

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:
**ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FRACCIONES
PROVENIENTES DE DOS PLANTAS MEDICINALES ECUATORIANAS:
EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE MASHUA (*Tropaeolum
tuberosum* (RUÍZ Y PAVÓN) TROPAEOLACEA) Y ACEITE ESENCIAL
DE CONGONA (*Peperomia inaequalifolia* (RUÍZ Y PAVÓN)
PIPERACEAE).**

AUTORA:
CRISTINA LORENA AILLÓN ROJAS

DIRECTOR:
PACO NORIEGA RIVERA

Quito, enero del 2014

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DEL USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo Cristina Lorena Aillón Rojas autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaro que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, enero del 2014

Cristina Lorena Aillón Rojas

CC: 171755935-3

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por darme la paciencia para vencer todos los obstáculos que surgieron durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres Fernando y Sandra.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme usar las instalaciones del laboratorio y poder desarrollar mi trabajo de investigación.

A mi director de tesis el químico Paco Noriega por ayudarme a desarrollar este trabajo de investigación y poder cumplir esta meta.

A los profesores Pablo Coba, Diana Calero, Tatiana Mosquera, Wilson Tapia, María Belén Aldás por su valiosa que de una de otra manera colaboraron para que este trabajo se terminara con éxito.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
ANTECEDENTES	2
1.1 Justificación.....	2
1.2 Hipótesis y Variables	4
1.2.1 Hipótesis	4
1.2.2 Variables:	4
1.3 Objetivos.....	5
1.4 Población y Muestra	6
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antioxidantes	8
2.1.1 Clasificación de los Antioxidantes.....	9
2.1.2 Familias de compuestos antioxidantes.....	12
2.1.3 Importancia de los Antioxidantes	12
2.2 Estrés Oxidativo.....	12
2.3 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante.....	13
2.3.1 Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	13
2.3.2 Método del ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico).....	14
2.3.3 Ensayo de los fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.	15
2.3.4 Ensayo de determinación de flavonoides totales con cloruro de aluminio	16
2.3.5 Capacidad antioxidante por fotoquimiluminiscencia (PCL).....	17
2.4 Uso industrial de los antioxidantes	18

2.5	Aceites Esenciales.....	18
2.5.1	Clasificación de los aceites esenciales	19
2.5.2	Química de los Aceites Esenciales.....	20
2.5.3	Características Físicas de los Aceites Esenciales	21
2.5.4	Propiedades Químicas de los Aceites esenciales	22
2.5.5	Grupos Funcionales que tienen los Aceites Esenciales.....	22
2.5.6	Métodos de Extracción de los Aceites Esenciales	22
2.5.7	Usos de los aceites esenciales	25
2.6	Extractos vegetales.....	26
2.6.1	Clasificación de los extractos vegetales.....	27
2.6.2	Principales métodos para la extracción.....	28
2.6.3	Concentración de Extractos vegetales.....	29
2.6.4	Secado de los extractos vegetales	29
2.7	Compuestos antioxidantes.....	30
2.7.1	Compuestos Fenólicos	30
2.7.2	Clasificación de los Compuestos Fenólicos.....	31
2.8	Cromatografía	38
2.8.1	Cromatograma.....	39
2.8.2	Clasificación de las técnicas cromatográficas.....	39
2.8.3	Cromatografía Líquida (LC)	39
2.8.4	Cromatografía de Gases (GC).....	39
2.8.5	Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC).....	40
2.8.6	Cromatografía en capa fina (TLC).....	40
2.9	Descripción de la especie vegetal: mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>).....	42

2.9.1	Taxonomía:	43
2.9.2	Familia Tropaeolaceae	43
2.9.3	Género Tropaeolum	44
2.9.4	Descripción de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pavón	44
2.9.5	Características morfológicas de la planta.....	45
2.9.6	Propiedades medicinales de la planta.....	45
2.10	Descripción de la especie vegetal: congona (<i>Peperomia inaequalifolia</i>)	46
2.10.1	Taxonomía	46
2.10.2	Familia Piperacea.....	47
2.10.3	Género Peperomia.....	47
2.10.4	Descripción de <i>Peperomia inaequalifolia</i> Ruíz & Pavón	47
2.10.5	Características morfológicas de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	48
2.10.6	Propiedades Medicinales de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	49
CAPÍTULO III.....		50
METODOLOGÍA		50
3.1	Compra del material vegetal: congona (<i>peperomia inaequalifolia</i>) y mashua (<i>tropaeolum tuberosum</i>) en la provincia de pichincha.....	50
3.2	Elaboración del extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tuberosum</i>	52
3.2.1	Secado de la planta.....	52
3.2.2	Preparación del extracto hidroalcohólico de la planta	53
3.2.3	Concentración del extracto de <i>Troapeolum tuberosum</i>	54
3.3	Preparación del reactivo dpph (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	55
3.4	Preparación del reactivo abts	56
3.5	Evaluación de la actividad antioxidante.....	58

3.5.1	Evaluación del método del DPPH en el Aceite Esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	58
3.5.2	Evaluación del método del DPPH en el Extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	62
3.5.3	Método de ABTS en el aceite esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	67
3.6	Caracterización de la composición química del aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i> y evaluación de la actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina (tlc) y tlc-dpph: prueba antioxidante cualitativa	77
3.6.1	Cromatografía en capa fina del aceite esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	77
3.6.2	Evaluación TLC-DPPH, prueba antioxidante cualitativa	78
3.7	Determinación de compuestos fenólicos totales con el método de folin- ciocalteu en el extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tuberosum</i> y <i>camellia sinensis</i> usando ácido gálico como estándar	80
3.7.1	Construcción de la curva de calibración ácido gálico	81
3.8	Determinación de flavonoides totales con el método de cloruro de aluminio en el extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tuberosum</i> y <i>camellia sinensis</i> usando hyperósido como estándar.....	82
3.8.1	Construcción de la curva de calibración de hyperosido	83
CAPÍTULO IV		85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		85
4.1	Extracción del aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i> : determinación del rendimiento	85
4.3	Elaboracion del extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tuberosum</i>	87
4.4	Evaluación de la actividad antioxidante.....	88
4.4.1	Método del reactivo dpph en el aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i>	88
4.4.2	Metodo dpph en extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tuberosum</i>	91
4.4.3	Comparación entre Valores de IC 50	96

4.5	Método del reactivo abts en el aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i>	100
4.5.6	Comparación entre Valores de IC 50 en la prueba de ABTS.....	107
4.6	Caracterización de la composición química del aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i> y evaluación de la actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina (tlc) y tlc-dpph: prueba antioxidante cualitativa	111
4.7	Determinación de compuestos fenólicos totales con el método de folin- ciocalteu en el extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tubersoum</i> usando ácido gálico como patrón	115
4.8	Determinación de flavonoides totales con el método de cloruro de aluminio en el extracto hidroalcohólico de <i>tropaeolum tubersoum</i> usando hyperósido como patrón	118
4.9	Determinación de la capacidad antioxidante por fotoquimiluminiscencia (pcl) en el aceite esencial de <i>peperomia inaequalifolia</i>	121
	CONCLUSIONES	123
	RECOMENDACIONES	125
	LISTA DE REFERENCIAS	126
	ANEXOS	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variables, Indicadores y unidades	5
Tabla 2: Antioxidantes Exógenos o no enzimáticos	9
Tabla 3: Algunos tipos de antioxidantes Naturales.....	10
Tabla 4: Algunos tipos de Antioxidantes Artificiales.....	11
Tabla 5: Enfermedades asociadas al estrés oxidativo	13
Tabla 6: Localización de los aceites esenciales	19
Tabla 7: Propiedades generales de los aceites esenciales	21
Tabla 8: Usos de los aceites esenciales (Vía externa).....	26
Tabla 9: Usos de los aceites esenciales (Vía interna)	26
Tabla 10: Condiciones de los distintos tipos de extracción	28
Tabla 11: Condiciones de los distintos tipos de extracción	29
Tabla 12: Taxonomía	43
Tabla 13: Taxonomía	46
Tabla 14: concentraciones y soluciones del aceite de congona	59
Tabla 15: concentraciones y soluciones del aceite de <i>Thymus vulgaris</i>	60
Tabla 16: concentraciones y soluciones del extracto seco de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	63
Tabla 17: concentraciones y soluciones de ácido ascórbico	64
Tabla 18: concentraciones y soluciones del extracto seco de <i>Camellia sinensis</i>	66
Tabla 19: Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i> ..	68
Tabla 20: Preparación de las Soluciones del Estándar (Aceite Esencial de <i>thymus vulgaris</i>)	70
Tabla 21: Preparación de las Soluciones del extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	71
Tabla 22: Preparación de las Soluciones de ácido ascórbico.....	73
Tabla 23: Preparación de las soluciones de <i>Camellia sinensis</i>	75
Tabla 24: Soluciones y concentración de ácido gálico	81
Tabla 25: Soluciones de Hyperósido	83

Tabla 26: características organolépticas del aceite esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	85
Tabla 27: Composición química del aceite esencial de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	86
Tabla 28: Rendimiento medio que se obtuvo de extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	87
Tabla 29: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de <i>Thymos vulgaris</i>	88
Tabla 30: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	90
Tabla 31: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición de ácido ascórbico.....	92
Tabla 32: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto de <i>Camellia sinensis</i>	93
Tabla 33: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto seco de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	95
Tabla 34: Comparación entre valores de IC50 de los aceites.	97
Tabla 35: Comparación entre valores de IC50 de los extractos	97
Tabla 36: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de <i>Thymus vulgaris</i>	100
Tabla 37: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de Congona.....	101
Tabla 38: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición de ácido ascórbico.....	103
Tabla 39: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto seco de <i>Camellia sinensis</i>	104
Tabla 40: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	106
Tabla 41: Comparación entre valores de IC50 de los aceites.	108
Tabla 42: Comparación entre valores de IC50 de los extractos	109
Tabla 43: Tiempos de retención de los principales compuestos encontrados en el aceite de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	111
Tabla 44: Datos de absorbancias y concentraciones de ácido gálico	115
Tabla 45: Concentración de fenoles totales para el extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i> y <i>Camellia sinensis</i>	116
Tabla 46: Concentraciones y absorbancia de hyperósido	118
Tabla 47: Concentraciones de flavonoides en el extracto de <i>Camellia sinensis</i> y <i>Tropaeolum tuberosum</i>	119
Tabla 48: Análisis de fotoquimioluminiscencia en aceites	121

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Radical libre) izquierda y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (no radical) derecha	14
Gráfico 2: Molécula de (Acido. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfónico) o ABTS	15
Gráfico 3: Equipo de destilación por Arrastre de Vapor.....	25
Gráfico 4: Etapas generales para la obtención de extractos vegetales	27
Gráfico 5: Estructura de un Fenol.....	32
Gráfico 6: Estructura Básica de los Flavonoides	33
Gráfico 7: Estructura de la quercetina.....	33
Gráfico 8: Estructura de Flavonas y Flavonoles	35
Gráfico 9: estructura de Flavanonas y dihidroflavonoles	35
Gráfico 10: Estructura de un isoflavonoide	36
Gráfico 11: Estructura de taninos (ácido gálico).....	37
Gráfico 12: Estructura de taninos hidrolizables (ácido elágico, ácido chebúlico)	37
Gráfico 13: Cromatografía en columna	38
Gráfico 14: Equipo de TLC	41
Gráfico 15: Planta de Mashua.....	42
Gráfico 16: Planta <i>Peperomia inaequalifolia</i>	46
Gráfico 17: <i>Peperomia inaequalifolia</i>	49
Gráfico 18: Droga humedecida en alcohol por dos horas	53
Gráfico 19: Montaje del equipo de percolación.....	54
Gráficos 20 y 21 Absorbancia del Aceite de <i>Thymos vulgaris</i> y % de Inhibición del Aceite de <i>Thymos vulgaris</i> versus la concentración del antioxidante	89
Gráficos 22 y 23 Absorbancia del Aceite de <i>Peperomia inaequalifolia</i> y % de Inhibición del Aceite de <i>Peperomia inaequalifolia</i>	90
Gráficos 24 y 25 Absorbancia de la ácido ascórbico y % de Inhibición de la ácido ascórbico versus la concentración del antioxidante	92
Gráficos 26 y 27 Absorbancia del extracto de <i>Camellia sinensis</i> y % de Inhibición del <i>Camellia sinensis</i> versus la concentración del antioxidante	94

Gráficos 28 y 29 Absorbancia del extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> y % de Inhibición del extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	95
Gráfico 30: Comparación del IC50 de los aceites.....	97
Gráfico 31: Comparación del IC50 de los extractos.....	98
Gráficos 32 y 33 Absorbancia del Aceite de <i>Thymus vulgaris</i> y % de Inhibición del Aceite de <i>Thymus vulgaris</i> versus la concentración del antioxidante	100
Gráficos 34 y 35 Absorbancia del Aceite de Congona y % de Inhibición del Aceite de Congona	102
Gráficos 36 y 37 Absorbancia de la solución de ácido ascórbico y % de Inhibición de ácido ascórbico	103
Gráfico 38 y 39: Absorbancia del extracto seco de <i>Camellia sinensis</i> y % de inhibición de <i>Camellia sinensis</i> versus la concentración del antioxidante.....	104
Gráficos 40 y 41: Absorbancia del extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> y % de Inhibición del extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	106
Gráfico 42: Comparación del IC50 de los aceites.....	108
Gráfico 43: Comparación del IC50 de los extractos	110
Gráfico 44: Prueba TLC- DPPH.....	112
Gráfico 45: Prueba TLC- DPPH.....	113
Gráfico 46: Prueba TLC- DPPH.....	113
Gráfico 47: Curva de calibración de ácido gálico.....	115
Gráfico 48: Fenoles en el extracto de mashua	116
Gráfico 49: Curva de calibración con hyperósido.....	118
Gráfico 50: Flavonoides totales en el extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i> y <i>Camellia sinensis</i>	119

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1** Identificación de las plantas de congona y Mashua por parte del herbario de la Universidad Central del Ecuador
- Anexo 2** Cálculo para determinar la cantidad de reactivo DPPH que se debía pesar para pruebas antioxidantes
- Anexo 3** Determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*
- Anexo 4** Esquema General de la Metodología
- Anexo 5** Extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*
- Anexo 6** Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

RESUMEN

Se investigaron dos plantas medicinales originarias de la Sierra ecuatoriana, estas plantas son congona *Peperomia inaequalifolia* (Ruíz y Pavón) Piperaceae y mashua *Tropaeolum tuberosum*. (Ruíz y Pavón) Tropaeolaceae. El aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la especie *Peperomia inaequalifolia* (Congona) arrojó como resultado actividad antioxidante IC50 DPPH de 2.22 mg/mL e IC50 ABTS de 0.006mg/mL comparado con *Thymus vulgaris* (tomillo) como control positivo. Durante el estudio se investigaron las características taxonómicas y etnobotánicas y se obtuvieron muestras representativas de las dos plantas, con ellas se extrajo el aceite esencial de congona procedimiento que fue realizado en la fundación CHANKUAP en la ciudad de Macas, cuyo rendimiento con planta fresca fue del 0,1607%. De este aceite se caracterizó su composición química, por medio de cromatografía de gases acoplada a masa (CG-MS) la cual mostró que dicho aceite posee safrol, estearil palmitato y miristicina dentro de los compuestos más abundantes. Además se realizó cromatografía en capa fina (TLC) la cual confirmó la actividad antioxidante del aceite al existir una decoloración del reactivo DPPH de violeta a amarillo. En cuanto al extracto seco de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) obtenido por percolación arrojó como resultado actividad antioxidante IC50 DPPH de 0.788mg/mL e IC50 ABTS de 0.09mg/mL comparado con *Camellia sinensis* y ácido ascórbico como control positivo. Además se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos por medio del método de Folin-Colicialteu y flavonoides totales por medio del método del reactivo de cloruro de aluminio en el que los resultados demostraron que el extracto seco de *Tropaeolum tuberosum* no presenta cantidades significativas de fenoles y flavonoides.

Palabras clave: *Peperomia inaequalifolia*, *Tropaeolum tuberosum*, GC/MS, DPPH, ABTS, actividad antioxidante

ABSTRACT

They investigated two medicinal plants native to the Ecuadorian highlands, these plants are congona *Peperomia inaequalifolia*. Piperaceae (Ruíz & Pavón) and Mashua *Tropaeolum tuberosum*.tropaeolaceae (Ruíz & Pavón). The essential oil obtained from the species hidrodestilation *Peperomia inaequalifolia* (Congona) antioxidant activity resulted IC50 DPPH of 2.22 mg/mL e IC50 ABTS of 0.006mg/mL compared with *Thymus vulgaris* (tomillo) like positive control. During the study investigated taxonomic and ethnobotanical features and obtained representative samples of the two plants, with them essential oil of congona is extracted in the foundation CHANKUAP, in Macas city, whose fresh plant performance was 0.1607%. This oil was characterized by its chemical composition, by gas chromatography coupled to mass (CG-MS) which showed that the oil has Safrole, Myristicin, and stearyl- palmitate within the most abundant compounds. Were tested for antioxidant activity as DPPH and ABTS test whose values of Ic50 were 2.157 mg/mL and 0.1860mg/mL respectively. Also underwent thin layer chromatography which confirmed the antioxidant activity of the oil to be a bleaching reagent of DPPH from violet to yellow. As for the dry extract of *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) obtained by percolation antioxidant activity resulted IC50 DPPH of 0.788mg/mL e IC50 ABTS of 0.09mg/mL compared with *Camellia sinensis* and ascorbic acid like positive control. In addition quantitation of phenolic compounds by the method of Folin-Colicialteu and total flavonoids by the method of aluminum chloride in which results showed that the dry extract of *Tropaeolum tuberosum* no significant amounts of flavonoids and phenolic compounds.

Keywords: *Peperomia inaequalifolia*,GC/MS, DPPH, ABTS, antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos que ayudan a retardar el envejecimiento celular así como la oxidación de las moléculas orgánicas impidiendo que se produzcan olores y sabores desagradables. Además que se ha comprobado que el consumo de alimentos como frutas, verduras así como de ciertas especies de plantas contienen sustancias como antioxidantes, minerales, fibra, vitaminas que ayudan a la prevención o que aparezcan enfermedades de carácter degenerativo como diversos tipos de cáncer, y enfermedades cardiovasculares.

En la presente investigación se estudiara la capacidad antioxidante de dos plantas provenientes de la provincia de Pichincha: la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) que se analizará su extracto hidroalcohólico y congona (*Peperomia inaequalifolia*) la cual se analizará su aceite esencial. Los métodos a utilizarse para el extracto hidroalcohólico de Mashua son DPPH, ABTS, análisis de polifenoles totales, análisis de flavonoides totales. Mientras que los métodos a utilizarse para el aceite esencial de congona son DPPH, ABTS, TLC y PCL, mediante los cuales se obtendrá los resultados para el conocimiento de la actividad antioxidante de cada una de las plantas, este conocimiento ayudará a un análisis en el cual se podrá determinar si la cantidad de antioxidantes es lo suficientemente alta para empleada en la elaboración de diferentes tipos de productos y de esta manera contrarrestar el efecto de radicales libres, los mismos que ha grandes cantidades ocasionan daños a nivel celular produciendo un envejecimiento prematuro de estas y otros efectos.

Los antioxidantes prometen mucho en cuanto al mejoramiento de la salud y el bienestar en general, siendo así una herramienta muy importante para combatir diferentes tipos de afecciones, por estas y otras razones es importante una búsqueda continua de estos compuestos.

Ecuador es un país con una gran biodiversidad de flora y aprovechando que los antioxidantes se encuentran en las plantas se debe aprovechar la riqueza de estos recursos la calidad de vida en cuanto a salud se refiere.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Justificación

Los radicales libres se forman en el organismo por el contacto con el oxígeno, estos radicales libres alteran las membranas celulares y atacan el material genético de éstas dando lugar a enfermedades tales como envejecimiento prematuro, arteriosclerosis, cataratas, entre otras. Científicos piensan que aproximadamente un 80% de las enfermedades degenerativas se relacionan con los radicales libres. La influencia de agentes ambientales así como de algunos hábitos alimenticios, el consumo de alcohol, tabaco contribuyen a un aumento excesivo de radicales libres, los mismos que producen diversas afecciones. Los compuestos antioxidantes en los alimentos juegan un papel importante como un factor de protección de la salud. Evidencias científicas sugieren que los antioxidantes reducen el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades en el corazón. Las fuentes primarias de origen natural de antioxidantes son los granos enteros, frutas y las verduras. Sustancias antioxidantes de origen vegetal como la vitamina C, vitamina E, carotenos, ácidos fenólicos, fitatos y los fitoestrógenos tienen el potencial para reducir el riesgo de enfermedades. Más cabe señalar que los antioxidantes en una dieta típica son derivados de fuentes vegetales y pertenecen a diversas clases de compuestos con una amplia variedad de propiedades físicas y químicas. (Prakash, Rigelhof, y Miller, 2001)

La especie *Tropaeolum tuberosum* conocida como Mashua desde la antigüedad era utilizada por las poblaciones indígenas debido a que se le atribuye propiedades medicinales para las enfermedades del hígado y los riñones. (Fuentes, 2006)

Por otra parte la especie *Peperomia inaequalifolia* o más conocida como congona se la utiliza principalmente como remedio tradicional en algunas comunidades

del Ecuador. La literatura menciona sus efectos antiinflamatorio, cicatrizante, antiparasitario, y tranquilizante. (Pino, 2006)

El método DPPH desarrollado por Brand-Williams para determinar capacidad antioxidante de compuestos secundarios y alimentos es un método fácil, rápido en el que utiliza al radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). Una de las principales características de la reacción es que el radical DPPH se decolora de azul- violeta a amarillo a una absorbancia de 517nm. “Una inhibición de por lo menos 50 % de la concentración de DPPH representa una buena actividad antioxidante”. (Estrada, y otros, 2011)

Por otro lado el método ABTS es un método que ha sido utilizado ampliamente ya sea para materiales biológicos, compuestos puros o para extractos de plantas, el reactivo es muy soluble en agua y químicamente estable, el ABTS se lo genera de varias formas pero la más usada es mezclándolo con persulfato potásico el cual pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005)

El objetivo de esta investigación es evaluar la capacidad antioxidante del extracto seco de las fracciones de Mashua tomando como punto de partida los estudios en donde ya se tiene conocimiento de que posee compuestos fenólicos para luego poder elaborar productos ya sea alimentos o medicamentos. Además la capacidad antioxidante de los aceites esenciales permite usarlos como agentes naturales para la conservación de los alimentos, en sustitución de los antioxidantes sintéticos. Esta posibilidad será interesante principalmente en los sectores específicos de la industria de la conservación de los alimentos cuando las propiedades antioxidantes y el aroma son al mismo tiempo deseados. (Graca, y otros)

1.2 HIPÓTESIS Y VARIABLES

1.2.1 Hipótesis

Hipótesis Alternativa (H1):

- El extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de la especie mashua (*Tropaeolum tuberosum*) presenta actividad antioxidante.
- El aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia*) presenta actividad antioxidante

Hipótesis Nula (H0):

- El extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de la especie mashua (*Tropaeolum tuberosum*) no presenta actividad antioxidante.
- El aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia*) no presenta actividad antioxidante

1.2.2 Variables:

Variable Independiente:

- Extracto hidroalcohólico de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Tropaeolaceae.
- Aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia*) Piperaceae.

Variable dependiente:

- Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Tropaeolacea
- Actividad antioxidante del aceite esencial de Congona (*Peperomia inaequalifolia*) Piperaceae.

Indicadores:

Tabla 1: Variables, Indicadores y unidades

Variables	Indicadores	Unidades
V.I. Aceite esencial	Concentración del aceite esencial	mg/mL
V.I. Extracto hidroalcohólico	Concentración del extracto seco	mg/mL
V. D. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico	Cambio de color en los reactivos DPPH, ABTS	mg/mL
V.D. Actividad antioxidante del aceite esencial	Cambio de color en los reactivos DPPH, ABTS	mg/mL

Elaborado por. Cristina Aillón, 2013

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la actividad antioxidante en fracciones provenientes de dos plantas medicinales ecuatorianas: Extracto hidroalcohólico de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) Tropaeolaceae y Aceite Esencial de Congona (*Peperomia inaequalifolia* Ruíz y Pavón) Piperaceae

Objetivos específicos:

- Obtener un extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) por medio de la técnica de percolación.

- Analizar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de Mashua por medio de métodos espectrofotométricos: DPPH test y ABTS test
- Obtener el aceite esencial de las hojas de Congona (*Peperomia inaequalifolia*) por medio de la técnica de Hidrodestilación.
- Analizar la actividad antioxidante del aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia*) por medio de métodos espectrofotométricos: DPPH test, ABTS test y PCL test. Cálculo de su IC50.
- Separar los componentes del aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia*) por medio de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) e identificar los componentes antioxidantes.

1.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

En el presente estudio se consideró como población a la familia de las *Piperaceas* del género *Peperomia*, plantas herbáceas, provenientes de la provincia de Pichincha, cantón Quito, en la zona de Nayón y la familia de las *Tropaeolaceas* del género *Tropaeolum*, plantas herbáceas, provenientes de la provincia de Pichincha, cantón Mejía, en la zona de Machachi; dentro de las cuáles se determinará la actividad antioxidante del aceite esencial de las *Piperaceas* y del extracto hidroalcohólico de las fracciones provenientes de las *Tropaeolaceas* por medio de métodos espectrofotométricos como lo son la prueba del DPPH y la prueba del ABTS, determinación de polifenoles totales y flavonoides totales y también se determinará dicha actividad por medio de la cromatografía en capa fina (TLC).

Muestra

La muestra está conformada por la especie (*Peperomia inaequalifolia*), conocida vulgarmente como congona, de la cual se extraerá su aceite esencial y de la especie (*Tropaeolum tuberosum*) conocida como mashua, de la cual se realizará un extracto seco, de cada muestra se ensayará a diferentes concentraciones para las pruebas de DPPH, ABTS, cromatografía en capa fina (TLC) solo para el aceite esencial, determinación de polifenoles totales y flavonoides totales para el extracto hidroalcohólico de mashua.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes han adquirido en la actualidad un gran interés ya que no solo son compuestos que impiden la oxidación de los alimentos sino que también se los está tomando muy en cuenta como sustancias que impiden el envejecimiento celular y por ende la aparición de enfermedades graves en el ser humano. Los alimentos que poseen en gran cantidad antioxidantes son las frutas, legumbres, hortalizas, el pan, patatas, entre otros, es recomendable ingerir diariamente una cierta cantidad de los mismos para evitar la generación de afecciones de importante carácter. "Actualmente se ha propuesto el uso de diversos antioxidantes para la prevención de enfermedades crónicas degenerativas y en la prevención del envejecimiento prematuro. " (García, Sánchez, y García, Vigil, 2008)

El organismo posee una serie de sistemas de naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres por él generados, estos sistemas se denominan antioxidantes. Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previendo la formación de EOR (especies de oxígeno reactivas)
- Interceptando el ataque de EOR (especies de oxígeno reactivas)
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Facilitando la reparación del daño causado por EOR (especies de oxígeno reactivas)
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes. (García, Sánchez, & García, Vigil, 2008)

2.1.1 Clasificación de los Antioxidantes

A los antioxidantes se los ha clasificado en dos grandes grupos, los antioxidantes exógenos y los endógenos. (Tabla 2)

Entre los antioxidantes exógenos o no enzimáticos se puede nombrar a la Vitamina E, vitamina C, β carotenos, vitamina A, Selenio y Zinc los cuales deben ser aportados en nuestra alimentación diaria. Estas sustancias actúan en el interior del organismo encerrando a los radicales libres evitando que los mismos dañen a otras moléculas. (Rosales, 2011)

Dentro de los antioxidantes endógenos o enzimáticos se destacan las enzimas antirradicales, como por ejemplo la superoxida dismutasa y la glutatión peroxidasa ambas evitan que se produzca radicales libres y si se diera el caso de que ya existieran en el cuerpo los destruye.

Aunque también se los puede clasificar en si son solubles en agua (hidrofilicos) o en lípidos (hidrofóbicos). (Rosales, 2011)

Antioxidantes Naturales: Se encuentran en casi todas las partes de las plantas, ya que las protegen contra lesiones del tejido, oxidándose y combinándose con otros componentes, también pueden servir como defensa contra herbívoros. (Tabla 3)

Los polifenoles son el grupo más numeroso de componentes antioxidantes y están presentes en frutas y en vegetales, semillas de leguminosas, granos, té, especias y vinos. (Delgado, Betanzos, & Sumaya, 2010)

Tabla 2: Antioxidantes Exógenos o no enzimáticos

Antioxidante	Fuente	Acción antioxidante	Efectos secundarios
Vitamina E (Tocoferol)	Aguacate, camote, espárragos, tomate, brócoli, zanahoria, cereales, lentejas, plátanos, moras.	Mantiene la integridad de la membrana celular, retarda el envejecimiento celular.	No tiene

Vitamina C (ácido Ascórbico)	Acelgas, tomates, perejil, coliflor, nabos, cítricos, kiwi, fresas.	Inhibidor de la oxidación de lípidos, ofrece protección contra todo tipo de cánceres	En grandes cantidades puede provocar cálculos en riñones o vías urinarias.
β- Caroteno (pro-vitamina A)	Zanahoria, tomates, espinacas, melón, mango	Protege al ADN, detiene el deterioro de tejidos	El consumo excesivo puede producir descamaciones de la piel, caída del cabello
Flavonoides (polifenólicos)	Espinacas, cebolla, ajo, té verde, vino, manzanas, peras, cítricos	Quela metales	No tiene
Oligoelementos Selenio (Se), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Cobre (Cu)	Carne, pescados, cereales integrales, lácteos, ajo, cebollas, brócoli, piña, cacao	Forman parte del núcleo activo de las enzimas con actividad antioxidante, mantienen en buen estado las funciones hepáticas	El Se es el más tóxico su ingestión en dosis altas produce pérdida del cabello, alteración de uñas y dientes.

Fuente: (Delgado, Betanzos, & Sumaya, 2010)

Tabla 3: Algunos tipos de antioxidantes Naturales

Nombre	Origen	Uso Habitual	Efectos secundarios
Ácido Láctico	Bacteriano	Pepinos, alimentos para niños, bebidas gaseosas	Ninguno
Ácido L-ascórbico	Síntesis artificial	Bebidas de frutas, mermeladas	Ninguno en las dosis habituales

Tocoferoles de origen natural	Extractos de aceite de soya, germen de arroz, germen de trigo	Aceites vegetales. Postres preparados	Ninguno
Lecitina	Soya, maíz, huevos	Yogurt, leche en polvo, chocolates	Ninguno
Ácido cítrico		Frutas y hortalizas en conserva, helados	Irritante a dosis altas

Fuente: (Bueno, 2009)

Antioxidantes artificiales: son totalmente sintéticos, dentro de los principales antioxidantes artificiales están el BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno) y TBHQ (butilhidroquinona terciaria). (Bueno, 2009).

En la tabla 4 se observa algunas características de cada uno de ellos.

Tabla 4: Algunos tipos de Antioxidantes Artificiales

Nombre	Origen	Uso Habitual	Efectos secundarios
Galato de propilo	Síntesis artificial	Cereales, chicles, aceites vegetales	Prohibidos en lactantes y niños, dolor de estómago
Ácido eritórbito	Síntesis artificial	Carnes en conserva	No se han descrito
Butilhidroxianisol (BHA)	Síntesis artificial	Galletas, dulces, nueces, aceites	Aumento del colesterol, prohibidos en lactantes y niños
Butilhidroxitolueno(BHT)	Síntesis artificial	Chicles, aceites	Alergizante, prohibidos en lactantes y niños

Fuente: (Bueno, 2009)

2.1.2 Familias de compuestos antioxidantes

Dentro de los compuestos naturales de origen vegetal con acción antioxidante es posible encontrar una variada gama de grupos, no obstante hoy se reconoce a las familias pertenecientes al grupo de los conocidos como compuestos fenólicos o polifenoles, el mayor espectro no solo en cuanto a su actividad antioxidante, sino que además en cuanto a su efecto bioactivo específico sobre determinadas patologías de carácter degenerativo en seres humanos. (Delgado, Betanzos, & Sumaya, 2010)

2.1.3 Importancia de los Antioxidantes

Cabe mencionar que los antioxidantes son importantes ya que actúan como donadores de hidrogeno o quelar iones como el hierro y el cobre, lo que es de vital importancia ya que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, que son las responsables de producir enfermedades coronarias. Además en estudios in vitro se llegaron a la conclusión de que cierto tipo de antioxidantes poseen un papel protector ante algunos canceres como el de mama, intestinal, de colon, ovario entre otros. (Vásquez, y otros, 2007)

2.2 Estrés Oxidativo

La ausencia de antioxidantes en el organismo origina el estrés oxidativo, se sabe que el oxígeno es una molécula muy necesaria para la vida pero esta molécula también puede generar reacciones en el interior de cuerpo humano que pueden llegar a ser perjudiciales para la salud , debido a que el oxígeno al unirse con otras moléculas forma radicales libres y cuando estos radicales existen en mucha cantidad en el organismo genera lo que es el estrés oxidativo, el cual provoca graves daños a nivel de los núcleos celulares de allí el aparecimiento del envejecimiento precoz, hasta enfermedades más graves como el cáncer, diabetes, infartos, demencias, manchas en la piel, entre otras patologías. (Tabla 5) (Rosales, 2011)

Tabla 5: Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Arteriosclerosis	Diabetes Mellitus
Envejecimiento	Cáncer
Enfermedades Respiratorias	Artritis reumatoide
SIDA	Enfermedades inflamatorias crónicas del intestino
Hepatopatías	Enfermedad de Alzheimer

Fuente: (Guerra, 2001)

2.3 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

“Los métodos de determinación de la actividad antioxidantes se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.” (Castañeda, Ramos, y Ibañez, 2008)

2.3.1 Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

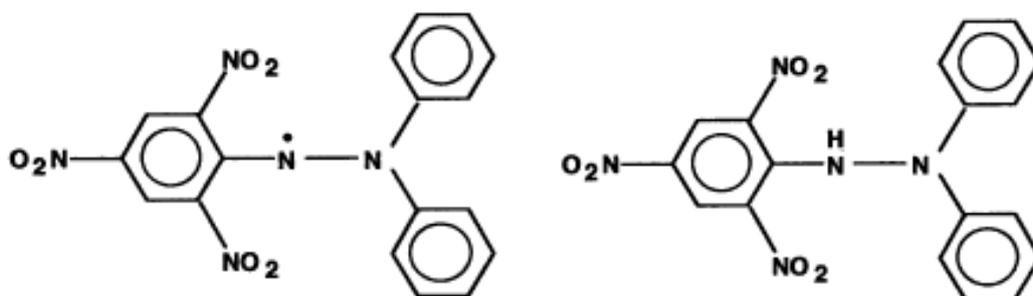
El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. El DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol o etanol para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total. Es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales. El método del DPPH fue desarrollado por Brand- Williams y otros autores el método se basa en que este radical tiene color azul-violeta el cual va cambiando progresivamente cuando entra en contacto con la muestra que contiene el posible antioxidante. La medición se la realiza en un espectrofotómetro a una

absorbancia de 517 nm y para la realización de la cuantificación se utiliza como soluciones estándar vitamina C o Trolox. (Castañeda, Ramos, & Ibañez, 2008)

Para realizar la actividad antioxidante utilizando el radical DPPH (Gráfico 1) se toman alrededor de 100 μ M disueltos en 80% de metanol o etanol y se mide a una absorbancia de 517 nm, en cuanto a la muestra se toma 0,1 mL se mezcla bien, este proceso debe ser realizado en la oscuridad durante 30 minutos. Una vez transcurridos los 30 minutos se comienza realizando las medidas de absorción a 517 nm 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 en este proyecto poder determinar la concentración del radical DPPH. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005)

Su principal ventaja radica en que es un método fácil ya que el radical DPPH ya se comercializa en el mercado como tal y no es necesario prepararlo como en el caso del radical ABTS. (Laccalle, 2007)

Gráfico 1: Molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Radical libre) izquierda y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (no radical) derecha



Fuente: (Molyneux, 2003)

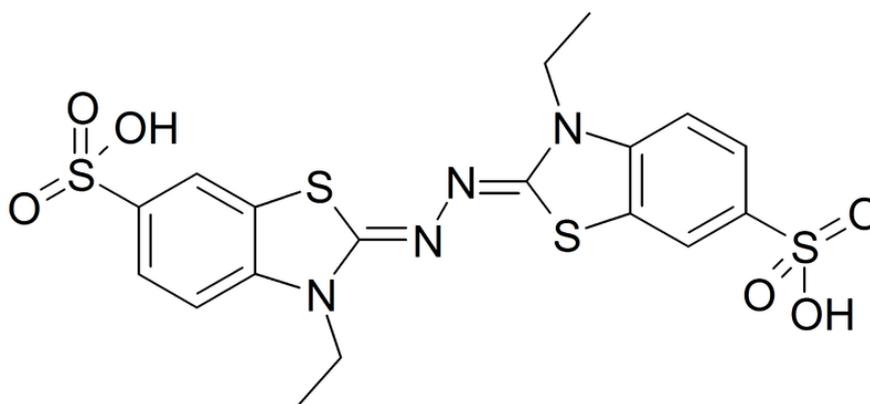
2.3.2 Método del ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico); Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox (Ensayo TEAC)

Actualmente el método ABTS es ampliamente usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El método ABTS fue descrito por Kuskoski y otros autores, el cual se basa en que el radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato potásico a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16 horas. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005)

El radical ABTS (Gráfico 2) presenta color azul-verde a un máximo de absorbancia de 342 nm, el posible antioxidante se añade antes de que se genere el radical ABTS y se determina la inhibición en la formación del radical. (Laccalle, 2007)

Una vez formado el radical ABTS éste se diluye con etanol hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.70 a 754 nm. En cuanto a las muestras que serán evaluados también se diluyen en etanol hasta lograr una inhibición del 20% al 80%, en comparación a la absorbancia del blanco. Para realizar la actividad antioxidante se toma 980 µL del radical ABTS ya diluido y se determina la absorbancia a un valor de 754 nm a 30° C, luego se añade la muestra que contendrá el posible antioxidante y se mide nuevamente la absorbancia al cabo de un minuto, y posteriormente se siguen realizando mediciones a la misma absorbancia durante los siguientes 7 minutos. El antioxidante de referencia será la vitamina C ya que en este proyecto se trabaja con una especie de planta que puede ser ingerida por el ser humano sin causarle intoxicación. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005)

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



Fuente: (Bourbonnais & Paice, 1990)

2.3.3 Ensayo de los fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en

base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sufre de numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos, y tiempos y temperaturas de incubación.

Existen además diversas sustancias de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares y algunas sales inorgánicas. (Prior, Wu, y Schaich, 2005). Se emplea al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante (Sun, Chu, Wu, y Hai, 2002). El ensayo de Folin-Ciocalteu también se ha empleado en estudios in vivo para la determinación de los niveles de compuestos fenólicos totales en plasma/suero tras la ingesta de vino y zumos de frutas ricos en compuestos fenólicos. (Pedersen, y otros, 1999)

2.3.4 Ensayo de determinación de flavonoides totales con cloruro de aluminio ($AlCl_3$)

El $AlCl_3$ forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3- hidroxilados y 5-hidroxiados. En el caso de los orto-dihidroxiados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxiados son estables. Por lo anterior, si al determinar el espectro con $AlCl_3$ y HCl se mantiene un desplazamiento batocrómico de 35-55 nm en la banda I (comparando con el espectro metanólico) se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado. Si el desplazamiento es de 17-20 nm se puede tratar de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado y 6-oxigenado. Si el desplazamiento es de 50-60 nm se trata de una flavona o un flavonol 3-hidroxiado (con o sin 5-OH). (Martínez, 2005)

Los flavonoides pueden detectarse en una cromatografía en capa delgada por el color que desarrollan en el espectro Visible (Vis) o en Ultravioleta (UV); debido a la relación que existen entre los colores y la posible estructura del flavonoide. El espectro de absorción en el UV-Vis del compuesto aislado es útil para determinar el tipo y la cantidad de flavonoide. Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente

consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm y 300-550 nm. La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos. La reacción de flavonoides con sales metálicas como el cloruro de aluminio actúa como excelente catalizador para la reacción de cloración. La reacción de un o-hidroxialdehído aromático con un aldehído o una cetona en presencia de ácido da un derivado benzopirano llamado sal de benzopirilio. Un probable intermedio en la reacción es el hemiacetal cíclico, que es una pseudobase como la que se encuentra en equilibrio con hidróxido de oxonio. La metenamina también denominada hexametilentetramina, cuya estructura es un anillo cíclico, es utilizada para catalizar las reacciones de resinas de fenol-formaldehído. (Teleguario, 2008)

2.3.5 Capacidad antioxidante por fotoquimiluminiscencia (PCL)

La fotoquimiluminiscencia (PCL) es una técnica que permite la cuantificación tanto de la capacidad antioxidante de la sustancia pura en hidrófilos y/o lipófilos, como la medición de la capacidad antioxidante en fase lipídica (ACL) y en fase acuosa (ACW) de matrices complejas de diverso origen: sintética, vegetal, animal, humana, etc. Con este método, las propiedades antioxidantes de las sustancias en cuestión se pueden determinar en forma rápida y eficiente, limitando la pérdida de actividades relacionadas con la degradación. La metodología se basa en autooxidación fotoinducida de luminol, acompañada de una intensa quimioluminiscencia. La presencia de antioxidantes inhibe la autooxidación del luminol, debido a la interacción con O^{2*-} generada por vía fotoquímica. El luminol asume el papel sea de fotosensibilizador como de reactivo quimioluminiscente. En presencia de sustancias que actúan como trampas para radicales, la intensidad de PCL es aumentada en función de su concentración. La prueba puede llevarse a cabo de acuerdo a dos protocolos diferentes, ACW y ACL, que consiste en poner en evidencia la capacidad antioxidante de componentes hidrosolubles y liposolubles, respectivamente. De hecho, en el componente hidrosoluble incluye antioxidantes pertenecientes a la familia de flavonoides, mientras en el liposoluble incluye compuestos como tocoferol, tocotrienol, carotenoides, etc. El protocolo ACL implica el uso de Trolox como estándar de referencia, mientras por el ACW se utiliza el ácido

ascórbico, el resultado está expresado respectivamente en equivalente de Trolox y equivalente de ácido ascórbico. (Universidad de Estudios de Ferrara, 2013)

2.4 Uso industrial de los antioxidantes

A finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, extensos estudios, fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna. (Jacob, 1996)

Los antioxidantes sintéticos se han considerado relativamente seguros y se aplican ampliamente en una serie de productos manufacturados incluidos los productos farmacéuticos, cosméticos, alimentos para humanos, y en la alimentación animal. En la industria alimenticia, el ácido ascórbico y sus derivados, el conjunto de tocoferoles conocidos como vitamina E, el BHA, el BHT, entre otros, son muy utilizados en productos cárnicos, conservas vegetales, bebidas refrescantes, zumos, productos de repostería y en la cerveza, para eliminar el oxígeno del espacio de cabeza. Contribuyen a evitar el oscurecimiento de la fruta cortada en trozos y a evitar la corrosión de los envases metálicos. El Butilhidroxianisol (BHA), es un antioxidante sintético que se utilizó inicialmente en la industria petrolífera. Desde los años cuarenta se utiliza como aditivo alimentario, al igual que el Butil-hidroxi-tolueno (BHT), o el cloruro estannoso (como aditivo exclusivamente para espárragos enlatados, aunque prácticamente ya no se utiliza). (Valenzuela & Nieto, 1996)

2.5 Aceites Esenciales

Son compuestos químicos producidos a través del metabolismo secundario que provienen de una misma familia química. Tiene la particular característica de proporcionar a la planta olores agradables para el ser humano, por ende se los utiliza como compuestos de gran importancia en la industria cosmética, nutracéutica y farmacéutica. Se localizan en toda la planta ya sea en la raíz, fruto, hoja, sumidad florida, etc. (Tabla 6). (Mahecha, 2010)

Los aceites esenciales o esencias volátiles son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas, los cuales generalmente se obtienen por destilación

por arrastre de vapor, aunque también existen otros tipos de técnicas. (Mahecha, 2010)

Tabla 6: Localización de los aceites esenciales

Raíz; rizoma: cúrcuma, jengibre	Sumidad florida: menta, lavanda
Fruto: anís, enebro	Flores: manzanilla
Corteza: canela	Hojas: eucalipto, laurel, tomillo
Leño: alcanfor	

Fuente: (Kuklinski, 2003)

2.5.1 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se los clasifica de acuerdo a los siguientes criterios:

- Consistencia
- Naturaleza química
- Origen

Consistencia

De acuerdo a la consistencia se clasifican en bálsamos, resinas y esencias

- **Esencias:** son líquidos volátiles a temperatura ambiente (Mahecha, 2010)
- **Bálsamos:** tienen la consistencia más espesa, son poco volátiles y pueden sufrir reacciones de polimerización. (Mahecha, 2010)
- **Resinas:** son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas como el caucho (Mahecha, 2010)

Naturaleza Química

Esta clasificación se da por la composición química de las sustancias mayoritarias presentes en el aceite por ejemplo aquellos aceites ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (por ejemplo hierbabuena, albahaca, etc.), en sesquiterpenoides son los aceites esenciales sesquiterpenoides (por ejemplo copaiba, pino, etc.) (Mahecha, 2010)

Por lo general en la planta el contenido total de aceites esenciales es menos del 1%, mediante diversos métodos de extracción se puede obtener una forma muy

concentrada que es empelada para diferentes usos en la industria. (Martínez M. A., 2003)

Origen

De acuerdo al origen se clasifican en naturales, artificiales y sintéticos.

- **Naturales:** son aquellos que se obtienen directamente de la planta sin sufrir ninguna modificación posterior ya sea física o química. Son demasiado costosas debido a su bajo rendimiento. (Martínez M. A., 2003)
- **Artificiales:** son aquellos que se obtienen a través de diversos métodos con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, a mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecido con linalol. (Martínez M. A., 2003)
- **Sintéticos:** son aquellos que se producen por la combinación de sus componentes que en la mayoría dichos componentes son producidos por síntesis química, son mucho más utilizados en la industria debido a que son muy baratos. (Martínez M. A., 2003)

2.5.2 Química de los Aceites Esenciales

Químicamente son muy diversos se encuentran distribuidos principalmente en cuatro grandes grupos: los hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, los hidrocarburos alifáticos y sus derivados oxigenados, los derivados del benceno y los compuestos misceláneos. (Noriega, 2009)

Hidrocarburos Terpénicos

Los terpenos y sus derivados son hidrocarburos cuya estructura química se deriva del isopreno (2-metil-butadieno) que pueden estar ligados de diversas maneras ya sea con diferentes tipos de cierres de anillos, con diferentes grados de insaturación, y con distintos grupos funcionales. (Sacchetti, y otros, 2004). Estos hidrocarburos se pueden clasificar en:

- Monoterpenos (C10): acíclicos, monocíclicos, bicíclicos
- Sesquiterpenos (C15): acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, sesquiterpelactonas, azulenos

- Diterpenos (C20): acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, giberelinas
- Triterpenos (C30)
- Tetraterpenos (C40) (Noriega, 2009)

Hidrocarburos alifáticos

Son compuestos orgánicos que están constituidos por carbono e hidrogeno, los átomos de carbono forman cadenas de hidrocarburos y sus derivados oxigenados como aldehídos, cetonas, ácidos ésteres. (Noriega, 2009)

Derivados del Benceno

Es el tercer grupo mayor de constituyentes de los aceites esenciales, son los derivados del benceno o específicamente del n- propil benceno y sus derivados oxigenados. (Sacchetti, y otros, 2004)

Compuestos Misceláneos

Son los compuestos que presentan diversa naturaleza. (Noriega, 2009)

2.5.3 Características Físicas de los Aceites Esenciales

- Son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente.
- Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos.
- Su densidad es inferior a la del agua
- Tienen un índice de refracción elevado.
- Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales como por ejemplo éter o cloroformo
- Son liposolubles y muy poco solubles en agua (tabla 7) (Mahecha, 2010)

Tabla 7: Propiedades generales de los aceites esenciales

Líquidos a temperatura ambiente	Poder rotatorio
Volátiles	Lipófilos
Aromáticos	Solubles en disolventes orgánicos apolares

Incoloros o amarillentos	Índice de refracción elevado
Menos densos que el agua	Insolubles en agua
Extraíbles por arrastre de vapor, de agua o expresión	

Fuente: (Kuklinski, 2003)

2.5.4 Propiedades Químicas de los Aceites esenciales

Se clasifican en terpenoides y no terpenoides

- **Terpenoides:** son el grupo más importante y utilizado en la industria, los terpenos son unos compuestos que se encuentran en los aceites esenciales, resinas y en aquellas sustancias aromáticas como en los pinos y en los cítricos. (Mahecha, 2010)
- **No terpenos:** no se los considera tan importantes en cuanto a sus usos y aplicaciones. En este grupos se encuentran sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. (Mahecha, 2010)

2.5.5 Grupos Funcionales que tienen los Aceites Esenciales

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, thuyona)
- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β pineno) (Mahecha, 2010)

2.5.6 Métodos de Extracción de los Aceites Esenciales

Dentro de los procesos más importantes de extracción de aceites esenciales tenemos: extracción por destilación (en corriente de vapor a presión reducida), por expresión, por extracción mediante grasas o solventes y por extracción con fluidos supercríticos. (Martínez M. A., 2003)

- **Expresión:** este proceso es utilizado para el caso de los cítricos en los que el material vegetal es exprimido para liberar el aceite, el cual es recolectado y luego filtrado. (Martínez M. A., 2003)
- **Enflorado o Enfleurage:** como su nombre lo indica es utilizada en la industria para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), aunque es un proceso demasiado costoso debido a su bajo rendimiento. (Martínez M. A., 2003)
- **Extracción con Fluidos Supercríticos:** es el método más moderno para extracción de aceites esenciales y presenta muchas ventajas como que no produce ningún daño al medio ambiente, los solventes que se utilizan son de fácil eliminación y hasta se pueden reciclar, tienen un rendimiento muy alto, se usan bajas temperaturas por lo que no cambian la composición química de las esencias. (Martínez M. A., 2003)
- **Extracción con Solventes Volátiles:** este proceso es normalmente utilizado a nivel de laboratorio debido a que resulta costosa por el valor que tiene los solventes, y además porque se obtienen esencias impuras. (Martínez M. A., 2003)
- **Destilación por Arrastre de Vapor:** es el proceso más utilizado en la industria ya que tiene un alto rendimiento, a la pureza del aceite que se obtiene y además porque no necesita de una tecnología demasiado sofisticada, es especialmente utilizado para la industria de perfumería. Consiste en colocar la muestra vegetal fresca y cortada en trozos pequeños en una cámara inerte la cual es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, la esencia que es arrastrada luego tiene un proceso de condensación, posteriormente es recolectada y separada de la fracción acuosa. (Martínez M. A., 2003)
En este proceso existe agua en el fondo del recipiente. El vapor de agua está saturado o súper calentado, y frecuentemente, a una mayor presión que la atmosférica, es introducido atravesando el material vegetal colocado sobre un

soporte. La gran ventaja de este proceso consiste en que la cantidad de vapor de agua puede ser controlada. El proceso de destilación con vapor da como resultado riesgos menores de degradación térmica y constituye el proceso más utilizado por la industria de los aceites esenciales, principalmente cuando se trata de la producción de aceites esenciales para la fabricación de perfumes. (Sharapin, 2000)

El equipo (Gráfico 3) para la destilación de aceites esenciales comprende cinco componentes básicos: recipiente, condensador, vaso separador, colector y generador de vapor.

El recipiente está representado por el aparato de extracción, propiamente dicho. Generalmente, este recipiente está hecho de acero inoxidable y posee un fondo falso compuesto por una lámina perforada de acero inoxidable en la cual se deposita el material vegetal para ser extraído.

El fondo de forma cónica posee un grifo de desagüe para permitir la salida del vapor de agua condensado. En la parte superior tiene una tapa con cierre hermético. La tapa está conectada al condensador por medio de un tubo, también de acero inoxidable.

El condensador es el lugar donde los vapores de aceite y de agua pasan a la fase líquida, posibilitando la separación de dos líquidos no miscibles. El condensador está constituido por un serpentín o varios tubos refrigerados mediante agua corriente.

El vaso separador es el recipiente en donde se realiza la decantación del aceite esencial y agua. La decantación debe ser rápida y completa. El volumen de agua condensada siempre es mayor que la cantidad de aceite; por esta razón, el agua debe ser eliminada continuamente. Los separadores son de dos tipos: separadores para aceites más livianos y para aceites más pesados que el agua.

El recolector es un recipiente, de forma y volumen apropiado, destinado a recoger el aceite esencial, una vez separada el agua. Los recolectores deben ser de material resistente a la acción corrosiva de los componentes de los aceites esenciales. Los tambores recubiertos internamente con resinas tipo epoxi son de gran utilidad para la recolección y el almacenamiento de los aceites. (Noriega, 2009)

Gráfico 3: Equipo de destilación por Arrastre de Vapor



Fuente: Chang, 1992

2.5.7 Usos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales principalmente se los utiliza en la industria farmacéutica, cosmética alimentaria, así como agroindustrial (insecticidas).

Industria farmacéutica: se usan en la formulación de cremas dentales, inhalantes y analgésicos para descongestionar las vías respiratorias. (Tabla 8). El eucaliptol es muy empleado en odontología. (Universidad Politécnica de Madrid, 2011)

Industria alimentaria: se usan para condimentar carnes, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Además para la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas. (Universidad Politécnica de Madrid, 2011)

Industria cosmética: se usan principalmente en la elaboración de perfumes. (Universidad Politécnica de Madrid, 2011)

Biosidas e insecticidas: son aceites que actúan contra hormigas, áfidos, pulgas, moscas, etc. (Tabla 8 y 9). (Universidad Politécnica de Madrid, 2011)

Tabla 8: Usos de los aceites esenciales (Vía externa)

Vía externa	
Antisépticos	Rubefaciente
Desodorante	Analgésico
Antiinflamatorio	Insecticida/repelente
Cicatrizante	Vulnerario

Fuente: (Kuklinski, 2003)

Tabla 9: Usos de los aceites esenciales (Vía interna)

Vía interna	
Expectorante	Colerético
Carminativo	Antiinflamatorio
Estomacal	Digestivo
Antiespasmódico	Diurético
Sedante	

Fuente: (Kuklinski, 2003)

2.6 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son mezclas de consistencia líquida, semisólida o sólida, los cuales son obtenidos generalmente a partir de material vegetal o tejidos animales en estado seco. Se clasifican en extractos fluidos y tinturas, extractos blandos o densos y extractos secos. (Martínez M. , 2012)

Los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente que pueden ser alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo y un proceso de extracción adecuado. (Gráfico 4) (Pérez, 2011)

Gráfico 4: Etapas generales para la obtención de extractos vegetales



Fuente: (Pérez, 2011)

2.6.1 Clasificación de los extractos vegetales

Extractos Fluidos

Los extractos fluidos son preparaciones líquidas en las que se usa como solvente etanol y que además también funciona como preservante. (Miranda, 2001)

Extractos Blandos

Los extractos blandos se definen como el extracto fluido correspondiente a 4-6 kg de la droga, concentrado con vacío a una temperatura inferior a 60 °C hasta el peso de 1 kg de extracto. (Miranda, 2001)

Extractos Secos

El extracto seco se define como el extracto fluido concentrado con vacío a una temperatura inferior a 60 °C, hasta que quede en forma de polvo seco. (Miranda, 2001)

Crioextractos

Se obtienen de la droga fresca congelada, de la que se extraen los principios activos mediante nitrógeno líquido y luego se añade alcohol etílico. Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies. (Kuklinski, 2003)

2.6.2 Principales métodos para la extracción

Maceración: la maceración es un proceso de extracción que se caracteriza por remojar la droga en una cantidad de menstuo o solvente ya establecida, ésta se coloca en un recipiente de vidrio, se deja de 2 a 14 días bien cerrado y alejado de la luz, en el caso de que no se conozca el tiempo de maceración es aconsejable dejar 7 días. (Tabla 10)

Por lo general la maceración se utiliza cuando no se puede usar la lixiviación que es uno de los métodos más empleados para extracción, este método también se utiliza cuando los principios activos pueden sufrir alteración por el calor o por el aire y son solubles a temperatura ambiente en un menstuo que no debe ser volátil. (Miranda, 2001)

Digestión: en este método se aplican todos los pasos que se llevan a cabo en la maceración con la única diferencia que en este método se emplea el calor. (Tabla 10). Se aplica una temperatura superior a la ambiente pero inferior a la de ebullición del menstuo y su aplicación mediante cualquier variante que permita su regulación. (Miranda, 2001)

Lixiviación o Percolación: en este método se utiliza un equipo llamado lixivador o percolador el cual retiene la droga y a través de él se hace circular un menstuo en forma descendente, se deja en reposo alrededor de unas 48 horas, transcurrido este tiempo se abre la llave del percolador y se recolecta todo el líquido posible. (Miranda, 2001) (Tabla 11)

Tabla 10: Condiciones de los distintos tipos de extracción

Extracción discontinua	Temperatura	Tiempo	Disolventes
Maceración	Temperatura ambiente	Horas-días	Agua, mezclas hidroalcohólicas, glicerina
Digestión	Temperatura > ambiente	Horas-días	Agua, mezcla hidroalcoholicas, glicerina
Infusión	Temperatura próxima a la ebullición;	1-2 minutos hasta 30	Agua

	temperatura menor	minutos	
Decocción	Temperatura ebullición	13-30 minutos	Agua

Fuente: (Kuklinski, 2003)

Tabla 11: Condiciones de los distintos tipos de extracción

Extracción	Temperatura	Tiempo	Disolvente
continua			
Percolación	Temperatura ambiente	Variable	Variado
Soxhlet	Temperatura ebullición	Variable	Disolvente orgánico

Fuente: (Kuklinski, 2003)

2.6.3 Concentración de Extractos vegetales

Una vez que se ha obtenido el extracto es necesario concentrarlo con la finalidad de que se elimine parte del solvente que se ha utilizado y aumente la cantidad de sólidos contenidos en el extracto. Para ello el rotavapor es el mejor equipo para concentrar un extracto en el que se utiliza presión reducida con lo que disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente. (Pérez, 2011)

2.6.4 Secado de los extractos vegetales

Para preservar los componentes naturales presentes en los extractos de plantas, se emplean métodos de secado para su obtención en forma de polvos. Estos pueden ser secados por atomización y lecho fluidizado fundamentalmente. En estos procesos es muy importante evaluar las variables: concentración de sólidos, temperatura de secado, humedad, presión, flujo y velocidad de trabajo, así como la utilización de aditivos inertes como coadyuvantes del secado para favorecer el rendimiento (Pérez, 2011)

Ventajas de los extractos vegetales

- Buena conservación, sobre todo aquellas soluciones extractivas en las que el disolvente es antiséptico (alcohol, propilenglicol).
- Fácil utilización.
- Posibilidad de concentrar el contenido por eliminación de los disolventes.
- Posibilidad de estandarizar los productos obtenidos es decir ajustar el contenido de principio activo (Kuklinski, 2003)

2.7 Compuestos antioxidantes

2.7.1 Compuestos Fenólicos

Las plantas a lo largo de toda su vida tienen la capacidad de producir una gran cantidad de grupos de compuestos que provienen del metabolismo secundario, uno de estos grupos son los fenoles a los cuales se les confiere la capacidad antioxidante, estos compuestos pueden estar en cualquier parte de la planta y las concentraciones pueden variar a lo largo de la vida de la especie. Las características que tienen que ver con el sabor, el olor, la astringencia y la dureza son dadas por los fenoles, además que su capacidad antioxidante se debe a la reactividad del grupo fenol. (Paladino, 2008)

Los compuestos fenólicos de los vegetales proceden de las dos grandes vías de la aromanogénesis:

- La vía del sikimato (ácido sikímico) es la más frecuente, conduce a partir de osas a la formación de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) y después por desaminación de estos últimos, a la de ácidos cinámicos y de numerosos derivados ácidos benzoicos, acetofenonas, lignanos y ligninas, cumarinas, etc. (Bruneton, 2001)
- La otra vía parte del acetato y conduce a la formación de poli- β cetoesteres de longitud variable poliacetatos que producen por ciclación compuestos normalmente policíclicos cromonas, isocumarinas, orcinoles, depsidos, xantonas, quinonas. (Bruneton, 2001)

Dentro de las principales funciones que poseen los fenoles se citan:

- Asimilación de nutrientes
- Síntesis proteica
- Actividad enzimática
- Fotosíntesis
- Formación de componentes estructurales
- Alelopatía
- Defensa ante los factores adversos del ambiente (Paladino, 2008)

2.7.2 Clasificación de los Compuestos Fenólicos

En la naturaleza se encuentran alrededor de 8000 compuestos fenólicos. Se les denomina compuestos fenólicos porque todos en su estructura poseen un anillo fenol- un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. (Paladino, 2008)

Se califican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química entre ellos tenemos:

No flavonoides

- Fenoles no carboxílicos: C6, C6-C1, C6-C3.
- Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3. (Gimeno, 2004)

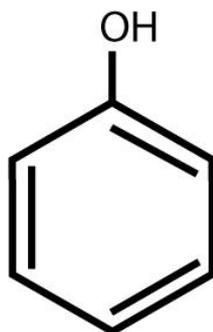
Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.

Subgrupos:

- Antocianos.
- Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos. (Gimeno, 2004)

Gráfico 5: Estructura de un Fenol



Fuente: (Paladino, 2008)

2.7.2.1 Ácidos Fenólicos

Según su estructura se clasifican en derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico. Dentro de este grupo se han identificado al ácido cafeico, ácido vainílico, ácido ferulico, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido benzoico y ácido p-hidroxbenzoico. (Soler, 2009)

Fenoles simples

Son compuestos bastante escasos en la naturaleza salvo la hidroquinona que se encuentra en diversas familias como en la Ericaceae, Rosaceae, etc., Frecuentemente se encuentran en forma de glucósido del difenol o de un monometiléter. (Paladino, 2008)

Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico

Son compuestos muy frecuentes tanto libres como combinados al estado de ésteres o de heterósidos. (Paladino, 2008)

Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico

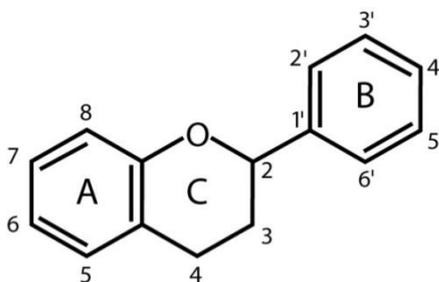
La mayoría de los ácidos fenólicos están ampliamente distribuidos, se encuentran raramente en forma libre, normalmente esterificados. (Paladino, 2008)

2.7.2.2 Flavonoides

Son compuestos fenólicos que en su estructura están formados por dos grupos fenilo A y B unidos por un puente de tres carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado (C), son de bajo peso molecular. (Domínguez, 2010). Se han identificado alrededor de 4000 compuestos flavonoides entre ellos están los derivados hidroxilados (aquellos que tienen en su estructura un grupo hidroxilo), metoxilados (tienen en su estructura un grupo metoxilo), y glicosilados (tienen en su estructura un glúcido). A estos compuestos se les atribuye la propiedad de ser antioxidantes y la capacidad de capturar radicales, (Paladino, 2008)

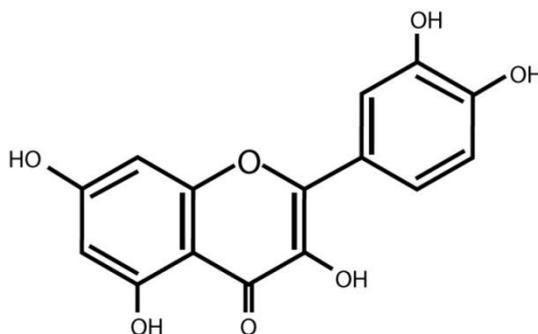
Son casi siempre hidrosolubles, son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. Si no son directamente visibles, contribuyen a la coloración por su papel de copigmentos: así ocurre con las flavonas y flavonoles incoloros que copigmentan y protegen a los antocianósidos. Los flavonoides se encuentran también en la cutícula foliar y en las células epidérmicas de las hojas lo cual ayuda a proteger los tejidos contra los efectos nocivos de las radiaciones ultravioletas. (Bruneton, 2001)

Gráfico 6: Estructura Básica de los Flavonoides



Fuente: (Paladino, 2008)

Gráfico 7: Estructura de la quercetina



Fuente: (Bruneton, 2001)

2.7.2.3 Distribución

La presencia de flavonoides es frecuente en Bryophytas (musgos y hepáticas) y son mayoritariamente de *O*-y *C*-heterosidos de flavonas y de derivados *O*-uronicos. En Pteridophytas no es mayor la variedad estructural de flavonoides, las Psylotales y Selaginellales se caracterizan por la presencia de biflavonoides, las Equisetales presentan los compuestos proantocianidoles. Los helechos presentan los *O*-heterosidos y también pueden presentar chalconas o proantocianidoles. (Bruneton, 2001)

2.7.2.4 Estructura química

Los flavonoides presentan en su estructura al menos tres hidróxilos fenólicos en C-5, C-7 y C-4 de la genina.

2.7.2.5 Clasificación de los Flavonoides

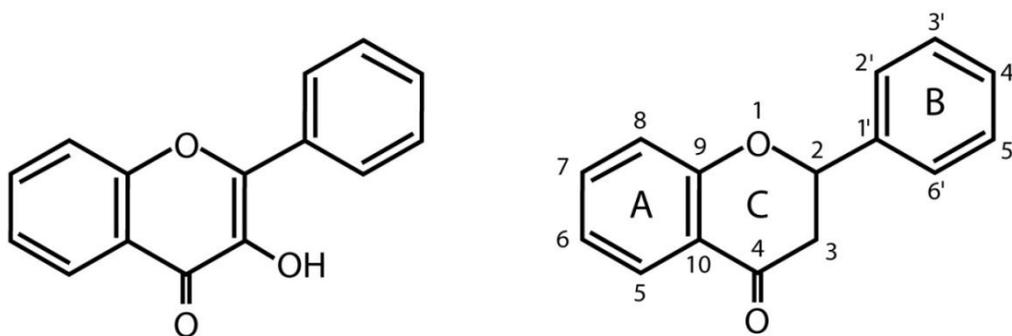
Flavonas, flavonoles

En estas moléculas el ciclo A se encuentra en más del 90% de los casos, sustituidos por dos hidroxilos fenólicos en C-5 y C-7. Estos hidroxilos se pueden encontrar libres o eterificados. Un tercer hidroxilo libre en las chalconas, es biogenéticamente el origen del átomo de oxígeno del ciclo piránico de los demás flavonoides y del oxígeno del ciclo furánico de las auronas. (Bruneton, 2001)

Las flavonas son compuestos que le confieren el color amarillo a los pétalos y frutos de algunas plantas, son los responsables del color amarillo de los vinos blancos. (Martínez A. , 2005) Las flavonas más importantes son:

- Tricetina
- Apigenina
- Luteolina

Gráfico 8: Estructura de Flavonas y Flavonoles



Fuente: (Martínez A. , 2005)

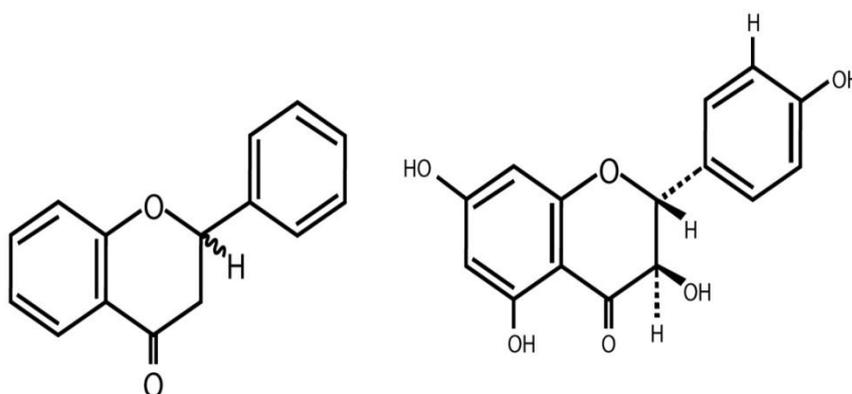
Flavanonas y dihidroflavonoles

Se caracteriza por la ausencia del doble enlace en 2,3 y por la presencia de centros de asimetría. En las flavanonas naturales, el carbono C-2 es normalmente de configuración 2S. En los dihidroflavonoles son posible cuatro isómeros. (Bruneton, 2001).

Son compuestos que se encuentran en muy altas concentraciones principalmente en los cítricos. Son precursores de otros flavonoides más complejos. Las principales flavanonas son:

- Naringenina
- Liquiritigenina
- Eriodictiol

Gráfico 9: estructura de Flavanonas y dihidroflavonoles

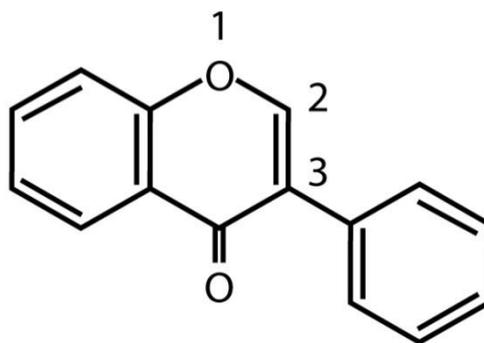


Fuente: (Bruneton, 2001 y Martínez A. , 2005)

2.7.2.6 Isoflavonoides

Derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4- benzopirona). Se forman por migración de un anillo bencénico de la posición 2 a 3 del anillo central. El grupo integra más de 230 estructuras, y los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína. Su función es defender a las plantas del ataque de patógenos. (Bruneton, 2001)

Gráfico 10: Estructura de un isoflavonoide



Fuente: (Paladino, 2008)

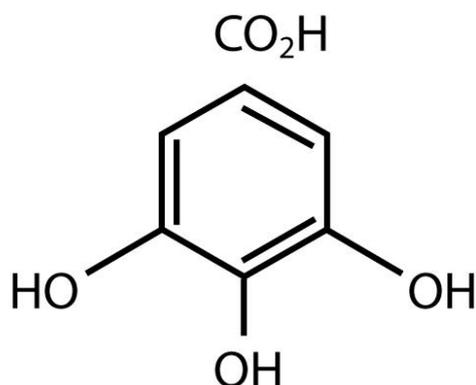
2.7.2.7 Taninos

Son compuestos polifenólicos de naturaleza no nitrogenada son solubles en agua, alcohol y acetona y poco solubles en éter, tienen un sabor astringente.

La estructura de los taninos se basa en polímeros más o menos complejos formados por unidades de flavan-3-oles o 3-flavanoles. Los flavan-3-oles, comúnmente llamados catequinas poseen dos ciclos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado (núcleo fenil-2 cromano). (Romero, 2008)

Tienen una masa molecular comprendida entre 500 y 3000 y presentan, junto a las reacciones clásicas de fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. (Bruneton, 2001)

Gráfico 11: Estructura de taninos (ácido gálico)



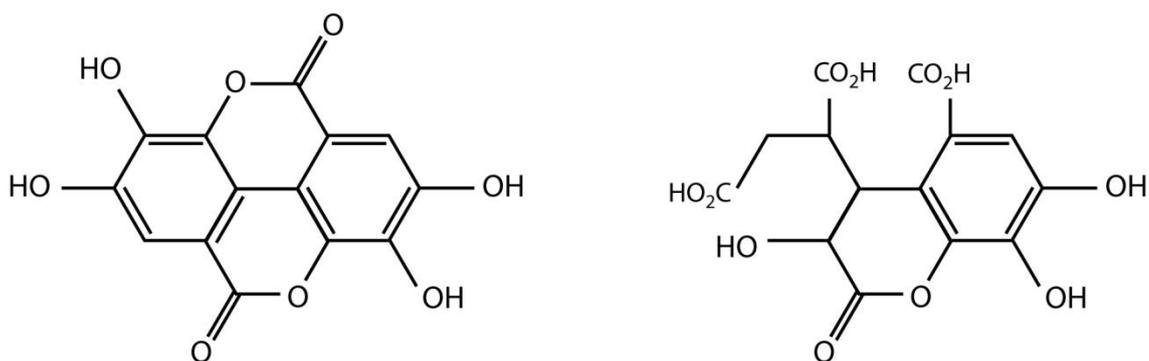
Fuente: (Bruneton, 2001)

2.7.2.7.1 Clasificación de los taninos

Taninos hidrolizables

Son oligo- o poliésteres de un azúcar y de un número variable de moléculas de ácido fenol. El azúcar generalmente es la glucosa. El ácido fenol es o bien el ácido gálico en el caso de los taninos gálicos, o el ácido hexahidroxidifenico y sus derivados de oxidación en el caso de los taninos clásicamente llamados taninos elagicos. (Bruneton, 2001)

Gráfico 12: Estructura de taninos hidrolizables (ácido elágico, ácido chebúlico)



Fuente: (Bruneton, 2001)

Taninos condensados

También llamados proantocianidoles son polímeros flavánicos, están constituidos por unidades de flavan- 3-oles ligadas entre sí por enlaces carbono-carbono generalmente 4→8 ó 4→6, resultante de un acoplamiento entre el C-4. (Bruneton, 2001)

2.8 Cromatografía

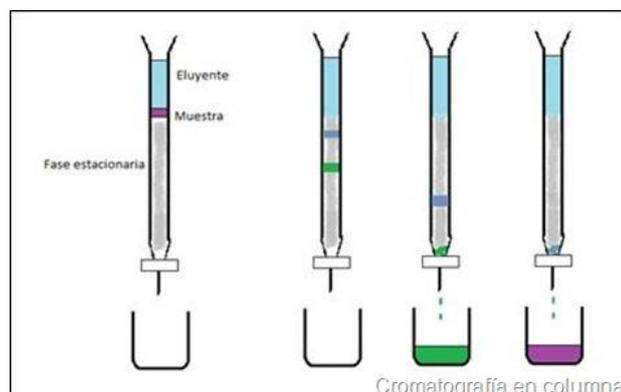
La cromatografía es una técnica en la se separan los constituyentes de una mezcla. Es el método analítico que mas se utiliza en los ultimos tiempos para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. Es la técnica con mas campo de aplicación y gracias a ello ocupa una posición dominante. (Rousessac, 2000)

Es un procedimiento de aplicación muy amplia, tanto asi que muchas mezclas heterogeneas o en forma sólida pueden transformarse en fase líquida po el empleo de un disolvente. (Rousessac, 2000)

El procedimiento de se describe de la siguiente manera:

- Se inmoviliza en una columna un sólido finamente dividido llamado *fase estacionaria*.
- Se coloca en la parte superior de la columna un pequeño volumen de *muestra* que hay que separar.
- Se fuerza a la mezcla disuelta, a través de la *fase móvil*, a atravesar la columna de arriba abajo para arrastrar los diversos constituyentes. Si los compuestos de la mezcla migran a velocidades diferentes, podrán recogerse separadamente. (Rousessac, 2000)

Gráfico 13: Cromatografía en columna



Fuente: (tripleenlace, 2012)

2.8.1 Cromatograma

El cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. El tiempo de elución se lleva al eje de abscisas, y la intensidad de la señal detectada, al eje de ordenadas. La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluido. La separación se completa cuando el cromatograma presenta tantos picos que vuelven a la línea base como compuestos hay en la mezcla de análisis. (Rousessac, 2000)

2.8.2 Clasificación de las técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas se clasifican de acuerdo a la naturaleza física de las fases, según el procedimiento utilizado, según el fenómeno físico-químico originario del coeficiente de distribución K. (Rousessac, 2000)

Cromatografía Líquida (LC)

Es el método en donde si la fase móvil es un líquido (denominado eluyente). (Gutiérrez, 2002). Es la técnica de cromatografía más antigua conocida como método preparativo de separación. Fue utilizada por primera vez en 1903-1906 por el botánico ruso Mikhail Tswett para separar los componentes coloreados de un extracto de plantas. Esta técnica a su vez se subdivide en *Cromatografía líquido-sólido (o de adsorción)*, *Cromatografía iónica*, *Cromatografía de exclusión*, *Cromatografía líquido-líquido (o de reparto)*, *Cromatografía de afinidad (de fase enlazada)* (Rousessac, 2000)

2.8.3 Cromatografía de Gases (GC)

La fase móvil es un gas inerte, es una técnica muy extendida sus primeras aplicaciones se remontan a principios de los años 40 en donde se aplicaron en el control de las fracciones ligeras de las refinerías de petróleo. Las aplicaciones son muy numerosas en todos los terrenos y los desarrollos de la cromatografía gaseosa a gran velocidad o multidimensional hacen que esta técnica sea más interesante. Se divide en *Cromatografía gas-líquido*, *Cromatografía gas-sólido*. (Rousessac, 2000)

2.8.4 Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC)

La fase móvil es un fluido en estado supercrítico, como el dióxido de carbono a unos 50° C y 150 bares. La fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. (Rousessac, 2000)

2.8.5 Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC, de thin layer chromatography) es una técnica complementaria de la HPLC que tiene su propia especificidad. Si bien el funcionamiento de estas dos técnicas es diferente, el principio de la separación y la naturaleza de las fases es el mismo. Es un método sensible, de bajo costo y con posibilidad de automatizarse, y dada su gran capacidad de tratamiento de muestras, constituye un método muy utilizado en análisis cuantitativo. (Rousessac, 2000)

2.8.5.1 Funcionamiento de la cromatografía en capa fina

La separación de los constituyentes de la muestra por cromatografía en capa fina se realiza sobre una delgada capa del material que constituye la fase estacionaria, generalmente compuesta por gel de sílice, depositando sobre una placa rectangular de vidrio, plástico o aluminio. (Rousessac, 2000)

El principio de la separación entre las fases es semejante al de la HPLC, pero el proceso experimental en TLC es diferente. El proceso se realiza en tres etapas:

Aplicación de la muestra

Se inicia aplicando un pequeño volumen que puede ser de varios microlitros de una disolución diluida de la muestra, aproximadamente a un centímetro del borde inferior de la placa. Esta aplicación se realiza, manualmente o de manera automática, por medio de un capilar de extremo plano. La mancha puede tener la forma de un trazo horizontal de algunos milímetros, que se obtiene por pulverización de la muestra mediante un dispositivo automático (Rousessac, 2000)

Gráfico 14: Equipo de TLC



Fuente: (Camag, 2013)

Migración sobre la placa

La placa se introduce en una cuba provista de una tapadera, de la que existen numerosos modelos, y en el fondo de la cual se encuentra un poco de la fase móvil que sirve de eluyente. La aplicación de la disolución de la muestra debe llevarse a cabo por encima del nivel del eluyente si este último contiene agua puede ser útil añadir una sal para limitar los fenómenos de disolución y aumentar de este modo la resolución.

La fase móvil migra por capilaridad a través de la fase estacionaria, arrastrando a diferentes velocidades los constituyentes a separar. El tiempo de migración depende de diversos parámetros. (Rousessac, 2000)

Revelado postcromatográfico

La localización de compuestos incoloros exige que estos sean revelados. Para facilitar su visualización, las placas contienen una sal de zinc fluorescente añadida a la fase estacionaria. Al eliminar la placa con una lámpara de vapor de mercurio, se ve aparecer, en forma de manchas oscuras o coloreadas sobre un fondo fluorescente, las posiciones donde se encuentran los compuestos. (Rousessac, 2000)

Fases estacionarias

Para elegir una buena fase estacionaria se debe tomar en cuenta parámetros físico-químicos por ejemplo el tamaño de los granos, su superficie específica, el volumen de los poros, su diámetro y la distribución granulométrica.

En TLC también se utilizan soportes con base de celulosa, bajo la forma de fibra o polvo microcristalino. La más conocida es la DEAE-celulosa, fase bastante básica que lleva el grupo dietilaminoetilo. (Rousessac, 2000)

Particularidades asociadas a la TLC

- Comprende un sistema donde están presentes tres fases distintas: una fase estacionaria sólida, una fase móvil líquida, una fase vapor, en equilibrio.
- La fase estacionaria está parcialmente equilibrada por la fase líquida antes del paso de los compuestos.
- No es posible hacer variar el flujo de la fase móvil para mejorar la separación. (Rousessac, 2000)

2.9 Descripción de la especie vegetal: mashua (*Tropaeolum tuberosum*)

Mashua – *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón – Tropaeolaceae

Gráfico 15: Planta de Mashua



Fuente: (Morley read, 2009)

2.9.1 Taxonomía:

Tabla 12: Taxonomía

Nombre Científico:	<i>Tropaeolum tuberosum</i>
Reino:	Plantae
Filo:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledoneae
Orden:	Brassicales
Familia:	Tropaeolaceae
Género:	Tropaeolum
Especie:	<i>tuberosum</i>
Autor Epíteto Específico	Ruiz & Pavón

Fuente: (Perú ecológico, 2007)

2.9.2 Familia Tropaeolaceae

Las Tropaeolaceae son una familia de plantas herbáceas, generalmente suculentas, de tallos postrados frecuentemente trepadores por pecíolos sensitivos que se enrollan. A veces con raíces tuberosas. Hojas alternas, peltadas a veces lobadas, sin estípulas. Flores: perfectas, zigomorfas, espolonadas, generalmente solitarias axilares. Perianto: sépalos 5, uno diferenciado en espolón relleno de néctar; pétalos 5 frecuentemente unguiculados. Estambres: 8. Gineceo: ovario súpero, 3 carpelar, 3 locular, con 1 óvulo péndulo por lóculo, estilo apical, estigmas 3. Fruto: esquizocarpo formado por tres mericarpos. Semillas: sin endosperma, con embrión recto y cotiledones gruesos, carnosos. (Facultad de Ciencias exactas y naturales y agrimensura, 2001)

2.9.3 Género *Tropaeolum*

El género *Tropaeolum* comprende unas 80 especies de plantas herbáceas, anual y perenne con flores, es una de los tres géneros de la familia Tropaeolaceae. Este género natural de Suramérica y América Central. Incluye varias plantas muy populares de jardín que son *Tropaeolum speciosum*, *Tropaeolum majus* y *Tropaeolum peregrinum*. La especie más robusta es *Tropaeolum polyphyllum* de Chile, ya que las raíces perennes pueden sobrevivir cuando la temperatura cae a 15° bajo cero. La característica principal de este género es que poseen flores llamativas, a menudo brillantes. Las flores tienen cinco pétalos y son tubulares. Las flores se pueden degustar en ensaladas exóticas, tienen un gusto similar al berro. El género *Tropaeolum tuberosum* produce un tubérculo subterráneo comestible, fuente de alimento en los Andes. Las especies *Tropaeolum* son utilizadas como alimento por las larvas de ciertas especies de Lepidopteros. En el Perú existen 24 especies pertenecientes a este género todas ellas son herbáceas y bejuco, las cuales se encuentran principalmente en las regiones bosques muy húmedos montanos y mesoandina, entre los 1800 y 3200 m de altitud.

2.9.4 Descripción de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón

Hábito: Hierba terrestre o bejuco

Origen: Nativa

Nombres comunes: mashua, mashwa, isaño, añu, mascho, maswallo

Etnias: Kíchwa de la Sierra, Mestiza

Ubicación geográfica: Planta originaria de los Andes centrales específicamente de Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. (Samaniego, 2010).

Provincias: Chimborazo, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Cañar, Azuay, “Pichincha”. Hierba nativa y cultivada en la zona andina. 3000-3800 msnm. (Samaniego, 2010).

Distribución: Es comúnmente cultivada y distribuida en Perú, Bolivia y Ecuador. (Samaniego, 2010)

2.9.5 Características morfológicas de la planta

Tallos: La especie *Tropaeolum tuberosum* es una planta herbácea erecta o semiprostrada, de tallos cilíndricos y hábitos rastreros.

Hojas: Esta planta posee un follaje compacto, con hojas de color verde oscuro en el haz y más claras en el envés. Las hojas tienen lámina redondeada y el peciolo inserto en el centro.

Flores: La especie *Tropaeolum tuberosum* posee flores solitarias de distintos colores que van desde el anaranjado hasta el rojo oscuro. El número de estambres varía de 8 a 13, y el tiempo que permanece abierta oscila entre 9 y 15 días.

Tubérculos: Los tubérculos que produce *Tropaeolum tuberosum* miden de 5 a 15 cm de largo, tienen forma cónica alargada, yemas profundas, y variados colores como el amarillo, blanco, rojizo, morado, gris y negro, con jaspes oscuros en la piel. El tubérculo posee una textura arenosa y contiene 15 % de proteínas, con alto porcentaje de carbohidratos y 80 % de agua. Debido a la presencia de isotiocianatos, que también se encuentran en la mostaza y los rabanitos, *Tropaeolum tuberosum* tiene un sabor acre y picante, pero que desaparece con la cocción volviéndose dulce. (Samaniego, 2010)

2.9.6 Propiedades medicinales de la planta

Se atribuye al tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* propiedades anafrodisíacas y también medicinales para las enfermedades del hígado y los riñones. Es utilizado como depurativo, para curar enfermedades venéreas; también detiene hemorragias y cicatriza heridas internas y externas. Cocinado con panela para contrarrestar la prostatitis y también para aliviar la blenorragia. (Fuentes, 2006). El tubérculo es comestible y se usa para preparar chicha de agradable sabor que también se usa para tratar el reumatismo. Las hojas se las usa por lo general como alimento para borregos. El tubérculo repele insectos y otros invertebrados, además que las ramas también se usan para realizar baños. El tubérculo posee una gran cantidad de vitamina C por lo que se usa para curar el escorbuto. (Fuentes, 2006)

2.10 Descripción de la especie vegetal: congona (*Peperomia inaequalifolia*)

Congona – *Peperomia inaequalifolia* Ruíz & Pavón – Piperaceae

Gráfico 16: Planta *Peperomia inaequalifolia*



Fuente: (Orlowa, 2012)

2.10.1 Taxonomía:

Tabla 13: Taxonomía

Nombre Científico:	<i>Peperomia inaequalifolia</i>
Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	Peperomia
Especie:	<i>inaequalifolia</i>
Autor Epíteto Específico	Ruiz & Pavón

Fuente: (centro de datos para la conservación, 2007)

2.10.2 Familia Piperacea

La familia de las Piperaceae comprende especies leñosas y herbáceas, con hojas alternas, raramente verticiladas, con o sin estípulas. Las flores son hermafroditas y lampiñas, se sitúan en las axilas de las brácteas y se reúnen en inflorescencias en espiga dispuestas en el ápice de las ramas. El androceo tiene 2 estambres de filamento corto y el gineceo tiene 3 carpelos soldados en un ovario unilocular que se prolonga en tres estigmas. (Furnari, y otros, 2005)

Esta familia se caracteriza por sus inflorescencias en espigas delgadas y largas, con miles de flores microscópicas muy primitivas. El género *Peperomia* Ruiz & Pav. presenta flores, cada una con dos anteras, un pistilo y una bráctea inferior. El género se distribuye en Centro y Sudamérica y existen más de 1000 especies. La gran mayoría de peperomias son plantas semi suculentas, de hojas aplanadas y de crecimiento todo el año. Otras especies tienen dos formas de crecimiento: En el periodo húmedo almacenan agua en sus hojas suculentas y luego producen hojas delgadas y de mayor superficie. Las especies suculentas verdaderas son pocas, y gran número de ellas son nativas del Perú. (Pino, 2006)

2.10.3 Género Peperomia

El género *Peperomia* incluye a 1000 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; concentradas en Centro y norte de Sudamérica. Solo 17 especies se encuentran en África. Este género se caracteriza por presentar 2 estambres y 1 estigma, pueden ser hierbas terrestres o epífitas, rupícolas o más frecuentemente epífitas suculentas.

Hojas alternas u opuestas o verticiladas (por reducción de los entrenudos), flores laxamente agrupadas sobre el raquis sin formar bandas alrededor de la espiga, sésiles o pediceladas; pistilo parcialmente inmerso en el raquis, monocarpelar, estigma fimbriado, solitario, lateral o terminal, en el lado abaxial del pico. Fruto ovoide o cilíndrico con un pericarpio víscido y a menudo verrugoso. (Pino, 2006)

2.10.4 Descripción de *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pavón

Hábito: Hierba terrestre

Origen: Nativa cultivada

Nombres comunes: congona, cuncuna

Etnias: Kíchwa de la Sierra, Mestiza

Ubicación geográfica: Procede de América del Sur (2000-2600 msnm), especialmente Chile, Perú y Ecuador.

Provincias: Chimborazo, Azuay, Cañar, Carchi, “Pichincha”. Hierba nativa y cultivada en la zona andina. 1500-3500msnm.

Distribución: Es comúnmente cultivada y distribuida en Perú, Ecuador y los países vecinos.

2.10.5 Características morfológicas de *Peperomia inaequalifolia*

Raíz: pivotante;

Tallo: erecto, ramificado, de 50 a 100 cm de altura, leñoso al madurar; tienen nodos, pueden ser articulados aéreos y subterráneos, presentan el tejido vascular primario en 2 o más anillos, o anillos pequeños esparcidos; el xilema sin fibras traqueidas pero con fibras libriformes. (Lajones, 2006)

Hojas: alternas, romboides a ovadas, de 3 a 5 centímetros de largo y 1 a 2 cm. de ancho, bordes aserrados, excepto en la base; pecíolo corto; pueden o no tener glándulas aromáticas, nervadura pinnada o palmatinnada, venulada en cruz, no presentan mersitemo basal persistente, con hidatodes comúnmente presentes y estomas anisocíticos o ciclocíticos. (Lajones, 2006)

Flores: amarillas pálida, solitaria, con pedúnculo corto, cinco pétalos arreglados en vértice; las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo espada o espadices, son flores diminutas con brácteas suculentas, sin perianto.

Fruto: en cápsula que produce semillas negras periformes; aplanadas por sus dos caras que presentan en un extremo dos aristas agudas. (Lajones, 2006)

El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas); y por esquejes de los tallos, El fruto es una drupa o baya, y consta de una semilla. (Lajones, 2006)

Gráfico 17: *Peperomia inaequalifolia*



Fuente: (Feiertag, 2012)

2.10.6 Propiedades Medicinales de *Peperomia inaequalifolia*

Las hojas trituradas son cicatrizantes tópicos y se usan como dentífrico y contra la gingivitis. La infusión de las hojas es tranquilizante y analgésica para la cefalea. Las hojas se mezclan con el alimento de los animales para apacentarlos. A las hojas asadas al fuego se les extrae el contenido por presión y se aplica en gotas contra la otitis y conjuntivitis ocular. (Pino, 2006)

En Ecuador *Peperomia inaequalifolia* se toma como un remedio herbal para las dolencias del corazón, dolor de oído y enfermedades del bazo como un té. También *Peperomia inaequalifolia* tiene un efecto calmante sobre los nervios. (Feiertag, 2012)

También se utiliza *Peperomia inaequalifolia* para los dolores auditivos, bilis, como antiparasitario, antisudorífico, limpiados, aromática, para el insomnio, y la inflamación. (Cerón, 2006)

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 COMPRA DEL MATERIAL VEGETAL: CONGONA (*Peperomia inaequalifolia*) Y MASHUA (*Troapeolum tuberosum*) EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA

Para la compra de la especie *Troapeolum tuberosum* se visitó el mercado del cantón Machachi, mientras que para la compra de *Peperomia inaequalifolia* se visitó el mercado Central de la ciudad de Quito. Las características de las especies vegetales obtenidas fueron estar en buen estado, hojas y tallos verdes, plantas jóvenes.

Materiales

- Muestra seca de la planta (*Troapeolum tuberosum*)
- Cámara fotográfica
- Material vegetal fresco

Equipos

- Estufa Memmert modelo SNB-400

Para la recolección del material vegetal se visitó Machachi en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha donde se adquirió la planta (*Troapeolum tuberosum*), el lugar tiene una superficie total de 1 476 km² y una altura máxima de 5126 msnm, la temperatura de esta zona puede llegar a alcanzar los 35°C, posteriormente se identificó y comprobó taxonómicamente comparándola con muestras del Herbario de la Universidad Central del Ecuador, para lo cual se llevó una muestra de planta a dicho lugar. (**Anexo 1**)

Se adquirió alrededor de 700 g de material vegetal fresco para la realización del extracto hidroalcohólico y para llevar una muestra representativa al herbario de la Universidad Central del Ecuador.

Materiales

- Muestra seca de la planta (Congona)
- Cámara fotográfica
- Material vegetal fresco

Equipos

- Estufa Memmert modelo SNB-400

Para la recolección del material vegetal se visitó el Mercado Central de la ciudad de Quito en donde se recolectó suficiente cantidad de planta que proviene del cantón Nayón, dicha zona se encuentra al este de Quito (Terán, 2011), su clima es cálido, posee una temperatura promedio de 23°C (Terán, 2011), posteriormente se identificó y comprobó taxonómicamente comparándola con muestras del Herbario de la Universidad Central del Ecuador, para lo cual se llevó una muestra de planta fresca a dicho lugar. (**Anexo 1**)

Se adquirió alrededor de 10.90 kg de material vegetal fresco para la extracción del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* el mismo que se realizó en la ciudad de Macas en la Fundación Chankuap, en un destilador con el sistema de destilación con agua y vapor de agua en el cual la planta se colocó sobre una placa perforada, situada apenas sobre el fondo del recipiente. Se agregó agua hasta un nivel cercano al de la placa. El agua se calentó y el vapor húmedo atravesó el material, de tal modo que la planta no entró en contacto directo con el agua, además que se tomó una muestra representativa que sirvió para llevar al herbario de la Universidad Central del Ecuador.

3.2 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum*

De la especie *Tropaeolum tuberosum* se obtendrá un extracto hidroalcohólico por medio del método de percolación, utilizando etanol y agua destilada, dicho extracto servirá para la realización de pruebas de actividad antioxidante.

Materiales

- Material vegetal fresco (*Tropaeolum tuberosum*)
- Percolador de 1000 mL
- Vasos de precipitación de 1000 mL
- Algodón
- Papel aluminio
- Vasos de precipitación de 100 mL

Equipos

- Estufa Mommet modelo SNB-400
- Balanza OHAUS SC4010
- Molino casero
- Rotavapor modelo Tecnical TE-210

Reactivos

- Alcohol potable al 96%
- Agua destilada

3.2.1 Secado de la planta

El secado de la planta se lo realizó en una estufa Mommet modelo SNB-400, a unos 60° C por tres días. Una vez seca la planta se procedió a moler en un molino casero hasta obtener un polvo fino el cual se pesó en una balanza OHAUS SC4010, el peso que se obtuvo fue de 344 g de polvo de planta.

3.2.2 Preparación del extracto hidroalcohólico de la planta

Para preparar el extracto hidroalcohólico de *Troapeolum tuberosum* se procedió de la siguiente manera:

- Los 344 g de planta seca y molida que se obtuvieron se colocaron en vasos de precipitación de 1000 mL luego se humedeció la droga con alcohol potable al 96% y se dejó reposar por dos horas.
- Una vez transcurridas las 2 horas se colocó la droga en un percolador de 1000 mL al que previamente se le colocó en la base un pedazo de algodón, se añadió la droga al percolador tomando en cuenta que la droga debe quedar bien compacta.
- Se agregó alcohol potable al 96% como solvente hasta 2cm por encima de la droga.
- Se abrió la llave del percolador con el goteo más lento hasta que se filtre completamente, el filtrado obtenido se colocó nuevamente en el percolador y esta vez se llenó de alcohol potable hasta 5cm por encima de la droga, se dejó reposar por dos días.
- Al completarse los dos días, se abrió la llave del percolador con el goteo más lento y se dejó filtrar completamente. (Miranda, 2001)

Gráfico 18: Droga humedecida en alcohol por dos horas



Elaborado por: Cristina Aillón, 2012

Gráfico 19: Montaje del equipo de percolación



Elaborado por: Cristina Aillón, 2012

3.2.3 Concentración del extracto de *Troapeolum tuberosum*

- El filtrado obtenido se pesó y se obtuvo 89.9 g de extracto, éste extracto se concentró en un rotavapor modelo Tecnical TE-210 a una temperatura de 40°C hasta la obtención de un residuo seco.
- El sobrante que se obtuvo se colocó en vasos de precipitación de vidrio y se los llevo a baño María a 40° C por 4 días que fuel el tiempo en que se evaporo toda el agua que se encontraba en el extracto.
- El extracto finalmente obtenido se colocó en frascos ámbar y en un refrigerador modelo Haceb no frozen.

3.3 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se basa en la reducción de un compuesto cromóforo estable en este caso el DPPH en presencia de moléculas antioxidantes, el DPPH a condiciones normales es de color violeta si se añade diversas concentraciones de un antioxidante este fomentara la reducción del compuesto haciendo que este se decolore a un tono amarillento, entre mayor es la decoloración (reducción) mayor es su actividad antioxidante. (Castañeda, Ramos, y Ibañez, 2008)

Materiales:

- Matraz de 250 mL
- Espátulas
- Papel aluminio
- Vidrio reloj
- Probeta de 100 mL

Equipos:

- Ultrasonido
- Balanza analítica OHAUS SC4010
- Refrigeradora Haceb no frozen

Reactivos:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
- Etanol al 96%

Un día antes de realizar el análisis se preparó 250 mL de una solución de DPPH $1 \times 10^{-4} M$ en etanol al 96%.

- Previamente se tapó el matraz con papel aluminio para evitar que la solución tenga contacto con la luz.

- Una vez calculada la cantidad de reactivo DPPH que se necesita, se pesó los 9.85 mg de DPPH y se colocaron en 100 mL de alcohol potable.
- Luego se aforo a los 250 mL y se colocó en un frasco ámbar

3.4 PREPARACIÓN DEL REACTIVO ABTS

El método descrito por (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, y Milner, 1993) prevé el empleo de un compuesto radicalizable el ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt). El principio del ABTS radicalizado es de un color azul oscuro y la adición de un agente antioxidante determina su decoloración.

Materiales:

- Matraz de 250 mL
- Espátulas
- Papel aluminio
- Vidrio reloj
- Probeta de 100 mL

Equipos:

- Ultrasonido
- Balanza analítica OHAUS SC4010
- Refrigeradora Haceb no frozen

Reactivos:

- ABTS (Acido. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfónico))
- Etanol al 96%

3.4.1 Preparación de la solución madre de ABTS

Un día de realizar la prueba se preparó una solución madre de ABTS 2mM disolviendo exactamente 0,0275g (27,5mg) de ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) en 25mL de agua bidestilada. (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, y Milner, 1993)

3.4.2 Preparación de la solución de $K_2S_2O_8$

Se preparó una solución de 70 mM de $K_2S_2O_8$ la cual se obtuvo de disolver 0,1882 g (188.2 mg) de $K_2S_2O_8$ en 10 mL de agua bidestilada. (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, y Milner, 1993)

3.4.3 Preparación del ABTS radicalizado.

A la solución de ABTS radicalar se añadió 250 uL de solución $K_2S_2O_8$ se agitó y se conservó en la oscuridad al menos por 6 horas para permitir la radicalización, mejor toda la noche. La solución dura 2 días y permanece azulada. (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, y Milner, 1993)

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.5.1 Evaluación del método del DPPH en el Aceite Esencial de *Peperomia inaequalifolia*

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

Materiales

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100ml
- Masking
- Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*
- Puntas para pipetas

Equipos:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240
- Agitador

Reactivos:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
- DMSO (Dimetil sulfóxido)
- Etanol

En la tabla 14 se muestra las soluciones que se preparó y su respectiva concentración:

Tabla 14: concentraciones y soluciones del aceite de congona

Solución	Preparación	Concentración mg/mL
1	100 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	
2	1 µL de aceite esencial 1/10 + 99 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.033
3	2 µL de aceite esencial 1/10 + 98 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.066
4	5 µL de aceite esencial 1/10 + 95 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.166
5	10 µL de aceite esencial 1/10 + 90 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.333
6	20 µL de aceite esencial 1/10 + 80 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.666
7	50 µL de aceite esencial 1/10 + 50 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	1.666
8	100 µL de aceite esencial 1/10	3.333

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

- A cada uno de las anteriores diluciones se añade 2.9 mL de una solución de DPPH previamente preparada el día anterior.
- Se agito en la oscuridad por 30 minutos
- Las diluciones se fueron leyendo en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 desde la menor concentración hasta la mayor concentración a una absorbancia de 517 nm.
- En el aceite esencial se usó como control positivo el aceite de *Thymus vulgaris* el cual se preparó de la siguiente manera:

Tabla 15: concentraciones y soluciones del aceite de *Thymus vulgaris*

Solución	Preparación	Concentración mg/mL
1	0.05 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 100 µL DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.01608
2	0.1 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 99.9 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.0323
3	0.2 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 99.8 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.0646
4	0.5 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 99.5 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.1615
5	1 µL de aceite esencial de	0.323

	<i>Thymus vulgaris</i> + 99 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	
6	2 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 98 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	0.646
7	5 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 95 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	1.615
8	10 µL de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + 90 µL de DMSO (Dimetil-sulfoxido)	3.23

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

- A cada uno de las anteriores diluciones se añadió 2.9 mL de una solución de DPPH previamente preparada el día anterior.
- Se agito en la oscuridad por 30 minutos
- Las diluciones se fueron leyendo en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 desde la menor concentración hasta la mayor concentración a una absorbancia de 517nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.

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

$$1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

3.5.2 Evaluación del método del DPPH en el Extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosus*

La actividad "captadora de radicales" ha sido evaluada siguiendo el procedimiento reportado por (Wang, Rind, Trepte, Kent, y Yue, 1998), para los extractos primero se preparó una solución madre en la que se pesó 1 g de extracto hidroalcohólico y se diluyó con 10 mL de etanol al 96%, luego se prepararon 8 soluciones, a diferentes concentraciones en frascos ámbar de 3 mL y se aforo con etanol al 96%.

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Extracto seco de *Tropaeolum tuberosum*
- Puntas para pipetas
- Matraz de 10 mL

Equipos:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240
- Agitador
- Ultrasonido

Reactivos:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
- DMSO (Dimetil sulfóxido)
- Etanol

Tabla 16: concentraciones y soluciones del extracto seco de *Tropaeolum tuberosum*

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	100 μ L de etanol	0.00
2	1 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 99 μ L de etanol	0.033
3	2 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 98 μ L de etanol	0.066
4	5 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 95 μ L de etanol	0.166
5	10 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 90 μ L de etanol	0.333
6	20 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 80 μ L de etanol	0.666
7	50 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10 + 50 μ L de etanol	1.666
8	100 μ L de extracto hidroalcohólico diluido 1/10	3.333

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

- A las soluciones anteriores se añadió 2.9 mL de la solución de DPPH preparada previamente el día anterior.
- Se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador magnético
- Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 a una absorbancia de 517 nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.
- La actividad del barrido del radical se calculará según la siguiente ecuación:

$$1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

Para el extracto se usó como control positivo una solución de ácido ascórbico para lo cual se preparó una solución de 1g de ácido ascórbico en 1000 mL de etanol al 96% y luego se procedió a preparar las siguientes soluciones (tabla 17):

Tabla 17: concentraciones y soluciones de ácido ascórbico

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	100 µL de etanol	0.000
2	1 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 99 µL de etanol	0.00033
3	2 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 98 µL de etanol	0.00066
4	5 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 95 µL de etanol	0.00166

5	10 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 90 µL de etanol	0.0033
6	20 µL de ácido ascórbico 1/1000+ 80 µL de etanol	0.0066
7	50 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 50 µL de etanol	0.0166
8	80 µL de ácido ascórbico 1/1000 + 20 µL de etanol	0.0266

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

- A las soluciones anteriores se añadió 2.9 mL de la solución de DPPH previamente preparada
- Se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador magnético
- Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 517 nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.
- La actividad del barrido del radical se calculará según la siguiente ecuación:

$$1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

Se usó también como control positivo un extracto seco de Té verde (*Camellia sinensis*) del cual se tomó 1g de extracto seco de *Camellia sinensis* en 100 mL de etanol al 96%. Luego se procedió a preparar las siguientes soluciones (tabla 18):

Tabla 18: concentraciones y soluciones del extracto seco de *Camellia sinensis*

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	100 µL de etanol	0.000
2	1 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 99 µL de etanol	0.0033
3	2 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 98 µL de etanol	0.0066
4	5 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 95 µL de etanol	0.0166
5	10 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 90 µL de etanol	0.0333
6	20 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 80 µL de etanol	0.0666
7	50 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 50 µL de etanol	0.1666
8	80 µL de extracto <i>Camellia sinensis</i> 1/100 + 20 µL de etanol	0.2666

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

- A las soluciones anteriores se añadió 2.9 mL de la solución de DPPH previamente preparada
- Se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador magnético
- Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 517 nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.
- La actividad del barrido del radical se calculará según la siguiente ecuación:

$$1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

3.5.3 Método de ABTS en el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

El método ABTS fue descrito (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005), el cual se basa en que el radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato potásico a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16 horas. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005)

Se prepararon 8 soluciones cada una a diferente concentración de aceite esencial en frasco ámbar de 3 mL para posteriormente aforar con DMSO.

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*
- Puntas para pipetas

Equipos:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240
- Agitador magnético

Reactivos:

- ABTS (Acido. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfónico))
- DMSO (Dimetil sulfóxido)
- Etanol

Tabla 19: Preparación de las soluciones de Aceite Esencial de *Peperomia inaequalifolia*

Solución	Preparación	Concentración mg/mL
1	300 uL de DMSO	0.000
2	0,1 uL de aceite esencial + 299,9 uL de DMSO	0.00037
3	0,2 uL de aceite esencial + 299,8 uL de DMSO	0.00075
4	0,5 uL de aceite esencial + 299,5 uL de DMSO	0.0018
5	1uL de aceite esencial + 299 uL de DMSO	0.0037

6	2ul de aceite esencial + 298 uL de DMSO	0.0075
7	5 uL de aceite esencial + 295 uL de DMSO	0.0189
8	10 uL de aceite esencial + 290 uL de DMSO	0.038
9	15 uL de aceite esencial + 285 uL de DMSO	0.0570

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

3.5.3.1 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas en el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

Se tomó 2 mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25 mL de etanol hasta obtener una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.5.3.2 Lectura del blanco

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

3.5.3.3 Lectura de las soluciones.

Se tomó 2,7 mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3ml de cada solución de aceite esencial o de extracto.

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

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{OD_{\text{blanco}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}} \times 100$$

Tabla 20: Preparación de las Soluciones del Estándar (Aceite Esencial de *thymus vulgaris*)

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	300 uL de DMSO	0.000
2	0,1 uL de aceite esencial + 299,9 uL de DMSO	0.0010
3	0,2 uL de aceite esencial + 299,8 uL de DMSO	0.0021
4	0,5 uL de aceite esencial + 299,5 uL de DMSO	0.0051
5	1 uL de aceite esencial + 299 uL de DMSO	0.0107
6	2 ul de aceite esencial + 298 uL de DMSO	0.021
7	5 uL de aceite esencial + 295 uL de DMSO	0.0538
8	10 uL de aceite esencial + 290 uL de DMSO	0.1075

9	15 uL de aceite esencial + 285 uL de DMSO	0.1615
---	--	--------

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

3.5.3.4 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Se tomó 2 mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25 mL de etanol hasta obtener una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.5.3.5 Lectura del blanco

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

3.5.3.6 Lectura de las soluciones aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Se tomó 2,7 mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3 mL de cada solución de aceite esencial o de extracto.

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

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{OD_{\text{blanco}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}} \times 100$$

Tabla 21: Preparación de las Soluciones del extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*

Diluir 1gr de extracto hidroalcohólico en 25mL de etanol (solución madre)

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	300 uL de etanol	0

2	1 uL de solución madre + 299 uL de etanol	0.0133
3	2 uL de solución madre + 298 uL de etanol	0.0266
4	5 uL de solución madre + 290 uL de etanol	0.0666
5	10 uL de solución madre + 290 uL de etanol	0.1333
6	20 uL de solución madre + 280 uL de etanol	0.2666
7	50 uL de solución madre + 250 uL de etanol	0.666
8	100 uL de solución madre + 200 uL de etanol	1.333
9	150 uL de solución madre + 150 uL de etanol	2.000

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

3.5.3.7 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas en el extracto hidroalcohólico de *tropaeolum tubersoum*

Se tomó 2 mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25 mL de etanol hasta obtener una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.5.3.8 Lectura del blanco

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

3.5.3.9 Lectura de las soluciones en el extracto hidroalcohólico de *tropaeolum tuberosum*

Se tomó 2,7 mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3ml de cada solución de aceite esencial o de extracto.

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

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{OD_{\text{blanco}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}} \times 100$$

Tabla 22: Preparación de las Soluciones de ácido ascórbico

Se diluyó 1gr de ácido ascórbico en 250mL de etanol (solución madre)

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	300 uL de etanol	0
2	1 uL de solución madre + 299 uL de etanol	0.000133
3	2 uL de solución madre + 298 uL de etanol	0.000266
4	5uL de solución madre + 290uL de etanol	0.00066
5	10uL de solución madre + 290uL de etanol	0.00133

6	20uL de solución madre + 280uL de etanol	0.00266
7	50uL de solución madre + 250uL de etanol	0.00666
8	100uL de solución madre + 200uL de etanol	0.0133
9	150uL de solución madre+ 150uL de etanol	0.02

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

El ácido ascórbico se utilizó como control positivo para realizar la comparación con el extracto de Mashua

3.5.3.10 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas en el ácido ascórbico

Se tomó 2 ml del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25mL de etanol hasta obtener una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.5.3.11 Lectura del blanco

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

3.5.3.12 Lectura de las soluciones del ácido ascórbico

Se tomó 2,7mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3ml de cada solución de aceite esencial o de extracto.

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

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{OD_{\text{blanco}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}} \times 100$$

Tabla 23: Preparación de las soluciones de *Camellia sinensis*

Se diluyó 1gr de extracto seco de *Camellia sinensis* en 250mL de etanol (solución madre)

El extracto seco de *Camellia sinensis* también se utilizó como control positivo para realizar la comparación con el extracto de *Tropaeolum tuberosum*. Para ello se prepararon las siguientes soluciones (Tabla 23)

Solución	preparación	Concentración mg/mL
1	300 uL de etanol	0
2	1 uL de solución madre + 299 ul de etanol	0.000133
3	2 uL de solución madre + 298 uL de etanol	0.000266
4	5 uL de solución madre + 290 uL de etanol	0.00066
5	10 uL de solución madre + 290 uL de etanol	0.00133
6	20 uL de solución madre + 280 uL de etanol	0.00266
7	50 uL de solución madre + 250 uL de etanol	0.00666
8	100 uL de solución madre +	0.0133

	200 uL de etanol	
9	150 uL de solución madre+ 150 uL de etanol	0.02

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

3.5.3.13 Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas en el extracto seco de *Camellia sinensis*

Se tomó 2 mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25 mL de etanol hasta obtener una absorbancia $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$.

3.5.3.14 Lectura del blanco

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

3.5.3.15 Lectura de las soluciones del extracto seco de *Camellia sinensis*

Se tomó 2,7 mL de solución ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3ml de cada solución de aceite esencial o de extracto.

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

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{OD_{\text{blanco}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}} \times 100$$

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) Y TLC-DPPH: PRUEBA ANTIOXIDANTE CUALITATIVA

Se realizó la técnica de cromatografía en capa fina para determinar los principales compuestos que posee el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* que posteriormente servirá para determinar cuál o cuáles compuestos son los responsables de la actividad antioxidante.

3.6.1 Cromatografía en capa fina del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*
- Puntas para pipetas
- Placas cromatográficas

Equipos:

- Secador industrial modelo AH-30 Masterflow heat blower
- Camag Linomat 5

Reactivos:

- Metanol
- Tolueno
- Éter de petróleo

- Acetato de etilo

3.6.1.1 Procedimiento

- Medir 30 uL del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* y añadir 1ml de metanol.
- Sembrar 15 uL en el TLC
- Previamente preparar la siguiente fase móvil: tolueno 93 mL; acetato de etilo 7 mL y éter de petróleo 20 mL, guardar en refrigeración.
- Colocar la placa cromatográfica ya inyectada con la fase estacionaria en el recipiente donde se encuentra la fase móvil hasta que la misma se encuentre faltando 1cm del borde de la placa.
- Secar con secador industrial
- Una vez la placa este completamente seca se revela a luz uV 254 y 350 nm, tomar los RF.

3.6.2 Evaluación TLC-DPPH, prueba antioxidante cualitativa

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*
- Puntas para pipetas
- Placas cromatográficas
- Aspersor
- Bomba

Equipos:

- Secador industrial modelo AH-30 Masterflow heat blower

- Camag Linomat 5

Reactivos:

- Metanol
- Tolueno
- Éter de petróleo
- Acetato de etilo
- DPPH
- Etanol

3.6.2.1 Procedimiento

- Se procede a preparar la placa cromatográfica en la que se inyecta 15 uL de la solución de metanol con aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* como se explicó en el paso anterior.
- Una vez ya identificado los compuestos presentes se procede a colocar en el roceador la solución de DPPH previamente preparada.
- Se roció a lo largo de toda la placa en donde se realizó la siembra, se espera unos minutos.
- Observar si existe un cambio de coloración del reactivo DPPH el mismo que en condiciones normales es violeta si se añade diversas concentraciones de un antioxidante ese fomentará la reducción del compuesto haciendo que este se decolore a un tono amarillento.

3.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES CON EL MÉTODO DE FOLIN- CIOCALTEU EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* Y *Camellia sinensis* USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO ESTÁNDAR

El método de Folin-ciocalteu es el procedimiento comúnmente utilizado para determinar fenoles totales, en esta investigación se hizo la evaluación en el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*, tomando como patrón ácido gálico.

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*
- Puntas para pipetas
- Balones de 10 mL
- Papel aluminio

Equipos:

- Ultrasonido Branson 1510
- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240

Reactivos:

- Folin-colciateu
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio

3.7.1 Construcción de la curva de calibración ácido gálico

- Se preparó soluciones a diferentes concentraciones de ácido gálico en agua destilada el cual se usó como estándar de la siguiente manera:
- Solución madre: 10 mg de ácido gálico en 10 mL de agua destilada (1mg/ml)

De la solución madre se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 24: Soluciones y concentración de ácido gálico

Solución	Concentración mg/mL
1 mg ácido gálico en 10 mL de agua destilada	0,001
2 mg ácido gálico en 10 mL de agua destilada	0,002
5 mg ácido gálico en 10 mL de agua destilada	0,005
10 mg ácido gálico en 10 mL de agua destilada	0,01
20 mg ácido gálico en 10 mL de agua destilada	0,02

Fuente: (Cruzado, Pastor, Castro, y Cedrón, 2013)

De cada una de estas soluciones se tomó 0,05 mL se añadió 3,95 mL de agua destilada más 0,25 mL del reactivo de Folin-colciateu y 0,75 mL de carbonato de sodio. (Cruzado, Pastor, Castro, y Cedrón, 2013)

En cuanto al extracto de *Tropaeolum tuberosum* se preparó previamente una solución de 1:10 a partir de esta solución se tomó 0,05 mL del extracto se añadió 3,95 mL de agua destilada más 0,25 mL del reactivo de Folin-colciateu y 0,75 mL de carbonato de sodio.

Se tomó en cuenta al extracto seco de *Camellia sinensis* como estándar para lo cual se preparó una solución de 1:200 y a partir de esta solución se tomó 0,05 mL se añadió 3,95 mL de agua destilada más 0,25mL del reactivo de Folin-colciateu y 0,75 mL de carbonato de sodio.

Se procedió hacer la lectura en el espectrofotómetro a 765 nm, se anotó el valor de las absorbancias, todas las mediciones se hicieron por triplicado.

3.8 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES CON EL MÉTODO DE CLORURO DE ALUMINIO EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* Y *Camellia sinensis* USANDO HYPERÓSIDO COMO ESTÁNDAR

La evaluación de flavonoides totales se realizó en el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*, para ello se realizó cuatro soluciones de cloruro de aluminio, el mismo que se utilizó como patrón para realizar la curva de calibración.

Materiales:

- Viales ámbar
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Masking
- Extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*
- Puntas para pipetas
- Balones de 10 mL
- Papel aluminio

Equipos:

- Ultrasonido Branson 1510
- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240

Reactivos:

- Etanol al 95%
- Hyperósido
- Acetato de potasio

- Cloruro de aluminio

3.8.1 Construcción de la curva de calibración de hyperósido

- Se preparó soluciones a diferentes concentraciones de hyperósido en alcohol al 95% el cual se usó como estándar de la siguiente manera:
- Solución madre: 5 mg de hyperósido en 5 mL de alcohol al 95%
- De la solución madre se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 25: Soluciones de Hyperósido

Solución	Concentración mg/mL
100 uL	0,01
200 uL	0,02
500 uL	0,05
700 uL	0,07

Fuente: (Barrón, García, Soto, Colinas, y Kite, 2011)

De cada una de las soluciones de la tabla se tomó 0,5 mL, luego se agregó 1,5 mL de etanol al 95%, más 0,1 mL de una solución de $AlCl_3$ al 10%, 0,1 mL de una solución de acetato de potasio y 2,8 mL de agua destilada. (Barrón, García, Soto, Colinas, y Kite, 2011)

Para el extracto de *Tropaeolum tuberosum* se preparó previamente una solución de 1:10 a partir de esta solución se tomó 0,5 mL, luego se agregó 1,5 mL de etanol al 95%, más 0,1 mL de una solución de $AlCl_3$ al 10%, 0,1 mL de una solución de acetato de potasio y 2,8 mL de agua destilada.

Se tomó en cuenta al extracto seco de *Camellia sinensis* como estándar para lo cual se preparó una solución de 1:200 y a partir de esta solución se tomó 0,5 mL, luego se agregó 1,5 mL de etanol al 95%, más 0,1 mL de una solución de $AlCl_3$ al 10%, 0,1 mL de una solución de acetato de potasio y 2,8 mL de agua destilada.

Las mezclas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415nm. (Barrón, García, Soto, Colinas, y Kite, 2011)

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia*: DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO

Para calcular el rendimiento del aceite esencial se procedió a calcular primero la densidad del mismo el cual se obtuvo 1.031, este valor se utilizó para calcular la masa en gramos de aceite esencial, luego se realizó una relación con el valor de masa y se obtuvo finalmente el rendimiento del aceite de *Peperomia inaequalifolia* para 10.90 kg de hojas frescas que se recolectó.

El rendimiento obtenido de la planta de *Peperomia inaequalifolia* es el 0.16% en planta fresca, este valor se encuentra dentro del rango aceptable en comparación con el trabajo de farmacognosia de aceites esenciales de (Torres, Ramos, Soto, y Caraballo, 2011), el cual afirma que el rendimiento de una planta va desde el 0,1 al 3% de peso vegetal.

En la siguiente tabla se encuentran las características organolépticas del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*:

Tabla 26: características organolépticas del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

Características	Descripción
Color	Amarillo
Sabor	Picante
Olor	Característico
Textura	Aceitosa

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia* POR MEDIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MASAS

Los resultados obtenidos por la cromatografía de gases son los siguientes:

Tabla 27: Composición química del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

#	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Porcentaje identificado	Porcentaje no identificado	Índice Adams	Método
1	41,107	Safrole	27,632 ±3,19%		1287	GC-MS RMN-1H
2	51,293	beta-Caryophyllene	2,197 ±2,02%		1419	GC-MS
3	51,977	gamma-Elemene	0,079 ±0,14%		1436	GC-MS
4	52,217	Aromadendrene	0,080 ±0,14%		1441	GC-MS
5	52,977	alpha-humulene	0,108 ±0,19%		1454	GC-MS
6	54,069	Germacrene D	0,125 ±0,22%		1481	GC-MS
7	54,462	Viridiflorene	2,820 ±0,03%		1496	GC-MS
8	54,628	Bicyclogermacrene	0,549 ±0,48%		1500	GC-MS
9	55,797	Myristicin	14,956 ±0,19%		1518	GC-MS RMN-1H
10	57,392	Spathulenol	0,087 ±0,15%		1578	GC-MS
11	57,524	N.I.		0,060±0,10%	N.D.	GC-MS
12	57,643	Globulol	0,064 ±0,11%		1590	GC-MS
13	57,879	Viridiflorol	6,642 ±0,30%		1592	GC-MS
14	60,421	11- α H-himachal-4-en-1- β -ol	18,789 ±1,36%		1699	GC-MS
15	66,448	1,2,3-Triazole	4,875 ±1,68%		N.D.	GC-MS
16	67,398	Isopropyl palmitate	20,936 ±2,54%		2024	GC-MS RMN-1H
Total			99,940 ±0,10%	0,060 ±0,10%		

Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013

El aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* posee un total de 16 compuestos de los cuales se pudo identificar 15 y tan solo uno no se logró identificar, es así que entre los compuestos principales tenemos el safrol (27,632%) con un tiempo de retención de 41.107, isopropil palmitato (20.936%) con un tiempo de

retención de 67.398, y miristicina (14.956%) con un tiempo de retención de 55.797.

4.3 ELABORACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum*

Para determinar el peso total que se obtuvo de extracto de *Tropaeolum tuberosum* se realizaron varios pesajes del extracto hasta que el peso este completamente estable lo que quiere decir que el agua que estuvo presente en el vaso ya se secó y el extracto se encuentra totalmente seco.

La tabla 28 muestra la cantidad total de extracto que se obtuvo una vez ya eliminado toda el agua. En la siguiente tabla se muestra el peso final que se obtuvo de extracto de *Tropaeolum tuberosum*.

Tabla 28: Rendimiento medio que se obtuvo de extracto de *Tropaeolum tuberosum*

Extractos (mL)	Peso (g)
Extracto 1	9.5 g
Extracto 2	8.4g
Rendimiento medio	8.95 g

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.4.1 MÉTODO DEL REACTIVO DPPH EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia*

4.4.1.1 Aceite esencial de *Thymus vulgaris* (antioxidante de referencia)

La tabla 29 y los gráficos 20 y 21, muestran las absorbancias obtenidas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de aceite de *Thymus vulgaris*.

El antioxidante de referencia es aquel que se usa como patrón para dar una idea de que tan antioxidante es la muestra a evaluar.

Tabla 29: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de *Thymus vulgaris*

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0	1,13 ± 0,0005	0
0,016	0,816 ± 0,0020	27,7286
0,032	0,793 ± 0,0020	29,7640
0,323	0,570 ± 0,0005	49,5280
0,646	0,435 ± 0,0020	61,4454
1,615	0,324 ± 0,0005	71,2684
3,230	0,194 ± 0,0015	82,8024

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 20: Absorbancia del Aceite de *Thymus vulgaris*

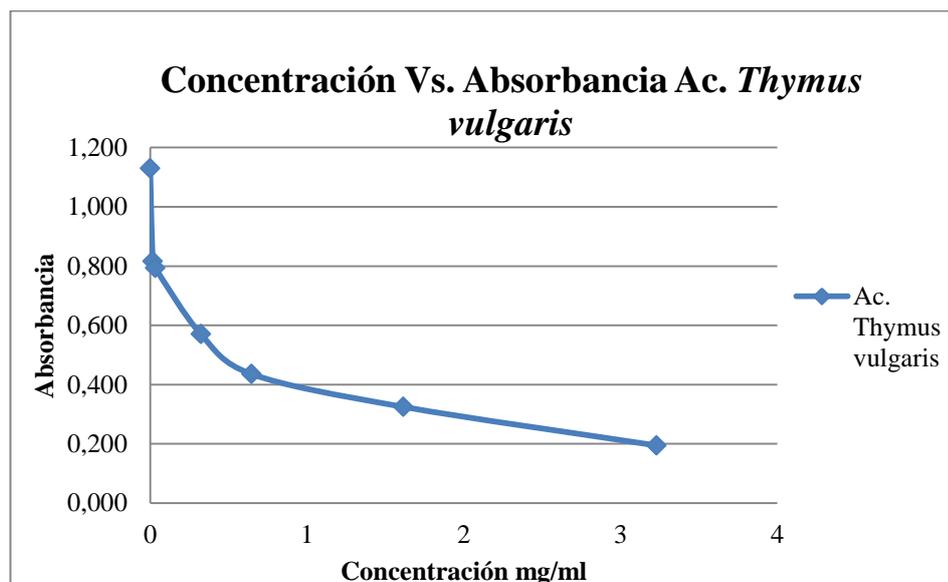
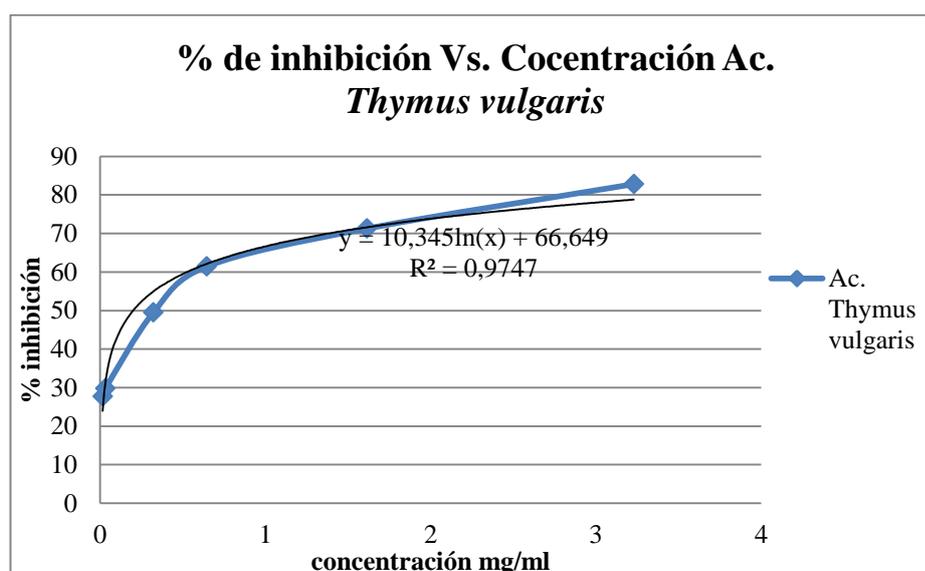


Gráfico 21: Porcentaje de Inhibición del Aceite de *Thymus vulgaris* contra la concentración del antioxidante



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 Aceite
<i>Thymus vulgaris</i>
0.206 mg/MI

4.4.1.2 Aceite de *Peperomia inaequalifolia*

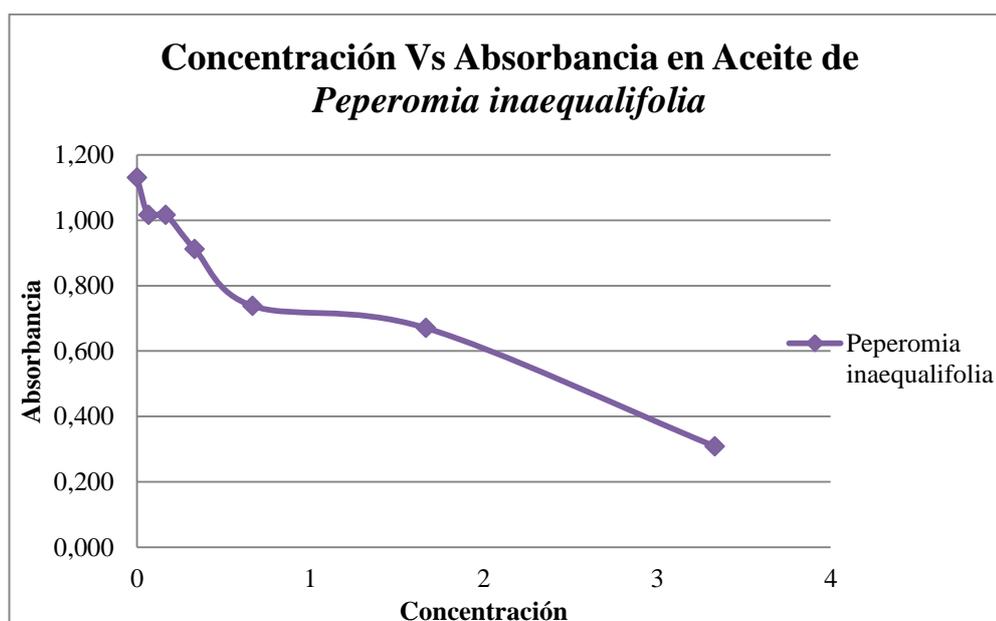
La tabla 30 y los gráficos 22 y 23 muestran las absorbancias obtenidas del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones de aceite de *Peperomia inaequalifolia*.

Tabla 30: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de *Peperomia inaequalifolia*

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0	1,130 ± 0,0005	0
0,0667	1,015 ± 0,015	10,1445
0,1667	1,015 ± 0,002	10,1445
0,3333	0,911 ± 0,001	19,4043
0,6667	0,738 ± 0,001	34,7095
1,6667	0,670 ± 0,014	40,6960
3,3333	0,308 ± 0,010	72,7219

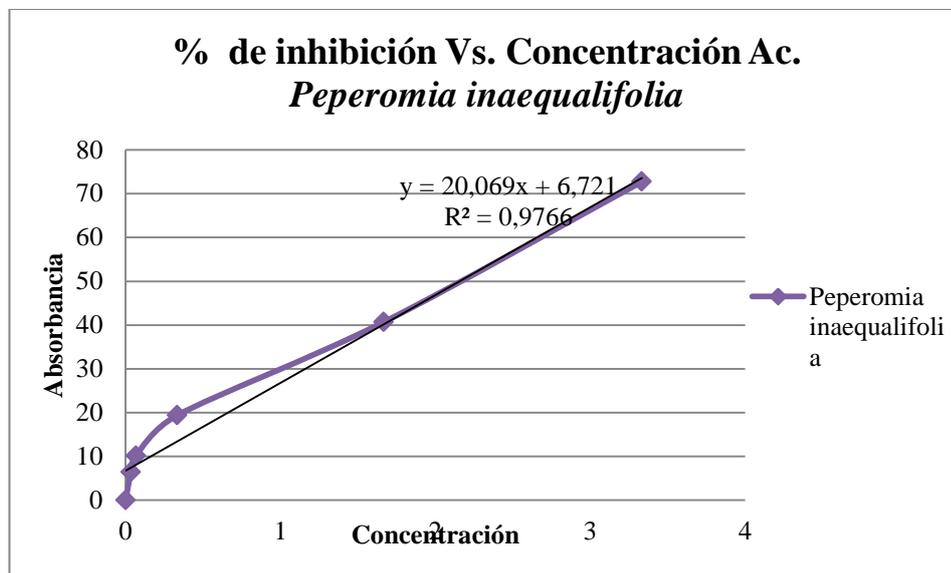
Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 22: Absorbancia del Aceite de *Peperomia inaequalifolia* versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 23: % de Inhibición del Aceite de *Peperomia inaequalifolia* versus concentración



<p>IC50 Aceite <i>Peperomia inaequalifolia</i> 2.22 mg/mL</p>
--

4.4.2 METODO DPPH EN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum*

4.4.2.1 Solución de ácido ascórbico (antioxidante de referencia)

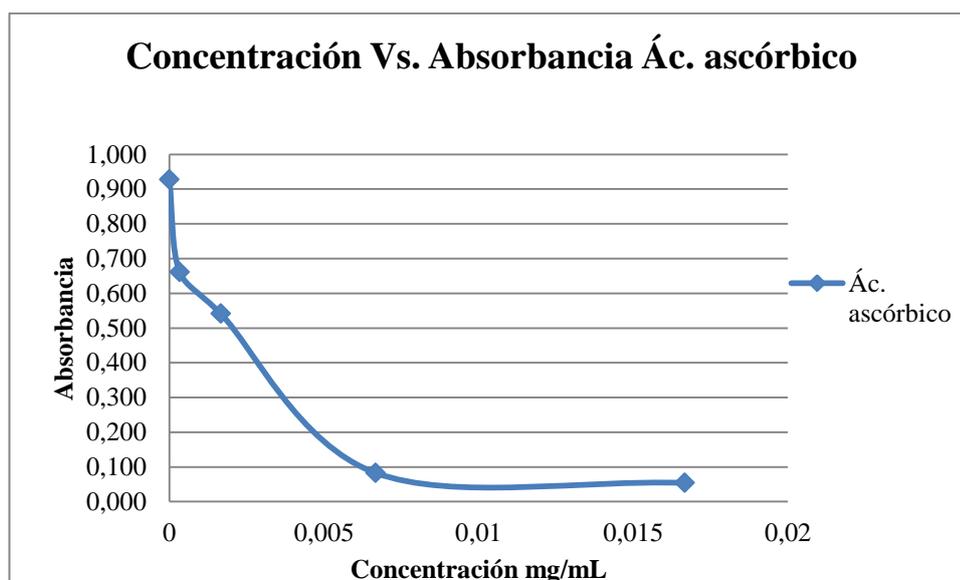
La tabla 31 y los gráficos 24 y 25, muestran las absorbancias obtenidas de ácido ascórbico versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de ácido ascórbico.

Tabla 31: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición de ácido ascórbico

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0,0000	0,927 ± 0,0005	0,0000
0,0003	0,661 ± 0,000	28,7460
0,0017	0,541 ± 0,0005	41,6457
0,0033	0,077 ± 0,001	91,6277
0,0067	0,083 ± 0,001	91,0528
0,0167	0,053 ± 0,001	94,2149

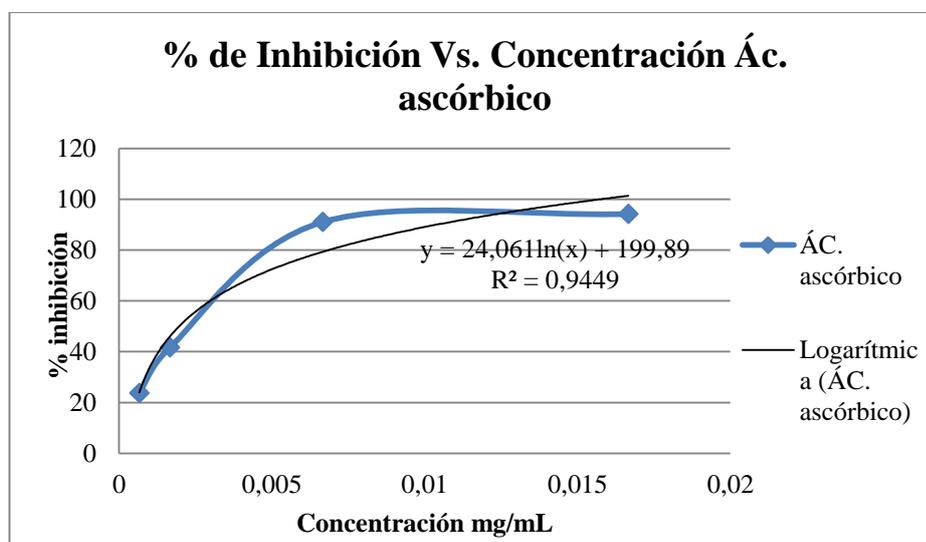
Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 24: Absorbancia de la ácido ascórbico versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 25: % de Inhibición de la ácido ascórbico versus la concentración del antioxidante



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 ácido ascórbico

0.00197 mg/mL

4.4.2.2 Extracto de *Camellia sinensis* (antioxidante de referencia)

La tabla 32 y los gráficos 26 y 27, muestran las absorbancias obtenidas del extracto de *Camellia sinensis* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de *Camellia sinensis*.

Tabla 32: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto de *Camellia sinensis*

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0	0,915 ± 0,000	0
0,0033	0,869 ± 0,001	5,0273
0,0067	0,835 ± 0,001	8,7067
0,0167	0,701 ± 0,0005	23,3151
0,0333	0,612 ± 0,0005	33,0419
0,0667	0,446 ± 0,0005	51,1840

0,1667	0,099 ± 0,0005	89,1439
0,2667	0,108 ± 0,000	88,1967

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 26: Absorbancia del extracto de *Camellia sinensis* versus concentración

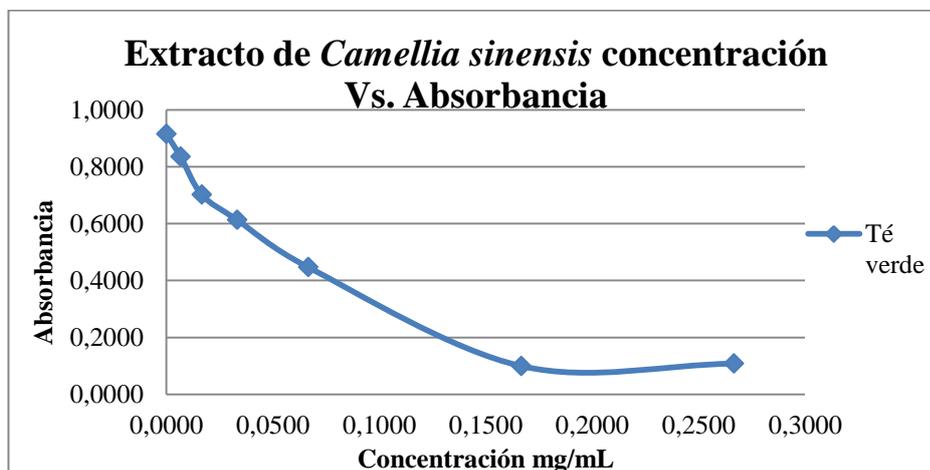
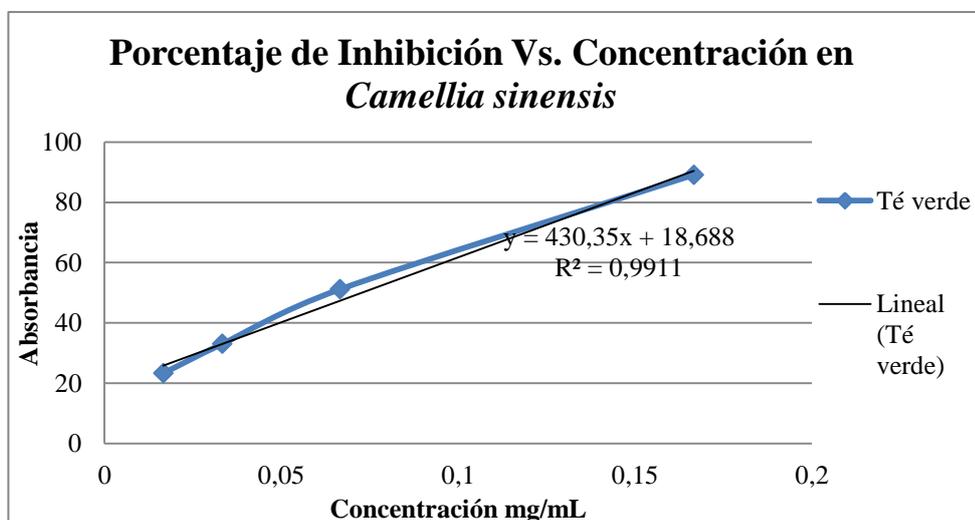


Gráfico 27: % de Inhibición del *Camellia sinensis* versus la concentración del antioxidante



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 <i>Camellia sinensis</i>
0.072 mg/mL

4.4.2.3 Extracto hidroalcohólico *Tropaeolum tuberosum*

La tabla 33 y los gráficos 28 y 29 muestran las absorbancias obtenidas del extracto de *Tropaeolum tuberosum* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones de extracto de *Tropaeolum tuberosum*

Tabla 33: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto seco de *Tropaeolum tuberosum*

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0,0000	1,666 ± 0,001	0
0,0333	0,756 ± 0,001	29,0807
0,0667	0,707 ± 0,001	33,7086
0,1667	0,143 ± 0,000	86,5854
0,3333	0,115 ± 0,009	89,2433
0,6667	0,104 ± 0,000	90,2752

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 28: Absorbancia del extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*

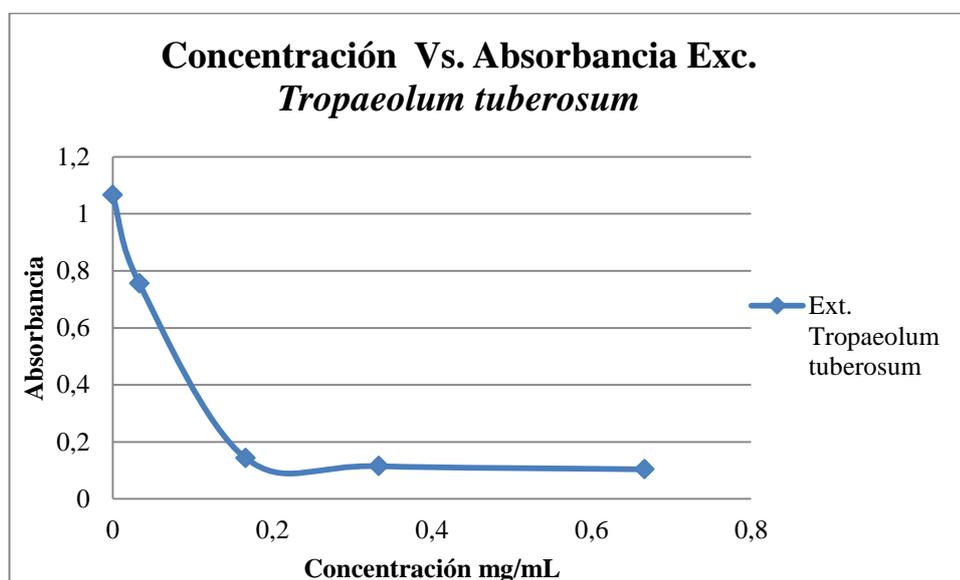
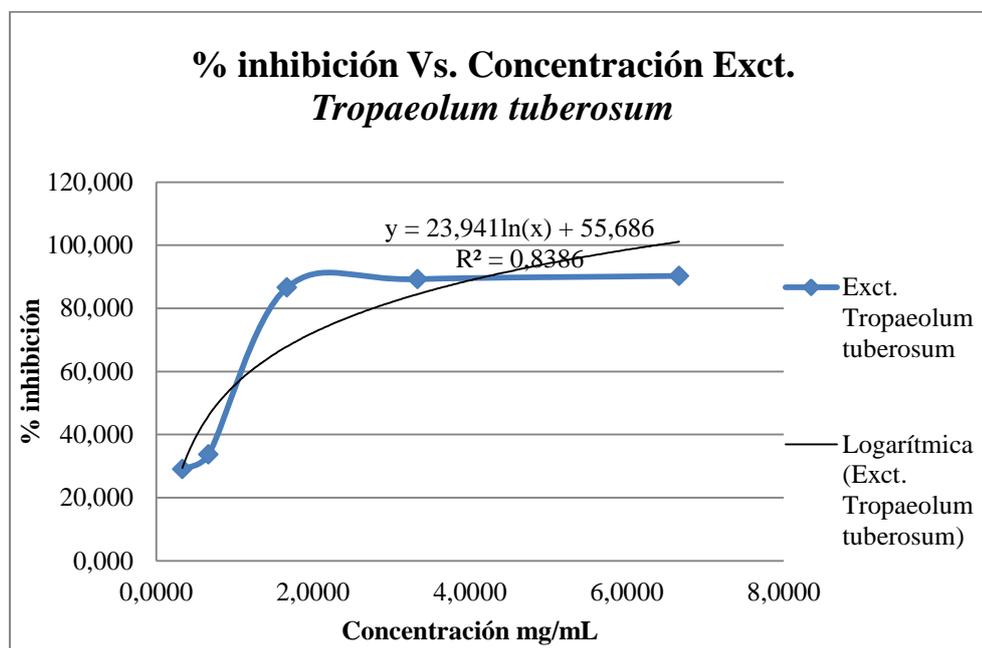


Gráfico 29: % de Inhibición del extracto de *Tropaeolum tuberosum* versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 Extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i>
0.788 mg/mL

4.4.3 Comparación entre Valores de IC 50

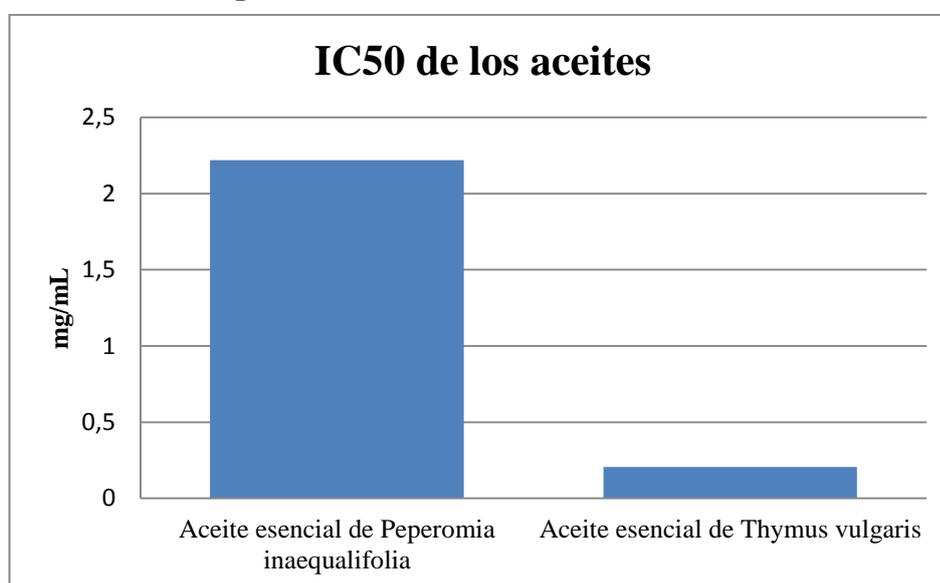
En la tabla 34 se observa la capacidad antioxidante, medida por el IC50 expresada en mg/L, para el aceite de *Peperomia inaequalifolia* y para el aceite de *Thymus vulgaris* utilizado como control positivo, para el ácido ascórbico, y *Camellia sinensis* ambos utilizados como control positivo para el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*, y en los gráficos se evidencian una comparación entre los IC50 de los aceites y extractos

Tabla 34: Comparación entre valores de IC50 de los aceites.

Antioxidante	IC 50 (mg/mL)	IC 50 (mg/L)
Aceite de <i>Thymos vulgaris</i>	0.206	206
Aceite <i>Peperomia inaequalifolia</i>	2.222	2222

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 30: Comparación del IC50 de los aceites



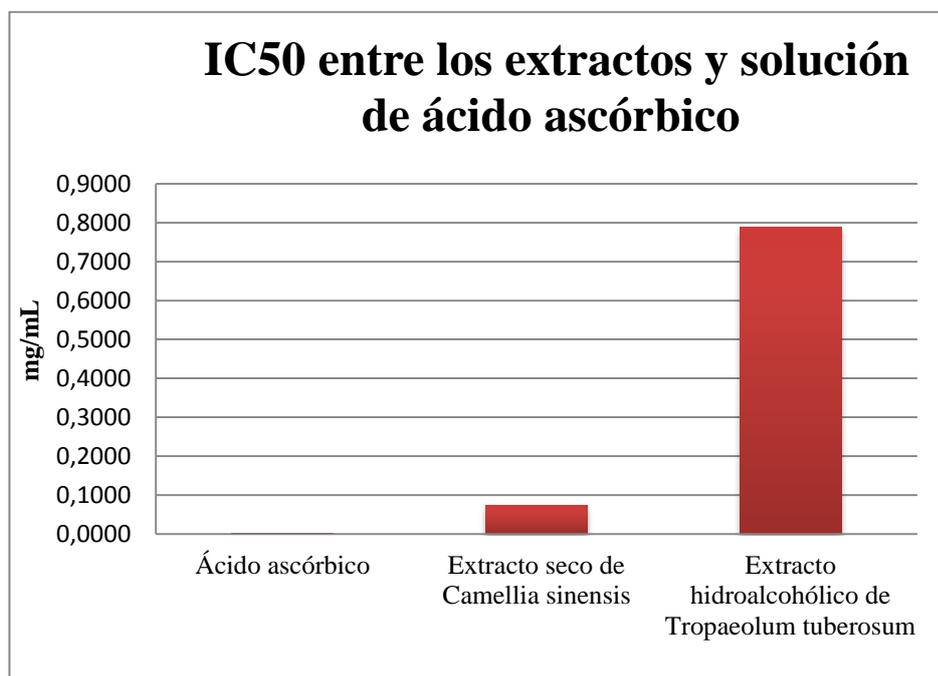
Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Tabla 35: Comparación entre valores de IC50 de los extractos

Antioxidante	IC50 (mg/mL)	IC50 (mg/L)
Extracto seco de <i>Camellia sinensis</i>	0.072	7.2
Solución de ácido ascórbico	0.0013	1.3
Extracto seco de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	0.788	788

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 31: Comparación del IC50 de los extractos



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

En este método se usó DMSO (dimetil-sulfóxido), por su polaridad afín con los aceites de estudio, debido a sus propiedades fisicoquímicas, actúa como solvente muy eficiente para los compuestos insolubles en agua y captura iones hidrógenos (Santos, Prieto, Gomes, Betbeder, y Castanho, 1998), para los extractos se utilizó etanol al 96% por ser un solvente bastante compatible para extractos.

Se utilizó como estándar de comparación el aceite esencial de *Thymus vulgaris* el cual presentó un IC50 de 206 mg/L para la reacción con el radical DPPH.

La actividad antioxidante se determina como la actividad antirradical utilizando el radical DPPH (Padilla, Rincón, y Bou-rached, 2008). La actividad antirradical en los aceites se evaluó con los valores de IC50, (cantidad de antioxidante necesaria para producir una reducción del 50% del radical libre presente, en este caso DPPH).

La evaluación de la capacidad antioxidante, para el aceite diluido en DMSO de *Peperomia inaequalifolia*, arrojó el siguiente resultado de IC50: 2222 mg/L.

De acuerdo con los datos del IC50 de cada aceite y al existir una relación inversamente proporcional, a mayor valor del IC50 menor actividad antiradical (Sánchez, 2002), se concluye que el aceite de *Thymus vulgaris* usado como estándar presenta mejor actividad antioxidante pero a su vez el aceite de *Peperomia inaequalifolia* posee un valor de IC50 bastante bueno lo que determinaría que tiene compuestos antioxidantes.

Se utilizó como estándar de comparación para extractos el extracto seco de *Camellia sinensis*, y una solución de ácido ascórbico los cuales presentaron los siguientes valores de IC50: 7.2 mg/L y 1.3 mg/L respectivamente para la reacción con el radical DPPH.

La evaluación de la capacidad antioxidante, para el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* diluido en etanol al 96%, arrojó el siguiente resultado de IC50: 788 mg/L.

De acuerdo con los datos del IC50 de cada extracto y solución de ácido ascórbico y al existir una relación inversamente proporcional, a mayor valor del IC50 menor actividad antiradical (Sánchez, 2002), se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* no presenta actividad antioxidante significativa en comparación a los estándares, esto puede deberse a que no posee compuestos antioxidantes o si los posee están en cantidades muy bajas.

4.5 MÉTODO DEL REACTIVO ABTS EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia*

4.5.1 Aceite esencial de *Thymus vulgaris* (antioxidante de referencia)

La tabla 36 y los gráficos 32 y 33, muestran las absorbancias obtenidas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de aceite de *Thymus vulgaris*.

Tabla 36: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite de *Thymus vulgaris*

Concentración mg/mL	Absorbancia	%inhibición
0	0,570 ± 0,000	0
0,0107	0,225 ± 0,011	22,6
0,0215	0,136 ± 0,017	75,96
0,0538	0,014 ± 0,0035	97,543
0,1075	0,009 ± 0,003	99,98

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 32: Absorbancia del Aceite de *Thymus vulgaris* versus la concentración

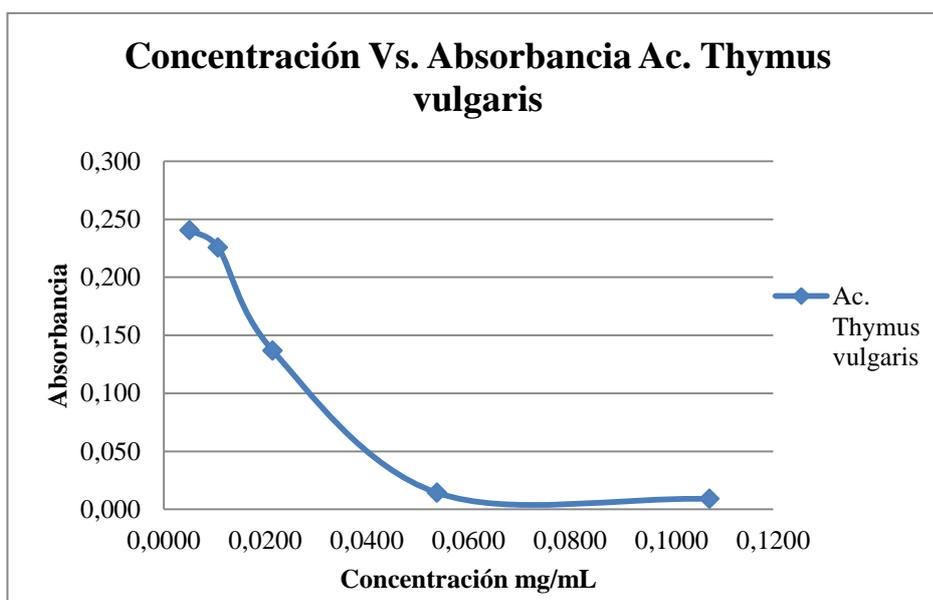
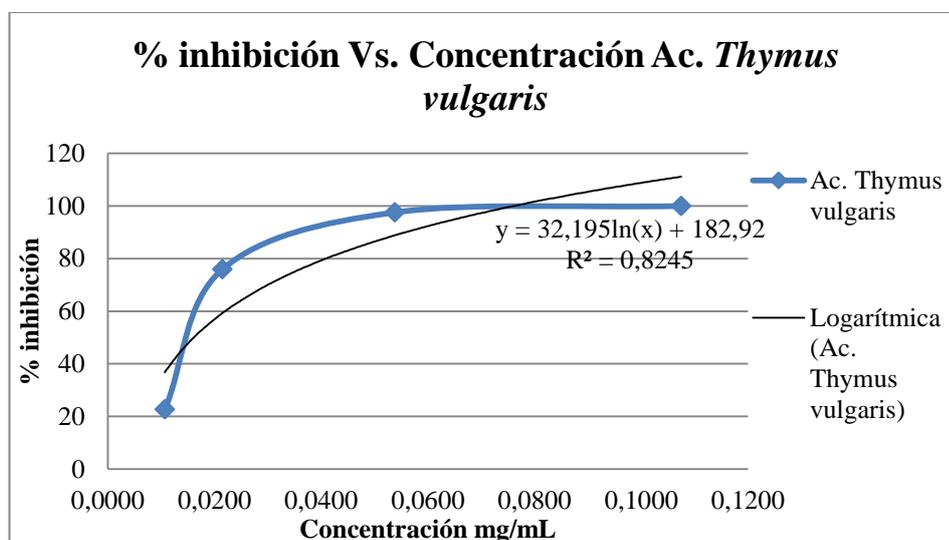


Gráfico 33: % de Inhibición del Aceite de *Thymus vulgaris* versus la concentración del antioxidante



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 Aceite de <i>Thymus vulgaris</i>
0.016 mg/mL

4.5.2 Aceite de *Peperomia inaequalifolia*

La tabla 37 y los gráficos 34 y 35 muestran las absorbancias obtenidas del aceite esencial de congona versus concentración y el % de inhibición de las soluciones de aceite de congona, *Peperomia inaequalifolia*.

Tabla 37: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del Aceite *Peperomia inaequalifolia*

concentración mg/mL	Absorbancia	%inhibición
0	0,588 ± 0,001	0
0,00075	0,223 ± 0,004	62,0748299
0,0018	0,243 ± 0,005	58,6734694
0,0075	0,024 ± 0,001	95,9183673

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 34: Absorbancia del Aceite de *Peperomia inaequalifolia* versus concentración

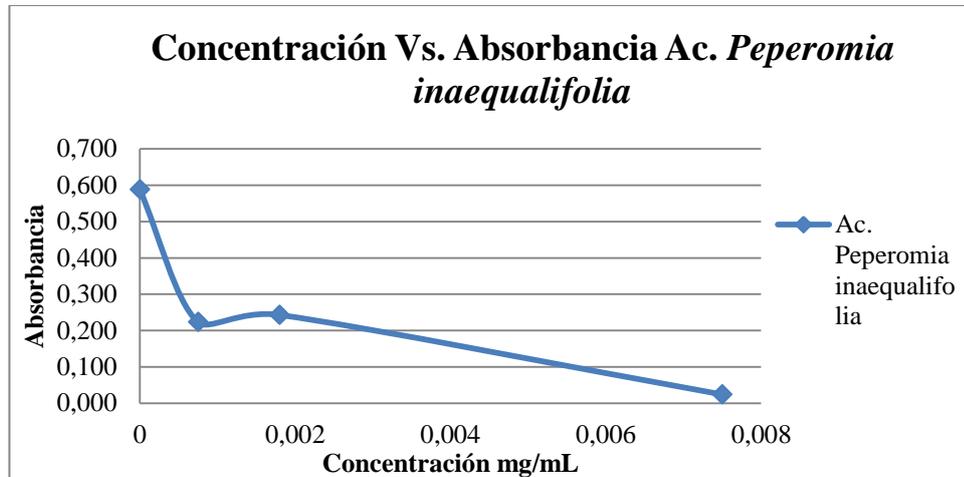
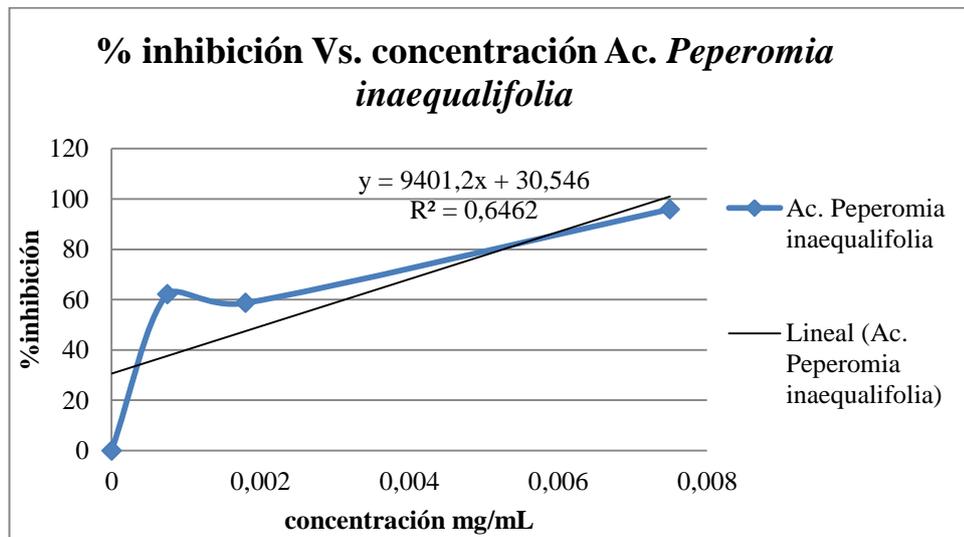


Gráfico 35: % de Inhibición del Aceite de *Peperomia inaequalifolia* versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Ic 50 Aceite de *Peperomia inaequalifolia*
0.0020mg/mL

4.5.3 Solución de ácido ascórbico (antioxidante de referencia)

La tabla 38 y los gráficos 36 y 37, muestran las absorbancias obtenidas de ácido ascórbico versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de ácido ascórbico.

Tabla 38: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición de ácido ascórbico

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0	0,576 ± 0,003	0
0,000266	0,542 ± 0,000	6,01156069
0,000666	0,459 ± 0,001	20,4046243
0,001333	0,422 ± 0,0005	26,7630058
0,002666	0,310 ± 0,0005	46,1849711
0,00666	0,021 ± 0,000	96,3583815

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 36: Absorbancia de la solución de ácido ascórbico versus concentración

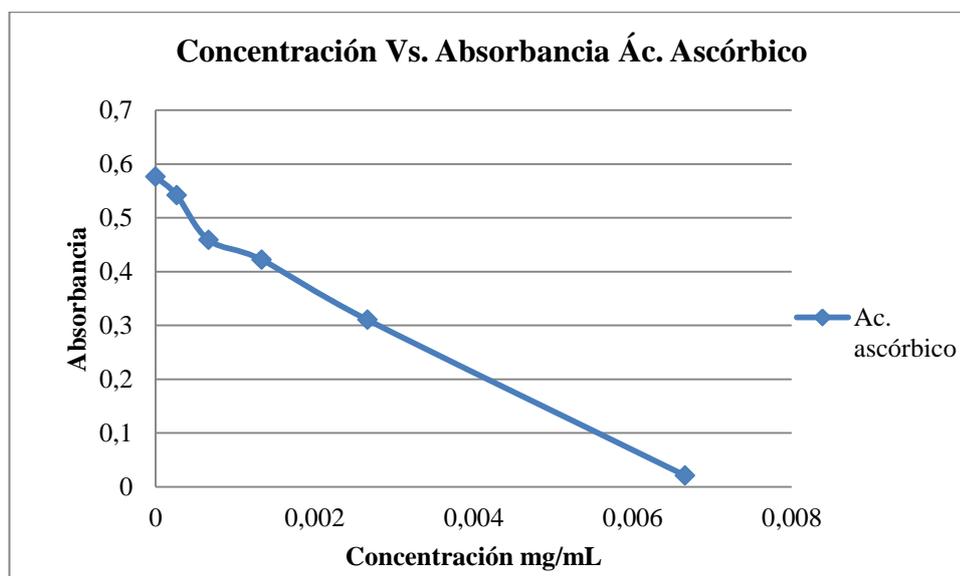
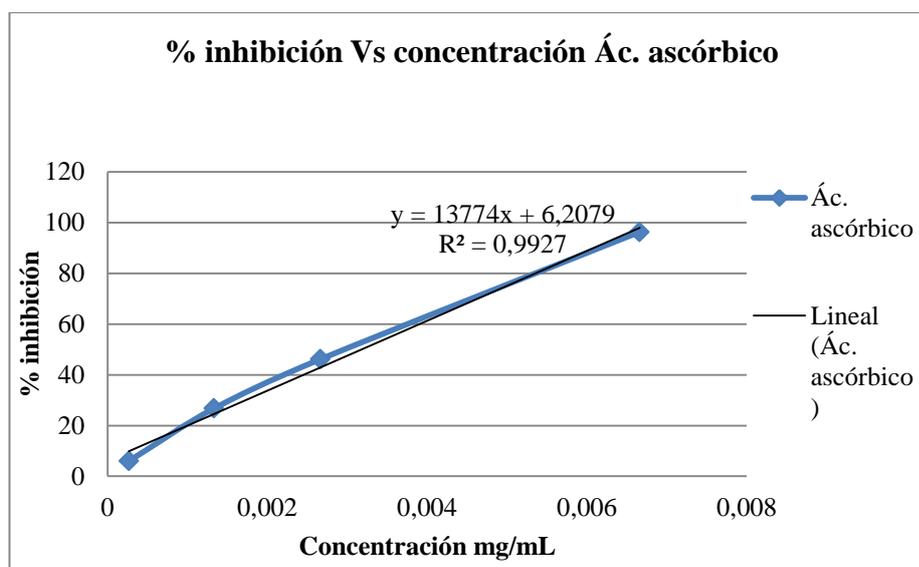


Gráfico 37: % de Inhibición de ácido ascórbico versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 Ácido ascórbico
0.00317mg/mL

4.5.4 Extracto de *Camellia sinensis* (antioxidante de referencia)

La tabla 39 y los gráficos 38 y 39, muestran las absorbancias obtenidas del extracto seco de *Camellia sinensis* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones estándar de *Camellia sinensis*.

Tabla 39: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto seco de *Camellia sinensis*

Concentración mg/ml	Absorbancia	% inhibición
0	0,616 ± 0,002	0
0,0001	0,410 ± 0,0005	33,38745
0,0003	0,394 ± 0,001	36,03896
0,0013	0,287 ± 0,002	53,35498
0,0027	0,217 ± 0,001	64,77273

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 38: Absorbancia del extracto seco de *Camellia sinensis* versus concentración

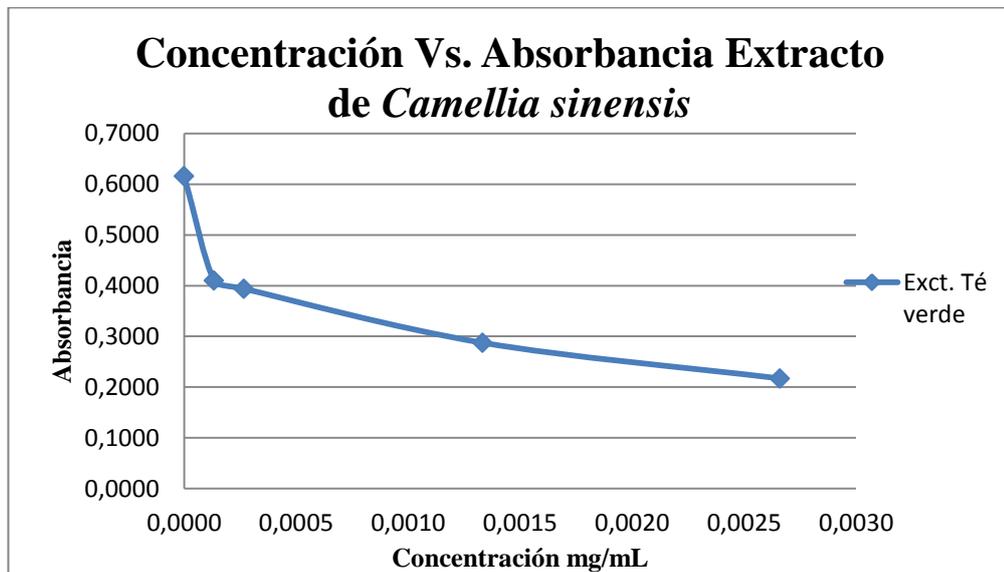
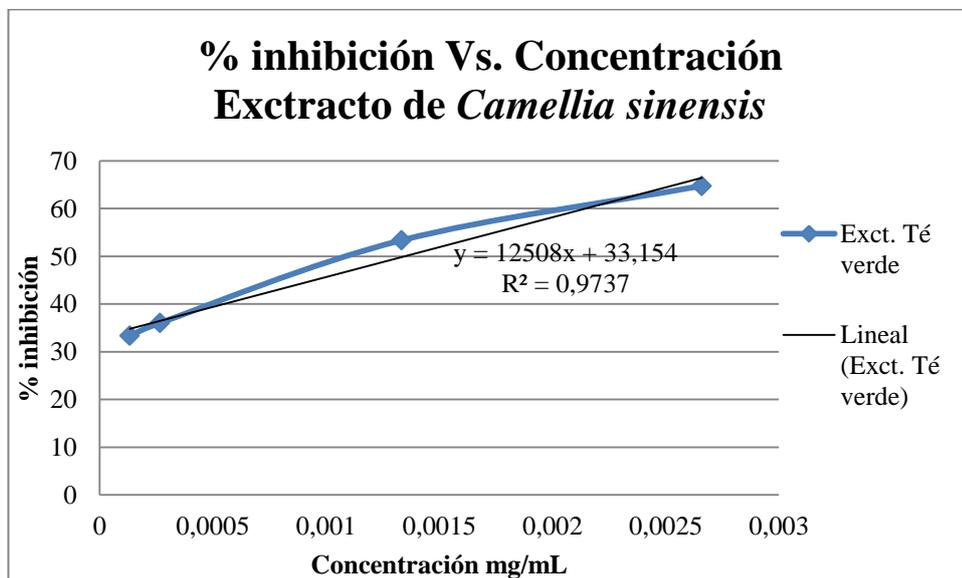


Gráfico 39: % de Inhibición de *Camellia sinensis* versus la concentración del antioxidante



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 <i>Camellia sinensis</i>
0.0013mg/mL

4.5.5 Extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*

La tabla 40 y los gráficos 40 y 41 muestran las absorbancias obtenidas del extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* versus concentración y el % de inhibición de las soluciones de extracto de *Tropaeolum tuberosum*

Tabla 40: Datos obtenidos de la absorbancia y % inhibición del extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*

Concentración mg/mL	Absorbancia	% inhibición
0	0,615 ± 0,002	0
0,066	0,389 ± 0,003	36,7480
0,1333	0,285 ± 0,005	53,5501
0,2666	0,064 ± 0,002	89,5935
0,666	0,002 ± 0,001	99,6206

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráficos 40: Absorbancia del extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*

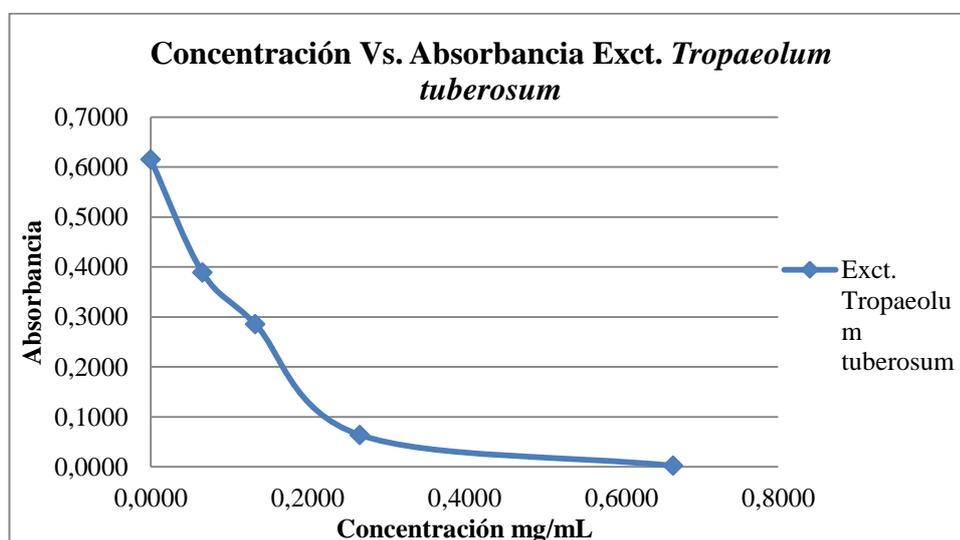
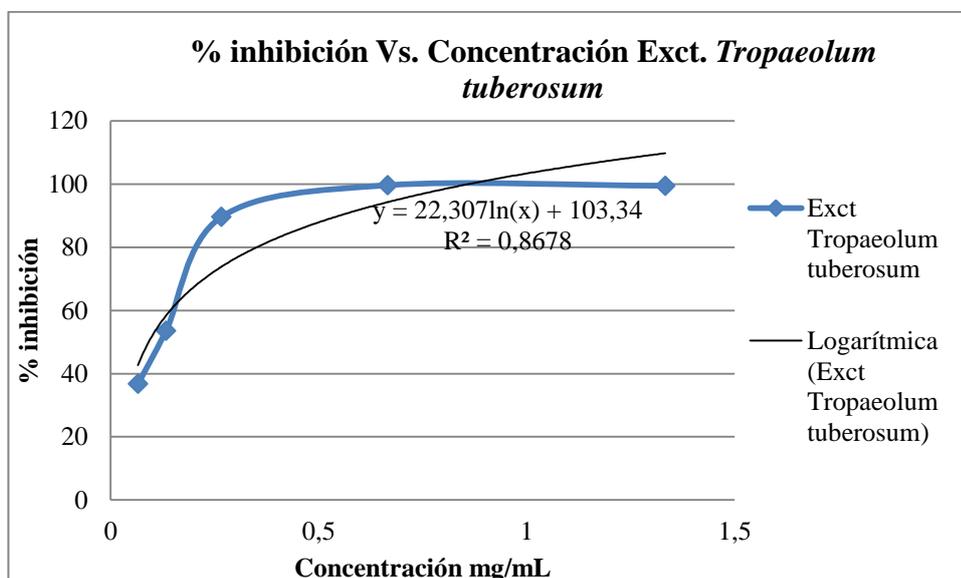


Gráfico 41: % de Inhibición del extracto de *Tropaeolum tuberosum* versus concentración



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

IC50 Extracto <i>Tropaeolum tuberosum</i>
0.0915 mg/mL

4.5.6 Comparación entre Valores de IC 50 en la prueba de ABTS

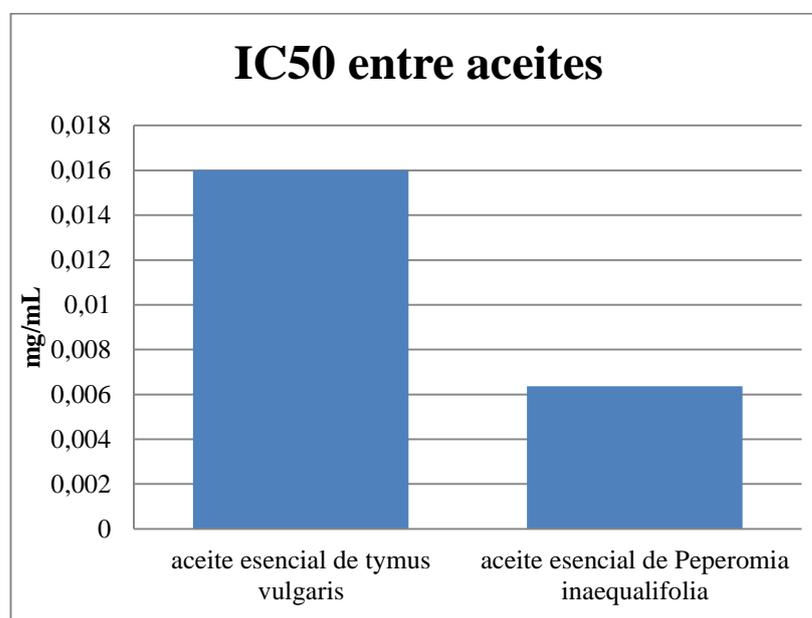
En la tabla 41 se observa la capacidad antioxidante, medida por el IC50 expresada en mg/L, para el aceite de *Peperomia inaequalifolia* y para el aceite de *Thymus vulgaris* utilizado como antioxidante indicador, para el ácido ascórbico y extracto seco de *Camellia sinensis* ambos utilizados como antioxidantes indicadores en el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum*, en los gráficos se evidencian una comparación entre los IC50 de los aceites y extractos

Tabla 41: Comparación entre valores de IC50 de los aceites.

Antioxidante	IC 50 (mg/mL)	IC 50 (mg/L)
Aceite de <i>Thymus vulgaris</i>	0.016	16
Aceite <i>Peperomia inaequalifolia</i>	0.0020	2

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 42: Comparación del IC50 de los aceites



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Al igual que en el método del DPPH en este método también se usó DMSO para los aceites por su polaridad afín con los aceites de estudio, debido a sus propiedades fisicoquímicas, actúa como solvente muy eficiente para los compuestos insolubles en agua y captura iones hidrógenos (Santos, Prieto, Gomes, Betbeder, y Castanho, 1998), para los extractos y solución de ácido ascórbico se usó etanol como solvente.

Se utilizó como estándar de comparación para aceites el aceite esencial de *Thymus vulgaris* el cual presentó un IC50 de 16 mg/L para la reacción con el radical ABTS.

Según la metodología descrita (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, y Fett, 2005), la actividad antioxidante se determina como la actividad antirradical utilizando el radical ABTS. La actividad antirradical en los aceites se evaluó con los valores de IC50, (cantidad de antioxidante necesaria para producir una reducción del 50% del radical libre presente, en este caso DPPH).

La evaluación de la capacidad antioxidante, para el aceite diluido en DMSO de *Peperomia inaequalifolia*, arrojó el siguiente resultado de IC50: 2 mg/L.

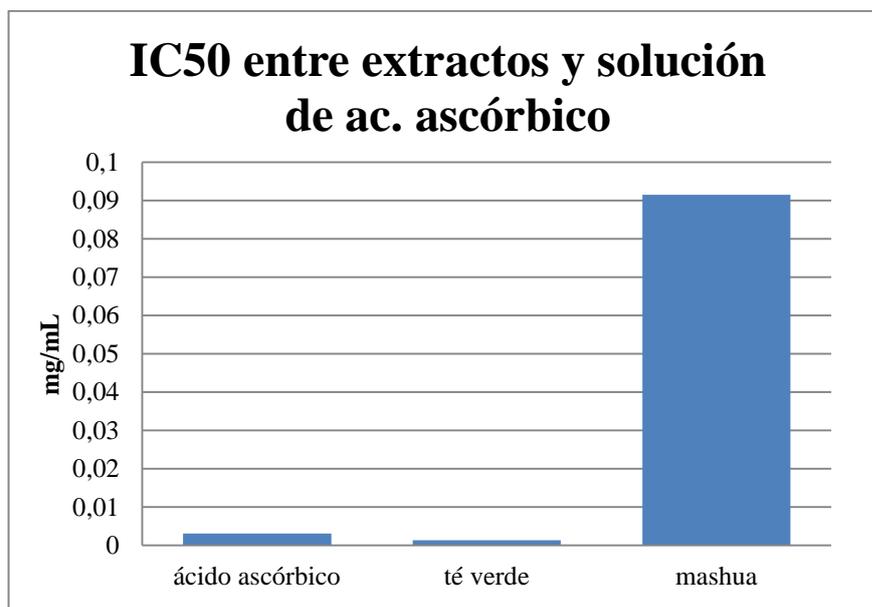
De acuerdo con los datos del IC50 de cada aceite y al existir una relación inversamente proporcional, a mayor valor del IC50 menor actividad antirradical (Sánchez, 2002), se concluye que el aceite de *Peperomia inaequalifolia* presenta una buena actividad antioxidante ya que su valor de IC 50 se encuentra próximo al valor de IC 50 del aceite de *Thymus vulgaris*.

Tabla 42: Comparación entre valores de IC50 de los extractos

Antioxidante	IC 50 (mg/mL)	IC 50 (mg/L)
Extracto seco de <i>Camellia sinensis</i>	0.0013	1.3
Ácido ascórbico	0.0031	3.1
Extracto hidroalcohólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	0.0915	91.5

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 43: Comparación del IC50 de los extractos



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Para los extractos se utilizó etanol al 96% por ser un solvente bastante compatible. Se utilizó como estándar de comparación para extractos el extracto seco de *Camellia sinensis*, y una solución de ácido ascórbico los cuales presentaron los siguientes valores de IC50: 1.3 mg/L y 3.1 mg/L respectivamente para la reacción con el radical ABTS.

La evaluación de la capacidad antioxidante, para el extracto hidroalcohólico de *Tropeolum tuberosum* diluido en etanol al 96%, arrojó el siguiente resultado de IC50: 91.5 mg/L.

De acuerdo con los datos del IC50 de cada extracto y solución de ácido ascórbico y al existir una relación inversamente proporcional, a mayor valor del IC50 menor actividad antiradical (Sánchez, 2002), se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Tropeolum tuberosum* no presenta actividad antioxidante significativa en comparación a los estándares, esto puede deberse a que no posee compuestos antioxidantes o si los posee están en cantidades muy bajas.

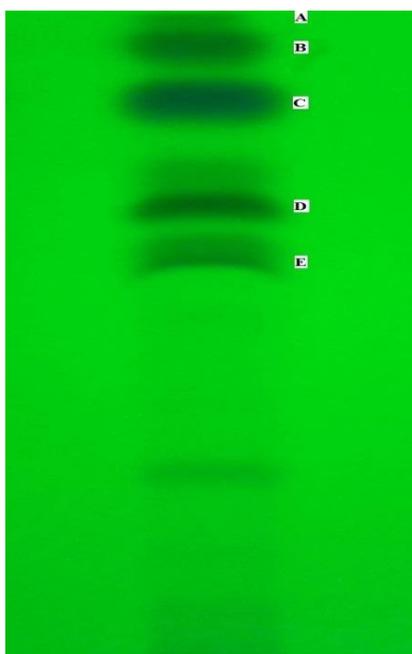
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) Y TLC-DPPH: PRUEBA ANTIOXIDANTE CUALITATIVA

En la tabla 43 se muestran los tiempos de retención de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* y el gráfico muestra la placa cromatográfica que se realizó en el aceite de *Peperomia inaequalifolia*

Tabla 43: Tiempos de retención de los principales compuestos encontrados en el aceite de *Peperomia inaequalifolia*

Símbolo	Rf	Compuesto
A	0,9770	Viridiflorene
B	0,9310	Safrole
C	0,8391	Myristicin
D	0,6322	1,2,3-Triazole
E	0,5402	11- α H-himachal-4-en-1- β

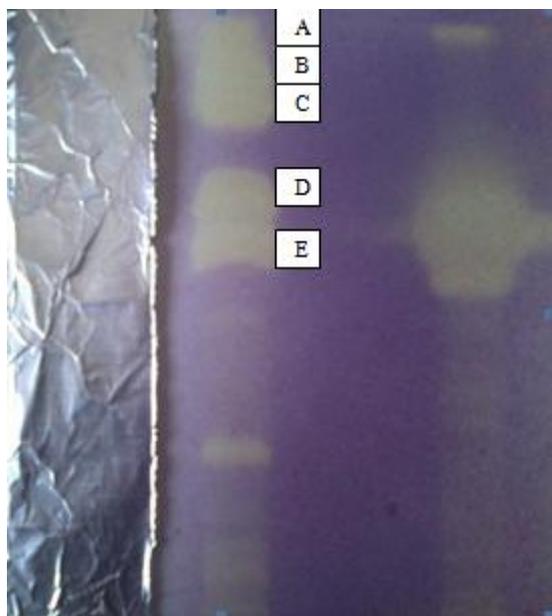
Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013



Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013

Los gráficos 44, 45 y 46 muestran los resultados de la prueba de TLC-DPPH prueba antioxidante cualitativa realizada al aceite de *Peperomia inaequalifolia*.

Gráfico 44: Prueba TLC- DPPH



Aceite de
Peperomia
inaequalifolia

Aceite de *Thymus*
vulgaris

Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013

Símbolo	Rf	Compuesto
A	0,9770	Viridiflorene
B	0,9310	Safrole
C	0,8391	Myristicin
D	0,6322	1,2,3-Triazole
E	0,5402	11- α H-himachal-4-en-1- β

Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013

Gráfico 45: Prueba TLC- DPPH

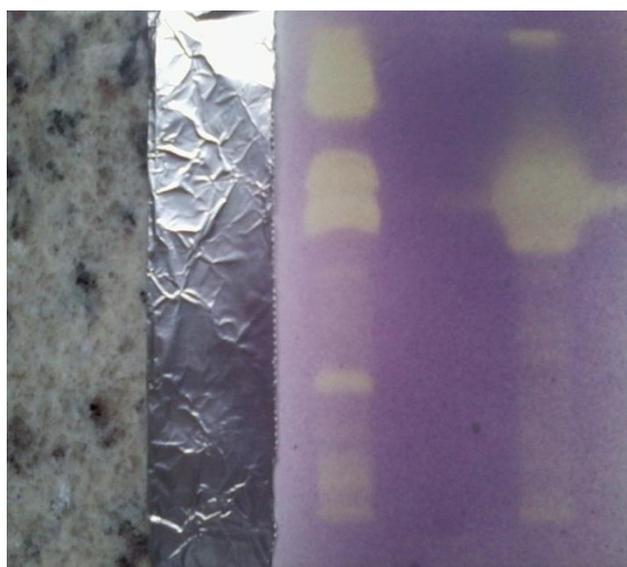


Aceite de
Peperomia
inaequalifolia

Aceite de *Thymus*
vulgaris

Elaborado por: Ivonne Coronel y Sebastián Piedra, 2013

Gráfico 46: Prueba TLC- DPPH



Aceite de
Peperomia
inaequalifolia

Aceite de *Thymus*
vulgaris

La actividad antioxidante se determina como la actividad antirradical utilizando el radical DPPH (Padilla, Rincón, y Bou-rached, 2008). La determinación se llevó a cabo con el reactivo

DPPH. En este ensayo, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta, cuando dicho reactivo se encuentra con el posible antioxidante se va decolorando progresivamente hasta tener una coloración amarilla es en este punto que se determina si la muestra es antioxidante o no. (Gráfico 42, 43, 44) (Padilla, Rincón, y Bou-rached, 2008). Con esto se concluye que el aceite de *Peperomia inaequalifolia* si es antioxidante ya se produjo una decoloración de violeta a amarillo, las manchas más grandes que tuvieron decoloración fueron por la presencia de compuestos como: Viridiflorene, safrol, miristicina, 1,2,3-Triazol y el 11- α H-himachal-4-en-1- β (Coronel y Piedra, 2013)

4.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES CON EL MÉTODO DE FOLIN- CIOCALTEU EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN

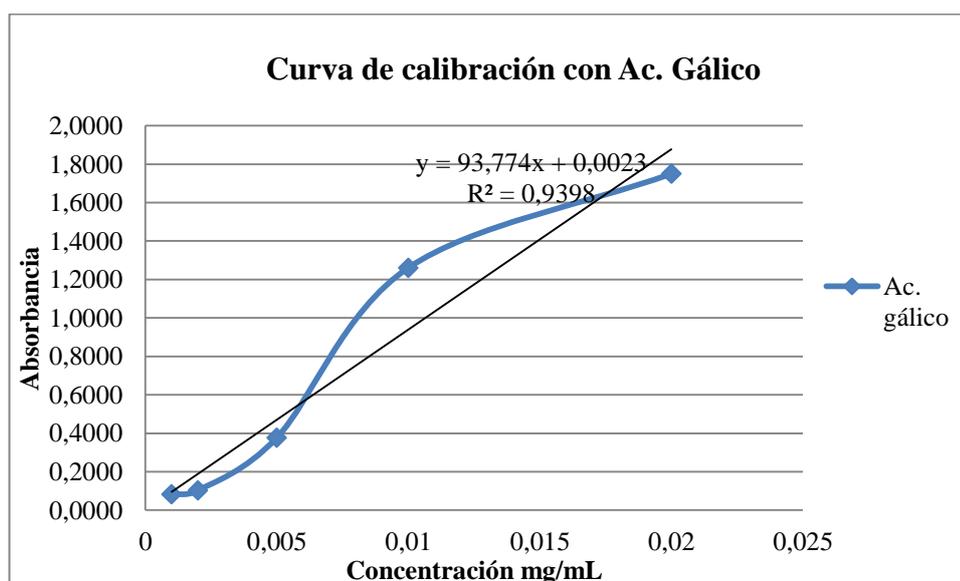
La tabla 44 muestra los datos de concentraciones y absorbancias que se realizó para construir la curva de calibración con ácido gálico.

Tabla 44: Datos de absorbancias y concentraciones de ácido gálico

Concentración mg/ml	Absorbancia
0,001	0,083 ± 0,001
0,002	0,102 ± 0,001
0,005	0,377 ± 0,001
0,01	1,261 ± 0,008
0,02	1,75 ± 0,000

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 47: Curva de calibración de ácido gálico



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Empleando la siguiente fórmula se relacionó la concentración de ácido gálico con las absorbancias obtenidas en el extracto de *Camellia sinensis* y extracto de *Tropaeolum tuberosum*:

$$\text{Ácido gálico} = \frac{\text{Absorbancia muestra} + 0,0023}{93,774}$$

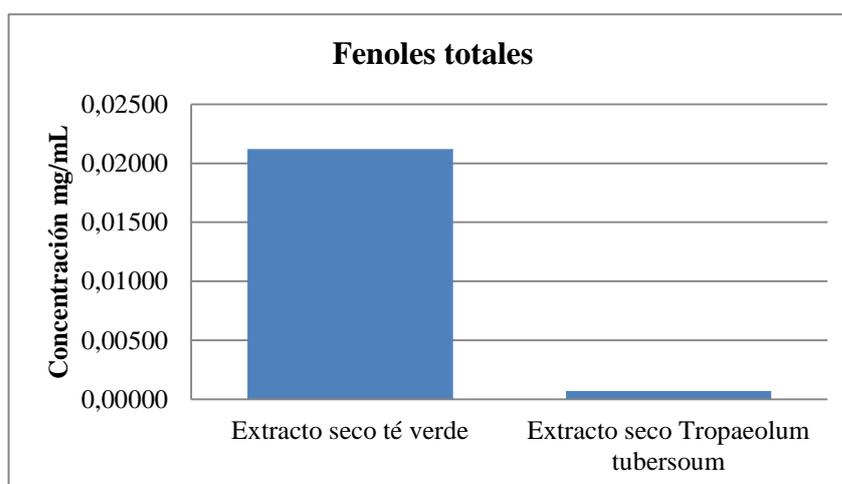
En la tabla 45 se observa la equivalencia entre la absorbancia promedio de las muestras de extractos de *Camellia sinensis* y *Tropaeolum tuberosum* con la concentración de ácido gálico obtenida de la ecuación proveniente de la curva de calibración del respectivo ácido.

Tabla 45: Concentración de fenoles totales para el extracto de *Tropaeolum tuberosum* y *Camellia sinensis*

Muestra	Absorbancia	Concentración fenoles totales mg/mL	Concentración fenoles totales mg/L
Extracto té verde	1,9883	0.0212	21.2
Extracto Mashua	0,0727	0.0007	0.7

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 48: Fenoles en el extracto de *Tropaeolum tuberosum*



Como se observa en la tabla 45 y en el grafico 46 el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* no presenta una significativa concentración de fenoles totales en comparación al extracto seco de *Camellia sinensis* que posee un valor bastante alto de fenoles totales, con esto se concluye que el extracto seco de Mashua no presenta actividad antioxidante de ahí que dicha planta no presenta gran cantidad de usos, a diferencia de los tubérculos.

4.8 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES CON EL MÉTODO DE CLORURO DE ALUMINIO EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* USANDO HYPERÓSIDO COMO PATRÓN

La tabla 46 muestra los datos de concentraciones y absorbancias que se realizó para construir la curva de calibración con hyperósido

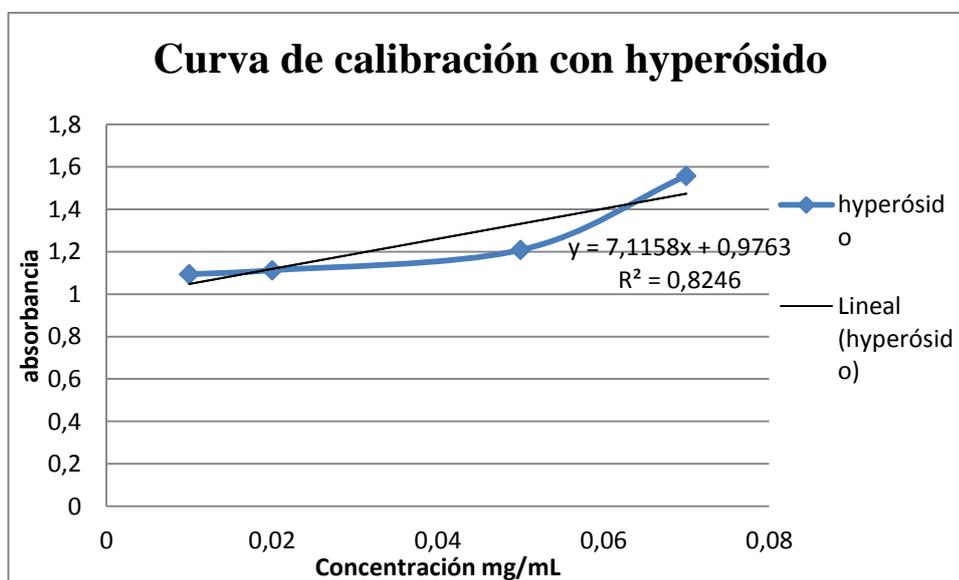
Tabla 46: Concentraciones y absorbancia de hyperósido

Concentración mg/ml	absorbancia
0,01	1,094 ± 0,001
0,02	1,112 ± 0,002
0,05	1,208 ± 0,014
0,07	1,558 ± 0,012

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

En el grafico 49 se muestra la curva de calibración con hyperósido:

Gráfico 49: Curva de calibración con hyperósido



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Empleando la siguiente fórmula se relacionó la concentración de hyperósido con las absorbancias obtenidas en el extracto de *Camellia sinensis* y *Tropaeolum tuberosum*:

$$\text{Hyperósido} = \frac{\text{Abs.muestra} + 0,9763}{7,1158}$$

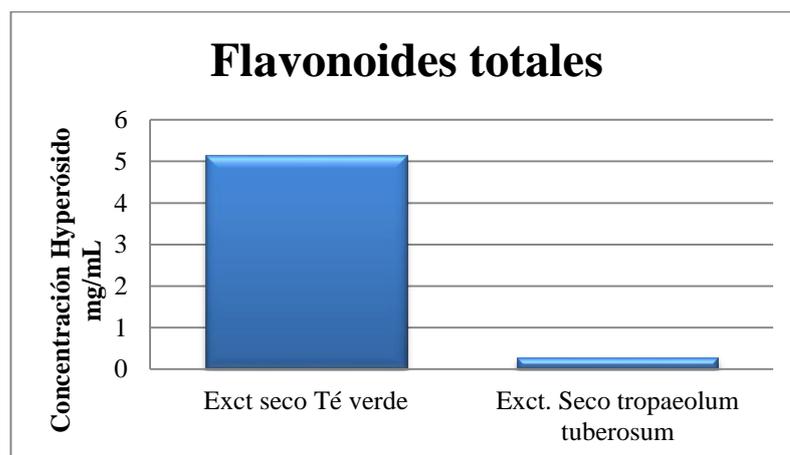
En la tabla 47 se observa la equivalencia entre la absorbancia promedio de las muestras de extractos de *Camellia sinensis* y *Tropaeolum tuberosum* con la concentración de hyperósido obtenida de la ecuación proveniente de la curva de calibración del respectivo compuesto.

Tabla 47: Concentraciones de flavonoides en el extracto de *Camellia sinensis* y *Tropaeolum tuberosum*

Muestra	Absorbancia	Concentración hyperósido mg/mL	Concentración hyperósido mg/L
Extracto de <i>Camellia sinensis</i>	2,12333333	0.4355	435.5
Extracto de <i>Tropaeolum tuberosum</i>	No presento actividad	No presento actividad	No presento actividad

Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Gráfico 50: Flavonoides totales en el extracto de *Tropaeolum tuberosum* y *Camellia sinensis*



Elaborado por: Cristina Aillón, 2013

Como se observa en la tabla 47 y en el grafico 48 el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* no presentó concentración de flavonoides totales en

comparación al extracto de *Camellia sinensis* que posee un valor bastante alto de los mismos, con esto se concluye que no se ha registrado actividad antioxidante en el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* por no contar con la presencia de flavonoides que son los responsables de dicha actividad.

4.9 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR FOTOQUIMILUMINISCENCIA (PCL) EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Peperomia inaequalifolia*

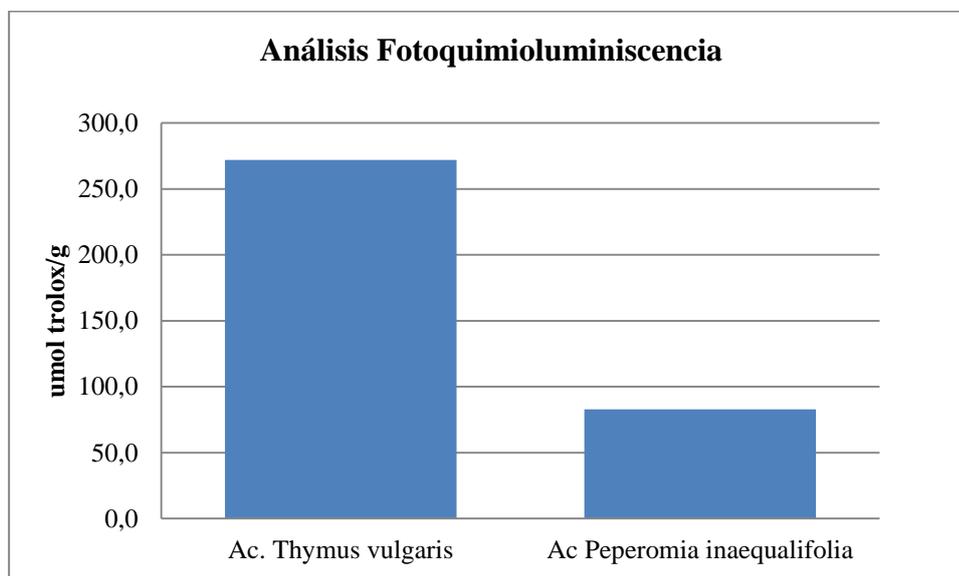
En la tabla 48 se reporta el valor de la capacidad antioxidante del aceite de *Peperomia inaequalifolia*, obtenido de la prueba por tres análisis independientes.

La capacidad antioxidante de la formulación cosmética esta expresada en micromoles de Trolox por gramo de muestra.

Tabla 48: Análisis de fotoquimioluminiscencia en aceites

Muestra	$\mu\text{moles Trolox/g}$ ($P \leq 0.05$)
Aceite esencial <i>Thymus vulgaris</i>	272.0
Aceite esencial <i>Peperomia Inaequalifolia</i>	82.8

Fuente: Universidad de Ferrara, 2013



Fuente: Universidad de Ferrara, 2013

De acuerdo con los resultados expresados en la tabla 48 se puede observar que la actividad antioxidante que posee el aceite de *Peperomia inaequalifolia* por medio de fotoquimioluminiscencia es tan solo 3 veces menor a la del aceite de *Thymus vulgaris* lo que confirma una vez más que dicho aceite posee una buena actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

- El rendimiento de la extracción de aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* a partir de hojas fue del 0.1607%, siendo un rango aceptable para aceites esenciales.
- Se obtuvo 8.95 g de extracto de *Tropaeolum tuberosum* por medio del método de percolación. Cantidad que se utilizó para pruebas antioxidantes: DPPH, ABTS, fenoles totales y flavonoides totales.
- Los principales compuestos encontrados en el aceite de *Peperomia inaequalifolia* fueron: el safrol (28.905%), 11- α H-himachal-4-en-1- β (17.388%), miristicina (14.880%), triazol (4.707%) y viridifloreno (2.820%).
- Se demostró que el aceite de *Peperomia inaequalifolia* si posee una significativa actividad antioxidante en las pruebas de DPPH y ABTS, cuyos valores de IC50 fueron: 2.22 mg/mL y 0.06 mg/mL respectivamente.
- Por medio de la técnica de la fotoquimioluminiscencia se demostró que el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* posee actividad antioxidante tan solo 3 veces menor que la del aceite de *Thymus vulgaris* con un valor de 272.0 μ moli trolox/g.
- La capacidad antioxidante que se determinó en el aceite de *Peperomia inaequalifolia* se confirmó totalmente con la prueba de TLC-DPPH, antioxidante cualitativa en la que se observó el cambio de coloración del reactivo de violeta a amarillo confirmando la hipótesis alternativa. Las fracciones que poseen actividad antioxidante son: viridifloreno (rf: 0.9770), safrol (rf: 0.9310), miristicina (rf: 0.8391), 1,2,3- Triazol (rf: 0.6322) y 11- α H- himachal-4- en -1. B (rf: 0.5402).
- El extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* por el contrario en las pruebas de DPPH y ABTS no obtuvo valores significativos comparado con el extracto seco de *Camellia sinensis*.

- Se demostró que el extracto de *Tropaeolum tuberosum* no posee una elevada concentración de fenoles totales ya que se obtuvo un valor muy bajo en comparación al extracto seco de *Camellia sinensis*.
- Se demostró que el extracto de *Tropaeolum tuberosum* no presentó presencia de flavonoides en comparación al extracto seco de *Camellia sinensis*.
- El principal aporte de este estudio es la determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* por los métodos del reactivo DPPH, ABTS, en TLC, PCL y TCL-DPPH esto ayudará a que en el futuro se puedan hacer nuevos estudios y poder descubrir un nuevo producto con excelentes características en beneficio de la humanidad.

RECOMENDACIONES

- El aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* presenta una actividad antioxidante elevada confirmada por tres métodos, lo que lo hace interesante desde el punto de vista medicinal y cosmético como posible materia prima.
- La inexistente presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* hace innecesaria la valoración TLC-DPPH.

LISTA DE REFERENCIAS

- Barrón, R., García, M. D., Soto, M., Colinas, T., y Kite, G. (14 de marzo de 2011). *Flavonoides y actividad antioxidante de Calia secundiflora (Ort.) Yakovlev*. Recuperado el 20 de junio de 2013, de Scielo: <http://www.scielo.org.mx>
- Bourbonnais, R., y Paice, M. (julio de 1990). *Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation*. Recuperado el 25 de abril de 2012, de Science direct: <http://www.sciencedirect.com/>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica y plantas medicinales*. Madrid, España: Zaragoza.
- Bueno, M. (4 de abril de 2009). *Aditivos antioxidantes*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Biosalud: <http://www.biosalud.org/>
- Camag. (2013). *Equipo de TLC*. Recuperado el 10 de febrero de 2013, de Camag: <http://www.camag.com/>
- Castañeda, C., Ramos, E., y Ibañez, V. (Julio de 2008). *Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*. Recuperado el 9 de febrero de 2012, de Horizonte médico: <http://www.innovacion.gob.sv>
- Cento de datos para la conservación. (2007). *Universidad Nacional Agraria La Molina*. Recuperado el 3 de noviembre de 2012, de <http://cdc.lamolina.edu.pe>
- Cerón, C. (2006). *Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Botánica económica de los Andes centrales: <http://www.beisa.dk>
- Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., y Cedrón, J. C. (2 de febrero de 2013). *Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (Cynara scolymus L.)*. Recuperado el 20 de junio de 2013, de Scielo Perú: <http://www.scielo.org.pe>
- Delgado, L., Betanzos, G., y Sumaya, M. T. (diciembre de 2010). *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo*. Recuperado el 8 de marzo de 2013, de Redalyc: <http://www.redalyc.org>

enlace, T. (24 de agosto de 2012). *Cromatografía en capa fina (casera) de tinta de rotuladores y obtención del correspondiente cromatograma de picos - See more at: [http://triplenlace.com/2012/08/24/cromatografia en capa fina casera de tinta de rotuladores](http://triplenlace.com/2012/08/24/cromatografia%20en%20capa%20fina%20casera%20de%20tinta%20de%20rotuladores)*. Recuperado el 15 de diciembre de 2012, de Triplenlace.com: <http://triplenlace.com/>

Estrada, E., Sánchez, M., Mateos, R., Chávez, R., Ramírez, G., y Hernández, M. (10 de noviembre de 2011). *Actividad antioxidante de alcaloides de Erythrina americana Miller*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Fitotecnia Mexicana: <http://www.scielo.org.mx>

Facultad de Ciencias exactas y naturales y agrimensura. (2001). *Familia Tropaeolaceae*. Recuperado el 10 de octubre de 2012, de Facultad de Ciencias exactas y naturales y agrimensura: <http://exa.unne.edu.ar>

Feiertag, S. (2012). *Congona. Peperomia congona*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de Ethno-botanik: <http://www.ethno-botanik.org/>

Fuentes, X. (2006). *Tubérculos*. Recuperado el 10 de abril de 2012, de Botánica económica de los Andes: <http://www.biesa.dk>

Furnari, G., Guglielmo, A., Longhitano, N., Pavone, P., Salmeri, C., y Scelsi, F. (2005). *Piperaceae*. Recuperado el 3 de noviembre de 2012, de Tabla Botánica sistemática: <http://www.dipbot.unict.it>

García, J. L., Sánchez, M., y García, Vigil, J. L. (28 de agosto de 2008). *Uso de antioxidantes para prevenir enfermedad cardiovascular. Metaanálisis de enayos clínicos*. Recuperado el 8 de marzo de 2013, de Aportaciones originales: <http://edumed.imss.gob.mx>

Gimeno, E. (6 de junio de 2004). *Compuestos Fenólicos*. Recuperado el 14 de marzo de 2013, de *Ámbito farmacéutico*: <http://apps.elsevier.es/>

Graca, M., Cacador, H., Faleiro, M., Galego, L., Almeida, V., y Costa, M. (s.f.). *Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Origanum*. Recuperado el 9 de febrero de 2012, de Facultad de Ingeniería de los Recursos naturales de la Universidad de Algarve: <http://www.drapalg.min-agricultura.pt>

Guerra, E. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Recuperado el 20 de abril de 2013, de Anales de medicina interna: <http://www.scielo.isciii.es>

Jacob, R. (1996). *Three eras of vitamin c discovery*. Recuperado el 25 de junio de 2013, de Google books: <http://books.google.com.ec/>

Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia. Estudios de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Omega.

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., y Fett, R. (diciembre de 2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Food science and technology: <http://www.scielo.br>

Laccalle, A. (20 de junio de 2007). *Antioxidantes en alimentación: Diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis*. Recuperado el 18 de abril de 2012, de Neiker tecnalia: <http://www.gencat.cat>

Lajones, A. (2006). *Plantas medicinales. Utilizadas por los habitantes del sitio la Siberia y de la Parroquia Bolívar*. Recuperado el 13 de marzo de 2012, de USAID from teha american people: <http://pdf.usaid.gov>

Mahecha, C. (2010). *Actividad Antioxidante y Antibacteriana de Aceites Esenciales extraídos de hojas y frutos de Siparuna sessiliflora*. Recuperado el 4 de marzo de 2013, de Pontificia Universidad Javeriana: <http://repository.javeriana.edu.co>

Martínez, A. (septiembre de 2005). *Flavonoides*. Recuperado el 18 de junio de 2013, de Universidad de Antioquia: <http://farmacia.udea.edu.co>

Martínez, M. (mayo de 2012). *Extractos vegetales*. Recuperado el 15 de noviembre de 2012, de Slideshare: <http://www.slideshare.net/>

Martínez, M. A. (febrero de 2003). *Aceites esenciales*. Recuperado el 5 de marzo de 2013, de Universidad de Antioquia: <http://farmacia.udea.edu.co>

Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., y Milner, A. (8 de enero de 1993). *A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates*. Recuperado el 18 de febrero de 2013, de Clinical science: <http://www.clinsci.org>

Miranda, M. (30 de octubre de 2001). *Farmacongnesia y Productos naturales*. Recuperado el 10 de febrero de 2013, de libreroonline: <http://www.libreroonline.com/>

Molyneux, P. (15 de diciembre de 2003). *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Biodiversity information service: <http://www.aseanbiodiversity.info/>

Morley read. (2009). *Tropaeolum tuberosum (mashua)*. Recuperado el 2 de noviembre de 2012, de 123RF: <http://es.123rf.com/>

Noriega, P. (30 de diciembre de 2009). *Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales*. Recuperado el 9 de febrero de 2013, de La granja: <http://lagranja.ups.edu.ec/>

Orlowa, E. (7 de septiembre de 2012). *Congona*. Recuperado el 2 de noviembre de 2012, de Livejournal: <http://ru-plants.livejournal.com/>

Padilla, F., Rincón, A. M., y Bou-rached, L. (9 de septiembre de 2008). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas de nueces*. Recuperado el 18 de abril de 2013, de Bibliografía Latinoamericana: <http://biblat.unam.mx>

Paladino, S. (2008). *Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos contenidos en las Semillas de la Vid (Vitis vinifera L.)*. Recuperado el 20 de marzo de 2013, de Biblioteca digital Uncuyo: <http://bdigital.uncu.edu.ar/>

Pedersen, C., Kyle, J., Jenkinson, A., Gardner, P., Mcphail, D., y Duthie, G. (14 de diciembre de 1999). *Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers*. Recuperado el 20 de junio de 2013, de European Journal of Clinical Nutrition: <http://livar.net/>

- Pérez, T. (2011). *Obtención de extractos a partir de plantas medicinales*. Recuperado el 10 de febrero de 2013, de Monografías.com: <http://www.monografias.com/>
- Perú ecológico. (octubre de 2007). *Distribución, Habitat y cultivo*. Recuperado el 2 de noviembre de 2012, de Perú ecológico: <http://www.peruecologico.com.pe>
- Pino, G. (2006). *Estado actual de las suculentas en el Perú*. Recuperado el 12 de febrero de 2012, de Zonas aridas: <http://www.lamolina.edu.pe/>
- Prakash, A., Rigelhof, F., y Miller, E. (2001). *Antioxidant activity*. Recuperado el 9 de febrero de 2012, de <http://www.medallionlabs.com>
- Prior, R., Wu, X., y Schaich, K. (26 de abril de 2005). *Standardized methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. Recuperado el 18 de junio de 2013, de Agricultural and food chemistry: <http://www.orac-info-portal.de/>
- Rosales, R. (2011). *Radicales libres y antioxidantes*. Recuperado el 20 de abril de 2012, de Ciencias de la Salud: <http://biosalud.saber.ula.ve>
- Rousessac, F. (2000). *Métodos y Técnicas instrumentales modernas. Teoría y ejercicios resueltos. Análisis químico*. Madrid, España: Mcgrawhill.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, E., Radice, M., y Bruni, R. (22 de junio de 2004). *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Recuperado el 20 de abril de 2013, de Science direct: <http://herbs.ph/>
- Samaniego, L. (2010). *Caracterización de la mashua en el Ecuador*. Recuperado el 2 de noviembre de 2012, de Universidad Tecnológica Equinoccial: <http://repositorio.ute.edu.ec/>
- Sánchez, C. (junio de 2002). *Methods used to evaluate the free radical scavenging Activity in Foods and Biological Systems*. Recuperado el 20 de mayo de 2013, de Digital.csic Ciencia en abierto: <http://digital.csic.es>

Santos, N., Prieto, M., Gomes, M., Betbeder, D., y Castanho, M. (6 de diciembre de 1998). *Structural characterization (shape and dimensions) and stability of polysaccharide/lipid nanoparticles*. Recuperado el 22 de julio de 2013, de Wiley online Library: <http://onlinelibrary.wiley.com/>

Sharapin, N. (marzo de 2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Recuperado el 15 de junio de 2013, de Google books: <http://books.google.com.ec/>

Soler, A. (noviembre de 2009). *Estudio de la Capacidad Antioxidante y la Biodisponibilidad de los Compuestos Fenólicos del Aceite de Oliva. Primeras Etapas en el desarrollo de un Aceite de Oliva Funcional*. Recuperado el 14 de marzo de 2013, de Universidad de Leida: <http://www.tdx.cat/>

Sun, J., Chu, y.-f., Wu, X., y Hai, R. (10 de julio de 2002). *Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits*. Recuperado el 20 de junio de 2013, de Asean food: <http://www.aseanfood.info/>

Teleguario, C. (2008). *Caracterización y cuantificación de flavonoides, sapogeninas esteroidales en extractos de tres plantas mesoamericanas Lippia graveolens (orégano), Passiflora edulis (maracuyá) y Smilax domingensis (zarzaparrilla)*. Recuperado el 20 de mayo de 2013, de Universidad de San Carlos de Guatemala: <http://biblioteca.usac.edu.gt>

Torres, O., Ramos, R., Soto, A. M., y Caraballo, A. L. (2011). *Aceites esenciales*. Recuperado el 15 de abril de 2013, de Scribd: <http://es.scribd.com>

Universidad de Estudios de Ferrara. (2013). *Determinación de la capacidad antioxidante mediante fotoquimioluminiscencia*. Ferrara: Ambrosia lab.

Universidad Politécnica de Madrid. (2011). *Uso de plantas aromáticas y medicinales*. Recuperado el 25 de enero de 2013, de Politécnica: <http://www.upm.e>

Valenzuela, A., y Nieto, S. (1996). *Synthetic and Natural Antioxidants: Food Quality*. Recuperado el 20 de junio de 2013, de Grasas y aceites: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>

Vásquez, A., Cala, M., Miranda, I., Tafurt, G., Martínez, J., y Stashenko, E. (mayo de 2007). *Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de Salvia aratocensis, Salvia sochensis, Bidens reptans y Montanoa ovalifolia*. Recuperado el 15 de abril de 2012, de Scientia et Technica: <http://www.bdigital.unal.edu.co/>

Wang, P.-H., Rind, D., Trepte, C., Kent, G., y Yue, K. (27 de junio de 1998). *An empirical model study of the tropospheric meridional circulation based on SAGE II observations*. Recuperado el 20 de junio de 2013 , de Journal Geophysical Research: <http://onlinelibrary.wiley.com>

ANEXOS

Anexo 1

Identificación de las plantas de congona y Mashua por parte del herbario de la Universidad Central del Ecuador



Herbario "ALFREDO PAREDES" QAP
Escuela de Biología, Universidad Central del Ecuador
Entre la Av. América y Carvajal. Ciudadela Universitaria, Edif. Facultad de Filosofía,
Torre Norte, sexto piso Ap. Postal 17.01.2177, E-mail: carlosceron57@hotmail.com
Telf.: 2547212 Quito - Ecuador

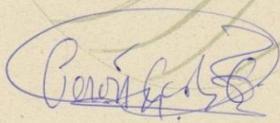
CERTIFICACIÓN

A quién corresponda:

La presente es para señalar que las muestras de plantas remitidas por la señora Cristina Lorena Aillon Rojas, como parte de su tesis en Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica Salesiana en el tema "Estudios de actividad antioxidante en dos plantas medicinales ecuatorianas: extractos hidroalcohólicos de la mashua y la congona". Corresponden a las especies *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. (Tropaeolaceae) y *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. (Piperaceae). Un duplicado de dicha muestra respectivamente montada y etiquetada se encuentra depositado en nuestro Herbario.

Doy fe que lo expresado en este escrito es verdad.

Atentamente,



Dr. Carlos E. Cerón Martínez MSc.
DIRECTOR AD-HONOREM DEL HERBARIO
ALFREDO PAREDES (QAP)



Quito DM, abril 17 del 2013

Anexo 2

Cálculo para determinar la cantidad de reactivo DPPH que se debía pesar para pruebas antioxidantes

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{moles soluto}}{\text{l solución}}$$

Se despejo los moles

$$1 \times 10^{-4} = \frac{\text{moles}}{0.25L}$$

$$\text{moles de DPPH} = 2.5 \times 10^{-5}$$

Se realizó una regla de tres para transformar los moles a gramos:

$$1 \text{ mol DPPH} \longrightarrow 394 \text{ g}$$

$$2.5 \times 10^{-5} \longrightarrow X$$

$$X = 0.00985$$

$$X = 9.85 \text{ mg de DPPH}$$

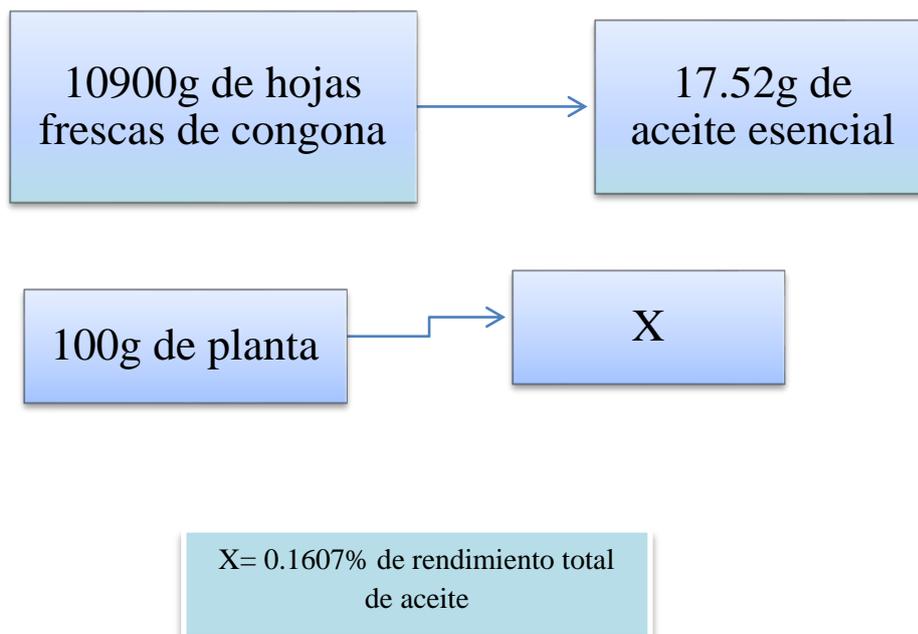
Anexo 3

Determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*

$$d = \frac{m}{v}$$

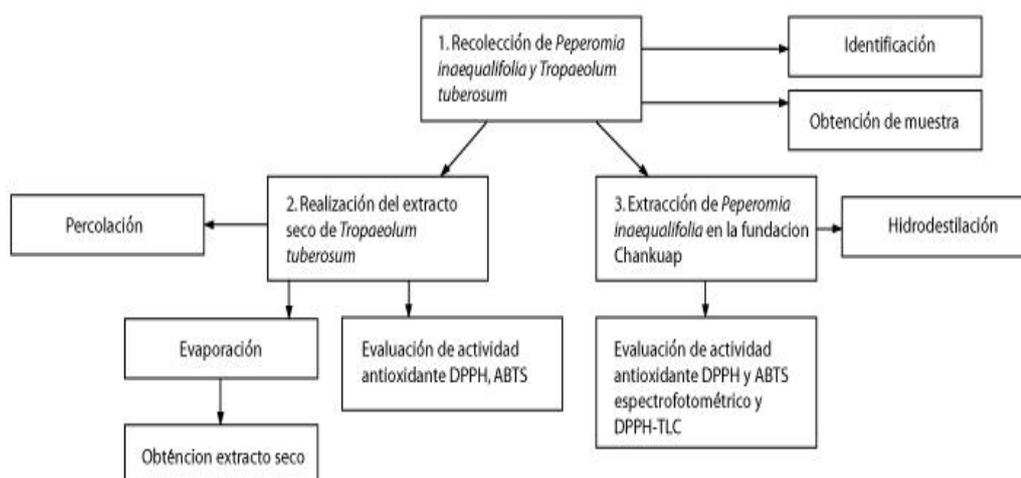
$$1.031 = \frac{m}{17 \text{ ml de aceite esencial}}$$

$m = 17.52 \text{ g de aceite esencial}$
--



Anexo 4

Esquema General de la Metodología



Elaborado por. Cristina Aillón, 2013

Anexo 5

Extracto hidroalcohólico de *Troapeolum tuberosum*



Elaborado por. Cristina Aillón, 2013

Anexo 6

Aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia*



Elaborado por. Cristina Aillón, 2013