer.

3.9.3.3 Procedimiento Tukey-Kramer o de múltiples rangos para ver la diferencia de la capacidad antioxidante entre las especies vegetales.

Una vez se ha determinado que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, es posible determinar cuáles medias son diferentes a otras, utilizando la prueba de Múltiples Rangos.

En base a este análisis, se determinó si existe diferencia significativa entre los aceites esenciales y su capacidad antioxidante, utilizando el software Statgraphic Centurion (versión 2014, USA). La diferencia se considerará estadísticamente significativas al nivel de $F < 0,05$

El procedimiento permitió hacer comparaciones simultáneamente entre todos los grupos, en este caso los aceites esenciales extraídos de las diferentes especies vegetales. Primero se calculan las diferencias entre todas las medias. Después,

se calcula un rango crítico. Si los tamaños de muestra difieren, se calcula un rango crítico para cada pareja comparada de medias de muestra. Por último, se compara cada una de las medias contra sus correspondientes rangos críticos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Bioprospección

Se realizaron 5 viajes de bioprospección a los lugares seleccionados de los departamentos de Ahuachapán y Sonsonate, acompañado de un experto botánico que identificaba las especies vegetales encontradas, de las cuales en la Finca San Jorge, Municipio de San Julián en el Departamento de Sonsonate encontramos 63 especies las cuales pertenecen a 36 familias botánicas (3 viajes de bioprospección) y en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca en el Departamento de Ahuachapán se encontraron 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas (2 viajes de bioprospección).

Al seleccionar las especies vegetales se realizaron 4 viajes de recolección en total, para la recolección de las especies vegetales *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez de la Finca San Jorge (2 viajes de recolección), *Nectandra martinicensis* Mez de la Laguna Verde (1 viaje de recolección) y la especie *Persea americana* Mill de la Finca El Carajo (1 viaje de recolección).

4.2 Extracción de aceites esenciales

Para la estandarización o "puesta a punto" se realizaron 9 extracciones, donde las primeras 4 se realizaron para verificar fugas en el aparato, tiempo de extracción, capacidad de material vegetal fraccionado en el balón fondo redondo. Al tener claro dichas observaciones, se siguieron las extracciones donde las 5 últimas extracciones y cuantificaciones llevadas a cabo, se consiguió una desviación estándar aceptable (Ver Tabla N°4). Se utilizaron en total 1.04 Kg de hojas frescas de hojas *Citrus x limon* (L.) Osbeck en donde la muestra rindió 2.5

mL de aceite esencial. Esto es interesante, desde el punto de vista de futuros ensayos con otras variedades de "Limón" o especies de cítricos, y en el caso de nuestro proyecto, para llevar a cabo los cálculos del costo de extracción de aceites esenciales.

El ejemplo para el cálculo de cuantificación de aceites esenciales en las hojas de "Limón" se muestra a continuación:

$$\% \frac{v}{m} = \frac{\text{volumen de aceite esencial extraído (mL)}}{\text{cantidad de material vegetal (g)}} * 100$$

Ejemplo de cálculo

$$\% \frac{v}{m} = \frac{0.35 \text{ mL}}{150 \text{ g}} * 100$$

$$\% \frac{v}{m} = 0.23\% \left(\frac{\text{mL}}{\text{g}} \right). \text{ Autoría propia}$$

Este ejemplo se emplea para la cuantificación de aceites esenciales de las especies *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez y *Persea americana* Mill presentados más adelante.

Tabla N°4. Resultados de los ensayos de extracción y rendimiento de las hojas de "Limón" mediante el aparato Clevenger. Elaboración propia.

Muestra vegetal (hojas de "Limón"; gramos)		Rendimiento % v/m (mL/g)	
100.755		0.29	
111.428		0.30	
150.064		0.28	
150.012		0.27	
150.001		0.23	
Total	662.26	Promedio	0.27 +/- 0.027

Los datos de rendimientos % v/m se relacionaron por 100 gramos de material vegetal.

4.2.1 Cuantificación de aceites esenciales en especies aromáticas seleccionadas

Se llevaron a cabo las extracciones de aceites esenciales de las 3 especies vegetales seleccionadas. El órgano vegetal y día de recolección, se detalla a continuación: hojas de *Nectandra martinicensis* Mez (25 de agosto de 2022- Laguna Verde), hojas de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez (1 y 22 de septiembre de 2022- Finca San Jorge) y hojas de *Persea americana* Mill (8 de noviembre- Finca El Carajo-Apaneca), a través de 4 viajes de recolección.

El procedimiento general que se efectuó con las muestras que ingresaron al laboratorio, consistió en fraccionar las hojas para las extracciones de sus aceites esenciales, luego colocar el peso adecuado en el balón de fondo redondo, posteriormente armar el aparato Clevenger y desarrollar la extracción durante aproximadamente 1 hora, repitiendo (6 extracciones de aceite esencial de *O. veraguensis* y 4 extracciones de *P. americana*) hasta obtener la cantidad necesaria de aceites esenciales para la cuantificación de la capacidad antioxidante.

La especie *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez recolectada en la Golondrinera no se toma en cuenta debido al bajo rendimiento, es por eso que se recolectó de la Finca San Jorge, Municipio San Julián en el Departamento de Sonsonate, esta presentó un buen rendimiento de aceite esencial y la cual se le realizó la cuantificación de la capacidad antioxidante.

Los rendimientos de la extracción de los aceites esenciales de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez está fuera del promedio y *Persea americana* Mill dentro del promedio que presentan los aceites esenciales en las especies vegetales aromáticas (0.1 a 1%), destacándose *P. americana*, ya que posee un mayor

rendimiento de obtención, en comparación de *O. veraguensis*. El caso de *N. martinicensis*, es peculiar, ya que no se observó la presencia de aceites esenciales (Ver Tabla N°5), pero si se percibió su olor, y este fenómeno se discute más adelante.

Tabla N°5. Resultados de la cuantificación de aceites esenciales de especies vegetales por medio del Método Clevenger. Autoridad propia. Elaboración propia.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Órgano	Rendimiento %v/m (mL/g)
<i>Nectandra martinicensis</i> Mez	"Canelón"	Lauraceae	Hojas	No observado
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez	"Canela de monte"	Lauraceae	Hojas	0.02 +/- 0.0039
<i>Persea americana</i> Mill	"Aguacate de olor"	Lauraceae	Hojas	0.58 +/- 0.0372

Los datos de rendimientos obtenidos se relacionaron por 100 gramos de material vegetal.

En cuanto al rendimiento de aceites esenciales en las hojas de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez, este fue de 0.019 (% m/m), mucho menor que el reportado para hojas (0.287% m/m) de esta especie vegetal recolectada en Costa Rica ⁽⁴⁹⁾. Hay que monitorear el rendimiento de aceites esenciales de esta especie vegetal en época seca y verificar su comportamiento.

El rendimiento obtenido de aceites esenciales procedentes de las hojas de *Persea americana* Mill "Aguacate de olor" (0.58%) colectadas en Apaneca fue comparado frente al rendimiento de 7 variedades de *P. americana* Mill colectadas en Marruecos en 2020, obteniéndose la siguiente relación de rendimiento: similar a la variedad Fuerte (0.5%), el doble que la variedad Ettinger (0.25%), 20 veces más que las variedades Reed (0.024%) y Maluma Hass (0.026%) y 40 veces más que las variedades Bacon (0.016%), Hass (0.015%) y Zutano (0.014%), respectivamente ⁽⁴³⁾. En un estudio llevado a cabo en Oaxaca, México, se obtuvo

un rendimiento inferior (0.24%) al obtenido en la especie salvadoreña ⁽⁵⁰⁾. Esta discusión revela que estamos ante una especie aromática con una gran expectativa para darle continuidad al estudio de extracción en otras épocas del año, la cuantificación y la determinación de la composición química del aceite esencial.

En el caso de *Nectandra martinicensis*, no se observó la presencia de aceite esencial, aunque sí unas notas fuertes de olor maderable en el alcoholato (agua que genera el vapor para la extracción) con una leve turbidez presentando algunas gotículas aceitosas, esto se puede deber a que los aceites esenciales presentes en esta especie podrían ser solubles en agua, como ocurre con los aceites esenciales de otras especies vegetales (por ejemplo en *Nepeta cataria*, “Hierba del gato”, Lamiaceae, González et al., 2007, Patente, España) ⁽⁵¹⁾. Sin embargo, en un estudio realizado en *N. amazonum* y *N. hihua*, se extrajeron aceites esenciales, y se obtuvieron rendimientos de 0.04 y 0.12%, respectivamente ⁽⁴⁸⁾.

Por otra parte, el rendimiento de aceites esenciales obtenidos en las diferentes especies vegetales aromáticas (mL/Kg de planta fresca) se muestra en la Tabla N°6.

Debido a que es un rendimiento bajo, se llevaron a cabo una serie de extracciones con material fresco de *O. veraguensis* y *P. americana* (1.9 y 1 Kg), respectivamente, obteniéndose 0.6 y 6 mL de aceite esencial. Estos serán utilizados para análisis de capacidad antioxidante.

Tabla N°6. Cantidad de aceite esencial extraído en 1Kg muestra de especies vegetales. Elaboración propia.

Nombre científico	Aceite esencial extraído (mL)
<i>Nectandra martinicensis</i> Mez	No observado
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez	0.3
<i>Persea americana</i> Mill	6

Los aceites esenciales extraídos de las especies seleccionadas se depositaron en un eppendorf estéril y previamente etiquetado y tarado. Para luego realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de las especies seleccionadas.

4.3 Puesta a punto del método para determinar actividad antioxidante con el aceite esencial de “Limón”

La actividad antioxidante del aceite esencial de “Limón” (*Citrus x limon* (L.) Osbeck) (Ver Tabla N°7), fue llevada a cabo con unas muestras de hojas recolectadas en la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana.

Así, se realizaron 4 ensayos para determinar la puesta a punto de la metodología, así, en el primer ensayo se prepararon concentraciones de 0.7 mg/mL, 1.5 mg/mL y 3.0 mg/mL, respectivamente. El segundo ensayo, las concentraciones se aumentaron a 10 mg/mL, 15 mg/mL y 20 mg/mL, respectivamente y en el tercer ensayo se aumentó más las concentraciones trabajando con 20 mg/mL, 35 mg/ml y 50 mg/mL, respectivamente.

Debido a la variación en los resultados, se optó por concentraciones intermedias (del segundo y tercer ensayo) trabajando el cuarto ensayo con concentraciones

de 15 mg/mL, 20 mg/mL y 25 mg/mL, respectivamente.

La actividad antioxidante del aceite esencial de “Limón” se expresó en IC_{50} , la cual es una medida que identifica la cantidad mínima necesaria de una especie antioxidante (aceite esencial) para reducir al 50% la concentración de una sustancia oxidante dentro de la solución de trabajo, por lo tanto, se espera que a mejor capacidad antioxidante que tenga la solución en estudio, su IC_{50} , sea menor, y se compara con el estándar de Trolox.

El resultado del IC_{50} , del ensayo No. 1 fue de 283.94 ± 5.93 mg/mL, del ensayo No.2 fue $IC_{50} = 250.74 \pm 23.57$ mg/mL, del tercero tuvo un IC_{50} de 365.76 ± 0.25 mg/mL y el cuarto, fue de 175.44 ± 0.82 mg/mL (tomando los valores de este último ensayo por ser menos dispersos).

Por lo tanto, se determinó que las concentraciones de 15 mg/mL, 20 mg/mL y 25 mg/mL, mantienen la mejor capacidad antioxidante del aceite esencial, mostrando un menor IC_{50} .

Tabla 7. Determinación de la capacidad antioxidante en aceite esencial de “Limón”. Elaboración propia.

N° ensayo	1	2	3	4
Concentración (mg/mL)	0.7	10	20	15
	1.5	15	35	20
	3.0	20	50	25
IC_{50}	283.94 ± 5.93 mg/mL	250.74 ± 23.57 mg/mL	365.76 ± 0.25 mg/mL	175.44 ± 0.82 mg/mL

La actividad antioxidante de los aceites esenciales se expresó en IC_{50} , y se comparó frente al estándar de Trolox, esto se debe a que es una molécula

antioxidante utilizada ampliamente en ensayos antioxidantes ⁽⁴⁰⁾ y en el caso del ácido ascórbico, es un potente agente reductor, lo que significa que dona electrones fácilmente a las moléculas receptoras el cual también y es también muy utilizado en ensayos de actividad antioxidante ⁽⁴¹⁾.

4.4 Cuantificación de la capacidad antioxidante por Espectrofotometría UV-Vis empleando el método DPPH.

Se utilizó Estándar de Trolox para preparar la curva de calibración comenzando con una solución madre de 500 μM y a partir de ella se prepararon soluciones estándares de Trolox de 250 μM a 6.25 μM . Se preparó una curva de calibración de las muestras con el aceite esencial extraído y metanol, comenzando con una solución madre de 25 mg/mL y realizando diluciones en cascada para preparar soluciones a 20 mg/mL y 15 mg/mL.

Para la lectura del espectrofotómetro UV-Vis se prepararon 3 cubetas por cada concentración estándar que contenían: 50 μL de Trolox diluido en metanol y 950 μL de solución DPPH para lectura del espectrofotómetro UV-Vis. La cubeta de muestra contiene: 50 μL de solución de muestra y 950 μL de DPPH. El blanco contenía 50 μL de agua destilada y 950 μL de una mezcla de alcoholes que contenía 931,27 μL de etanol absoluto y 18,73 μL de metanol.

El tiempo de reacción es de 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad, antes de medir la absorbancia de cada cubeta, comenzando por el estándar, en un espectrofotómetro UV-Vis. 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.

Tabla N°8. Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH. Elaboración propia.

Estándar μM Trolox	Absorbancia			Promedio	S	CV
	Std 1	Std 2	Std 3			
500	0.183	0.184	0.185	0.1840	0.001	0.543478
250	0.400	0.410	0.410	0.4107	0.000577	0.140589
100	0.548	0.542	0.546	0.5453	0.003055	0.560217
50	0.589	0.586	0.588	0.5877	0.001527	0.259931
25	0.606	0.617	0.598	0.6070	0.009539	1.571564
12.5	0.620	0.627	0.634	0.6270	0.007	1.116427
6.25	0.625	0.625	0.624	0.6247	0.000577	0.092425

Al final de toda la cuantificación de todos los estándares, se promediaron las absorbancias de cada estándar en las diferentes curvas y se omitieron las lecturas que no siguen la misma tendencia para un mismo estándar, para ello se utilizó como parámetro el coeficiente de variación, debiendo ser menor al 10% para aceptar el valor de la absorbancia.

El resultado es la curva de calibración promedio, a partir de la cual se obtiene la ecuación de la recta (Ver Figura N°8)

Por cada aceite esencial se pesaron 2 muestras de trabajo, y se prepararon 3 soluciones (con concentraciones similares a las usadas en la puesta punto del método con "Limón"). Y por cada muestra se midió por triplicado la absorbancia de las soluciones preparadas. Luego estos resultados se tabularon y graficaron para obtener el IC₅₀ en mg/mL para cada aceite esencial de las especies aromáticas seleccionadas.

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.

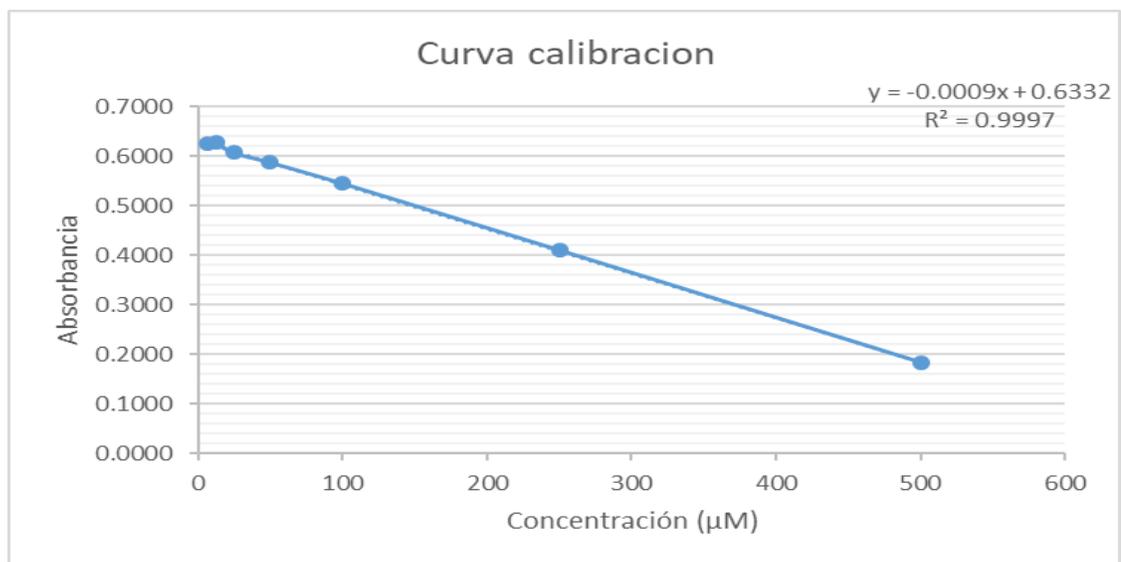


Figura N°6. Curva de calibración con Estándar de Trolox para la determinación de capacidad antioxidante. Elaboración propia.

4.4.1 Ensayo antioxidante en extracto liofilizado de café (*Coffea arabica* L. variedad "Pacamara")

Por cada extracto liofilizado se prepararon 3 diluciones de trabajo las cuales se leyeron por triplicado. La cuantificación de capacidad antioxidante en el Fruto fresco de café (*Coffea arabica* L. variedad "Pacamara") se expresa en μmol equivalentes de Trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca, y los resultados se pueden observar en la Tabla N°9.

Tabla N°9. Antioxidantes contenidos en fruto de café (*Coffea arabica* L.variedad Pacamara) expresado en ug Equivalentes de Trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca. Elaboración propia.

Muestra de café	Pulpa de café (g)	Peso neto muestra liofilizado de café (g)	Humedad pulpa de cafe	Promedio μmol Equiv. de Trolox/ g FF	DS	CV	μmol Equiv. de Trolox/g de FF
1	7.500	0.562	43.62%	38.47	3.83	9.94	38.47 \pm 3.83
2	7.504	0.552	43.62%	44.98	4.08	9.165	44.98 \pm 4.08
3	7.508	0.542	43.62%	51.48	4.32	8.39	51.48 \pm 4.32
Promedio	7.504	0.552	43.62%	44.98	4.08	9.165	44.98 \pm 4.08

El contenido de antioxidantes para la pulpa fresca de café fue de 44.98 μmol equiv. de Trolox/g de FF pulpa de *Coffea arabica* L. (Ver Tabla N°10), considerándose superior si lo comparamos con los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de 20 frutas de la flora salvadoreña ⁽⁴¹⁾

Cabe mencionar, que el contenido de antioxidantes fue mayor que el reportado para pulpa de café, reportados en Colombia ⁽⁴⁴⁾ y Tailandia ⁽⁴⁵⁾. Esto hace a el extracto de pulpa de café salvadoreño, interesante para la formulación de fitocosméticos.

4.4.2 Capacidad antioxidante en aceite esencial de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez y *Persea americana* Mill,

Por cada muestra de aceite esencial obtenido, se prepararon 2 soluciones de trabajo y a cada una de estas le corresponden 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), en cada una de las curvas de calibración se generó la ecuación de línea recta, la cual se utilizó para obtener el IC₅₀ en mg/ mL de cada repetición con la siguiente fórmula:

$$IC_{50} = \left(\frac{\left(\frac{a}{2} \right) - b}{m} \div 100 \right) * PM_{Trolox}$$

donde:

a: Lectura de blanco

b: Intercepto

m: Pendiente

PM: 250.29 mg/mmol

Ejemplo de cálculo para determinar IC₅₀:

$$IC_{50} = \left(\frac{\left(\frac{0.514}{2} \right) - 0.6332}{-0.0009} \div 1000 \right) * 250.29 \text{ Autoría propia}$$

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las nuevas especies vegetales aromáticas (*Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez y *Persea americana* Mill), se determinó según el procedimiento del apartado 3.8 por medio del método DPPH el cual determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso, y a mayor captación del radical libre por parte del antioxidante, habrá una mayor disminución de la absorbancia inicial del radical DPPH.

Dando a recordar que el análisis de la actividad antioxidante no se realizó en la especie *Nectandra martinicensis* Mez ya que no se observaron aceites esenciales durante la extracción.

Tabla N°10. Resultados de la Actividad antioxidante en aceite esencial de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez y *Persea americana* Mill. Elaboración propia.

Aceite esencial	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Ocotea veraguensis</i> (Meisn.) Mez	310.25 ± 1.8
<i>Persea americana</i> Mill	138.65 ± 1.15
Trolox	68.7 ± 0.7

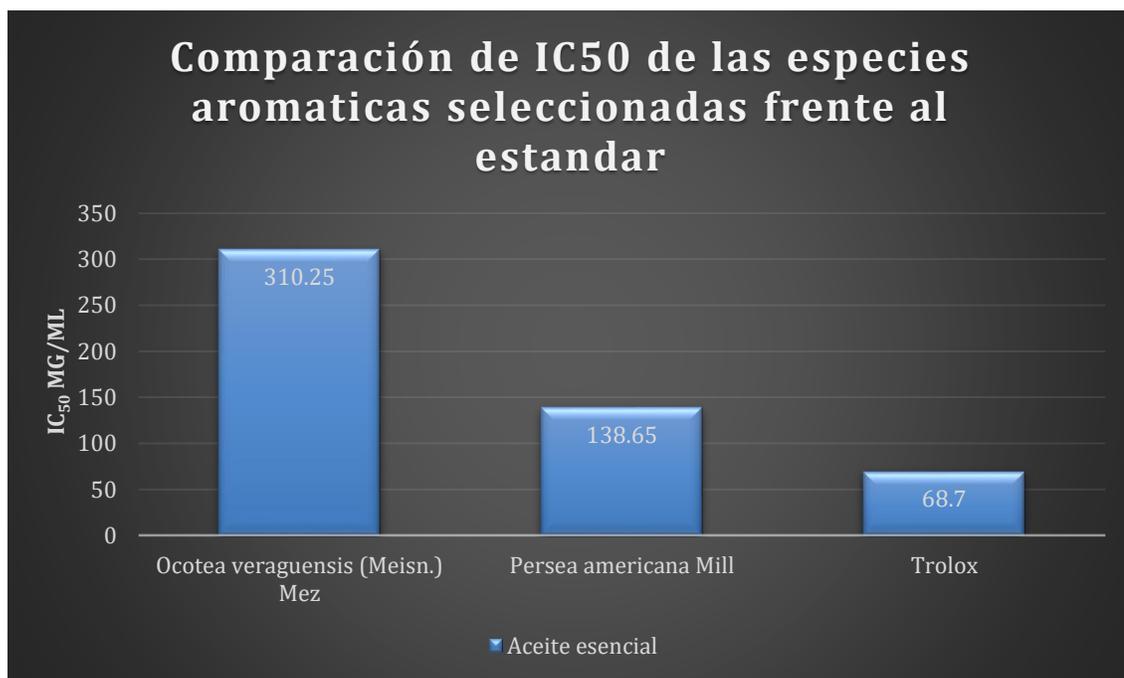


Figura N°7. Comparación de los IC₅₀ de las especies vegetales analizadas. Elaboración propia.

La capacidad de captura de radicales libres de aceite esencial se determinó mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH y se expresaron en IC₅₀ el

cual significa la concentración de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%, es decir a la mitad, por lo que cuanto menor sea la IC₅₀, mayor será la actividad antioxidante ⁽⁴²⁾.

El análisis de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos (Ver Tabla N°10 y Figura N°7) se observa que el aceite esencial de *Persea americana* Mill mostró la mayor actividad captadora de radicales libres con un IC₅₀ = 138.65 ± 1.15 mg/mL en comparación con las otras especies vegetales analizadas, sin embargo, no se puede reivindicar una actividad antirradical significativa ⁽⁴³⁾. Y al compararla con otro estudio en este caso del aceite esencial extraído de la semilla de *Persea americana* Mill recalca su baja actividad antioxidante ⁽⁴⁶⁾.

Los resultados obtenidos revelaron que el aceite esencial de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez presenta la menor capacidad captadora de radicales libres (IC₅₀ = 310.25 ± 1.8 mg/mL) con respecto a las especies analizadas. Sin embargo, al compararla con estudios previos de aceite esencial de *Ocotea veraguensis* (IC₅₀ > 500 mg/mL) demuestran su inactividad ⁽⁴⁷⁾, esto puede deberse a la composición, donde las hojas de la especie *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez está compuesto principalmente por Bulnesol (29.5%), *p*-cymene (19.8%) y spathulenol (8.5%).

Cabe mencionar que, debido a los posibles efectos cancerígenos de algunos antioxidantes sintéticos, la investigación sobre la extracción y evaluación de antioxidantes naturales está recibiendo una atención cada vez mayor. Debe recordarse que los antioxidantes previenen la oxidación de las cadenas de radicales libres, que destruyen la integridad de la membrana, lo que con mayor frecuencia conduce a la lisis celular.

4.5 ANALISIS ESTADISTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez Y *Persea amaericana* Mill.

Se observa una diferencia notablemente significativa entre los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez Y *Persea amaericana* Mill dando un IC₅₀ de 310.25 ± 1.8 mg/mL y 138.65 ± 1.15 mg/mL respectivamente (Ver figura N°7)

CAPITULO V

CONCLUSIONES

5.0 CONCLUSIONES

1. En los lugares donde se realizó viajes de bioprospección; Laguna Verde, Municipio de Apaneca del Departamento Ahuachapán identificando hasta el momento 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas y Finca San Jorge, Municipio de San Julián del Departamento de Sonsonate 63 especies vegetales pertenecientes a 36 familias botánicas de las cuales pueden ser posibles especies vegetales potenciadoras de aceites esenciales y con buena capacidad antioxidante que valdría la pena seguir investigando.
2. El rendimiento de extracción de aceite esencial de la especie *Persea americana* Mill fue de 0.58% y *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez con un rendimiento de 0.02%. En el caso de *Nectandra martinicensis* Mez, es peculiar, debido a que no se observó presencia cuantificable (gotículas de aceite) de aceites esenciales. Observando que *Persea americana* Mill presentó el mayor rendimiento de aceites esenciales de las especies vegetales aromáticas estudiadas.
3. El contenido de antioxidantes para la pulpa fresca de café fue de 44.98 μmol equiv. de Trolox/g de FF pulpa de *Coffea arabica* L. considerándose superior si lo comparamos con los resultados obtenidos en otros estudios de capacidad antioxidante del “Árbol de pan” y “Jocote corona”.
4. De las especies vegetales estudiadas la *Persea americana* Mill mostró la mayor capacidad antioxidante con un $\text{IC}_{50} = 138.65 \pm 1.15$ mg/mL, seguida por la especie y *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez con un IC_{50} de 310.25 ± 1.8 mg/mL presentando de esta forma que la *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez reveló la menor captación de radicales libres.
5. La baja actividad antioxidante en la especie vegetal de *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez se podría relacionar a su contenido de metabolitos secundarios, compuesto mayoritariamente por ácidos grasos y esterol.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

6.0 RECOMENDACIONES

Las recomendaciones van dirigidas a guiar futuras investigaciones sobre el análisis de la capacidad antioxidante centrada en las especies de plantas examinadas en este trabajo

1. En futuras investigaciones se debe realizar extracciones de aceites esenciales en diferentes épocas del año, verificando altura y humedad en el lugar de recolección y evaluar la actividad antioxidante de las especies vegetales.
2. En el caso de la especie vegetal *Ocotea veraguensis* (Meisn.) Mez, hay que monitorear el rendimiento de aceites esenciales de esta especie vegetal en época seca y verificar su comportamiento.
3. Realizar la cuantificación de fenoles totales de las especies vegetales aromáticas que se investigaron en este trabajo.
4. Conservar condiciones de oscuridad y temperatura ambiente ya que los reactivos y extractos son más sensibles al oxígeno, la temperatura y la luz en solución debido a su inestabilidad.
5. Basados en los resultados obtenidos en esta investigación elaborar una propuesta de formulación para la preparación de un fitocosméticos rico en antioxidantes, utilizando extracto liofilizado de *Coffea arabica* L. variedad Pacamara.
6. Se recomienda para futuros proyectos a la obtención de antioxidantes a partir de la pulpa de "Café", realizarlo a tres diferentes concentraciones para poder realizar el cálculo de IC₅₀ de dicho extracto.
7. Realizar análisis de cromatografía de gases-masa a los aceites en estudio para determinar su composición química y completar los estudios preliminares de estas especies vegetales

BIBLIOGRAFÍA

1. Shaaban HA, El-Ghorab AH, Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components. Review. J. Essent. Oil Res. 2012; 24 (2):203–212.
2. Robles GR, Barbosa KO, Soto RV. Evaluación de los productos forestales no madereros en América Central. Costa Rica. [internet]. [cited: 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ae159s/AE159S04.htm>.
3. Setzer WN, Takaku S, Stokes SL, Penton AF. Inhibition of cruzain by Ocotea leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. Nat. Prod. Commun. 2007; 2(12): 1211-1213.
4. 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): 1-6.
5. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem. 2005; 4 (91): 621-632.
6. Tofiño AP, Ortega M, Melo A, Mier 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.
7. Bandoni AL. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Argentina. 2a.ed. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; 2000.
8. Mabberley DJ. The plant book: A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge New York: Fedes repertorium,1998 109(5-6),378.
9. Chaverri C, Ciccio JF. Essential oil of trees of the genus Ocotea (Lauraceae)

- in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. Rev. biol. Trop. 53(3- 4): 431-436.
10. Gottlieb OR. Chemosystematics of the Lauraceae. Phytochemistry.1972 11(5): 1537-1570.
 11. Coy BC, Cuca SL. Isolated metabolites of *Raputia Heptaphula* and *Esenbeckia Alata* (Rutacea) and Syntesis of Quinolinic Alcaloid Analog Precursors. Elem. 2015; 5(5): 1-14.
 12. López MT. Los aceites esenciales. Offarm [Internet] 2004 [Consultado 25 de mayo de 2022]; 23 (7):88-91. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los -aceites-esenciales13064296>.
 13. Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales. 2ª ed. Editorial Acribia; 1993. p. 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.
 15. Olle M, Williams IH. Organic Cultivation of Vegetables. Springer Nature. 2021; 52(12):1-19.
 16. Bowles EJ. The chemistry of aromatherapeutic oils 3ª Edición. Routledge. 2003. P. 256.
 17. Fornari T, Vicente G, Vázquez E, Garcia MR, Reqlero G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. J. Chromatogr. A. 2012; 1250: 34–48.
 18. Rao VP, Pandey D. Extraction of essential oil and its applications, National Institute of Technology Rourkela. Rourkela,India: National Institute of Technology; 2006. p. 21-24.
 19. Caniard A, Zerbe P, Legrand S, Cohade A, Valot N, Magnard JL, 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; 12(119): 1-13.

20. Bou DD, Lago JH, Figueiredo CR, Matsuo AL, Guadagnin RC, Soares MG, 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.
21. Wang L, Well CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Food Sci. Technol.* 2006; 17 (6): 300-312.
22. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.* 2014; 79(7): 1231- 1249.
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.
24. Masango P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean Prod.* 2005; 13(8): 833–839.
25. Barmce A, Beer J, Boshier DH, Chamberlain J, Cordero J, Detlefson G, et al. *Árboles de Centroamérica*. Oxford Forestry Institute.2003, Pág 14-15.
26. 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.
27. 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. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040729/pdf/brjexppathol00150-0135.pdf>.
28. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53 (6): 1841-1856.
29. Khan AL, Khan H, Hussain J, Adnan M, Hussain I, Khan Y, Khan AR. Sesquiterpenes: The Potent Antioxidants *Rev.Pak. J. Sci. Ind. Res.* 2008; 51(6):343-350.
30. 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.
31. Castillo UG, Joachin EA, Martínez ML, Velásquez E, Pacas L, Núñez MJ. Capacidad antioxidante y contenido de cafeína en cafés especiales de El Salvador. *Revista Minerva.* 2021; 4(2): 75-84.
 32. Farmacopea Estadounidense USP 34 NF 39. Determinación de aceites volátiles Clevenger. 2009;34(1):196-7.
 33. Montoya Cadavid, G. de J. Aceites esenciales: Una alternativa de Diversificación para el eje cafetalero [Internet] Edu.co [citado 28 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/55532/9588280264.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 34. El-Ghorab AH, Fadel HM, El-Massry KF. The egyptian Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris: chemical compositions of the fruit volatile oil and antioxidant activity. *Flavour Fragr J.* 2002;17(4):306- 312.
 35. Mayor OR. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. Inst. Med Trop.* 2010;5(2):23-29
 36. Magoni C, Bruni I, Guzzetty L. Sangiovanni E. Dell`agil M, Massimo L. Coffee pulp waste as a source of antioxidant phytocomplexes. 2015.
 37. López A, et al. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM,* 2012. 6(1):49-51.
 38. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Organica. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas. 2002, Pág. 259-292.
 39. Magoni C, Bruni I, Guzzetty L. Sangiovanni E. Dell`agil M, Massimo L. Coffee pulp waste as a source of antioxidant phytocomplexes. 2015
 40. Gómez-Ordoñez, E.S., Reategui-Díaz, D. y Villanueva-Tiburcio, J.E. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Sci. Agropec,* 2018. 9(1), 113-121.

41. Rivas, M.M., Zaldaña, J., Galvez, A., Castillo, U.G., Menjivar, J., Martínez, M.L. y Nuñez, M.J. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en frutos de la flora salvadoreña. *Rev. Minerva*, 2020. 3(2), 21-33.
42. Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. y Kefalas, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 2005. 89(1), 27-36.
43. Nasri, C., Halabi, Y., Aghzaf, S., Nounah, I., Brunel, M., Oubihi, A., El-Guorrami, O., Harhar, H., Costa J. y Tabyoui, M. Seven *Persea americana* varieties essential oils comparison: chemical composition, toxicity, antibacterial, and antioxidant activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2022. 46(3), 489-490.
44. Meza, S.A.C. Determinación de antioxidantes en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia). 2017. (Tesis de postgrado), Universidad Técnica de Pereira, Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.utp.edu.co/items/2c457a24-bf52-45b6-b8e3-8d325499ddd0>
45. Jaisan, C., Chase, S. y Punbusayakul, N. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvents extracts of *Coffea arabica* pulp. *Rev. J. Process. Energy Agric.* 2015. 19(5), 224-227.
46. Rengifo, P.G., Carhuapoma, M., Artica, L., Castro, A.J., López, S. Characterization and antioxidant activity of seed oil avocado *Persea americana* Mill. *Rev. Sci. Inv.* 2015. 18(1), 33-36.
47. Salleh, W.M.N.H.W., Ahmad, F. Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Ocotea* (Lauraceae): A Review on Recent Research Results (2000-2016). *J. Appl. Pharm. Sci.* 2017. 7(05), 204-218.
48. Bosquiroli, L.S.S., Ferreira, A.C.d.S., Farias, K.S., da Costa, E.C., Matos, M.d.F.C. Kadri, M.C.T., Rizk, Y.S., Alves, F.M., Perdomo, R.T., Carollo, C.A., de Arruda, C.C.P. In Vitro antileishmania activity of sesquiterpene-rich essential oils from *Nectandra* species. *Pharm. Biol.* 2017. 55(1), 2285-2291

49. 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.
50. Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vázquez-López, A., Lagunez-Rivera, L. y Rojas-Olivas, A. Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2015. 5(6), 463-467.
51. Gonzalez, Y., Jackson, S.C., Manzer, L.E. (2007). Destilación de vapor de plantas de albahaca de gato (España, No de patente: PCT/US2007/025997). Oficina Española de Patentes y Marcas. (Fecha de presentacion: 20.12.2007; Fecha de publicacion: 03.07.2008; Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 20.12.2007, E07867850 (5); Fecha y número de publicación de la concesión europea: 10.05.2017, EP 2121885). <https://patentimages.storage.googleapis.com/2b/79/45/de3bbcda0e4cd9/ES2634265T3.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1: método de extracción

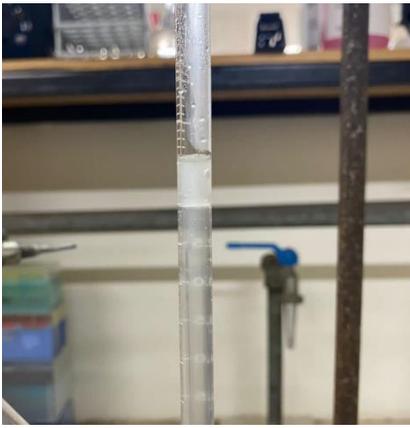
		
		
<p>Preparación de la muestra vegetal</p>	<p>Extracción de aceite esencial utilizando aparato Clevenger</p>	<p>Obtención del aceite esencial</p>

Figura N°8. Método de Hidrodestilación utilizando el aparato Clevenger.
Elaboración propia.

Anexo 2: Desarrollo del método de actividad antioxidante

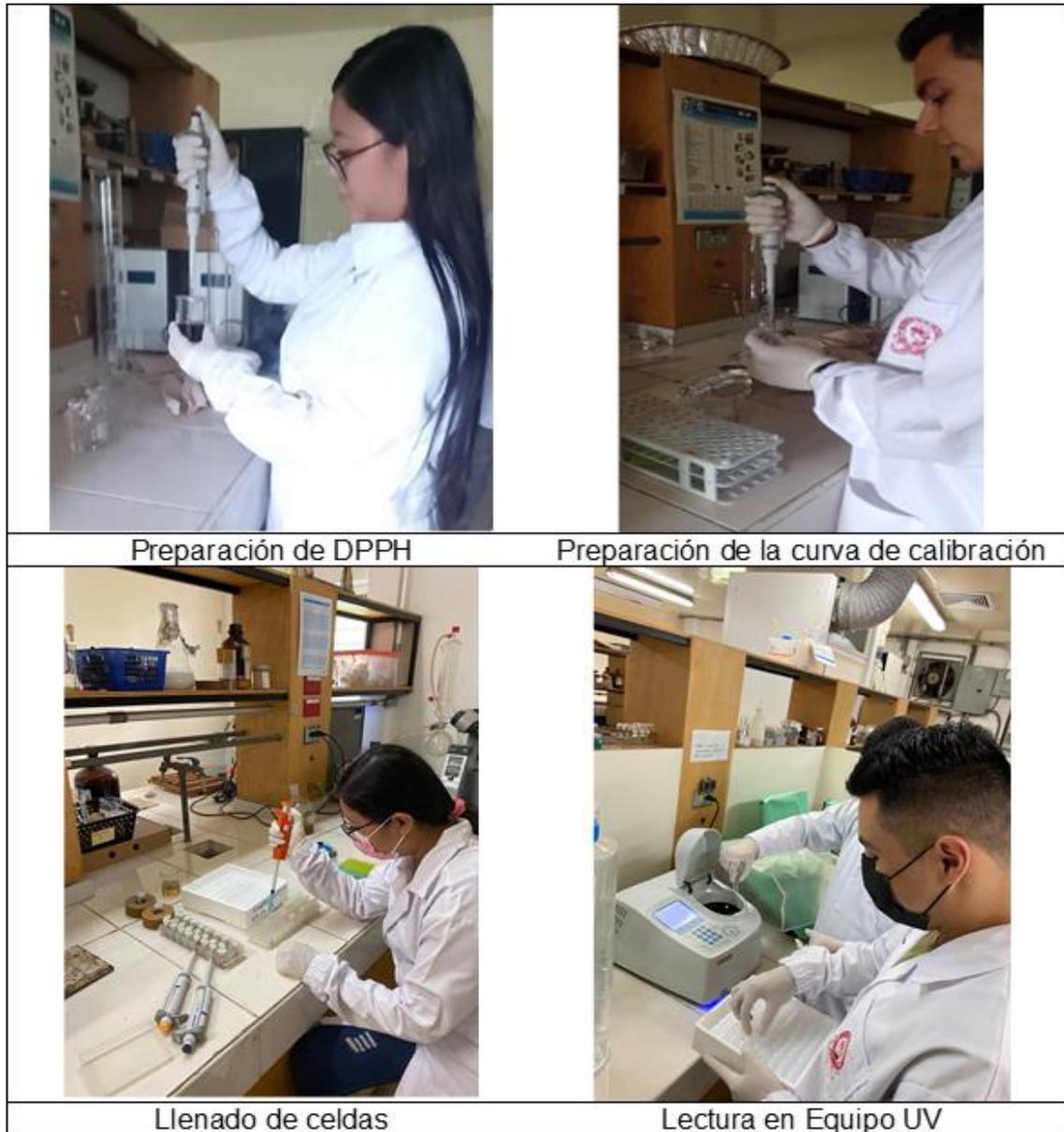


Figura N°9. Desarrollo del método de cuantificación de actividad antioxidante en el aceite esencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck "Limón". Elaboración propia .

Anexo 3: Antioxidantes contenidos en fruto de “Café” (*Coffea arabica* L. variedad Pacamara)

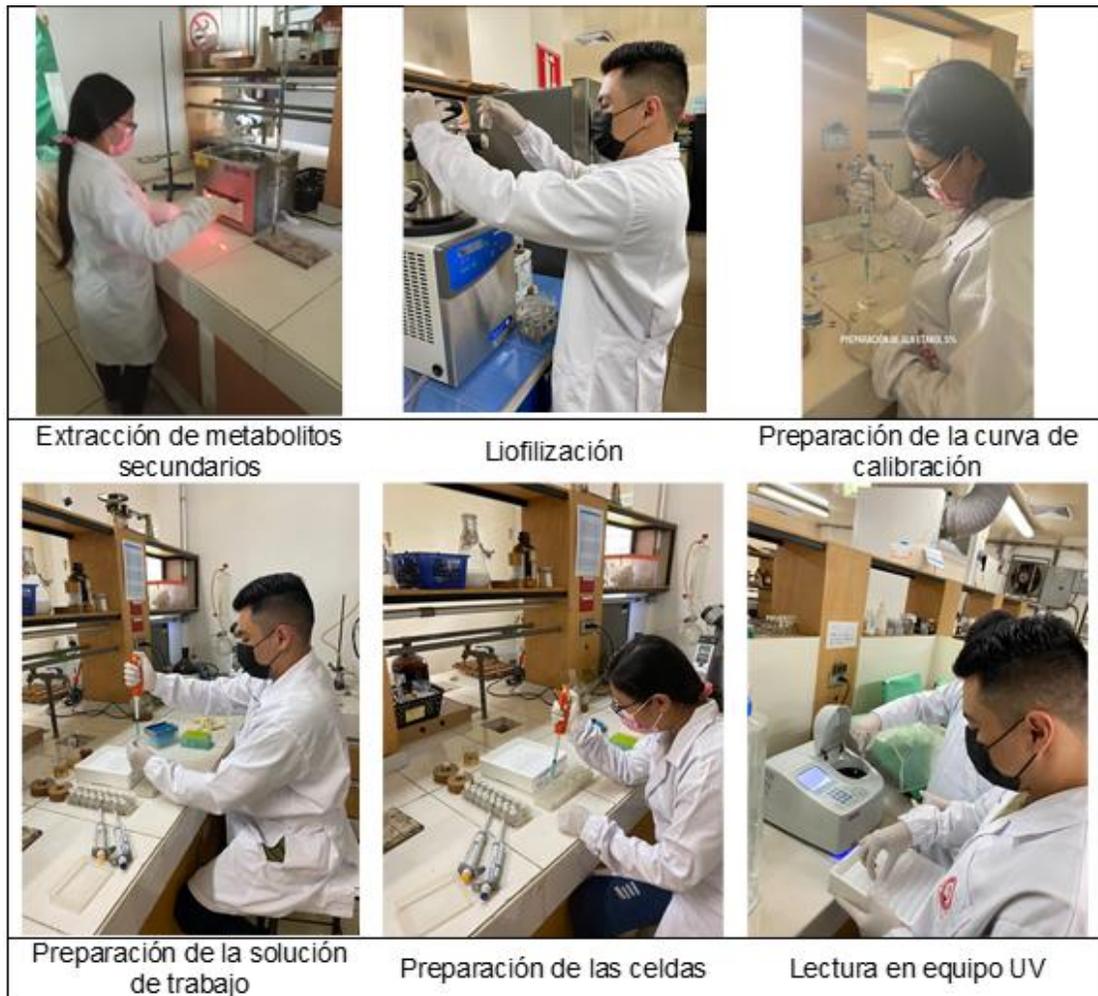


Figura N°10. Determinación de la capacidad antioxidante en extracto liofilizado de “Café” (*Coffea arabica* L. variedad Pacamara). Elaboración propia.