

**UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA
DE 5 VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES AMAZÓNICOS (*Ocotea
quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale*)**

**AUTORAS:
ELIANA CRISTINA CHASIPANTA RONQUILLO
TATIANA SILVANA CHICAIZA GALARZA**

**TUTOR:
PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotras, Eliana Cristina Chasipanta Ronquillo y Tatiana Silvana Chicaiza Galarza con documento de identificación N° 1717603391 y N° 1720228376 , manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum*; *Piper imperiale*)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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



Eliana Cristina Chasipanta Ronquillo

CI: 1717603791

Fecha: 25-02-2016



Tatiana Silvana Chicaiza Galarza

CI: 1720228376

Fecha: 25-02-2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum*; *Piper imperiale*) realizado por Eliana Cristina Chasipanta Ronquillo y Tatiana Silvana Chicaiza Galarza, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero, 2016



Paco Fernando Noriega Rivera

CI:0602421323

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	3
Marco conceptual	3
1.1 Botánica de las especies vegetales	3
1.1.1 Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>).	3
1.1.2 Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>).	5
1.1.3 Guayaba (<i>Psidium guajava</i>).	7
1.1.4 Sacha aniz (<i>Piper auritum</i>).....	11
1.1.5 Ampar (<i>Piper imperiale</i>).....	14
1.2 Aceites Esenciales	15
1.3 Métodos de Extracción de Aceites Esenciales	17
1.4 Estudios de los aceites esenciales.....	18
1.5 Antioxidantes.....	22
1.6 Radicales libres.....	25
1.7 Mecanismos de acción de los antioxidantes.....	26
1.8 Métodos de actividad antioxidante.....	27
1.8.1 Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	28
1.8.2 Método del ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico).	30
1.9 Método para evaluar la Actividad Antioxidante	32
1.9.1 Método de Determinación de la actividad antioxidante β – caroteno “bleaching (BCB) test”.	32
1.10 Estudios Bioautográficos.....	33
Capítulo 2	36
Metodología	36

2.1	Material vegetal	36
2.2	Extracción (arrastre de vapor, condiciones, rendimiento).....	36
2.3	Determinación de la composición química	37
2.4	Valoración de la capacidad captadora de electrones por el método DPPH.....	
	37
2.4.1	Preparación del reactivo DPPH (2,2- DIFENIL-1-Picrilhidrazil).....	38
2.5	Evaluación por método del DPPH.....	38
2.5.1	Preparación de las soluciones de Aceite Esencial	38
2.5.2	Preparación de la solución de BHA	39
2.5.3	Preparación de la solución control positivo	40
2.6	Lectura de las soluciones.....	41
2.7	Valoración de la capacidad captadora de electrones por el método ABTS.....	
	41
2.7.1	Preparación de la solución madre de ABTS.....	42
2.7.2	Preparación de la solución de (K ₂ S ₂ O ₈).	42
2.7.3	Preparación del ABTS radicalizado.	42
2.8	Evaluación por método de ABTS.....	42
2.8.1	Preparación de las soluciones de Aceite Esencial.	43
2.8.2	Preparación de la solución de BHA.	44
2.8.3	Preparación de la solución control positivo.	44
2.8.4	Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.....	45
2.9	Lectura del blanco	46
2.10	Lectura de las soluciones.....	46
2.11	Evaluación de la actividad antioxidante con el β-carotene bleaching (BCB)	
test	46

2.11.1	Preparación de la emulsión de β -carotene.....	46
2.11.2	Preparación de las soluciones de Aceite Esencial.....	47
2.11.3	Preparación de las soluciones de BHA.....	48
2.11.4	Preparación de la solución control positivo.	49
2.12	Lectura de las soluciones.....	51
2.13	Identificación de los compuestos con actividad antioxidante de los aceites esenciales amazónicos en estudio, mediante el método TLC-DPPH.....	51
2.13.1	Preparación del aceite para inyectar.	51
2.13.2	Elaboración de la fase móvil.	51
2.13.3	Preparación de la placa TLC.	51
2.13.4	Revelado de la placa con DPPH.....	52
2.14	Evaluación GC/MS de las fracciones separadas por TLC	52
2.14.1	Ubicación de fracciones antioxidantes.	52
	Capítulo 3.....	54
	Resultados y Discusión	54
3.1	Rendimiento de los 5 aceites esenciales Amazónicos.....	54
3.2	Composición química.....	54
3.3	Valoración de la capacidad captadora de electrones por DPPH.....	60
3.4	Valoración de la capacidad captadora de electrones por ABTS.....	63
3.5	Evaluación de la actividad antioxidante β -caroteno “bleaching (BCB) test”	67
3.6	Evaluación comparativa DPPH VS. ABTS.....	71
3.7	Cladograma	72
3.8	Análisis de varianza.....	74
3.9	Métodos Bioautográficos	74

3.9.1	Análisis de datos de la actividad bioautográfica antioxidante.	75
	Discusión	77
	Conclusiones	78
	Recomendaciones	79
	Referencias	80

Índice de figuras

Figura 1. La solución de DPPH.	29
Figura 2. El radical catiónico ABTS ^{•+}	31
Figura 3: Descripción de la actividad antioxidante β caroteno test	71
Figura 4: Representación DDPH vs ABTS	72
Figura 5. Cladograma.....	73
Figura 6: DPPH- (HP) TLC de los 5 aceites esenciales.....	75

Índice de ecuaciones

Ecuación 1: Porcentaje de inhibición de DPPH.....	29
Ecuación 2: Porcentaje de inhibición de ABTS.....	31
Ecuación 3: Actividad antioxidante	33
Ecuación 4: Valor de Rf.....	34
Ecuación 5: Índice de retención	35
Ecuación 6: Porcentaje de Rendimiento	36

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones y soluciones	39
Tabla 2. Concentraciones y soluciones del BHA.....	40
Tabla 3. Concentraciones y soluciones del aceite de Tomillo	41
Tabla 4. Concentraciones y soluciones ABTS.....	43
Tabla 5. Concentraciones y soluciones del BHA.....	44
Tabla 6. Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	45
Tabla 7. Concentraciones y soluciones para los 5 aceites esenciales	47
Tabla 8. Concentraciones y soluciones del BHA.....	48
Tabla 9. Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	50
Tabla 10. Rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por el método de inyección de vapor de agua.....	54
Tabla 11. Porcentaje de composición química de 5 aceites esenciales amazónicos..	56
Tabla 12. Aceite esencial de Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>).....	60
Tabla 13. Aceite esencial de Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>).....	60
Tabla 14. Aceite esencial de Sacha anís (<i>Piper auritum</i>)	61
Tabla 15. Aceite esencial de Ampar (<i>Piper imperiale</i>).....	61
Tabla 16. Aceite esencial de Guayaba (<i>Psidium guajava</i>).....	62
Tabla 17. Aceite esencial de Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	62
Tabla 18. BHA	63
Tabla 19. Aceite esencial de Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>).....	64
Tabla 20. Aceite esencial de Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>).....	64
Tabla 21. Aceites esencial de Sacha anís (<i>Piper auritum</i>).....	65
Tabla 22. Aceite esencial de Ampar (<i>Piper imperiale</i>).....	65
Tabla 23. Aceites esencial de Guayaba (<i>Psidium guayaba</i>)	66

Tabla 24. Aceite esencial de Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	66
Tabla 25. BHA	67
Tabla 26. Aceite esencial de Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>).....	68
Tabla 27. Aceite esencial de Sacha anís (<i>Piper auritum</i>)	68
Tabla 28. Aceite esencial de Ampar (<i>Piper imperiale</i>).....	69
Tabla 29. Aceite esencial de Guayaba (<i>Psidium guajava</i>).....	69
Tabla 30. Aceite esencial de Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	70
Tabla 31. BHA	70
Tabla 32. DPPH VS. ABTS	71
Tabla 33. Prueba estadística de ANOVA.....	74
Tabla 34. Identificación de componentes químicos	76

Resumen

El presente trabajo experimental evaluó el potencial antioxidante de cinco especies amazónicas presentes en la estación biológica Kutuku de la Universidad Politécnica Salesiana (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*), todas ellas empleadas por los moradores de la zona por sus propiedades medicinales.

Los métodos espectrofotométricos DPPH y ABTS cuantificaron la capacidad captadora de radicales libres de los aceites proporcionando los siguientes resultados respectivamente: *Piper auritum* (4,931; 2,961); *Ocotea quixos* (11,291; 7,897), *Eugenia stipitata* (12,868; 18,834), *Psidium guajava* (89,788; 50,155) y *Piper imperiale* (313,724; 179,383) teniendo como referente su capacidad de inhibición de la oxidación al 50% (IC₅₀) en ul/mL. La actividad antioxidante se determinó por el método del blanqueo del β -caroteno test tomando como valor medio de actividad el IC₅₀ en ul/mL fueron: *P. auritum* (3,19E-02), *O. quixos* (4,28E-01), *P. guajava* (2,15E-01) y *P. imperiale* (4,82E+01).

El aceite esencial natural de *T. Vulgaris* se empleó como control positivo. Los aceites con mejor desempeño antioxidante en orden de actividad fueron *P. auritum*, *O. quixos* y *E. stipitata*, y de menor actividad *P. guajava* y *P. imperiale*. Las pruebas bioautográficas revelaron decoloración para *P. auritum* con el safrol como responsable de la actividad, *E. stipitata* con el cadideno δ como responsable y en *O. quixos* los componentes activos fueron el cariofileno, oxido de cariofileno α -humuleno y α -copaeno.

Palabras clave: Aceite esencial, Potencial antioxidante, DPPH, ABTS, β -caroteno test.

Abstract

This experimental study evaluated the antioxidant potential of five Amazon species collected at the Kutuku biological station at the Universidad Politécnica Salesiana, (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*), all they used by locals for their medicinal properties.

In order to quantify the radical scavenging capacity of the essential oils the DPPH and ABTS spectrophotometric methods were used, providing the following results respectively: *P. auritum* (4,931; 2,961); *O. quixos* (11,291; 7,897), *E. stipitata* (12,868; 18,834), *P. guajava* (89,788; 50,155) and *P. imperiale* (313,724; 179,383), at a 50% (IC₅₀) inhibitory concentration of oxidation in ul/mL. The antioxidant property was determined by the β -carotene bleaching test, which took the mean value from IC₅₀ in ul/mL and provided the following values: *P. auritum* (3, 19E-02), *O. quixos* (4, 28E-01), *P. guajava* (2, 15E-01) and *P. imperiale* (4, 82E+01). The natural essential oil of *Thymus vulgaris* was used as a positive control. The essential oils that present the best antioxidant properties in order of strength were *P. auritum*, *O. quixos* y *E. Stipitata*, and in a lesser degree *P. guajava* and *P. imperial*. The bioautographic assays revealed discoloration for *P. auritum* with safrole as responsible for this activity, *E. stipitata* with δ -cadidene as responsable and in *O. quixos* the active components were caryophyllene, caryophyllene oxide, α -humulene and α -copaene.

Keywords: Essential oil, antioxidant potential, DPPH, ABTS, β -carotene test.

Introducción

En el Ecuador existe un uso difundido de especies medicinales, se estima en aproximadamente 432 el número de plantas usadas entre silvestres y cultivadas. Se conoce el uso de 273 especies para aproximadamente 77 dolencias o problemas de salud, siendo los más relevantes: antiinflamatorios (104), limpias (73), baños calientes (36), estomacales (35), circulatorios (33), sobre el sistema nervioso (30), aromáticas (20), para el post-parto (19), cardíacos (18), resfrío y otras (13) (Cerón, 2006). Por esta razón podemos concluir que el potencial medio ambiental y económico de estas especies podría constituir en las comunidades donde se cultivan o recolectan una fuente real de explotación y de beneficio en las mismas. Dentro de estas especies medicinales sobresalen aquellas de naturaleza aromáticas de las cuales mediante un sencillo procedimiento podemos extraer aceites esenciales y contar con una matriz de componentes químicos con un alto valor agregado.

Nuestro país cuenta con una de las diversidades ecológicas más interesantes del planeta destacándose la región amazónica, en donde existe una variedad vegetal reconocida mundialmente y en donde es posible localizar especies aromáticas muchas veces poco o nada estudiadas.

Uno de los estudios que frecuentemente se evalúan en las plantas medicinales es el de su potencial antioxidante, ya que las condiciones actuales de vida someten a los seres humanos a situaciones de estrés fisiológico y como consecuencia a niveles elevados de radicales libres, lascivos tanto para nuestras células como para nuestro material genético. Varios científicos aseguran que los daños al ADN (ácido desoxirribonucleico) por radicales libres tendrían efectos nocivos y aportarían a la generación de mutaciones y carcinogénesis (Criado & Moya, 2009).

En la naturaleza existen muchos compuesto químicos con la capacidad de neutralizar la acción perjudicial de los radicales libres, a muchos de ellos los encontramos en alimentos comunes como las frutas y las verduras que son ricos en moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, antocianinas, flavonoides, terpenos, ácidos grasos esenciales, etc (Valderrama, 2003, p. 35). Muchos antioxidantes sintéticos como: (BHT) butil hidroxitoulueno, (BHA) butil hidroxianisol, (PG) galato de propilo y el (TBHQ) ter butil hidroquinona son empleados en la preservación de alimentos, varios estudios ponen en evidencia a los mismos como promotores de efectos negativos en la salud (Kulisic, Radonic, A, Katalinic, & Milos, 2003).

El presente estudio evaluó el potencial antioxidante de cinco aceites esenciales de las especies, *Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*; cuya proveniencia es la cordillera del Kutukú, en los terrenos de la Estación Biológica de la Universidad Politécnica Salesiana y que busca evidenciar el potencial químico antioxidante de los aceites esenciales en su conjunto e identificar a los componentes responsables por medio de técnicas bioautográficas su posible aplicabilidad en industrias de diversa naturaleza.

Por lo descrito, al menos uno de los aceites esenciales amazónicos (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*), si presenta actividad antioxidante.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1 Botánica de las especies vegetales

Los aspectos y características más relevantes de cada especie en estudio para esta investigación se describen en el siguiente orden: taxonomía, origen, hábito, descripción de la planta, geobotánica, estudios farmacológicos y químicos a continuación.

1.1.1 Arazá (*Eugenia stipitata*).

“Clase: Equisetopsida C. Agardh, Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht, Superorden: Rosanae Takht, Orden: Myrtales Juss. ex Bercht & J. Presl, Familia: Myrtaceae Juss, Género: *Eugenia L.*, Especie: *Eugenia stipitata*” (Missouri Botanical Garden, 2015).

Es una planta nativa , cultivada en el sudoeste de la Amazonía y crece extendiéndose hasta el Estado de Acre (Brasil) y el Departamento de Loreto (Perú), además se hallan poblaciones espontáneas en el valle del río Ucayali (Sidney, 1999). “Hábito Arbusto o árbol” (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 467).

Es un arbusto o árbol pequeño de 1,5-5 m de altura posee ramaje denso y copa redondeada, las ramas y hojas nuevas son rojizas, en la maduración las ramas y parte del tronco exhiben cáscara exfoliante de color pardo a pardo-violetáceo, las ramas maduras son glabras, lisas y presentan sección circular además al no presentar dominancia apical esta ramificada abundantemente a partir de los 10-30 cm del suelo,

además se observa que las ramas e inflorescencias poseen pelos de 0.3mm de largo y las hojas nuevas desarrollan pelos duros de color marrón-pardos en la zona nerval de 0,1 mm de largo que desaparecen con la edad (Do Nascimento & Oliveira, 1999, p. 11).

Crece en clima tropical, sub-tropical y cálido a temperaturas de 21 – 24°C a una humedad relativa de 60% y hasta los 600 m, crece bien en suelos francos, bien drenados, profundos (50 cm al menos) y que contengan abundante materia orgánica (4%) y potasio, con una acidez: 5.2 a 6.8 con una topografía ligeramente plana (EPN-Alvarez, Patricia; Espín, Paulina;2007, pp. 14-15).

La raíz y el fruto se consumen en mermeladas, jugos y en forma de conservas, por las comunidades; Cofán, Secoya, Siona- Sucumbíos; Kichwa del Oriente- Pastaza; Shuar- Napo, Orellana, Sucumbías; Etnia no especificada – Napo, Zamora Chinchipe (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 467).

El aceite proveniente de las hojas fue analizado e identificado en sus componentes por GC/MS, de los cuales los componentes principales “eran sesquiterpenos y monoterpenos como α -pineno (14,1%), β -cariofileno (22,7%) y oxido de cariofileno (15,4%)” (Medeiros, et al., 2002, pp. 293-295).

En otros estudios los compuestos volátiles se aislaron del arazá mediante extracción líquida-líquida continua con el uso de pentano di cloro metano durante 8 h y se analizaron por cromatografía de gases capilar en total, se identificaron 27 ésteres, 20 terpenos, cinco alcoholes, seis compuestos carbonílicos, cinco ácidos, tres hidrocarburos, dos lactonas y dos compuestos azufrados. De los 70 constituyentes

identificados, 53 se reportan por primera vez en esta fruta. Los ésteres (54,8 % del total de la composición) fueron la clase de compuestos más abundante. El octanoato de etilo, dodecanoato de etilo y decanoato de etilo fueron los componentes mayoritarios. Otros compuestos significativos fueron: el etanol, 1-hexanol, globulol, ácido 2-metilbutanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, 3-metil-2-buten-1-ol y 2-furfural (Pino & Quijano, 2007, pág. 363).

1.1.2 Ishpingo (*Ocotea quixos*).

“Clase: Equisetopsida C. Agardh, Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht, Superorden: Magnolianaes Takht, Orden: Laurales Juss. Ex Bercht. & J. Presl, Familia: Laurales Juss, Género: *Piper L*, Especie: *Ocotea quixos*” (Missouri Botanical Garden, 2015).

Descrita como una “especie Nativa, Cultivada, crece como árbol”. (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008).

Botánicamente se lo describe como árbol perenne de 2-5 m de altura, la lámina de la hoja de 14,5-23,5 cm de longitud x 3,5-6 cm de ancho emana un aroma a canela, su flor es blanco-verdosa y presenta un cáliz persistente de seis sépalos y el fruto ovalado de 4 cm de diámetro, esta especie al alcanza la madurez mínimo después de veinte años, para luego florecer y fructificar cada dos años (Noriega & Dacarro, 2008, pág. 4).

“Se desarrolla naturalmente en la Amazonía Ecuatoriana, en el bosque húmedo tropical a los 310 y 1.250 msnm de altitud” (Noriega & Dacarro, 2008, pág. 4).

También hallada en Napo, Pichincha, Esmeraldas (Rios, Koziol, Pedersen, & Gabriela, 2007, pág. 652).

Popularmente se la prepara como infusión de las hojas y corteza, además las hojas frescas son utilizadas en la preparación de ensaladas, las hojas secas en sopas y en forma de decocción para el tratamiento de úlceras gástricas además se la mezcla con miel y para consumirla como tónico para la gripe o para recuperarse de alguna enfermedad, también es utilizada para el tratamiento de la artritis y calambres (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008). Usada además en limpias, como aromática y para tratar afecciones como el Pasma (Cerón, 2006). Los cálices son usados como condimento (Ulloa, 2006). También usado como Eupéptico y analgésico local (Naranjo, Kijjoa, Giesbrecht, Gottlieb, & Otto, 1981, págs. 233-236).

Es conveniente recolectar las hojas en la fase de luna creciente, así se desarrollan nuevos brotes, seleccionando las sanas, limpias y maduras de color verde cosechándolas hasta dos veces al año y tan solo el 50 % del área foliar (Espinoza, 2013, pág. 39).

Los componentes identificados del aceite esencial foliar proveniente de Ecuador fueron: “Cariofileno 19,029%, Humuleno 14,323% y Eremofileno 11,407%” (Noriega & Samaniego, 2006, pág. 5). En otro estudio se determinó que el constituyente mayoritario del aceite esencial de las hojas es “trans-Cariofileno 28,2%, metilcinamato 19,5%, beta-selineno, alfa-humuleno 10,1%, delta – cadiene 3,1%” (Destryana, et al., 2014).

El aceite foliar extraído por destilación a vapor fue analizado GC y GC - MS determinando que los componentes principales fueron “ β - cariofileno (15,1%), acetato

de cinamilo (11,4%), sabineno (7,6%), geranial (5,6%) y trans- cinamaldehído (5,1%)” (Sacchetti, Guerrini, Noriega, Bianchi, & Bruni, 2006, págs. 674-676).

En las fracciones en etanol y en éter de petróleo de *Ocotea quixos*, se identificaron sesquiterpenos como el cariofileno o de fenoles como el trans-cinamaldehído que actúan sobre las enfermedades del sistema nervioso y circulatorio, también se identificó la presencia de glicósidos que actúan sobre el sistema nervioso, además de ejercer un efecto purgante y laxante sobre el sistema digestivo, se aprovecha para el tratamiento del dolor de huesos o para los cólicos menstruales en las mujeres determinado que los compuestos que generan una actividad antiinflamatoria y analgésica son los componentes fenólicos y glicósidos encontrando correspondencias en las aplicaciones de la medicina tradicional y los componentes que se determinaron en el screening fitoquímico (Montealegre, 2011, pág. 62).

En otros análisis del aceite foliar se identificaron “44 compuestos, los principales componentes detectados fueron trans-cinamaldehído (27,9%), metilcinamato (21,6%), 1,8-cineol (8,0%), benzaldehído (3,6%), y b-selineno (2,1%)” (Bruni, y otros, 2003, págs. 415-421).

1.1.3 Guayaba (*Psidium guajava*).

“Clase: Equisetopsida C. Agardh, Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht, Superorden: Rosanae Takht, Orden: Myrtales Juss. Ex Bercht. & J. Presl, Familia: Myrtaceae Juss, Género: *Psidium* L., Especie: *Psidium guajava* L” (Missouri Botanical Garden, 2015).

Se la describe como una especie “nativa, cultivada” (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008). Se la ubica en América tropical además está distribuida en los trópicos del Viejo Mundo (León, 2000). Su hábito es de “árbol” (Cerón & Montalvo, 1998).

Es un árbol bajo y muy ramificado, de copa abierta o compacta, con las ramillas nuevas cuadrangulares, el tronco y las ramas se desprenden continuamente por la presencia de felógenos activos, las hojas son de forma elíptica a oblongas de 3 a 6 cm de ancho por 16 cm de largo y presentan en el haz un aspecto liso y más oscuro, y en el envés nervios prominentes, pubescente y cubierta de puntos más claros, las flores brotan solitarias o raramente en grupos de tres en las ramillas nuevas el pedúnculo mide de uno a dos centímetros y tiene varias brácteas agudas en la base, el receptáculo o hipantio, de cinco a 10 mm de largo, se angosta en el ápice para luego ensancharse en un cáliz de cuatro a cinco sépalos, los pétalos blancos y cóncavos miden alrededor de un centímetro de largo con numerosos estambres; el pistilo con ovario de cuatro celdas, termina en un estigma peltado, los frutos son de formas distintas: esféricos, elipsoidales o piriformes, que en tamaño varían de cuatro a 14 cm de largo por cuatro a siete centímetros (León, 2000, pág. 233).

Se la observa creciendo cerca de las casas y en la orilla de los caminos a una precipitación anual de 600 mm y altitud entre 150 a 600 m, a temperaturas entre los 15 y 30 °C pero tolera hasta los 45 °C, los requerimientos pluviales se hallan entre 1,000 y 2,000 mm, es tolerante a suelos ácidos y alcalinos, en los plantíos comerciales a temperaturas promedio de 18 °C (pH de 4.5 a 9.4) (Species Plantarum, 2015).

Es cultivada para obtener sus frutos, que se consumen crudos o en dulces (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, pp. 469-470). Se extrae vitamina C a bajo costo y en la producción de jaleas y mermeladas (León, 2000). Es un producto de consumo humano los frutos cocidos en colada y los frutos maduros sin ninguna preparación (Cerón & Montalvo, 1998).

Las hojas se aplican sobre la piel solas o combinadas con distintas hierbas, también usadas en forma de cataplasmas, se usa además para tratar la caries, curar las heridas hinchazón, escarlatina, bilis, hemorragia vaginal, fiebre, y deshidratación, además se estruja las hojas para aliviar úlceras y el reumatismo también son masticadas para curar las heridas de la boca, se combina el uso de las hojas del guayabo junto con las hojas de *Loranthus beengewess*, citrus limón y *Jatropha curcas*, para tratar la Diabetes mellitus por generar un efecto hipoglucémico; así mismo los extractos fenólicos (guaverina, ácido psidiolico, quercetina) de hojas y flores han manifestado actividad antibiótica (G-) contra *Eschericia coli*, *Salmonella enteriditris* y *Shigella flexneri* (Species Plantarum, 2015, págs. 201-204). Las hojas se consumen como alimento y en el tratamiento del reumatismo; en infusión junto con horchata de arroz trata la diarrea con sangre, además para el tratamiento de la ictericia, las hojas, mezcladas con las del hobo (*Spondias sp.*), se hierven para realizar lavados vaginales (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008).

Las hojas de guayabo contienen cantidades significativas de fenoles naturales que actúan como antioxidantes, comparando dos extractos de sus hojas se logró demostrar que el extracto etanólico tuvo mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso, debido a la mayor cantidad de componentes fenólicos que le permite mayor habilidad para neutralizar radicales (He & Venant, 2004, págs. 676-683). También se determinó

que los extractos de hojas de guayaba contienen ácido felúrico, componente que promueve la actividad antioxidante (Yin Chen & Chin Yen, 2006, págs. 686-694).

En múltiples ensayos in vitro e in vivo de los extractos obtenidos de la planta (Hojas y frutos), se han identificado metabolitos que ejercen su actividad biológica útil, como los componentes fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides y triterpeno, que presentan propiedades antiespasmódicas y antimicrobianos en el tratamiento de la diarrea y la disentería conjuntamente es utilizado como agente hipoglucémico, además estudios farmacológicos previos determinan que *Psidium guajava* actúa como agente antioxidante, hepatoprotector, antialérgico, antimicrobiano, antígenotóxico, antiplasmodial, citotóxico, anticough, antidiabético, antiespasmódico, cardioactivo antiinflamatorio y anticonceptivo, que fundamenta su uso tradicional (Pérez, Mitchell, & Vargas, 2008, págs. 1-27).

Los compuestos del fruto fueron analizados por cromatografía/espectrometría de masa gas-líquido (GLC/MS) y se determinó que los componentes dominantes fueron “ β -cariofileno (17,6%) y limoneno (11,0%), adicionalmente los componentes encontrados en el aceite esencial de las hojas fueron identificados como β -cariofileno (16,9%) y selin-7 (11)-en-4 α -ol (8,3%), consecutivamente las actividades de barrido de radicales de ambos aceites esenciales fueron evaluadas por DPPH y los ensayos de degradación de desoxirribosa reflejando que el aceite de hoja de guayaba redujo radicales DPPH e impidió la degradación de la desoxirribosa con valores de IC₅₀ de 3,59 y 12,64 mg/ml” (El-Ahmady, Ashour, & Wink, 2013, págs. 1-6).

La composición del aceite volátil obtenido de la hidrodestilación de las hojas de *P. guajava* L. que crecen en Nigeria, se estudió mediante GC-MS de los que se identificó cuarenta y dos compuestos que representan más del 90% de la mezcla volátil, de los que se destacaron “limoneno (42,1%) y β -cariofileno (21,3%)” (Ogunwande, Olawore, Adeleke, Ekundayo, & Koenig, 2003, págs. 136-138).

El aceite esencial de las hojas de *P. guayaba* provenientes de la Amazonía Ecuador se “compone de limoneno (33,3%) y pineno (29,5%)” (Sacchetti, y otros, 2004, págs. 621-632). Otros constituyentes de los aceites esenciales de las hojas de *Psidium guajava* L. “se analizaron mediante GC-MS cualitativa y cuantitativamente, sesenta compuestos de los aceites esenciales se identificaron en un 90,56% y los componentes principales fueron cariofileno (18,81%), copaeno (11,80%), azuleno (10,27%), eucaliptol (7,36 %)” (Li, Chen, & Luo, 1999).

1.1.4 Sacha aniz (*Piper auritum*).

Clase: Equisetopsida C. Agardh, Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht, Superorden: Magnolianae Takht, Orden: Piperales Bercht. & J. Presl, Familia: Piperaceae Gisek, Género: *Piper* L, Especie: *Piper auritum* (Missouri Botanical Garden, 2015).

Se trata de una especie originaria de México a Colombia, su hábito es de un arbusto o árbol pequeño (Fernández, 2009).

Es un arbusto o árbol pequeño de 1.5 a 5 m de altura que presenta nudos visibles en los tallos con glabras además describen hojas simples, alternas, láminas de (13-) 15-27 (-35) x 12 - 21 (-26) cm de forma ovalada o ampliamente ovalada a elíptico-ovada, posee un ápice acuminado con la base desigual, cordada a profundamente auriculada,

el lóbulo más grande tan largo como del pecíolo y a menudo traslapándolo, el más corto hasta 1/3 de la longitud del pecíolo, el margen entero, cortamente pubescentes, pecioladas. Inflorescencias axilares, erectas en la antésis y péndulas en fruto, blancas a verde pálido, raquis de (6-) 12-28 (-35) cm de largo, papilado, flores diminutas, densamente agrupadas en el raquis sin formar bandas alrededor de la espiga. Frutos de 0,8 - 1 mm de largo, ovoides, glabros, verde pálido, con una semilla (Fernández, 2009).

Se localiza en “bosques húmedos y bosques secundarios a 0 – 1,300 m de elevación” (Fernández, 2009).

Encontrada además en “México, Panamá, oeste de la India, Colombia, Guyana Francesa, Ecuador y en las costas del Amazonas” (Grandtner & Chevrette, 2013).

Habita en climas cálido semicálido y semiseco desde el nivel del mar hasta los 2000 m, es cultivada en huertos familiares también crece a orillas de caminos y en vegetación de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino de terreno semiseco (Flores, 2009).

Alivian el dolor de cabeza al ser aplicadas las hojas frescas en la frente, además bebiéndola y aplicándola tópicamente se la usa como antídoto para la mordedura de serpiente, conjuntamente se atribuye a la planta efectos emolientes, antirreumáticas, diaforéticas, diuréticas y estimulantes, se encuentran preparaciones farmacéuticas en forma de extractos y tinturas que son administradas para aliviar las dolencias generadas por enfermedades reumáticas (Roig, 1988).

El extracto metanólico contiene alcaloides además de flavonoides, terpenoides en el extracto hexánico que muestra una propiedad insecticida y tóxica (Delgado E. , 2011, págs. 40-44).

Según (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009, págs. 39-46), la composición química de la planta en Cuba, del aceite esencial extraído de las hojas y tallos, por el método de hidrodestilación presenta como componente mayoritario el monoterpeno oxigenado safrol (74,29%), y se puede considerar la presencia de g- terpineno (6,21%), a- terpinoleno (4,96%), b-pineno (2,99%), a-terpineno (2, 65%), a-pineno (1,79%) y trans-cariofileno (1,43%). Las variaciones con la composición del aceite, en cuanto al contenido de safrol y la abundancia relativa de los otros componentes, pueden explicarse considerando las variaciones en las condiciones ecológicas en el que se desarrolla la planta, así como las condiciones de extracción.

En Colombia, el rendimiento del acetite esencial de las hojas e inflorescencias obtenida por hidrodestilación asistida por microondas fue “2,3% para hojas y de 2,4% para inflorescencias y se determinó que los componentes mayoritarios fueron, safrol, 94,0% (hojas) y 90,3% (inflorescencias) y miristicina, 3,2% (hojas) y 5,8% (inflorescencias) determinando que el aceite esencial presentó una baja actividad atrapadora del radical DPPH (0,002 mg/L), en comparación con la presentadas por la vitamina E (3,69% mg/L) sustancia antioxidante usada como referencia” (García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007).

1.1.5 Ampar (*Piper imperiale*).

Clase: Equisetopsida C. Agardh, Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht., Superorden: Magnolianaes Takht., Orden: Piperales Bercht. & J. Presl, Familia: Piperaceae Giseke, Género: *Piper* L., Especie: *Piper imperiale* (Missouri Botanical Garden, 2015).

“Especie nativa del Ecuador y su hábito de arbusto, arbolito o árbol” (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 500).

Descrita como un árbol o arbusto de 2 a 6 m de alto que posee tallos verdes con algo de vellos con puntas blandas gruesas de 2 cm de ancho, de pocas ramas; las hojas verrugosas y alternadas a lo largo del tallo de 20 a 60 cm de largo y 15 a 35 cm de ancho, con forma de corazón, ápice acuminado, base asimétrica, con un lado pegado al peciolo. Las flores de color verde y en algunas ocasiones moradas, de espigas colgantes hasta de 28 a 55 cm de largo y 8-10 mm de espesor. Fruto carnoso de color verde a marrón rojizo de 0,2 cm de ancho (UDCA-Jara, Angela;2013, p. 26).

Destinada como alimento de vertebrados (Kichwa del Oriente –Sucumbíos) La infrutescencia se usa como pasta dental (Wao-Orellana) (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 500).

“Se usa para tratar la gastritis. Las hojas calientes se aplican sobre las piernas para tratar el reumatismo, dolores y enfriamiento” (Chachi- Esmeraldas; Tsa´chi-Pichincha). Además para tratar la “mordedura de serpiente” (De la Torre L. , Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 500).

En estudios químicos realizados a la planta, mediante las metodologías como el DPPH y FRAP, se ha descrito la presencia de compuestos naturales como los polifenoles entre ellos el ácido ferúlico, se determina por ser antioxidante, que ayudan a prevenir y retrasar la aparición de varias enfermedades como el cáncer, el hepatitis, y diabetes ocasionadas por la aparición de radicales libres, pero también hay que tomar cuenta la presencia de flavonoides y alcaloides que le pueden brindar propiedades antiparasitarias, y anti fúngicas a la especie en estudio (UDCA-Jara, Angela;2013, p. 11).

1.2 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, son volátiles y se caracterizan por desprender un fuerte aroma (Abad, Bedoya, Apaza, & Bermejo, 2012), estas materias primas naturales aromáticas, que pueden ser extraídas empleando métodos de destilación con agua o vapor, son productos vegetales que poseen varias propiedades "biológicas" término que comprende toda actividad ejercida en humanos, animales y otras plantas que son mediados por esta mezcla de compuestos volátiles que son absorbidas dentro del sistema circulatorio de humanos y animales para luego ser metabolizados y eliminados (Buchbauer & Can Baser, 2014, p. 1021).

Química de los Aceites Esenciales: los aceites esenciales pueden estar constituidos por los siguientes grupos: hidrocarburos alifáticos con sus derivados oxigenados además de hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados y los derivados del benceno y sus compuestos misceláneos (Noriega, 2009, págs. 5-6).

Usos: estas mezclas naturales poseen actividad biológica y propiedades anti cancerígenas, efectos anticonceptivos, actividad antiviral, propiedades antiflogísticas y efectos antioxidantes, además se les atribuye actividad antimicrobiana por ello es importante su caracterización química (Buchbauer & Can Baser, 2014).

Importancia económica: en la actualidad se conoce que las plantas aromáticas que producen aceites esenciales poseen actividad biológica sobre levaduras, mohos y bacterias, generando un efecto antimicrobiano que se relacionan con su composición química, además su potencial interés como antioxidante (Reyes, Palou, & López, 2014, p. 68).

Los aceites esenciales y aromas químicos son productos de alto volumen y de bajo volumen, utilizados en perfumería y las industrias farmacéuticas por ello en la industria son buenas fuentes naturales de sustancias con potencial comercial como materiales de partida para la síntesis química, es por ello que la demanda global de estos se ha incrementado por que son usados en gran variedad de productos como saborizantes alimentarios, aditivos para piensos, agentes de sabor en la industria del tabaco, y en la composición de cosméticos y perfumes, que ha incrementado el interés el uso de los aceites esenciales como biosidas y repelentes de insectos, además de estudiarlos más detalladamente ante su potencial antimicrobiano (Buchbauer & Husnu Can Baser, 2014).

En la agroindustria la demanda de composiciones aromáticas a generado un incremento de 10%, su destino principlamente es la industria cosmética y alimenticia, La CORPEI señala cinco pequeñas empresas del Ecuador que se dedican a la extracción y comercialización de las esencias de plantas andinas, tropicales

incluyendo especies endémicas e introducidas (Noriega, 2009, págs. 5-6).

1.3 Métodos de Extracción de Aceites Esenciales

La extracción de los A.E se puede realizar por varios métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos extracción con fluidos supercríticos que utiliza dióxido de carbono como solvente, destilación con agua o hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor de agua, destilación con agua y vapor (cohobación) destilación sometida a una degradación térmica, destilación-extracción con solvente (DES), head-space (HS), y destilación asistida por radiación microondas (HDM) (Torrenegra, 2014, págs. 21-22).

Existen tres métodos de destilación por arrastre de vapor:

- a) Método de inyección de vapor de agua: la droga se encuentra sobre un fondo falso perforado sobre el agua que contiene el equipo, por inyección de calor una corriente de vapor de agua arrastra los aceites esenciales. A continuación se condensa el vapor de agua, que se recoge en un recipiente para luego separar el aceites del agua ya que ahora forman dos fases (Kuklinski, 2003).
- b) Hidrodestilación: el material vegetal está cubierto con agua llevándolos a ebullición acompañado de un ligero movimiento en un recipiente que posee un condensador, la esencia se evapora, se condensa y es recolectada en un recipiente que separa las dos fases formadas por aceite esencial y agua (Guenter, 1948, pág. 112).

- c) Destilación mixta: consiste en poner el agua en el mismo recipiente que la droga pero sin que estos entren en contacto, la droga está sobre una rejilla y el agua está en el fondo del recipiente. El agua en ebullición en forma de vapor atraviesa la rejilla con la droga arrastrando consigo los aceites esenciales. Después se condensa, se recoge y se separan los aceites esenciales del agua (Kuklinski, 2003).

Métodos mecánicos (expresión): consisten en exprimir el aceite esencial que se encuentra alojado en las células del material vegetal de interés, se aplica generalmente a los cítricos, mecánicamente se pincha o raspa la corteza del fruto y se hace pasar una corriente de agua que arrastra el zumo. Posteriormente los aceites esenciales se separan del agua por decantación (Olaya & Méndez, 2005, pág. 18).

1.4 Estudios de los aceites esenciales

Arazá (*Eugenia stipitata*)

Se analizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD), el mesocarpio y el epicarpio del fruto de arazá en diferentes etapas de maduración, determinado presencia de compuestos fenólicos, se comprobó la identidad de los componentes químicos por medio de la comparación de cada uno de los picos de los compuestos patrones al realizar un análisis comparativo espectral UV-VIS, con los picos de las muestras que alcanzan los mismos máximos de absorción, y como resultado se estableció la presencia de ácido gálico, caféico y clorogénico (Cuellar, Ariza, Anzola, & Restrepo, 2013, p. 26).

“El aceite inhibe el crecimiento antimicrobiana de: *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* y *L. monocytogenes*” (Medeiros, et al., 2002, pp. 293-295).

Ishpingo (*Ocotea quixos*)

Estudios demuestran que el aceite esenciales un potencial agente inhibidor de la agregación plaquetaria en ensayos in vitro e in vivo el aceite esencial posee potente y segura actividad antitrombótica atribuible a su antiplaquetaria y los efectos vasodilatadores, constituyendo al trans-cinamaldehído como el principal responsable de esta actividad a través de un supuesto mecanismo que implica la inhibición de los receptores de tromboxano A2 (Ballabeni V. , y otros, 2007).

Además se determinó que “inhibe el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans*, *Streptococcus piogenes* y *Streptococcus mutans*, que son susceptibles a la presencia del aceite esencial extraído de las hojas” (Noriega & Dacarro, 2008).

El aceite esencial extraído de los cálices de la fruta de Ishpingo (*Ocotea quixos*, Lauraceae) fue analizado por CG (cromatografía de gases) y GC-MS (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas), además se ha determinado que la actividad antioxidante por el método de DPPH, ejerce su actividad sobre el 52 % del radical, como resultado al ensayo de blanqueo por β -caroteno el aceite mostró débiles ECTS en la inhibición de la oxidación de ácido linoléico, los componentes del aceite esencial actúan sobre microorganismos gram positivos, tales como (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y gram

negativos cepas (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*), consecutivamente se ensayaron diferentes dosis de aceites esenciales sobre cultivos de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pythium ultimum* fitopatógeno y dermatofitos *Trichophyton mentagrophyte* concluyendo que posee una actividad fúngica que depende de la dosis (Bruni, y otros, 2003, págs. 415-421).

Se encontró que el aceite esencial de los cálices está constituido por “trans-cinamaldehído y cinamato de metilo”, componentes que ejercen una actividad antiinflamatoria en ensayos in vitro y en modelos in vivo (edema en la pata de la rata), esto genera la primera evidencia de una actividad gastro-ahorradores antiinflamatoria significativa de aceite esencial de *O. quixos* (Ballabeni V. , y otros, 2010, págs. 289-285).

O. quixos fue el inhibidor más potente contra los mediadores proinflamatorios (Destryana, et al., 2014, pp. 1531-1542).

Guayaba (*Psidium guajava*)

Ensayos mostraron que el 94.4-96.2% de oxidación de ácido linoléico fue inhibido con la adición de extractos de hojas de guayaba y té de guayaba a una concentración de 100 ug/ml, se demostró que los extractos de las hojas de *P. guajava* poseen una capacidad de barrido de los radicales peroxilo y que los efectos significativos de los extractos de hojas en radicales ABTS y anión superóxido aumentó a mayor concentración (Yin Chen & Chin Yen, 2006).

La actividad antioxidante del aceite esencial por el ensayo de DPPH determinó una capacidad antioxidante moderada con el valor de IC₅₀ de 460,37 ± 1,33 mg / ml, del mismo modo en el ensayo por blanqueo de beta caroteno presenta una inhibición moderada a la oxidación de 81,67±1,48%, además el contenido fenólico total del aceite fue evaluado espectrofotométricamente según el método de fenol de Folin-Ciocalteu y se expresa en equivalentes de ácido gálico (GAE) dando como resultado la alta presencia de fenoles 495,93±7,88 mg de GAE/g de EO, concluyendo que las hojas de guayaba son promisorias en la obtención de antioxidantes naturales (Wei, Roziahanim, Suthagar, Shanmugapriya, & Sabariah, 2012, págs. 86-91).

Sacha anís (*Piper auritum*)

El aceite esencial presentó una baja actividad atrapadora del radical DPPH (0.0029 mg/L), en comparación con la vitamina E (sustancia antioxidante usada como referencia) con el valor de (3.69 mg/L), el análisis cromatográfico reveló la presencia de hidrógenos arílicos los que se les atribuye la leve actividad antioxidante que presenta el aceite esencial, entre los compuestos orgánicos volátiles presentes en los aceites esenciales analizados por GC-MS, se destaca el alto contenido de safrol (principal compuesto) en consecuencia las concentraciones de safrol y el rendimiento del aceite, convierte a la especie *Piper auritum* en una fuente alternativa de safrol (García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007).

El cromatograma reveló que el componente mayoritario que constituye el “87% del aceite es el safrol; se comprobó que inhibió el crecimiento de amastigotes intracelulares de *L. donovani* con un valor de IC₅₀ de 22,3 +/- 1,8 microg/ml, por ello

se lo considera como una alternativa prometedora para el tratamiento de la Leishmaniasis” (Monzote, García, Montalvo, Scull, & Miranda, 2010, pp. 168-173).

Ampar (*Piper imperiale*)

Los extractos de las flores describen una fuerte actividad antimicrobiana sobre *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv además todos los extractos exhiben efectos cito tóxicos dependientes de la dosis contra las células MCF-7 de cáncer, asimismo el contenido de fenoles totales se identificó y cuantificó por HPLC; entre los extractos etanólicos y ácido gálico, catequina, epi - catequina, ácido ferúlico, resveratrol y quercetina. Al mismo tiempo los ensayos de DPPH y ABTS mostraron una alta actividad antioxidante del extracto de la hoja (IC₅₀ ABTS = 15,6g / ml, IC₅₀ DPPH = 27,3g / ml) con IC₅₀ en el mismo orden de magnitud que la hidroxiquinona (IC₅₀ ABTS = 10,2g / ml, IC₅₀ DPPH = 15,7g / mL), por ello se indica que los extractos de *Piper imperiale* revelan un alto potencial biológico que puede ser aprovechado (Díaz, et al., 2012, pp. 41-42).

1.5 Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice, estas defensas se las denomina antioxidantes, los niveles bajos de los mismos, o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Alomar, 2015, p. 33).

Los compuesto fenólicos son antioxidantes no nutrientes que cumplen con la función de proteger al organismo de la oxidación producida por los radicales (Avello & Suwalsky, 2009, p. 165).

Tipos de antioxidantes: los antioxidantes se clasifican en endógenos, fabricados por la propia célula, y exógenos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (Criado & Moya, 2009).

Los antioxidantes exógenos más importantes con capacidad antioxidante son las vitaminas y sus fuentes se nombran a continuación:

- La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras (Avello & Suwalsky, 2009, pp. 161-172).
- Los carotenoides son compuestos coloreados tales como los beta carotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli, y las beta criptoxantinas en frutas cítricas (Avello & Suwalsky, 2009, pp. 161-172).
- Los oligoelementos son micronutrientes que se necesitan en poquísima cantidad pero que son esenciales para que puedan desarrollarse correctamente las funciones metabólicas, entre ellos encontramos manganeso, cobre, selenio y zinc actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes, pero también son capaces de ejercer funciones antioxidantes de manera independiente (Merí, 2005, p. 94).

- Flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. En función de sus características estructurales se clasifican en: Flavonas, como la catequina con un grupo –OH; los flavonoles representados por la quercitina que posee un grupo carbonilo; y las antocianidinas (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002, p. 272).
- El β caroteno es precursor de la vitamina A, importante antioxidante lipofílico que neutraliza el oxígeno singlete, su acción es la de proteger el DNA y detener el deterioro de tejidos se tiene como fuentes el tomate, espinacas, melón, melocotón y mango (Delgado, Betanzos, & Sumaya, 2010, p. 11)
- Compuestos fenólicos algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y polifenoles (aceitunas), café, vino tinto y té (Avello & Suwalsky, 2009).
- Compuestos de especias y plantas aromáticas terpenos (Causse, 2010).

Entre los antioxidantes endógenos destacamos: Glutación, Coenzima Q, Acido tioctico, y las enzimas: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, Glutación peroxidasa. La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrogeno. Está presente en todas las células, con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula. La catalasa es una enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Se presenta en forma de

hemotetramero y se localiza en los peroxisomas (Criado & Moya, 2009, p. 12).

La coenzima Q10 es un antioxidante soluble en la grasa más importante del cuerpo que defiende tejidos del daño reactivo oxidativa conocido como ubiquinone se encuentra en todas las membranas celulares (Downey,CA, 2015).

1.6 Radicales libres

Según Finkel y Holbrook (2000) son átomos muy reactivos que tiene la capacidad de reaccionar con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor, debido a que poseen un electrón desapareado o libre buscan alcanzar estabilidad electroquímica captando un electrón de una molécula estable, una vez alcanzado el objetivo, la molécula que se ha cedido su electrón queda desapareado, convirtiéndolo en un radical libre, esta reacción producida en cadena, es la responsable de la destrucción celular produciendo su degeneración y muerte, es posible controlarlo por medio del consumo de antioxidantes (Avello & Suwalsky, 2009, p. 62).

Existen 2 tipos de radicales libres como el Hidróxilo (OH), Peróxilo (ROO), Hidroperoxilo (HOO), Superóxido (O₂⁻), Óxido Nítrico (NO), Alcoxilo (RO.), y Dióxido nitrógeno (NO₂.) y los no-radicales: Peróxidos orgánicos (ROOH), Óxigeno singlete (O₂), Peróxido hidrógeno (H₂O₂), Ác. Hipocloroso (HClO), Ac. Nitroso (HNO₂), Cation nitrilo (NO₂⁺), Peroxinitrilo (ONOO⁻), Ac. peroxinitroso (ONOOH), Alquilperoxinitritos (ROONO), Ozono (O₃), Ac. hipobromoso (HBrO) (Lacalle, 2007, p. 9).

El estrés oxidativo, según Gutteridge y Halliwell (1999) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidativos y/o son fácilmente convertidos a radicales. Estos juegan un papel muy importante en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. Cuando el aumento del contenido intracelular del estrés oxidativo sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello & Suwalsky, 2009, p. 63).

1.7 Mecanismos de acción de los antioxidantes

“Los antioxidantes logran retrasar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos alterar el daño oxidativo de las moléculas afectadas”
(Alomar, 2015, p. 67).

Se clasifican en:

Antioxidantes preventivos: al comienzo de una cadena de oxidación (reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos) ej.: enzimas, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa (Alomar, 2015, p. 7).

Antioxidantes secundarios: bloqueando en alguna etapa la cadena de oxidación, una vez iniciada, captando radicales libres, Ej.: vitamina E y C, enzima superóxido dismutasa (Alomar, 2015, p. 7).

Antioxidantes enzimáticos: Superóxido dismutasa (SOD) es el único antioxidante enzimático conocido que se encarga de eliminar los radicales O_2 , además se conoce que tres isoenzimas que por la presencia de un metal determinado en su centro activo (Mn-SOD, Fe-SOD o Cu, Zn-SOD) se diferencian para provocar la dismutación del radical superóxido hasta H_2O_2 y O_2 (Hernández, 2013).

Además, esta batería de enzimas está apoyada por otras enzimas que actúan regenerando moléculas antioxidantes que son empleadas por las enzimas eliminadoras de H_2O_2 . En este grupo, destacan las enzimas deshidro ascorbato reductasa y (DHAR) mono deshidro ascorbato reductasa (MDHAR) cuya acción es la de regenerar ascorbato o vitamina C. Glutación reductasa (GR) regenera glutación reducido (GSH) que es empleado por la DHAR en el reciclaje del ascorbato. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G_6PDH) produce NADPH, que es empleado por la actividad GR en el reciclaje del GSH a partir de glutación oxidado (GSSG) (Hernández, 2013).

1.8 Métodos de actividad antioxidante

Los métodos mencionados a continuación miden el potencial antioxidante de los aceites esenciales los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres, el uso del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2',azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS, test del status antioxidante total) (Castañeda, Ramos, & Ibáñez, 2008).

1.8.1 Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) se le conoce como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517nm. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidante (Universidad Tecnológica de Pereira-Tovar del Rio, Jennifer;2013, pp. 15-17).

Para realizar la actividad antioxidante utilizando el radical DPPH, se toman 100µl disuelto en metanol o etanol al 80%, a una longitud de onda de 517nm. Se añade 0,1ml de la muestra y se mezclan bien hasta llegar homogenizar cuidadosamente, se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Una vez transcurridos los 30 minutos se comienza realizando las medidas de absorción a 517nm ya pasados los primeros 30 minutos y luego pasados los primeros 60 minutos. La curva de calibrado que se obtiene por regresión lineal es lo que permitirá determinar la concentración del radical DPPH (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005, pp. 726-732).

Estructura del DPPH antes y después de reaccionar con un antioxidante

(AH)

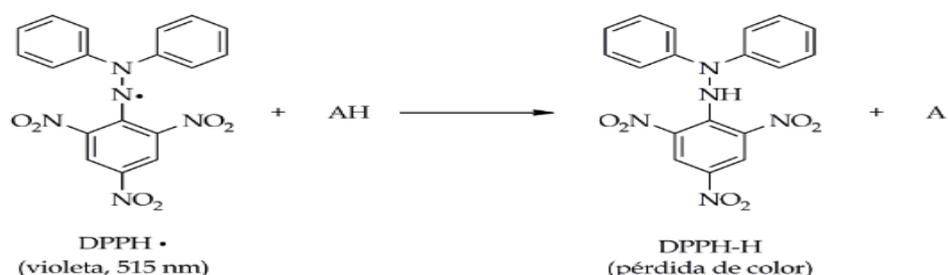


Figura 1. La solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, y el color violeta se desvanece. Tomada de la “Determinación de la actividad antioxidante por DPPH Y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Eco región Cafetera” por Tovar del Rio, Jennifer, 2013.

La actividad del barrido del radical para cada muestra se calcula siguiendo la fórmula del porcentaje de inhibición de DPPH:

Ecuación 1: Porcentaje de inhibición de DPPH

$$\% \text{ de inhibición DPPH} = 1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

El IC₅₀ es calculado a partir de las curvas de inhibición obtenidas mediante el trazado de porcentaje de inhibición frente a la concentración de aceites (Noriega, y otros, 2015, pág. 30).

Según Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008 citado por (UPS-Abad, Juan; Cabezas, Diana, 2014); “afirma que el IC₅₀ definido como la cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50% la inhibición, es decir la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de reducir en 50% del radical DPPH”

1.8.2 Método del ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico).

Actualmente el método ABTS tiene un amplio uso tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2,45mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005, pp. 726-732).

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es soluble en agua y químicamente estable. El radical ABTS una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm (Lacalle, 2007, p. 9).

Una vez formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70nm a 754nm. Las muestras que serán evaluadas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco. Para evaluar la actividad antioxidante se tomó 980 μl de dilución del radical ABTS así generado se le determina la absorbancia de 754nm a 30 $^{\circ}\text{C}$, luego se añade la muestra que contendrá el posible antioxidante y se mide de nuevo la absorbancia de 754nm pasado 1 minuto y después se mide a la misma absorbancia de forma continua transcurridos los 7 minutos (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005, pp. 726-732).

Molécula de (Acido. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6 sulfónico) o ABTS

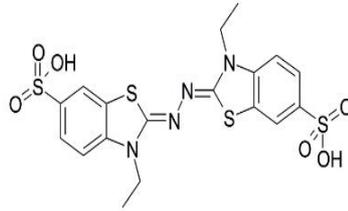


Figura 2. El radical catiónico ABTS^{•+} se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. Tomado de “Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios” por Rojano, Benjamín; Gaviria, Carlos; Gil, Maritza; Saez, Jairo; Schinella, Guillermo; Tournier, Horacio, (2008 p, 175, p).

La actividad del barrido del radical se calculará según la siguiente ecuación:

Ecuación 2: Porcentaje de inhibición de ABTS

$$\% \text{ de inhibición ABTS} = \frac{A-A1}{A} \times 100$$

Donde:

A: Absorbancia de patrón de referencia (blanco).

A1: Absorbancia de la muestra.

El IC₅₀ es calculado a partir del porcentaje de inhibición vs. La concentración de la muestra (Noriega, y otros, 2015).

Según (Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008) citado por (UPS-Abad, Juan; Cabezas, Diana, 2014) se obtiene el IC₅₀ definido como la cantidad de la muestra necesaria para disminuir en un 50% la inhibición, es decir la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de reducir el 50% del radical ABTS.

1.9 Método para evaluar la Actividad Antioxidante

“Es el método más común para evaluar la actividad antioxidante” (Prieto, Rodríguez, Vázquez, & Ma, 2012, p. 57).

1.9.1 Método de Determinación de la actividad antioxidante β – caroteno

“bleaching (BCB) test”.

Basada en la oxidación acoplada de β -caroteno y ácido linoleico. La oxidación de ácido linoleico C13 con la formación de radical peróxilo se produce en presencia de oxidantes, el mismo que es responsable de la propagación de la cadena de radicales adquiriendo un hidrógeno o una segunda molécula de ácido linoléico o de β -caroteno (Hettiarachchy, 2011).

Frankel, 1998 y Kulisic et al., 2004; citado por (Kulisic, Radonic, A, Katalinic, & Milos, 2003) detalla, que la oxidación de ácido linoléico produce radicales hidroperoxilo transformándose hacia hidroperoxilos lipídicos dienos conjugados y subproductos volátiles que reaccionan al mismo tiempo con el cromóforo de β -caroteno que produce el blanqueo de la emulsión de reacción. En esta prueba el β -caroteno en ausencia del antioxidante es sometido a decoloración rápida, lo que produce una reducción en la absorbancia de la solución de ensayo con el aumento de tiempo de reacción. La neutralización de los radicales hidroperoxilo linoleico impide la extensión de la decoloración (Sowndhararajan & Chul Kang, 2013), la presencia de estas determinaciones fueron tomadas por triplicado; (Mallet, et al; 1994) señala que el porcentaje de inhibición fue calculado por la siguiente fórmula:

Ecuación 3: Actividad antioxidante

$$AA = 100[(DR_c - DR_s)/DR_c]$$

Donde $DR_c = [\ln(a/b) / 60]$: Porcentaje de degradación del control, $DR_s = [\ln(a/b)/60]$: Porcentaje de degradación en presencia de la muestra, a es la absorbancia inicial en el tiempo 0 y b : Absorbancia después de 60 min de incubación.

1.10 Estudios Bioautográficos

De acuerdo a Shikov, et al; 2011 citado por (UPS-Abad, Juan; Cabezas, Diana, 2014) Es un método que combina la TLC (Cromatografía en capa fina) y la detección de radical DPPH por decoloración de la zona con actividad antioxidante. Fue utilizado para detectar compuestos antioxidantes presentes en extractos vegetales, sin embargo, el mismo no ofrece una estimación cuantitativa de la actividad anti-radical de cada sustancia después de la separación del extracto directamente sobre la placa de TLC.

Bioautografía: este ensayo separa los componentes activos que se encuentran presentes en el aceite esencial; sobre la superficie de una placa cromatográfica se procede a inyectar una gota del aceite esencial, para luego introducirla en un recipiente que contiene un sistema de disolventes apropiados; así el cromatograma se desarrolla separando los diferentes componentes de la mezcla, una vez completado el recorrido de los disolventes la corrida cromatográfica ha finalizado (Garcia & María, 2014).

Ubicación de los analitos en la placa

Una vez evaporado el disolvente con una lámpara ultravioleta se localiza y se marca con un lápiz cada una de las manchas para luego ser revelado con un indicador fluorescente, que permite la visualización del

componente activo mediante la formación de mancha en la placa, cada una de estas manchas pertenece a un componente o grupo de componentes diferentes (Ortuño, 2006, pág. 74).

Para obtener el parámetro Rf se mide la distancia desde el centro de cada mancha a la línea inferior trazada a lápiz (superior e inferior). Así tendremos un Rf para cada mancha (sustancia) distinta de un cromatograma. El Rf es un valor constante y distinto para cada sustancia química (Ortuño, 2006, pág. 52).

El valor Rf, no puede ser mayor que 1,0 o menor que 0 y se lo calcula con la siguiente fórmula:

Ecuación 4: Valor de Rf

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el problema (origen)}}{\text{distancia recorrida por el frente de disolvente (desde el origen)}}$$

(Durst & Gokel, 2007, pág. 52)

Identificación de Compuestos

Aplicando la técnica analítica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) se consigue la separación de dichas sustancias, que al ser fragmentadas y analizadas permite obtener su patrón de fragmentación que determina un valor que corresponde al índice de retención cromatográfica, que se calcula por comparación de los picos que eluyeron de los aceites en estudio, con las de un eluyente estándar, en condiciones experimentales idénticas, la identificación de los compuestos separados se lo realiza con el apoyo de un simulador matemático que compara los tiempos de elución de los compuestos comparandolos con la información contenida en una base de datos de espectros de masas ya conocidos, con esta información se logra la identificación definitiva de los

compuestos con referencia de la literatura apropiada; Para calcular el índice de retención se aplicó la siguiente fórmula (Prudkouvskii & Dolgonosov, 2008, p. 852):

Ecuación 5: Índice de retención

$$I^t = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + Z \right]$$

Dónde

- I^t = Índice de retención de temperatura programada análisis GC, velocidad de calentamiento constante.
- t_{Ri}^T = Tiempo de retención ajustado del pico de la muestra.
- t_{Rz}^T = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.
- $t_{R(z+1)}^T$ = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente después del pico de la muestra.
- Z = Número de carbonos de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.

Capítulo 2

Metodología

2.1 Material vegetal

Las especies (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*), fueron recolectadas en la Estación Biológica Kutuku de la Universidad Politécnica Salesiana en la localidad de Sevilla Don Bosco, Cantón Macas, Provincia de Morona Santiago. El aceite de *Thymus vulgaris*, fue obtenido de una muestra comercial verificándose por GC/MS su alta concentración de thymol y carvacrol.

2.2 Extracción (arrastre de vapor, condiciones, rendimiento)

Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas frescas de: *Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum*; *Piper imperiale* y *Thymus vulgaris*, usando el método de arrastre de vapor de agua (Kuklinski, 2003). A ebullición durante 5 horas, en el destilador artesanal de acero inoxidable de 250 litros de la Fundación Chankuap, localizada en la Provincia de Morona Santiago en la Ciudad de Macas. El rendimiento fue calculado tomando en cuenta la masa del aceite esencial obtenido en mililitros (mL) y el peso del material vegetal fresco en Kilogramos (Kg) con la:

Ecuación 6: Porcentaje de Rendimiento

$$[\% (W_{AE}/W_{MV}) \times 100]$$

2.3 Determinación de la composición química

Los aceites esenciales fueron analizados en el equipo GC-MS, el análisis fue realizado con un gas Varian 3900 para cromatografía equipado con una columna Factor Cuatro VF-5ms 5% -fenil- 95% -dimetilpolisiloxano (diámetro interior de 30 m × 0,25mm, 0,25 micras de espesor de película) y directamente interconectado a un espectrómetro de masas Varian Saturno 2100. El portador fue gas helio (1ml/ min) con una relación de división de 1:50. La temperatura del horno fue inicialmente 45°C y luego levantado a 100°C a una velocidad de 1°C/ min, a continuación, elevada a 250°C a una velocidad de 5°C/ min, y finalmente se mantuvo a esa temperatura durante 15 min.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: voltaje de ionización, 70eV; corriente de emisión, 10μ Amp; velocidad de barrido, 1scan/min; rango de masas, 35 a 400 Da; temperatura trampa 220°C; temperatura de la línea de transferencia, 260°C.

Entonces la identificación de los compuestos se logró mediante la consulta a la base de datos (NIST 2001) y el cálculo experimental de los índices de retención se determinó con relación al tiempo de retención, a partir de una serie de n-alcanos (C10-C30); el cálculo teórico de los índices de retención fueron comparados con la base de datos de moléculas aromáticas (Noriega, y otros, 2015, pág. 30).

2.4 Valoración de la capacidad captadora de electrones por el método

DPPH

Según Brand- Willams et al. el fundamento del método DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-

violeta, observando un cambio de color hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517nm (Ramos, Castañeda, & Ibañez, 2008, p. 43).

2.4.1 Preparación del reactivo DPPH (2,2- DIFENIL-1-Picrilhidrazil)

Un día previo al desarrollo del ensayo se preparó el reactivo DPPH.

Se pesó en la balanza analítica; OHAUS SC4010; 0.0098 gr del reactivo DPPH disolviéndolo en 100mL de alcohol potable al 96% (DPPH $1 * 10^{-4} M$), seguidamente se lo aforó a un volumen de 250mL de alcohol potable al 96%, conservándolo en un frasco ámbar y en refrigeración.

2.5 Evaluación por método del DPPH

La actividad "captadora de radicales" ha sido evaluada siguiendo el procedimiento reportado por Wang y otros (1998), para ello; se prepararon ocho soluciones a diferentes concentraciones de aceite esencial en frascos ámbar de 3mL y se aforaron con DMSO (dimetil sulfóxido).

2.5.1 Preparación de las soluciones de Aceite Esencial

Para cada uno de los aceites esenciales de *Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*, se preparó una solución madre (1/10): 20ul de aceite esencial + 180ul de DMSO₄, de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 1.
Concentraciones y soluciones

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de aceite esencial+100ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,67
3	5ul de aceite esencial+95ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,67
4	10ul de aceite esencial+90ul de DMSO+2,9ml de DPPH	3,33
5	20ul de aceite esencial+80ul de DMSO+2,9ml de DPPH	6,67
6	50ul de aceite esencial+50ul de DMSO+2,9ml de DPPH	16,67
7	80ul de aceite esencial+20ul de DMSO+2,9ml de DPPH	26,67
8	100ul de aceite esencial+0ul de DMSO+2,9ml de DPPH	33,33

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.5.2 Preparación de la solución de BHA

La solución de BHA es el referente sintético antioxidante, se pesó 0,1000gr BHA (Butilhidroxianisol), 1000ppm, luego se aforó a 100ml de etanol 96% y después se colocó en un frasco ámbar, de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 2.
Concentraciones y soluciones del BHA

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de BHA+100ul DMSO+ 2,9ml de DPPH	0,00E+00
2	2ul de BHA+98ul de DMSO+2,9ml de DPPH	6,67E-04
3	5ul de BHA+95ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,67E-03
4	10ul de BHA+90ul de DMSO+2,9ml de DPPH	3,33E-03
5	20ul de BHA +80ul de DMSO+2,9ml de DPPH	6,67E-03
6	50ul de BHA+50ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,67E-02
7	80ul de BHA+20ul de DMSO+2,9ml de DPPH	2,67E-02
8	100ul de BHA+0ul de DMSO+2,9ml de DPPH	3,33E-02

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.5.3 Preparación de la solución control positivo

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se usó como control positivo captador de electrones, el cual se preparó de la siguiente manera:

- Se preparó una solución madre (1/10) :20ul de aceite esencial de *Thymus vulgaris* + 180ul de DMSO₄, de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 3.
Concentraciones y soluciones del aceite de Tomillo

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de aceite esencial+100ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,07
3	5ul de aceite esencial+95ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,17
4	10ul de aceite esencial+90ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,33
5	20ul de aceite esencial+80ul de DMSO+2,9ml de DPPH	0,67
6	50ul de aceite esencial+50ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,67
7	80ul de aceite esencial+20ul de DMSO+2,9ml de DPPH	2,67
8	100ul de aceite esencial+0ul de DMSO+2,9ml de DPPH	3,33

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.6 Lectura de las soluciones

A todas las soluciones se las agitó en la oscuridad durante 30 minutos e inmediatamente después se midió la absorbancia a 517nm; por triplicado en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240.

2.7 Valoración de la capacidad captadora de electrones por el método ABTS

El ABTS.+ es un radical de nitrógeno de color azul-verde, que cuando se reduce por los antioxidantes a su forma no radical (ABTS) se vuelve incoloro. La capacidad de este antioxidante es cuantificada midiendo la

absorbancia de la reacción antioxidante - radicales a 645, 680, 734, 815 y 820nm, en un tiempo aproximado de 20 min, usando un espectrofotómetro (USFQ-Guevara, Diana;2012, p. 3).

2.7.1 Preparación de la solución madre de ABTS.

Se preparó un día antes, la solución madre de ABTS 2mM disolviendo exactamente 0,0275g de sal amónica cristalizada de ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) en 25ml de agua bidestilada.

2.7.2 Preparación de la solución de (K₂S₂O₈).

A continuación se preparó una solución de 70mM de K₂S₂O₈, disolviendo 0,1882g del reactivo (188.2 mg) de K₂S₂O₈ en 10ml de agua bidestilada.

2.7.3 Preparación del ABTS radicalizado.

A la solución de ABTS radicalar se añadió 250ul de solución K₂S₂O₈, se agitó la mezcla y se conservó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas para la formación del radical. Esta solución es estable durante dos días y permanece azulada.

2.8 Evaluación por método de ABTS

La actividad "captadora de radicales" ha sido evaluada siguiendo el procedimiento reportado por (Wang, et al., 1998), para ello; se prepararon ocho soluciones a diferentes concentraciones de aceite esencial en frascos ámbar de 3mL y se aforaron con DMSO (dimetil sulfoxido).

2.8.1 Preparación de las soluciones de Aceite Esencial.

Para cada uno de los aceites esenciales (*Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Eugenia stipitata*; *Piper auritum* y *Piper imperiale*)

- Se preparó una solución madre (1/10) : 20ul de aceite esencial + 180ul de DMSO₄, de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 4.
Concentraciones y soluciones ABTS

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de aceite esencial+100ul de DMSO+0,9 ml de ABTS	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de DMSO+0,9ml de ABTS	0,20
3	5ul de aceite esencial+95ul de DMSO+0,9ml de ABTS	0,50
4	10ul de aceite esencial+90ul de DMSO+0,9ml de ABTS	1,00
5	20ul de aceite esencial+80ul de DMSO+0,9ml de ABTS	2,00
6	50ul de aceite esencial+50ul de DMSO+0,9ml de ABTS	5,00
7	80ul de aceite esencial+20ul de DMSO+0,9ml de ABTS	8,00
8	100ul de aceite esencial+0ul de DMSO+0,9ml de ABTS	10,00

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.8.2 Preparación de la solución de BHA.

La solución de BHA es el referente sintético antioxidante, se pesó 0,1000gr BHA (Butilhidroxianisol), 1000ppm, luego se aforó a 100ml de etanol 96% y después se colocó en un frasco ámbar, de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 5.
Concentraciones y soluciones del BHA

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de BHA+100ul DMSO+ 2,9ml de DPPH	0,00
2	2ul de BHA+98ul de DMSO+2,9ml de DPPH	2,00E-03
3	5ul de BHA+95ul de DMSO+2,9ml de DPPH	5,00E-03
4	10ul de BHA+90ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,00E-02
5	20ul de BHA +80ul de DMSO+2,9ml de DPPH	2,00E-02
6	50ul de BHA+50ul de DMSO+2,9ml de DPPH	5,00E-02
7	80ul de BHA+20ul de DMSO+2,9ml de DPPH	8,00E-02
8	100ul de BHA+0ul de DMSO+2,9ml de DPPH	1,00E-01

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.8.3 Preparación de la solución control positivo.

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se usó como control positivo captador de electrones, el cual se preparó de la siguiente manera:

- Se preparó una solución madre (1/50) : 4ul de aceite esencial de *Thymus vulgaris* + 196ul de DMSO₄ , de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 6.
Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de *Thymus vulgaris*

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de aceite esencial+100ul de DMSO+0,9 ml de ABTS	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de DMSO+0,9ml de ABTS	4,00E-02
3	5ul de aceite esencial+95ul de DMSO+0,9ml de ABTS	1,00E-01
4	10ul de aceite esencial+90ul de DMSO+0,9ml de ABTS	2,00E-01
5	20ul de aceite esencial+80ul de DMSO+0,9ml de ABTS	4,00E-01
6	50ul de aceite esencial+50ul de DMSO+0,9ml de ABTS	1,00
7	80ul de aceite esencial+20ul de DMSO+0,9ml de ABTS	1,60
8	100ul de aceite esencial+0ul de DMSO+0,9 ml de ABTS	2,00

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

2.8.4 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.

Para cada una de las lecturas se tomó 2mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25mL de etanol 96% hasta obtener una absorbancia $734\text{nm} = 0,70 \pm 0,02$ a 517nm .

2.9 Lectura del blanco

Se tomó 2,7mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y posteriormente se añadió 0,3mL de etanol, en la cubeta se agitó por un minuto y se procedió a leer la absorbancia.

2.10 Lectura de las soluciones

Se tomó 0,9mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió DMSO, y 0,03mL de cada solución de aceite esencial, se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 517nm por triplicado en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240, a cada una de las soluciones.

2.11 Evaluación de la actividad antioxidante con el β -carotene bleaching (BCB) test

La actividad antioxidante de los compuestos volátiles de los aceites ensayados fueron determinados de acuerdo a la versión modificada de método del β -carotene bleaching method.

2.11.1 Preparación de la emulsión de β -carotene.

Se preparó una solución (A) el β -carotene (10mg) fue disuelto en cloroformo (10mL); en un balón volumétrico preparamos una solución de ácido linoleico (400ul) añadimos Tween 20 (8mL) y de 4mL de la solución (A), a continuación se llevó esta mezcla al rotavapor al vacío a 40° C durante 5 minutos o hasta la completa evaporación del cloroformo; agua destilada (1000mL) fue añadida y agitada hasta formar una emulsión. Posteriormente en un vaso de precipitación se pesó Tris (4,728g) para formar una solución con agua destilada (300mL) de PH 7,4.

2.11.2 Preparación de las soluciones de Aceite Esencial.

Para cada uno de los aceites esenciales (*Eugenia stipitata*; *Ocotea quixos*; *Psidium guajava*; *Piper auritum*; *Piper imperiale*) se preparó una solución madre:

- Aceite esencial (500ul) + Tween20 (1mL)

De la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación

Tabla 7.
Concentraciones y soluciones para los 5 aceites esenciales

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de aceite esencial+100ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	2,56E-02
3	5ul de aceite esencial+95ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	6,41E-02
4	10ul de aceite esencial+90ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,28E-01
5	20ul de aceite esencial+80ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	2,56E-01
6	50ul de aceite esencial+50ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	6,41E-01
7	80ul de aceite esencial+20ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,03E+00
8	100ul de aceite esencial+0ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,28E+00

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

El resultado de la mezcla de estos compuestos fueron denominados solución (C) de la misma se tomó (200ul) de cada uno que fueron depositados en frascos ámbar

correctamente etiquetados, seguidamente añadimos a cada frasco la solución (A) que fue preparada, (5mL).

En un vaso de precipitación se obtuvo una solución (D) que consistió en la mezcla de la solución (C) (200ul) y la adición de la solución (A) (5mL).

2.11.3 Preparación de las soluciones de BHA.

- Se preparó una solución madre de BHA: (0,50ul) + Tween20 (1mL) denominada solución (B), de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 8.
Concentraciones y soluciones del BHA

Solución	Preparación	Concentración ul/mL
1	0ul de BHA+100ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	0,00
2	2ul de BHA+98ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	2,56E-05
3	5ul de BHA+95ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	6,41E-05
4	10ul de BHA+90ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,28E-04
5	20ul de BHA +80ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	2,56E-04
6	50ul de BHA+50ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	6,41E-04
7	80ul de BHA+20ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,03E-03
8	100ul de BHA+0ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,28E-03

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

El resultado de la mezcla de estos compuestos fueron denominados solución (C) de la misma se tomó (200ul) de cada uno que fueron depositados en frascos ámbar correctamente etiquetados, seguidamente añadimos a cada frasco la solución (A) que fue preparada, (5mL).

En un vaso de precipitación se obtuvo una solución (D) que consistió en la mezcla de la solución (C) (200ul) y la adición de la solución (A) (5mL).

2.11.4 Preparación de la solución control positivo.

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se usó como control positivo el cual se preparó de la siguiente manera:

- Se preparó una solución madre de Aceite Esencial de *Thymus vulgaris*: (0,50ul) disuelto + Tween20 (1mL) denominada solución (B), de la que se tomó los siguientes volúmenes descritos a continuación:

Tabla 9.
Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de *Thymus vulgaris*

Solución	Preparación	Concentración ul/ml
1	0ul de aceite esencial+100ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	0,00
2	2ul de aceite esencial+98ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	3,66E-03
3	5ul de aceite esencial+95ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	9,16E-03
4	10ul de aceite esencial+90ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,83E-02
5	20ul de aceite esencial+80ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	3,66E-02
6	50ul de aceite esencial+50ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	9,16E-02
7	80ul de aceite esencial+20ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,47E-01
8	100ul de aceite esencial+0ul de etanol 95 %+ 900ul de TRIS	1,83E-01

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

El resultado de la mezcla de estos compuestos fueron denominados solución (C) de la misma se tomó (200ul) de cada uno que fueron depositados en frascos ámbar correctamente etiquetados, seguidamente añadimos a cada frasco la solución (A) que fue preparada, (5mL).

En un vaso de precipitación se obtuvo una solución (D) que consistió en la mezcla de la solución (C) (200ul) y la adición de la solución (A) (5mL).

2.12 Lectura de las soluciones

Las lecturas de todas las muestras fueron tomadas inmediatamente ($t=0$), seguidamente los frascos fueron incubados a 50°C en el lapso de 60 minutos para luego ser medidos en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 a la absorbancia de 754nm, por triplicado.

2.13 Identificación de los compuestos con actividad antioxidante de los aceites esenciales amazónicos en estudio, mediante el método TLC-DPPH

El ensayo modificado se llevó a cabo por el método desrito por (Shicov et al., 2011) citado por (Abad & Cabezas, 2014).

2.13.1 Preparación del aceite para inyectar.

En un tubo eppendorf, se preparó una muestra que contiene 30ul de aceite esencial, adicionado 1ml de metanol grado HPLC.

2.13.2 Elaboración de la fase móvil.

En una probeta se midió 100mL de tolueno, 10mL de acetato de etilo y 30mL de eter de petróleo para luego depositarlo todo en un frasco ambar, para ser conservado en refrigeración.

2.13.3 Preparación de la placa TLC.

Se seleccionó la placa cromatográfica de Silica gel, a continuación se colocó la placa cromatográfica sobre el equipo, y tomando con una jeringa 15ul de la muestra preparada anteriormente para después Programar el inyector automático en el Equipo Linomat, usando el software winCATS.

En la cámara para la placa TLC se añadió la fase móvil hasta 1cm antes del borde superior de la placa, inmediatamente la placa fue sometida a secado con aire frío.

2.13.4 Revelado de la placa con DPPH.

Se preparó una solución de DPPH 0.5%, se usó un dispersor para extender la solución uniformemente cubriendo toda la placa.

Se conservó la placa en la oscuridad, durante 30 minutos, para posteriormente observar y señalar las manchas de la decoloración del DPPH (de morado a amarillo), seguidamente se procede a calcular su respectivo Rf, utilizando la Ecuación 4, citada anteriormente.

2.14 Evaluación GC/MS de las fracciones separadas por TLC

Por observación se identificó los aceites que presentaron decoloración luego del revelado con la solución de DPPH y se analizó cada una de las fracciones por el equipo de GC/MS.

2.14.1 Ubicación de fracciones antioxidantes.

Se ubica la localización las fracciones que presentan actividad por medio de los Rf calculados que presentaron decoloración, a continuación por medio del raspado a la placa con una espátula se obtuvo un polvo blanco, que lo colocamos en un tubo eppendorf y se añadió 1ml de diclorometano grado HPLC, para posteriormente centrifugarlo a 4000 rpm, durante 10 minutos.

A continuación, con una jeringa se midió 10ul de este sobrenadante, se realizó 2 lavadas como mínimo con el sobrenadante antes de ser inyectado, a manera de

enjuague, se tomó 2ul del sobrenadante que se inyectó en el equipo CG Varian 3900 acoplado a un MS Varian 2000.

El procedimiento para cada aceite esencial se lo realizó por Triplicado, para verificar su reproducibilidad y las condiciones del GC/MS fueron las mismas usadas en el estudio de composición química de los aceites esenciales.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1 Rendimiento de los 5 aceites esenciales Amazónicos

A continuación se detalla los volúmenes de aceite esencial producto de la destilación.

Tabla 10.
Rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por el método de inyección de vapor de agua

	Material vegetal (Kg)	mL	Rendimiento (mL/Kg)
<i>Eugenia stipitata</i>	6	1,5	0,25
<i>Ocotea quixos</i>	30	30	1
<i>Piper auritum</i>	14,302	6,7	0,46
<i>Piper imperiale</i>	11,804	7	0,59
<i>Psidium guajava</i>	25,424	18	0,7

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.2 Composición química

A continuación se indican los componentes químicos presentes en los aceites esenciales y el porcentaje de cada uno:

Para *Eugenia stipitata* se encontraron 30 compuestos de los cuales fueron identificados el 83,33 % y los mayoritarios son; Muurolene γ , Caryophyllene E, Cadinene δ (Anexo 1).

Para *Ocotea quixos* se encontraron 28 compuestos de los cuales fueron identificados el 96,4 % y los mayoritarios son; Caryophyllene E, Humulene α , Methyl cinnamate E, Caryophyllene Oxide y Copaene α . (Anexo 2).

Para *Psidium guajava* se encontraron 17 compuestos de los cuales fueron identificados el 88,2% y los mayoritarios son; Limonene, Pinene α , Caryophyllene E, Selinene α , Selinene β , y Thujene α . (Anexo 3).

Para *Piper auritum* se encontraron 15 compuestos de los cuales fueron identificados el 93,3 y los mayoritarios son; Terpinene γ , Terpinolene, Safrol, Terpinene α , Caryophyllene E, Muurolene γ , Ocimene (E- β), y Ocimene (z- β) (Anexo 4).

Para *Piper imperiale* se encontraron 27 compuestos de los cuales fueron identificados el 100% y los mayoritarios son; Dimethoxy-5-vinyl-1,2-benzodioxide (4,6), Caryophyllene Z, Asarona, Isoelimicin, Selina-3,7 (11)-diene, Calamenene <trans>, Caryophyllene Oxide, y Calacorene β (Anexo 5).

Tabla 11.
Porcentaje de composición química de 5 aceites esenciales amazónicos

Compuesto	IK _A	<i>Psidium guajava</i>	<i>Piper auritum</i>	<i>Ocotea quixos</i>	<i>Eugenia stipitata</i>	<i>Piper imperiale</i>
thujene α	930	5,82 \pm 4,43	0,308 \pm 0,10	0,445 \pm 0,058		0,71 \pm 0,14
pinene α	939	25,82 \pm 3,78	0,585 \pm 0,22	3,437 \pm 0,497		
camphene	954			0,404 \pm 0,057		0,80 \pm 0,15
sabinene	975		0,387 \pm 0,08	1,023 \pm 0,144		
pinene β	979		0,588 \pm 0,18	2,682 \pm 0,359		
terpinene α	1017		3,518 \pm 0,85			
cymene (p)	1024		0,675 \pm 0,01	1,463 \pm 0,173		
limonene	1029	28,911 \pm 2,18		1,507 \pm 0,176		
cineole 1,8	1031	1,204 \pm 0,63		3,241 \pm 0,388		
ocimene (z- β)	1037		0,914 \pm 0,06			
ocimene (e- β)	1050		0,959 \pm 0,02			
terpinene γ	1059		9,284 \pm 2,72	1,246 \pm 0,150		
terpinolene	1088		7,089 \pm 1,53			
linalol	1096					2,76 \pm 0,50
elemene δ	1338				4,68 \pm 0,43	
cubebene α	1351					0,49 \pm 0,04
copaene α	1376	3,557 \pm 0,44	0,657 \pm 0,02	4,070 \pm 0,268	5,20 \pm 0,25	1,66 \pm 0,13
methyl cinnamate e	1378			11,992 \pm 0,304		
cubebene β	1388				0,75 \pm 0,16	1,68 \pm 0,12
elemene β	1390			1,043 \pm 0,020	1,46 \pm 0,03	0,38 \pm 0,03
cyperene	1398					0,39 \pm 0,04
caryophyllene z	1408					14,58 \pm 0,84

Compuesto	IK _A	<i>Psidium guajava</i>	<i>Piper auritum</i>	<i>Ocotea quixos</i>	<i>Eugenia stipitata</i>	<i>Piper imperiale</i>
gurjunene α	1409				0,53 \pm 0,11	
caryophyllene e	1419	11,88 \pm 1,30	1,103 \pm 0,07	18,224 \pm 0,822	12,11 \pm 0,19	
copaene β	1432				2,68 \pm 0,12	
elemene γ	1436				0,78 \pm 0,05	
guaiene α	1439				1,18 \pm 0,06	
aromadendrene	1441				0,53 \pm 0,05	
cinnamyl acetate e	1446			7,001 \pm 0,716		
muurolo -3,5-diene<cis>	1450				0,66 \pm 0,06	2,14 \pm 0,10
humulene α	1454			16,384 \pm 0,767		1,35 \pm 0,03
aromadendrene <allo>	1460	0,476 \pm 0,04				
caryophyllene <9-epi-e>	1466				0,57 \pm 0,06	
muurolo-4(14),5-diene <cis>	1466				0,54 \pm 0,11	
dauca-5,8-diene	1472					0,68 \pm 0,04
cadina-1(6),4-diene <trans>	1476				0,68 \pm 0,04	
muurolene γ	1479	0,314 \pm 0,07	0,928 \pm 0,023	0,252 \pm 0,011	22,34 \pm 1,19	0,42 \pm 0,04
germacrene d	1481				5,04 \pm 0,19	
amorpha-4.7 (11)-diene	1481				0,54 \pm 0,03	
selinene β	1490	7,042 \pm 0,90		1,427 \pm 0,183		
methyl isoeugenol e <trans>	1492			2,368 \pm 0,471		
guaiene cis β	1493				1,88 \pm 0,46	
muurolo-4 (14),5-diene <trans>	1493					1,51 \pm 0,03
valencene	1496					0,28 \pm 0,01
selinene α	1498	7,084 \pm 1,19				
muurolene α	1500	0,18 \pm 0,03				

compuesto	IK _A	<i>Psidium guajava</i>	<i>Piper auritum</i>	<i>Ocotea quixos</i>	<i>Eugenia stipitata</i>	<i>Piper imperiale</i>
bicyclogermacrene	1500			2,081±0,068		
himachalene β	1500			0,762±0,045		
muurolene α	1500				2,90±0,07	0,45±0,14
patchoulene gamma	1502				0,84±0,03	
cadinene γ	1513	0,24±0,08				
cadinene gamma	1513				1,53±0,03	
calamenene <trans>	1522					6,96±0,11
cadinene δ	1523	1,63±0,23		2,609±0,189		0,89±0,24
calamenene <cis>	1529	0,99±0,18				
zonarene	1529				0,15±0,00	
bisabolene e-γ	1531			3,102±0,160		
cadina-1,4-diene <trans>	1534					0,29±0,05
cadinene α	1538				0,54±0,01	
calacorene α	1545			0,416±0,012		
selina-3,7 (11)-diene	1546					9,29±0,13
calacorene β	1565					4,23±0,17
isoelimicin	1570					10,17±0,53
dendrolasin	1571			0,479±0,042		
spathulenol	1578			0,344±0,082		0,21±0,02
caryophyllene oxide	1583			3,566±0,413		5,21±0,07
guaiol	1600				0,53±0,12	
humulene epoxide ii	1608			2,059±0,093		
dimethoxy-5-vinyl-1,2-benzodioxide(4,6)	1654					14,71±0,72
calamenen-10,ol <trans>	1669					0,50±0,07

Compuesto	IK _A	<i>Psidium guajava</i>	<i>Piper auritum</i>	<i>Ocotea quixos</i>	<i>Eugenia stipitata</i>	<i>Piper imperiale</i>
tetradecanol	1672				0,99±0,53	
asarona	1676					13,01±0,92
heptadecane(n)	1700				0,24±0,07	

Los compuestos fueron identificados sobre la base de la comparación con los espectros de los datos MS, los índices de retención y productos químicos puros de referencia, se enumeran en el orden de elución de una columna columnaSE52;IK A: Índice de Kovats teórico de acuerdo a una serie de alcanos C8-C30 (Adams, 2007).

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.3 Valoración de la capacidad captadora de electrones por DPPH

Se evaluó la captación de radicales libres tomando tres determinaciones espectrofotométricas con una concentración determinada para cada aceite esencial, en la siguientes tablas se muestran los tres valores de porcentaje de inhibición IC₅₀ calculados mediante la ecuación 1, despejando la variable (x) y reemplazando (y) por el 50 que corresponde al porcentaje del 50 % de inhibición al radical de DPPH.

Tabla 12.
Aceite esencial de Arazá (*Eugenia stipitata*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,667	2,874	3,218	3,218
1,667	7,241	7,241	7,241
3,333	15,402	15,402	15,287
6,667	25,402	25,287	25,402
IC ₅₀ µl/mL	12,818	12,911	12,868

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 6.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 13.
Aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
1,667	14,395	14,423	14,423
3,333	19,386	19,423	19,615
6,667	32,821	32,692	32,885
16,667	59,501	58,654	58,846
26,667	71,977	72,115	72,115
IC ₅₀ µl/mL	11,238	11,287	11,348

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 7.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 14.
Aceite esencial de Sacha anís (*Piper auritum*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,667	8,893	8,997	8,997
1,667	18,614	18,614	18,614
3,333	35,16	35,16	35,16
6,667	57,808	57,808	57,808
16,667	86,35	86,453	86,453
26,667	90,589	90,589	90,589
33,333	91,003	91,107	91,107
IC ₅₀ µl/mL	4,937	4,928	4,928

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 8.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 15.
Aceite esencial de Ampar (*Piper imperiale*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
6,667	0,762	0,762	0,762
16,667	2,067	2,067	2,067
26,667	4,57	4,57	4,57
33,333	5,005	4,897	5,005
IC ₅₀ µl/mL	312,185	316,8	312,185

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 9.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 16.
Aceite esencial de Guayaba (*Psidium guajava*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,667	0	0,295	0
3,333	2,655	3,245	2,959
6,667	2,95	5,015	5,03
16,667	0	12,094	11,834
26,667	11,799	16,519	17,16
33,333	15,634	21,239	20,118
IC ₅₀ µl/mL	109,717	79,201	80,446

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 10.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 17.
Aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,07	6,48	6,39	6,3
0,17	26,04	25,96	26,02
0,33	31,41	31,24	31,2
0,67	49,04	49,19	49,29
1,67	64,84	64,91	64,84
2,67	83,89	83,67	83,64
3,33	92,3	92,19	92,17
IC ₅₀ µl/mL	0,609	0,609	0,608

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 11.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 18.
BHA

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,001	0,999	0,899	0,999
0,002	12,188	12,288	12,288
0,003	33,367	33,666	33,966
0,017	76,823	77,123	77,123
0,027	85,514	85,514	85,514
0,033	87,013	87,013	87,013
IC ₅₀ μl/mL	0,006	0,006	0,006

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 12.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.4 Valoración de la capacidad captadora de electrones por ABTS

Se evaluó la captación de radicales libres tomando tres determinaciones espectrofotométricas con una concentración determinada para cada aceite esencial, en la siguientes tablas se muestran los tres valores de porcentaje de inhibición IC₅₀ calculados mediante la ecuación 1, despejando la variable (x) y reemplazando (y) por el 50 que corresponde al porcentaje del 50% de inhibición al radical de ABTS.

Tabla 19.
Aceite esencial de Arazá (*Eugenia stipitata*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,2	1,24	1,24	1,24
0,5	1,24	1,42	1,59
1	4,26	4,07	4,06
2	8,51	8,5	8,48
5	13,48	13,63	13,6
8	22,87	22,83	22,79
10	26,06	26,02	25,97
IC ₅₀ µl/mL	18,807	18,821	18,875

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 13.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 20.
Aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*)

Concentración (ul/mL)	% inhibición 1	% inhibición 2	% inhibición 3
0	0	0	0,00
0,2	3,04	2,88	2,88
0,5	4,48	4,48	4,47
1	8,32	8,16	8,15
2	19,36	19,2	19,17
5	40,96	40,96	41,05
8	52,8	52,64	52,40
10	56,32	56,16	56,07
IC ₅₀ µl/mL	7,877	7,899	7,916

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 14.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 21.
Aceites esencial de Sacha anís (*Piper auritum*)

Concentración (ul/mL)	% inhibición 1	% inhibición 2	% inhibición 3
0	0	0	0,00
0,2	1,18	1,18	1,18
0,5	1,18	1,35	1,35
1	11,51	11,32	11,30
2	31,47	31,42	31,37
5	61,42	61,49	61,38
8	81,56	81,59	81,62
10	84,72	84,73	84,76
IC ₅₀ µl/mL	2,96	2,96	2,96

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 15.
 Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 22.
Aceite esencial de Ampar (*Piper imperiale*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,5	0,32	0,32	0,64
5	1,19	1,31	1,44
8	2,32	2,46	2,57
IC ₅₀ µl/mL	185,689	173,077	175,521

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 16.
 Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 23.
Aceites esencial de Guayaba (*Psidium guayaba*)

Concentración (ul/mL)	% inhibición 1	% inhibición 2	% inhibición 3
0	0	0	0
1	0,16	0,16	0,48
2	1,92	1,76	1,76
5	4,64	4,48	4,47
8	8,16	8,16	8,15
10	9,44	9,44	9,58
IC ₅₀ µl/mL	50,188	50,096	50,182

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 17.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 24.
Aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Concentración (ul/mL)	% inhibición 1	% inhibición 2	% inhibición 3
0	0	0	0
0,04	12,83	12,67	12,5
0,1	25	24,83	24,67
0,2	39,17	39	38,83
0,4	55,83	55,5	55,33
1	73,83	73,67	73,67
IC ₅₀ µl/mL	0,31	0,32	0,32

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 18.

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 25.
BHA

Concentración (ul/mL)	% inhibición 1	% inhibición 2	% inhibición 3
0	0	0	0
0,002	19,69	19,91	20,12
0,005	71,7	71,7	71,67
0,010	95,63	95,63	95,6
0,020	98,97	98,96	98,96
0,050	99,14	99,13	99,1
0,080	99,06	98,91	98,61
0,100	99,08	99,08	99,09
IC ₅₀ µl/mL	0,003	0,002	0,002

El cálculo del IC 50 se realizó en relación de concentración y el % de inhibición, ver anexo 19.
Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.5 Evaluación de la actividad antioxidante β –caroteno “bleaching (BCB) test”

En las siguientes tablas se mide el blanqueo del β – caroteno resultante de la oxidación de productos degradados del ácido linoléico, esta actividad antioxidante se determinó tomando los resultados espectrofotométricos de las absorbancias para cada uno de los aceites esenciales en estudio, por triplicado, a continuación se determinó mediante la ecuación 3 la actividad antioxidante.

Por medio de una representación gráfica de la concentración del aceite esencial vs la actividad antioxidante, se obtuvo una ecuación de la que se despejó la variable (x) y la variable (y) fue reemplazada por 50 que corresponde al porcentaje de inhibición al 50% del β – caroteno y su resultado determina el IC₅₀ de cada aceite en estudio.

Tabla 26.
Aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0,000	0,000	0,000	0,000
0,064	1,918	0,000	0,000
0,128	10,066	9,108	9,345
0,256	36,118	35,358	34,561
0,641	68,64	69,092	69,361
1,026	73,523	73,616	74,793
1,282	79,977	80,348	80,19
IC ₅₀ µl/mL	0,415	0,436	0,434

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 20

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 27.
Aceite esencial de Sacha anís (*Piper auritum*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,026	47,314	43,86	43,716
0,064	63,287	60,868	60,755
0,641	80,899	80,232	80,625
1,026	85,816	85,195	85,121
1,282	92,067	91,742	91,545
IC ₅₀ µl/mL	0,026	0,035	0,035

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 21

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 28.
Aceite esencial de Ampar (*Piper imperiale*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,026	-107,264	-105,646	-68,728
0,641	-60,53	-58,882	-64,412
1,026	-17,409	-18,578	-19,817
1,282	-6,813	-6,543	-10,826
IC ₅₀ µl/mL	25,478	6,934	112,123

El cálculo del IC50 se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 22

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 29.
Aceite esencial de Guayaba (*Psidium guajava*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0	0	0	0
0,026	9,153	10,762	11,825
0,064	24,629	25,793	25,646
0,128	34,013	34,499	34,574
0,256	60,426	59,914	59,51
0,641	72,035	72,617	72,904
1,026	78,126	78,155	78,241
1,282	83,54	83,657	83,619
IC ₅₀ µl/mL	0,22	0,214	0,212

El cálculo del IC50 se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 23

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 30.
Aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0,004	18,401	19,705	19,705
0,009	63,357	64,954	65,157
0,018	74,365	75,25	75,688
0,037	81,919	82,914	82,561
0,092	89,519	90,187	90,26
IC ₅₀ µl/mL	0,0087	0,00815	0,00811

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 24

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Tabla 31.
BHA

Concentración (ul/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
0,0000256	55,485762	62,6431579	64,3650842
0,000256	86,3842951	88,2593924	88,2754513
0,000641	93,6057617	94,4448318	94,278937
0,001026	95,9720443	96,5267574	96,3731014
0,001282	97,2591293	97,3577805	97,491938
IC ₅₀ µl/mL	0,000013	0,00000532	0,00000411

El cálculo del IC₅₀ se realizó en relación de concentración y % de inhibición AA (actividad antioxidante) ver anexo 25

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Los datos resultantes del promedio IC₅₀, ensayo realizado para cada uno de los aceites esenciales en estudio se analizaron mediante el software R y su representación gráfica es la siguiente:

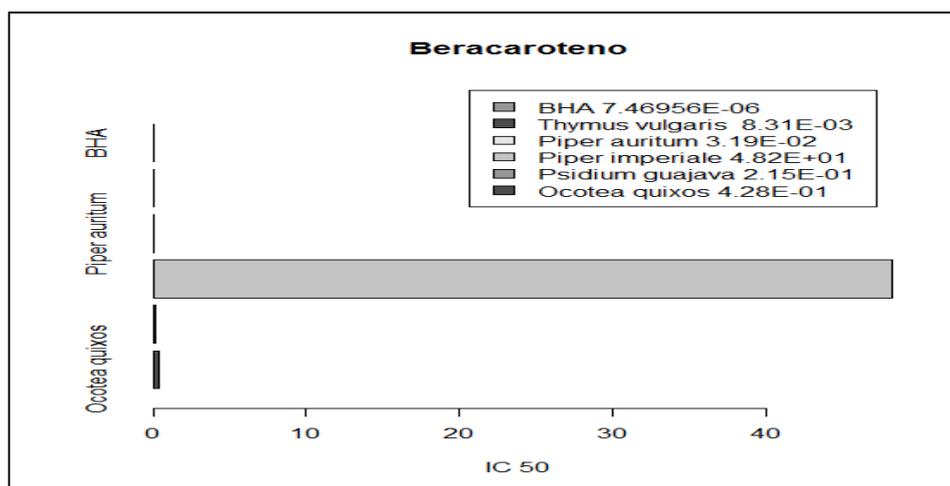


Figura 3: Descripción de la actividad antioxidante β caroteno test

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.6 Evaluación comparativa DPPH VS. ABTS

A partir de los datos espectrofotométricos por triplicado se calculó el IC₅₀ para cada aceite esencial en estudio, en la siguiente tabla se resumen los valores promedios obtenidos de IC₅₀ correspondiente a los ensayos para determinar la captación de radicales libres que poseen los aceites esenciales.

Tabla 32.
DPPH VS. ABTS

ACEITE ESENCIAL	DPPH IC ₅₀ ul/mL	ABTS IC ₅₀ ul/mL
<i>Eugenia stipitata</i>	12.868	18.834
<i>Ocotea quixos</i>	11.291	7.897
<i>Psidium guajava</i>	89.788	50.155
<i>Piper imperiale</i>	313.724	179.383
<i>Piper auritum</i>	4.931	2.961
<i>Thymus vulgaris</i>	0.608	0.315
BHA	0.006	0.00248

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

A continuación en la siguiente Figura se observa los picos generados al comparar los dos métodos utilizados para determinar la capacidad secuestrante de electrones.

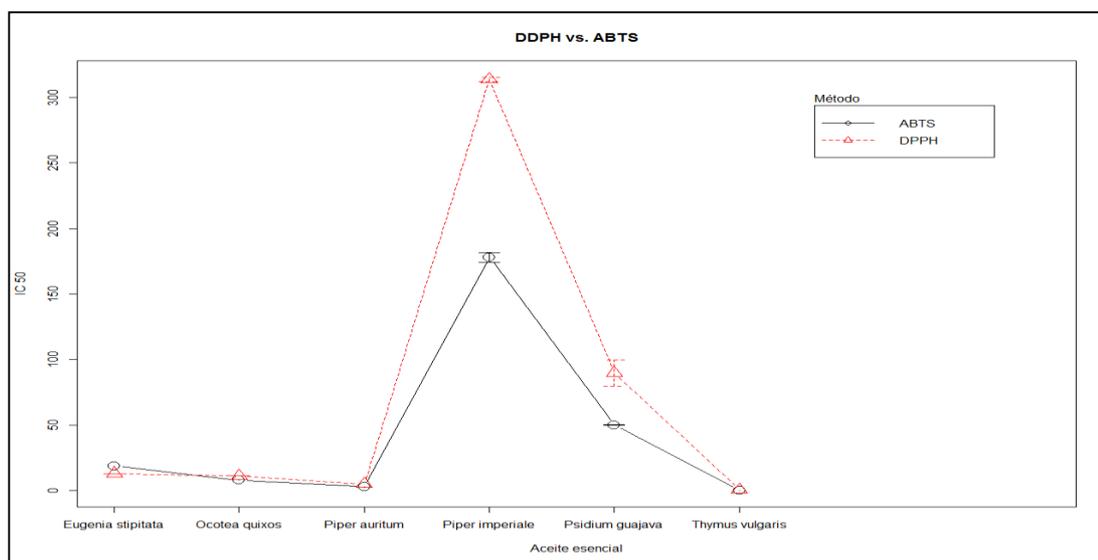


Figura 4: Representación DDPH vs ABTS

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Estas 2 metodologías se evaluaron tomando en cuenta la capacidad secuestrante de electrones mediante el método estadístico Kruskal-Wallis rank sum test, chi-cuadrado = 16.5789, df = 5, p-value = 0.005372.

3.7 Cladograma

Este diagrama permite representar el parentesco de cada una de las especies vegetales y sus respectivos aceites esenciales agrupados de la siguiente manera.

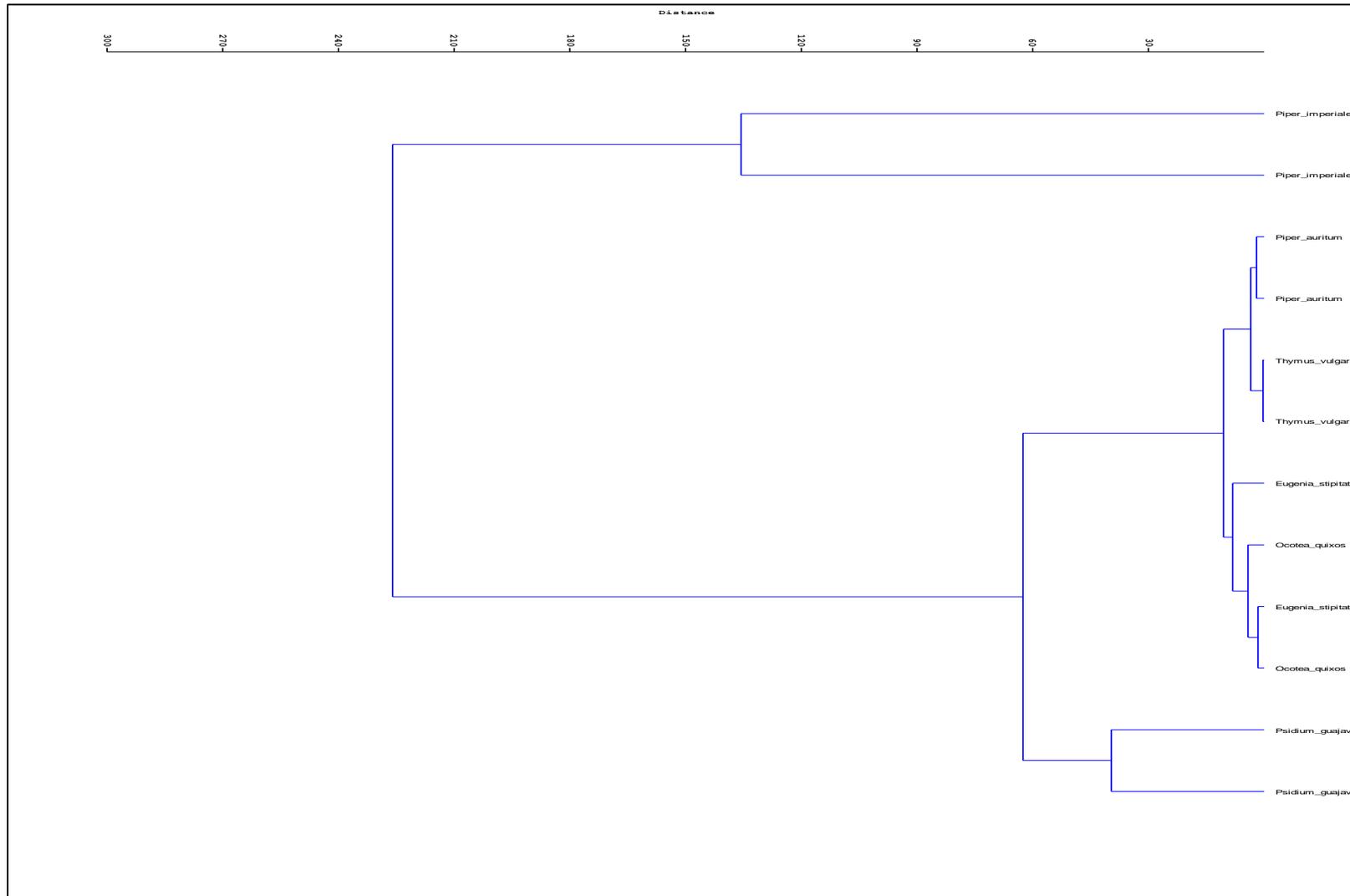


Figura 5. Cladograma

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

3.8 Análisis de varianza

Los valores obtenidos del ANOVA entre los valores del IC₅₀ agrupando a las especies estadísticamente similares.

Tabla 33.
Prueba estadística de ANOVA

DPPH		ABTS	
ANOVA	Kruskal-Wallis	ANOVA	Kruskal-Wallis
Grupo A: <i>Eugenia stipitata</i> <i>Ocotea quixos</i> <i>Piper auritum</i> <i>Thymus vulgaris</i>	chi-squared = 16.6304 df = 5 p-value =0.005257	Grupo A: <i>Eugenia stipitata</i> <i>Ocotea quixos</i> <i>Piper auritum</i> <i>Thymus vulgaris</i>	chi-squared = 16.5789 df = 5 p-value =0.005372
Grupo B: <i>Psidium guajava</i>		Grupo B: <i>Psidium guajava</i>	
Grupo C: <i>Piper imperiale</i>		Grupo C: <i>Piper imperiale</i>	

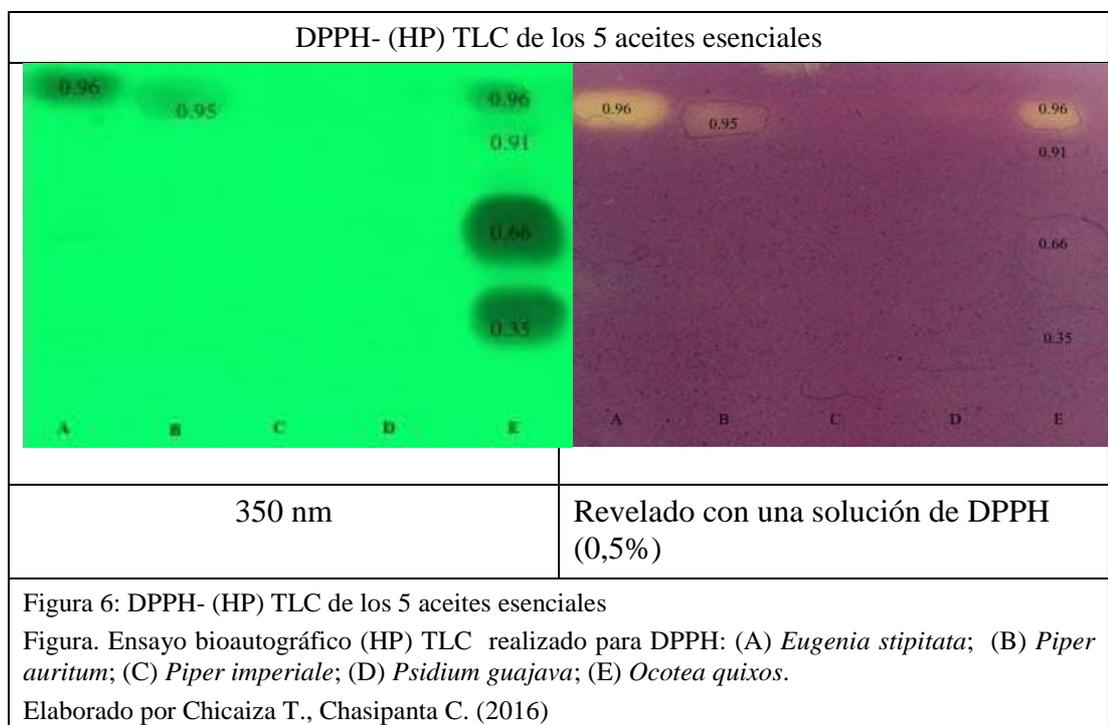
Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Se estimó que el método más sensible para diferenciar la actividad antioxidante entre grupos es el ensayo DPPH, con la prueba de ANOVA se determinó que los diferentes tratamientos no muestran diferencias significativas, además se aplicó la prueba de Tukey de manera orientativa para determinar si existe diferencia entre los tratamientos a evaluar, posteriormente se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para establecer si existen diferencia entre la actividad antioxidante de los aceites esenciales.

3.9 Métodos Bioautográficos

Por medio del cambio de coloración en las zonas en donde se aplicó el revelador DPPH, se localizaron e identificaron los compuestos activos que están determinados

por sus respectivos Rf que fueron calculados de cada corrida cromatográfica realizada a los aceites esenciales en estudio.



3.9.1 Análisis de datos de la actividad bioautográfica antioxidante.

En la siguiente tabla se resume los componentes mayoritarios que fueron identificados en cada uno de los aceites esenciales que mostraron cambio de coloración en el ensayo de DPPH- TLC.

Tabla 34.
Identificación de componentes químicos

RF	<i>Eugenia Stipitata</i> (A)	<i>Piper auritum</i> (B)	<i>Piper imperiale</i> (C)	<i>Psidium guajava</i> (D)	<i>Ocotea quixos</i> (E)
0.96	Cadinene δ	-	-	-	Caryophyllene E Humulene α Copaene α Caryophyllene oxide
0.95	-	Safrol	-	-	-
0.91	-	-	-	-	-
0.66	-	-	-	-	-
0.66	-	-	-	-	-

El signo (-) representan fracciones sin actividad antioxidantes

Nota: Elaborado por Chicaiza T., Chasipanta C. (2016)

Discusión

En lo que respecta a la composición química podemos apreciar que para *P. auritum* se confirma al safrol como el componente mas abundante en relación a la investigación de Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009 y García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007; quienes acotan que el aceite posee el safrol en un porcentaje elevado, en *O. quixos* se aprecian como mas abundantes al cariofileno y a los derivados del cinemaldehido lo que confirma lo hecho por Noriega & Samaniego, 2006; Destryana, Young, Woolley, Huang, Wu, & Shih, 2014; Bruni, et al., 2003 y Sacchetti, Guerrini, Noriega, Bianchi, & Bruni, 2006. Para *E. stipitata* el componente principal es el muuroleno y el cariofileno hallados también en las investigaciones de Medeiros, Medeiros, Davin, Laurence, & Lewis, 2002; el aceite se destaca por su alta concentración de cariofileno. Para *P. guajava* se observa mayoritariamente la presencia de limoneno lo cual se asemeja a la investigación hecha por Ogunwande, Olawore, Adeleke, Ekundayo, & Koenig, 2003 y Sacchetti, et al., 2004. Se pueden apreciar en todos los aceites que comparándolas con investigaciones anteriores existen similitudes en función del tipo de componentes principales, pero diferencias en la concentración de los mismos.

En lo que respecta al aceite de *P. imperiale* nuestra investigación es la primera en describir la composición química del aceite esencial destacandose la presencia de los compuestos cariofileno y asarona.

Conclusiones

Los resultados de actividad antioxidante ya sea como actividad inhibidora de los radicales libres o como actividad antioxidante directa demuestran que de los cinco aceites el que evidencia el mejor comportamiento es el *P.auritum*. De igual forma los aceites de las especies *O. quixos* y *E. stipitata* poseen una actividad buena como lo detallan los análisis estadístico que comparan la actividad con el referente natural aceite esencial *Thymus vulgaris*. Los aceites esenciales de *P.guajava* y *P.imperiale* poseen una actividad discreta y muy alejada estadísticamente del patrón natural.

Los resultado de actividad antioxidante bioautografica revelan decoloración en los ac de *E. Stipitata*; *P. auritum*; *O. quixos*, lo que corrobora de alguna forma lo realizado en los ensayos espectrofotométricos. Se destaca a delta cadineno como el responsable de la actividad antioxidante en *E. stipitata*; al safrol como el responsable en la actividad de *P. auritum*; y para *O. quixos* la actividad esta dada por varios sesquiterpenos entre los que se destacan cariofileno, óxido de cariofileno, humuleno y copaeno. En el caso particular del safrol se confirma en un nuevo aceite esencial su potencial antioxidante en una investigación realizada en la Universidad Politécnica Salesiana como referencia la especie *Peperonia inaequalifolia*.

Recomendaciones

La información química de las dos especies sin actividad antioxidante (*P. imperiale* y *P. guajava*), nos inducen a pensar que dichos aceites podrían ser considerados para investigaciones futuras evaluando su potencial insecticida sobre todo por sus altas concentraciones de limoneno y elemicina.

Para los aceites de *O. quixos*, *P. auritum* y *E. stipitata*, las evaluaciones de composición química dejan sentada la necesidad de continuar con otro tipo de evaluaciones de actividad biológica, pues varios de sus componentes ya cuentan con diversos estudios con resultados positivos.

Para los tres aceites que demostraron tener una buena actividad se recomienda continuar con estudios para que puedan ser usados como activos en productos cosméticos antioxidantes o conservantes en productos alimenticios para de esta manera aprovechar su actividad.

Referencias

- Abad, M., Bedoya, L., Apaza, L., & Bermejo, P. (2012). The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*, 2542-2566.
- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (4ª edición ed.). California: Allured Publishing Corporation.
- Alomar, M. F. (2015 йил 14-Новiembre). *Antioxidantes: captadores de radicales libres ó sinónimo de salud?* From <http://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2009). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Red Atenea.
- Ballabeni, V., Tognolini, M., Bertoni, S., Bruni, R., Guerrini, A., Moreno, G., & Barocelli, E. (2007). Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) calices of Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research*, 23-30.
- Ballabeni, V., Tognolini, M., Carmine, G., Bertoni, S., Renato, B., & Barocelli, E. (2010). Ocotea quixos Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia*, 289-285.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., . . . Sacchetti, G. (2003). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 415-421.
- Buchbauer, G., & Can Baser, H. (2014). *Essential Oils Science, Technology and Applications*. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Buchbauer, G., & Husnu Can Baser, k. (2014). *Essential Oils Science, Technology and Applications*. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Castañeda, C. B., Ramos, L. E., & Ibáñez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 59.
- Causse, C. (2010). *Los secretos de salud de los antioxidantes*. Barcelona: Hispano Europes.
- Cerón, C. (2006). *Plantas Medicinales de los Andes ecuatorianos*. Quito, Pichincha, Ecuador.

- Cerón, C., & Montalvo, C. (1998). *Etnobotánica de los Huaorani de Quehueiri-ono Napo-Ecuador*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.
- Criado, C., & Moya, M. (2009). *Vitaminas y Antioxidantes*. Madrid: Grupo Saned.
- Cuellar, F., Ariza, E., Anzola, C., & Restrepo, P. (2013). Estudio de la capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración. *Revista Colombiana de Química*, 26.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de la Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Pichincha, Ecuador: Herbario QCA.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de la Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Pichincha, Ecuador: Herbario QCA.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA.
- Delgado, E. (Junio de 2011). *Tesis en Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola: Propiedades Entomotóxicas de los Extractos Vegetales de Azadirachta indica, Piper auritum y Petiveria alliacea Para el control de Spodoptera exigua*. Recuperado el 18 de Agosto de 2015, de chapingo.mx: <http://www.chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISMIBA2011071108126255.pdf>
- Delgado, L., Betanzos, G., & Sumaya, M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Revista Científica de América Latina*, 11.
- Destryana, A., Young, G., Woolley, C., Huang, T., Wu, H.-Y., & Shih, W.-L. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Ocotea quixos, Copaiba and Blue cypress essential oils in vitro and in vivo. *SPRINGER*, 1552.
- Destryana, A., Young, G., Woolley, C., Huang, T., Wu, H.-Y., & Wen Ling, S. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Ocotea quixos, Copaiba and Blue cypress essential oils in vitro and in vivo. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1531-1542.
- Díaz, L., Muñoz, D., Prieto, R., Cuervo, S., González, D., Guzmán, J., & Sanjib, B. (2012). Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of Piper imperiale. *Molecules*, 41-42.
- Do Nascimento, A., & Oliveira, D. (1999 йил Julio). *Araza (Eugenia stipitata) CULTIVO Y UTILIZACION MANUAL TECNICO*. From MANUAL

TECNICO: http://www.otca.info/portal/admin/_upload/publicacoes/SPT-TCA-VEN-SN-araza.pdf

Downey, CA. (2015 йил 14-12). *The Oncology Institute of Hope & Innovation* . From http://www.theoncologyinstitute.com/pdfs/espanol/Coenzima%20Q10_spanish.pdf

Durst, H., & Gokel, G. (2007). *Química Orgánica Experimental*. Barcelona, España: Reverté.

El-Ahmady, S., Ashour, M., & Wink, M. (1 de Marzo de 2013). Chemical composition and anti-inflammatory activities of the essential oils of Psidium guajava fruits and leaves. *The Journal of Essential Oil Research*, 1-6.

EPN-Alvarez, Patricia; Espín, Paulina; 2007. (n.d.). *Estudio de Factibilidad para la Comercialización Internacional de los concentrados y/o mermelada de araza, a los Estados Unidos*. Quito.

Espinoza, G. (2013). *El aprovechamiento del Ishpink Ocotea quixos manual de buenas Prácticas de recolección*. Macas, Morona Santiago, Ecuador: Macas & Ávila Comunicaciones.

Fernández, C. (2009). *Plantas comestibles de Centroamérica*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.

Flores, M. (15 de Octubre de 2009). *Tlahui-Medic*. Recuperado el 12 de Agosto de 2015, de thahui.com: http://www.tlahui.com/medic/medic29/hoja_santa.htm

García, A., Leyva, M., Martínez, J., & Stashenko, E. (Mayo de 2007). Determinación de la composición Química y Actividad Antioxidante in vitro del Aceite Esencial de Piper auritum Kunth (Piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *Scientia Et Technica*, 1, 439-442. Recuperado el 6 de Agosto de 2015, de Scientia et Technica: <http://200.21.217.140/index.php/revistaciencia/article/view/6069/3303>

García, R. S., & María. (2014). *Aplicación de aceites esenciales para el control de bacteriosis que afectan la producción de Solanum lycopersicum L. (tomate)*. Montevideo: Tesis: Universidad ORT Uruguay.

Grandtner, M., & Chevrette, J. (2013). *Diccionario de Arboles* (Vol. 2). Quebec, Canadá: Elsevier.

Guenter, E. (1948). *The Essential Oils* (Vol. 1). New York: D. Van Nostrand Company, Inc.

He, Q., & Venant, N. (4 de 02 de 2004). Antioxidant power of phytochemicals from Psidium guajava leaf. *Science*, 676-683. Recuperado el 11 de 08 de 2015, de

orbi.ulg.ac.be:

<http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/27366/1/article%20ZJUS.pdf>

- Hernández, J. A. (2013 йил 30-01). *Mecanismos antioxidantes de defensa II: mecanismos enzimáticos*. From <https://cienciacebas.wordpress.com/2013/01/30/mecanismos-antioxidantes-de-defensa-ii-mecanismos-enzim…>; [...]
- Hettiarachchy, N. (2011). *Bioactive food proteins and peptides applications in human health*. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia*. Barcelona, España: Omega.
- Kulisic, T., Radonic, A, Katalinic, V., & Milos, M. (2003). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 633.
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 726-732.
- Lacalle, A. (2007). *Antioxidantes en alimentación: Diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y Métodos de análisis*. Barcelona: Neiker tecnalia.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales* (3 ed.). San José, Costa Rica: Agroamérica.
- Li, J., Chen, F., & Luo, J. (1999). GC-MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 78-80.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 272.
- Medeiros, J., Medeiros, N., Medeiros, H., Davin, Laurence, & Lewis, N. (2002). Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from de Azores. *Journal of Essential Oil Research*, 293-295.
- Merí, A. (2005). *Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte*. Madrid: Medica panamericana.
- Missouri Botanical Garden. (20 de Agosto de 2015). *Tropicos*. Recuperado el 20 de Agosto de 2015, de Tropicos.org: <http://www.tropicos.org>
- Montealegre, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del Espíngo (Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.) en la medicina tradicional indígena Inga, pruebas fitoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana*. Bogotá: Tesis: Pontificia Universidad Javeriana.

- Monzote, L., García, M., Montalvo, A. M., Scull, R., & Miranda, M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Pub Med*, 168-173.
- Naranjo, P., Kijjoa, A., Giesbrecht, A., Gottlieb, & Otto. (1981). Ocotea quixos, American cinnamon. *Journal of Ethnopharmacology*, 233-236.
- Noriega, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. (P. Noriega, Ed.) *10*, 5-6.
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 4.
- Noriega, P., & Samaniego, M. (1 de Diciembre de 2006). Análisis de la composición química del aceite esencial extraído de las hojas de ocotea quixos (Ishpink) por Cromatografía gaseosa acoplada a masas. *La Granja*, 5.
- Noriega, P., Mosquera, T., Baldiseserotto, A., Abad, J., Aillion, C., Cabezas, D., . . . Stefano. (2015). Chemical composition and in- vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential oils ans Natural Products*, 30.
- Ogunwande, I., Olawore, N., Adeleke, K., Ekundayo, O., & Koenig, W. (2003). Chemical composition of the leaf volatile of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *flavour and Fragrance Journal*, 136-138.
- Olaya, J., & Méndez, J. (2005). *Guía de plantas y productos medicinales*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- Ortuño, M. (2006). *Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana.
- Pérez, R., Mitchell, S., & Vargas, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-27.
- Pino, J., & Quijano, C. (2007). Volatile compounds of arazá fruit (*Eugenia stipitata* McVaught). *CENIC - Ciencias Químicas* , 363.
- Prieto, M., Rodríguez, A., Vázquez, J., & Ma, M. (2012). β -Carotene assay revisited. application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Pub med*.
- Prudkouvskii, A., & Dolgonosov, A. (2008). A tool for Evaluating the Kovats Index from the Retention Time of a Substance in Gas Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* , 852.

- Ramos, E., Castañeda, B., & Ibañez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*, 43.
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Programa de Doctorado en Ciencias de Alimentos*, 68.
- Rios, M., Koziol, M., Pedersen, B., & Gabriela, M. (2007). *Plantas Útiles del Ecuador Aplicaciones, Retos y Perspectivas*. (M. Rios, M. Koziol, B. Pedersen, & M. Gabriela, Edits.) Quito, Pichincha, Ecuador: Abya-Yala.
- Roig, J. (1988). *Plantas medicinales, aromáticas o venosas de Cuba*. Recuperado el 5 de Agosto de 2015, de ecured.ecu: <http://www.ecured.cu/index.php/Acuyo>
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., & Bruni, R. (2006). Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 674-676.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2004). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials foods. *Food Chemistry*, 621-632.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (Enero de 2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* KUNTH (Caisimón de anís). *Revista de Protección vegetal*, 39-46. Recuperado el 10 de Agosto de 2015, de scielo.sld.cu: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100006&script=sci_arttext
- Sidney, A. d. (1999). *Araza (Eugenia Stipitata) CULTIVO Y UTILIZACION, MANUAL TECNICO*. Manaus, Brasil: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-CPCA).
- Sowndhararajan, K., & Chul Kang, S. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Species Plantarum. (16 de Agosto de 2015). *Species Planatrum*. Recuperado el 16 de Agosto de 2015, de conabio.gob.mx: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf
- Torrenegra, M. (2014). *Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar extraído de especies de Oregano (Origanum vulgare spp) Oregano *Borde Blanco* (Origanum vulgare ssp) y Oreganito (Lippia alba) Cultivado*

en la Zona Norte del Departamento de Bolívar (Colombia). Medellín, Bolívar, Colombia: Tesis de Maestría. Universidad de Cartagena.

- UDCA-Jara, Angela;2013. (2013). *Análisis Fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del Extracto Etanólico de las hojas de la especie Piper imperiale (Piperaceae)*. Bogotá. Retrieved 2015 йил 16-08 from <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/bitstream/11158/243/1/203741.pdf>
- Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 313-328.
- Universidad Tecnológica de Pereira-Tovar del Rio, Jennifer;2013. (n.d.). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH Y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Ecoregion Cafetera*. Pereira.
- UPS-Abad, Juan; Cabezas, Diana. (2014). *Estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de piper pubinervulum C. DC proveniente de Macas, Ecuador estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de piper pubinervulum C. DC proveniente de Macas, Ecuador*. Quito.
- USFQ-Guevara, Diana;2012. (n.d.). *Estudio de la actividad antioxidante de los extractos de melanoidinas-polifenoles del café (Coffe sp.) ecuatoriano a través de los métodos : Método ABTS (*) Y Método FRAP (**)* * (2,2- azobis-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico). Quito.
- Wang, P. H., David, R., Trepte, C. R., S.Kent, G., Yue, G. K., & Skeen, K. M. (1998). An empirical model study of the tropospheric meridional circulation based on SAGE II observations. *Journal of Geophysical Research :Atmospheres*, 13801–13818.
- Wei, L., Roziahanim, M., Suthagar, P., Shanmugapriya, P., & Sabariah, I. (2012). Antioxidant Activities of Essential Oil of Psidium guajava L. Leaves. *Procedia APBBEE*, 86-91.
- Yin Chen, H., & Chin Yen, G. (7 de Febrero de 2006). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (Psidium guajava L.) leaves. *Food Chemistry*, 686-694. Recuperado el 10 de 08 de 2015, de http://www.researchgate.net/publication/222429570_