

EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE PULPA DE *Carica*
candamarcensis

CRISTINA MEJÍA HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE PULPA DE *Carica*
candamarcensis

CRISTINA MEJÍA HERNÁNDEZ

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Químico.

Director

NELSON HUMBERTO HURTADO
Ph.D. Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Art.1 del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Nelson Humberto Hurtado
Asesor

Juan José Lozada
Jurado

Olga Lucia Benavides
Jurado

San Juan de Pasto, Marzo del 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quien me ha brindado todo su amor y comprensión y siempre me han apoyado en todas la etapas de este recorrido por la vida. En especial a mi madre, ser que admiro y respeto profundamente.

De manera muy especial, quiero expresarle mi gratitud al doctor Nelson Hurtado, quien hizo posible el desarrollo de esta investigación, por su asesoría y colaboración.

A los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez, por su recomendaciones y opiniones en el desarrollo de este trabajo, especialmente por sus lecciones de vida y por sus consejos oportunos.

A la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño por toda la colaboración prestada.

A la Vicerrectoría de investigaciones, postgrados y relaciones internacionales (VIPRI) por la financiación de esta investigación.

A mis inigualables amigos, con quienes compartí este hermoso camino de mi vida, a March, Bock, Angela, Dario, Gabriel, Diego & Erwin.

RESUMEN

En la presente investigación se estudiaron los componentes mayoritarios del aceite esencial puro de la especie *Carica candamarcensis*, recolectada en el Municipio de La Florida-Nariño. El aceite esencial fue obtenido mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas y analizadas mediante cromatografía de gases (CG/FID) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM). Los componentes mayoritarios corresponden a hidrocarburos monoterpénicos, en su mayoría compuestos tipo éster alifáticos (80%), entre ellos: caprilato de etilo (20,2%), caprilato de butilo (12,2%), butirato de etilo (11,7%), caprilato de metilo (9,5%), caproato de etilo (8,0%), y octadecatrienoato de etilo (6,6%). Además, se realizó el fraccionamiento de aceite esencial puro y en la única fracción obtenida (AE_{F1}), se identificaron como componentes mayoritarios a caprilato de etilo (28,2%), butirato de etilo (17,0%), caprilato de butilo (15,0%), caprilato de metilo (13,0%) y caproato de etilo (11,7%).

La capacidad antioxidante del aceite esencial (AE) y su fracción (AE_{F1}) fue evaluada mediante el método de decoloración del catión radical ABTS, el cual presentó un valor AAT (actividad antioxidante total) de $0,458 \pm 0,04$ mmol trolox / Kg de AE y $0,307 \pm 0,04$ mmol trolox / Kg de AE_{F1} respectivamente. Además, se evaluó la eficiencia antirradical a través del método DPPH y se encontró un valor de EA de $1,517 \times 10^{-4}$ para el aceite crudo y de $3,608 \times 10^{-5}$ para la fracción. Otro método ensayado fue la peroxidación lipídica, se realizó por oxidación inducida con O_2 e iones Fe^{+2} en una emulsión de ácido linoléico. Los resultados sugieren un efecto pro-oxidante, debido al bajo efecto protector tanto del aceite puro, como de la fracción. El aceite esencial y la fracción de *C. candamarcensis* presentaron baja efectividad como mezcla antioxidante en la captura de radicales e incluso ejercen efectos pro-oxidantes en la peroxidación del ácido linoleico.

ABSTRACT

The present research studied the major components of the pure essential oil of the *Carica candamarcensis* species that were harvested in the town of Florida-Nariño. The essential oil was obtained by using microwave-assisted hydrodistillation technique and it was analyzed by using gas chromatography (GC/FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) techniques. The major components that were identified matched with the monoterpenes hydrocarbon, most of them ester aliphatic components (80%) such as ethyl caprylate (20,2%), butyl caprylate (12,2%), ethyl butyrate (11,7%), methyl caprylate (9,5%), ethyl caproate (8,0%), and ethyl octadecatrienoate (6,6%). Moreover, a fractionation of pure essential oil was carried out. The major components that were identified in the only fraction obtained (AE_{F1}) were ethyl caprylate (28,2%), ethyl butyrate (17,0%), butyl caprylate (15,0%), methyl caprylate (13,0%) and ethyl caproate (11,7%).

The antioxidant activity of the essential oil (EO) and its fraction(AE_{F1}) was evaluated by using the radical-cation decolorization assay ABTS which presented the total antioxidant activity of 0,458±0,04 mmol trolox / Kg of AE and 0,307±0,04 mmol trolox / Kg of AE_{F1} respectively. The antiradical efficiency was also evaluated by using the DPPH assay. It was found EA values for the pure oil ($1,517 \times 10^{-4}$) as well as for the fraction ($3,608 \times 10^{-5}$). Another assay that was used in this study was the lipid peroxidation which was carried out by using induced oxidation with O₂ and ions Fe⁺² in a linoleic acid emulsion. The results suggest a pro-oxidizing effect due to the low protective effect of the pure oil and the fraction. The essential oil and the fraction of *C. candamarcensis* have shown low effectiveness as an antioxidant mixture in the radical scavenging and they even have pro-oxidizing effects in the peroxidation of the linoleico acid.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	19
1. OBJETIVOS.....	21
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
2. MARCO REFERENCIAL.....	22
2.1 <i>Carica candamarcensis</i>	22
2.1.1 Composición Química.	23
2.1.2 Propiedades Biológicas..	24
2.2 ACEITES ESENCIALES.....	27
2.2.1 Definición.....	27
2.2.2 Composición química.	27
2.2.3 Factores que influyen sobre la composición de los aceites esenciales.	29
2.2.4 Aplicaciones de los aceites esenciales.....	29
2.2.5 Control de calidad de aceites esenciales.....	30
2.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES	31
2.3.1 Deterioro Oxidativo	31
2.3.1.1 Especies reactivas de oxígeno.....	32
2.3.1.2 Principales fuentes de ERO.	32
2.3.1.3 Antioxidantes.....	33
2.3.1.4 Estrés oxidativo y antioxidantes.	33
2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	34
2.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación microondas.	35

2.5	MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> . ..	36
2.5.1	Método TEAC.	36
2.5.2	Método DPPH.	37
2.5.3	Método de la peroxidación lipídica.	39
2.6	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	40
2.6.1	Cromatografía de gases (CG).	40
2.6.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).	41
2.6.3	Cuantificación de los componentes presentes en el AE.	42
3.	METODOLOGÍA.	43
3.1	Recolección de material vegetal.	43
3.2	Identificación taxonómica.	43
3.3	Extracción del aceite esencial	44
3.4	Fraccionamiento del aceite esencial	45
3.5	Análisis instrumental	46
3.5.1	Análisis cromatográfico.	46
3.5.2	Identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM.	47
3.5.3	Cuantificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial.	47
3.6	Valoración de la actividad antioxidante.	48
3.6.1	Determinación de la capacidad antioxidante: Método TEAC.	48
3.6.2	Determinación de la eficiencia antiradical: Método DPPH.	48
3.6.3	Determinación de la peroxidación del ácido linoleico.	49
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
4.1	Análisis de repetibilidad de los perfiles cromatográficos de AE de <i>C. candamarcensis</i>	51

4.2	Cuantificación de los componentes mayoritarios de AE de <i>C. candamarcensis</i> ..	54
4.3	Identificación de los compuestos mayoritarios de AE y AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> .	57
4.3.1	Análisis preliminar de compuestos mayoritarios de AE de <i>C. candamarcensis</i> .	57
4.3.2	Análisis preliminar de los compuestos mayoritarios de AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> .	60
4.3.3	Identificación de los compuestos mayoritarios del AE de <i>C. candamarcensis</i> por CG-EM.	62
4.3.3.1	Butirato de etilo.	65
4.3.3.2	Octanol.	66
4.3.3.3	Isotiocianato-metil-benceno.	67
4.3.3.4	Nerolidol.	68
4.3.3.5	Octadecadienoato de etilo.	69
4.3.4	Identificación de los compuestos mayoritarios de la fracción F1 de AE de <i>C. candamarcensis</i> por CG-EM.	71
4.4	Actividad antioxidante	73
4.4.1	Parámetros estadísticos para la validación de los métodos TEAC y DPPH.	73
4.4.1.1	Método TEAC.	73
4.4.1.2	Método DPPH.	79
4.4.2	Actividad antioxidante equivalente en trolox.	83
4.4.3	Determinación de la eficiencia antiradical: Método DPPH.	88
4.4.4	Determinación de la peroxidación del ácido linoleico.	96
	CONCLUSIONES	103
	RECOMENDACIONES	104
	BIBLIOGRAFÍA	105
	ANEXOS	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos mayoritarios de la fracción volátil de <i>C. candamarcensis</i> ...	24
Tabla 2. Compuestos del AE de <i>C. candamarcensis</i> extraídos por HDMO e identificados por CG.....	25
Tabla 3. Usos de los AE en diferentes áreas de la industria.	29
Tabla 4. Parámetros analíticos empleados para establecer la calidad de los AE .	30
Tabla 5. Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.....	34
Tabla 6. Parámetros cromatográficos empleados en la identificación preliminar de los compuestos mayoritarios de AE y AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i>	46
Tabla 7. Parámetros cromatográficos que se emplearon en la determinación del avance de oxidación del ácido linoleico.	50
Tabla 8. Análisis de repetibilidad de los tiempos de retención de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de <i>C. candamarcensis</i>	52
Tabla 9. Análisis de repetibilidad de los índices de retención de Kovats de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de <i>C. candamarcensis</i>	53
Tabla 10. Análisis de repetibilidad de las áreas cromatográficas de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de <i>C. candamarcensis</i>	54
Tabla 11. Repetibilidad del área cromatográfica de n-tetradecano a diferentes concentraciones.	55
Tabla 12. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los compuestos presentes en el AE de <i>C. candamarcensis</i>	56
Tabla 13. Identificación preliminar de los compuestos mayoritarios mediante índices de retención de Kovats del AE de <i>C. candamarcensis</i>	58
Tabla 14. Análisis preliminar de los compuestos mayoritarios mediante índices de retención de Kovats de AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i>	61
Tabla 15. Identificación, tiempo de retención y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios de AE de <i>C. candamarcensis</i> mediante CG/EM.....	62
Tabla 16. Identificación y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios presentes en AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> mediante CG/EM.	72

Tabla 17. Absorbancia de soluciones de ABTS** con diferentes concentraciones de trolox.	75
Tabla 18. Concentraciones experimentales de soluciones de Trolox.....	76
Tabla 19. Absorbancia final de las soluciones de Trolox.....	77
Tabla 20. Absorbancia de soluciones de DPPH*	80
Tabla 21. Exactitud del método DPPH	81
Tabla 22. Absorbancia final de las soluciones de DPPH*	82
Tabla 23. Actividad antioxidante de AE, AE _{F1} de <i>Carica candamarcensis</i> y sustancias de referencia.	85
Tabla 24. Nombres científico, común y cantidades relativas (%) de los componentes mayoritarios identificados en aceites esenciales representativos...	87
Tabla 25. Concentración, % DPPH* remanente y tiempo en el estado estacionario de las sustancias de referencia, AE y AE _{F1}	89
Tabla 26. Concentración necesaria para disminuir el 50% de la concentración inicial del DPPH y su clasificación cinética.....	91
Tabla 27. Eficiencia antiradical de las sustancias de referencia, AE y AE _{F1}	91
Tabla 28. Análisis de repetibilidad del tiempo de retención del éster del ácido linoleico en diferentes sistemas lipídicos.....	98
Tabla 29. Efecto protector de AE, AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> y α -tocoferol contra la oxidación de la emulsión del ácido linoleico, inducida por O ₂ y Fe ⁺²	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de <i>Carica candamarcensis</i> (Hooker filius).....	22
Figura 2. Unidad estructural característica de los terpenos.	27
Figura 3. Unidad estructural característica de los fenilpropanoides.	29
Figura 4. Equipo de hidrodestilación asistido por radiación microondas.	35
Figura 5. Estructura del catión-radical ABTS ⁺	36
Figura 6. Estructura del radical DPPH [•]	37
Figura 7. DPPH ₂ 2,2- difenil-1-picrilhidrazina molécula neutra, no radical.	38
Figura 8. Mapa de ubicación del área de estudio de la especie <i>Carica candamarcensis</i>	43
Figura 9. Planta de <i>Carica candamarcensis</i>	44
Figura 10. Montaje de hidrodestilacion asistida por radiacion microondas (HDMO) para obtener el aceite esencial.	45
Figura 11. Cromatógrafo de gases <i>Shimadzu GC-17A</i>	47
Figura 12. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por HDMO.	51
Figura 13. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por HDMO.	58
Figura 14. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por HDMO.	60
Figura 15. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM del AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por HDMO.	63
Figura 16. Espectro de masas del butanoato de etilo (EI, 70 eV).	65
Figura 17. Espectro de masas del n-octanol (EI, 70 eV).	66
Figura 18. Espectro de masas del Isotiocianato-metil-benceno (EI, 70 eV).	67
Figura 19. Espectro de masas del nerolidol (EI, 70 eV).	69

Figura 20. Espectro de masas del octadecadienoato de etilo (EI, 70 eV).	70
Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM de AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por HDMO.	72
Figura 22. Estructuras moleculares del ácido ascórbico, ácido gálico y butil-hidroxi-tolueno (BHT).	86
Figura 23. Perfil cromatográfico del ácido linoleico puro sometido a derivación ...	97
Figura 24. Perfil cromatográfico del metil éster del ácido linoleico en el sistema lipídico sin antioxidante (blanco).	97
Figura 26. Perfiles cromatográficos del metil éster del ácido linoleico con diferentes concentraciones de -tocoferol.	101
Figura 27. Perfil cromatográfico del metil éster del ácido linoleico en presencia del AE y AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i>	102

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración de n-tetradecano.	55
Gráfica 2. Comparación de los compuestos mayoritarios del AE y AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i>	73
Gráfica 3. Espectro de absorción del catión-radical ABTS ^{•+}	74
Gráfica 4. Curva de calibración de soluciones trolox a 734nm.....	77
Gráfica 5. Espectro de absorción del radical DPPH [•]	79
Gráfica 6. Curva de calibración de soluciones DPPH [•] a 515nm.	82
Gráfica 7. Grado de inhibición del catión-radical ABTS ^{•+} , en función de la concentración (mM) de trolox.....	84
Gráfica 8. Comparación de la actividad antioxidante del AE de <i>C. candamarcensis</i> y otros aceites esenciales	86
Gráfica 9. Comportamiento cinético de sustancias de referencia.	90
Gráfica 10. Disminución de la concentración del DPPH [•] en función de la cantidad de ácido ascórbico (g) por kg del radical.....	92
Gráfica 11. Disminución de la concentración del DPPH [•] en función de la cantidad de ácido gálico (g) por kg del radical.....	93
Gráfica 12. Disminución de la concentración del DPPH [•] en función de la cantidad de BHT (g) por kg del radical.	93
Gráfica 13. Cinética de la reacción del AE de <i>C. Candamarcensis</i> con el radical DPPH [•]	94
Gráfica 14. Cinética de la reacción del AE _{F1} de <i>C. candamarcensis</i> con el radical DPPH [•]	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biosíntesis de terpenos. Ruta del ácido mevalónico.	28
Esquema 2. Mecanismo de fragmentación propuesto del butanoato de etilo.	66
Esquema 3. Mecanismo de fragmentación propuesto del n-octanol.	67
Esquema 4. Mecanismo de fragmentación propuesto del isotiocianatometil- benceno.	68
Esquema 5. Mecanismo de fragmentación propuesto del nerolidol.	69
Esquema 6. Mecanismo de fragmentación propuesto de octadecadienoato de etilo.	70
Esquema 7. Representación de la reacción de reducción ABTS ⁺ en presencia de un antioxidante.	83
Esquema 8. Ecuación de la reacción de reducción de DPPH [•]	88
Esquema 9. Peroxidación lipídica del ácido linoleico.	99

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Perfil cromatográfico (CG-FID) de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C ₇ hasta C ₃₂	113
Anexo B. Estructuras moleculares de los compuestos identificados preliminarmente por CG/FID del AE de <i>C. candamarcensis</i>	114
Anexo C. Espectros de masas y posibles mecanismos de fragmentación de los compuestos del AE de <i>C. Candamarcensis</i> identificados por CG/EM	117

LISTA DE ABREVIATURAS

%CV	porcentaje coeficiente de variación
AAT	Actividad antioxidante total
ABTS	2,2'-Azinobis-(ethyl-bensothiazoline-6-sulfonic acid Acido 2,2'-azino bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico)
AE(s)	Aceite(s) esencial(es)
AE _{F1}	Fracción 1 de aceite esencial de <i>C. candamarcensis</i>
BHT	Butil hidroxil tolueno
BPL	Buenas práctica de laboratorio
CC	Cromatografía en columna
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DPPH·	2,2-Diphenyl- -picrylhydrazyl. Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EA	Eficiencia antiradical
EC ₅₀	Concentración de antioxidante necesaria para reducir el 50% del DPPH· inicial
ER%	Error relativo porcentual
FID	Flame ionization detector. Detector de ionización en llama
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HD	Hidrodestilación
HDMO	Hidrodestilación asistida por radiación microondas
IC	Intervalo de confianza
I _k	Índices de Kovats
IRR	Índices de retención relativos
I _{std}	Estándar interno
m/z	Relación masa carga
r	Coeficiente de correlación
R ²	Coeficiente de determinación
RL	Radical libre
S	Desviación estándar
S _a	Desviación típica de la ordenada
S _b	Desviación típica de la pendiente
S _{y/x}	Desviación típica que relaciona la pendiente y la ordenada
TEAC	Trolox [®] equivalent antioxidant capacity, Actividad antioxidante equivalente a trolox
T _{EC50}	Tiempo que tarda el EC50 para alcanzar el estado estacionario
t _r	Tiempo de retención

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevas alternativas de especies vegetales, la especie *Carica candamarcensis*, más conocido como “chilacúan” es un fruto que se ha destacado por sus aplicaciones medicinales. Se usa como alimento para el tratamiento de arterosclerosis, la cáscara y la pulpa se utilizan para eliminar hematomas.¹ Estudios realizados por Mena, 2005,² han revelado que tanto el aceite esencial como el extracto acuoso de *C. candamarcensis* presentan actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Helicobacter pylori*, una bacteria que tiene incidencia en la mayor parte de los casos de gastritis crónica en el ser humano.

Los aceites esenciales han ganado interés debido a sus múltiples propiedades funcionales. Se reporta que este tipo de productos presentan actividades antifúngica,³ antioxidante,^{4,5} antimicrobial,⁶ antirradicalaria.⁷ Debido a sus propiedades biológicas los AE han sido incluidos en la formulación de productos de limpieza bucal, de tocador, alimentos y agroquímicos.⁸ Algunos aceites, en particular, ejercen efectos sobre el sistema nervioso central, digestivo y respiratorio.⁹ Estas propiedades biológicas están directamente relacionadas con su composición química.

Por estas razones, por la necesidad y por el interés en fortalecer el conocimiento de la especie *Carica candamarcensis*, surgió la presente investigación, que tiene como fin establecer la composición química del aceite esencial de esta especie y estudiar su posible actividad antioxidante, eficiencia antirradical e inhibición de la peroxidación lipídica, en busca de evaluar si el AE de *C. candamarcensis* presente mecanismos de captura de radical y presente por lo tanto aplicaciones a nivel biológico.

¹ GUZMÁN, G. Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L). La Uruca San José. 1ª ed. 1998. pág. 33

² MENA, J. y Colaboradores. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. 2005. pág. 13-21

³ SACCHETTI, G. y Colaboradores. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. 2005. pág. 621-632

⁴ RAMOS, A. y Colaboradores. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. 2003. pág. 241-246

⁵ STASHENKO, E. y Colaboradores. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. 2004. pág. 93-103

⁶ PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. 2001. pág. 126-133

⁷ KULISIC, T. y Colaboradores. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. 2004. pág. 633-640

⁸ BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 2000. Pág. 145-147p

⁹ PASCUAL, M. y Colaboradores. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology. 2001. pág. 210

El aislamiento del AE de *C. candamarcensis* se realizó empleando la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas. La identificación de sus componentes mediante cromatografía de gases (índices de retención Kovats) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Con el propósito de valorar su capacidad antioxidante se implementaron los métodos de decoloración del radical , -difeníl- -picrilhidracilo (DPPH.) y del catión-radical ácido 2,2'-azinobis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS), tomando como referentes antioxidantes conocidos como ácido ascórbico, ácido gálico y BHT. Finalmente se valoró el efecto protector induciendo la oxidación con O₂ y Fe⁺² en un sistema lipídico.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Valorar la capacidad antioxidante *in vitro* del aceite esencial y fracciones de la pulpa de *Carica candamarcensis*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Extraer el aceite esencial de *C. candamarcensis* mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas (HDMO).
2. Fraccionar el aceite esencial de la pulpa de *C. candamarcensis* por medio de cromatografía de columna (CC).
3. Identificar los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. candamarcensis* mediante cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas (CG-EM).
4. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial y de las fracciones obtenidas de *C. candamarcensis* mediante las técnicas de DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo), TEAC (actividad antioxidante equivalente en trolox) e inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoleico.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 *Carica candamarcensis*.

Carica candamarcensis (Hooker filius) pertenece a la familia de las Caricaceae y también se clasifica botánicamente como *Carica pubescens* (Lenné & Kochó) o *Vasconcellea cundinamarcensis* (V, M, Badillo). Comúnmente se conoce como chilacuán, chiglacón, chamburu (Ecuador), papaya de monte, papaya de altura (Perú, Bolivia), papayuela (Colombia); en *inglés*: mountain papaya.¹⁰ Esta planta se origina probablemente en los Andes de América Meridional de Colombia o Perú. Se encuentra en Ecuador y Colombia entre los 2.000 y 3.000 msnm.¹¹

Figura 1. Frutos de *Carica candamarcensis* (Hooker filius)



Fuente: Esta Investigación.

Carica candamarcensis (Hooker filius) es una planta arbórea, tiene de 3 a 6 metros de alto, su tronco es cónico y fibroso. Su fruto es de forma oblonga a elíptico, es de color amarillo claro y muy aromático. Las semillas son muy numerosas y se encuentran en la cavidad central del fruto, llegan a medir 1cm de largo, son rugosas y con aristas envueltas por una membrana dulce, translúcida y gelatinosa.¹²

Este frutal crece en climas templados a sub-cálidos. La especie es sensible a las bajas temperaturas del amanecer y al intenso sol del mediodía en el invierno. Estos extremos de temperatura afectan al follaje y a la maduración normal de los frutos. La planta no soporta sequías prolongadas porque presenta una profusa

¹⁰ VEGA, S. La agricultura Andina. Frutales andinos. Universidad Nacional de Cajamarca. 2005. pág. 105

¹¹ GARCÍA, H. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Tercer Mundo Editores. 2^{da} ed. 1992. pág. 270-271

¹² *Ibíd.*, p. 22.

caída de hojas. Su cultivo es tradicional y se practica en huertos de casas rurales como planta de adorno y para consumo de frutos a nivel doméstico. En cada huerto se cultivan de 1 a 3 plantas y éstas reciben el mismo manejo agrícola que las otras especies de la parcela.¹³

Todas las partes de la planta producen fácilmente un látex lechoso cuando se les provoca alguna laceración. Dicha sustancia contiene papaínas que son enzimas proteolíticas (capaces de digerir proteínas). El látex procedente de frutos verdes se utiliza como ablandador de carnes, en la clarificación de cerveza y curtiembre de pieles. También se usa en la elaboración de goma de mascar, cosméticos y se emplea para eliminar verrugas y mezquinos en la piel. El fruto se usa como alimento para el tratamiento de la arteriosclerosis como también para aliviar afecciones digestivas, artritis, asma, diarreas, úlceras, gripe, y reumatismo. La pulpa y la cáscara se utilizan para eliminar hematomas. Debido a esto, en un principio se le conoció internacionalmente como fruta medicinal más que como fruta nutritiva.¹⁴

2.1.1 Composición Química. Dentro de los compuestos volátiles identificados para *C. candamarcensis* se publica que la mayoría de los componentes corresponden a ésteres, (50-70%), seguido de alcoholes e hidrocarburos saturados. En la tabla 1 se relacionan los compuestos mayoritarios identificados en otros estudios. No obstante, se observan diferencias en el contenido y tipo de constituyentes mayoritarios.^{15, 16, 17} La diferencia con relación al porcentajes entre las familias de compuestos se debe a factores como la composición de suelos, edad y la etapa de ciclo vegetativo, variables que cambian notoriamente la composición de los metabolitos secundarios, además de las técnicas de extracción empleadas.

Por otra parte, Gómez & Morán en el 2005,¹⁸ realizaron la identificación y cuantificación del aceite esencial de *C. candamarcensis* mediante CG-EM y CG-FID respectivamente. Se identificaron 25 compuestos de los cuales 72% corresponden a compuestos oxigenados y el 28% a hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados. En la tabla 2 se muestran los compuestos identificados en el fruto.

¹³ Ibid., p. 22.

¹⁴ GUZMÁN, G. Op. cit., p. 19.

¹⁵ IDSTEIN, H. y Colaboradores. Volatile constituents of mountain papaya (*Carica candamarcensis*, syn. *C. pubescens* Lenne et Koch) Fruit. 1985. pág. 665-666

¹⁶ MORALES, A. DUQUE, C. Aroma constituents of the fruit of de mountain papaya (*Carica pubescens*) from Colombia. 1987. pág. 539

¹⁷ GÓMEZ, D. MORÁN, N. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hooker filius. 2005. pág. 61-65

¹⁸ Ibid., p. 23.

Tabla 1. Compuestos mayoritarios de la fracción volátil de *C. candamarcensis*.

<i>Compuestos mayoritarios</i>	<i>País - Región</i>	<i>Método de extracción</i>
acetato de butilo butanoato de butilo butanoato de etilo acetato de etilo 3-metil-butil acetato acetato de hexilo butanoato de butilo acido 3-hidroxi-hexanoico acido 3-hidroxi-octanoico	Chile; Santiago de Chile	Extracción destilación al vacío seguido de extracción con solventes (pentano-diclorometano 2:1) ^a
butanol acetato de etilo butanoato de etilo butanoato de metilo acetato de n-butil	Colombia; Bogotá	Microdestilación-extracción con solventes simultaneas ^b
acetato de metilo decanoato de butilo farnesol heneicosano hexanoato de etilo 2-metil-pentano	Colombia; Pasto-Nariño	Destilación extracción simultanea ^c

Referencias ^a Idstein y Colaboradores, 1985. ^b Morales & Duque, 1987. ^c Gómez & Morán 2005.

2.1.2 Propiedades Biológicas. Las investigaciones que se han realizado de la especie *Carica candamarcensis* han sido especialmente en el campo de la bioquímica, con respecto a la composición del látex que esta especie produce y a sus aplicaciones medicinales. Igualmente se ha realizado estudios en genética sobre el mejoramiento de caricáceas.

En estudios realizados en 1993, se aislaron y caracterizaron las enzimas obtenidas a partir del látex de *C. candamarcensis*, aislando un sustituyente de la quimopapaína usada en el tratamiento de hernias discales. ¹⁹ En 1998 Genelhu, ²⁰ describió el uso de una proteína del látex rica en cisteína aislada de *C. candamarcensis* como un agente protector durante el aislamiento de ADN bacteriano.

¹⁹ WALREAVENS, V. y Colaboradores. Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. 1993. pág. 502

²⁰ GENELHU, M. y Colaboradores. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. 1998. pág. 1130

Tabla 2. Compuestos del AE de *C. candamarcensis* extraídos por HDMO e identificados por CG.

Clasificación		Compuestos	Concentración (mg/Kg material vegetal húmedo)
Oxigenados		hexadecanoato de butilo	295 x 10 ⁻³
		benzoato de butilo	178 x 10 ⁻²
		1-octen-3-ona	342 x 10 ⁻³
		hexanoato de etilo	152 x 10 ⁻³
		caprilato de butilo	345 x 10 ⁻²
		acetato de hexilo	97 x 10 ⁻³
		furancarboxilato de etilo	581 x 10 ⁻³
		octanol	242 x 10 ⁻²
		2-octenoato de etilo	702 x 10 ⁻³
		octanoato de metilo	341 x 10 ⁻²
		ácido octanoico	481 x 10 ⁻²
		2-hidroxibenzoato de etilo	200 x 10 ⁻³
		octanoato de etilo	128 x 10 ⁻⁴
		ácido tetradecanoico	150 x 10 ⁻³
		decanoato de butilo	645 x 10 ⁻³
	hexadecanoato de etilo	308 x 10 ⁻³	
	9,12,15-octadecatrienoato de metilo	108 x 10 ⁻³	
	caprilato de metilo	633 x 10 ⁻³	
Hidrocarburos	Insaturados	5-metil-1-hexeno	128 x 10 ⁻²
		2-metil-1-penteno	671 x 10 ⁻²
	Saturados	heneicosano	180 x 10 ⁻³
	Aromáticos	tolueno	106 x 10 ⁻²
Monoterpenos		linalool	335 x 10 ⁻³
Sesquiterpenos		farnesol	76 x 10 ⁻³
Nitrogenados		2-miristinol glicinamida	198 x 10 ⁻²

Fuente: Gómez, D. Morán, N. 2005.

De 100 a 720 unidades de proteínasa (1 microgramo = 6 unidades) permitió la protección del ADN cuando se incubó con varios tipos de microorganismos. Pereira,²¹ purificó la proteínasa rica en cisteína de látex de *C. candamarcensis*, designándola como CC-23 (peso molecular 23kDa y corresponde a la unión adyacente de residuos de cisteína), comportándose electroforéticamente como un monómero con un pH óptimo de 8.0. La eficacia catalizadora de CC-23 es seis veces más alta que CC-I (designada así, con respecto al incremento del punto isoelectrico) otra proteínasa de la misma planta.

²¹ PEREIRA, M. y Colaboradores. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. 2001. pág. 253

Por otro lado, Silva,²² mediante un aislamiento cromatográfico de un fragmento de proteína de *C. candamarcensis*, demostró que estas proteínas estimulan la proliferación de las células mamífero. En el 2004 se estudiaron las propiedades curativas de *C. candamarcensis*, elaborando un ungüento a base de látex que sana heridas, señalando que el principio activo de la planta está en alguna proteasa, cuya función es de ruptura y tiene como objetivo activar o desactivar, favoreciendo los mecanismos de proliferación celular. Estas proteasas también se probaron en lesiones gástricas demostrando mayor efectividad contra las úlceras que Omeprazol y Ranitidina.²³ Gómez,²⁴ en el 2005, mostró que el látex contiene un fragmento de proteína que estimula la proliferación de células de mamífero, las proteínasas responsables son P1, P2 (proteasas serinas que catalizan la escisión de péptidos) con 23 KDa, que estimulan la proliferación de fibroblasto (P2 con un 60%) y células epiteliales.

En otros estudios Mena,²⁵ trabajando con extractos acuosos y el aceite esencial de pulpa y semilla de *C. candamarcensis* sugiere que el AE de la pulpa fue el más promisorio inhibidor del crecimiento de *Helicobacter pylori*. A su vez en el 2010, se evaluó la citotoxicidad, mutagenicidad -premutagenicidad y genotoxicidad a los extractos acuosos y aceite esencial de *C. candamarcensis*, observando actividad citotóxica en la solución stock, al 10% y al 1% del AE, mientras que a distintas concentraciones (20-100%), fueron inocuas al igual que todas las dosis de la fracción acuosa. El índice de mutación para todas las dosis está por debajo de 1,5 considerando que están ausentes de efecto mutagénico, así mismo, se evidenció que los extractos no parecen tener efectos genotóxicos.²⁶

En el 2008, un estudio realizado en Perú encontró que el extracto acuoso de la papaya de monte (*Carica pubescens*) tiene buenos efectos antioxidantes, respecto a frutos como tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), aguaymato (*Physalis peruviana*) y tuna roja (*Opuntia ficus indica*), además de una mayor cantidad de compuestos fenólicos (167±0,3 mg de equivalente ácido gálico/100 g muestra).²⁷ Los compuestos fenólicos presentan propiedades reductoras que permiten estabilizar los radicales libres presentes en diferentes clase de alimentos o tejidos vivos, a su vez originan especies radicalarias estabilizadas por resonancia y poco reactivas. Sin embargo existe muy poca información sobre la actividad antioxidante del AE de esta especie.

²² SILVA, C. y Colaboradores. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. 2003. pág. 928

²³ SALAS, E. y Colaboradores. Papaya curativa. Universidad Federal de Minas Gerais. 2004.

²⁴ GÓMEZ, M. y Colaboradores. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. 2005. pág. 246

²⁵ MENA, J. y Colaboradores. Op. cit., p. 19.

²⁶ MENA, J. y Colaboradores. Evaluación del potencial citotóxico, mutagénico y genotóxico de extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis* Hook. 2010. pág. 4-S.

²⁷ CARRASCO, R. ENCINA, C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruana. 2008. pág. 118

2.2 ACEITES ESENCIALES.

2.2.1 Definición. Los aceites esenciales (AE) son sustancias líquidas, odoríficas y volátiles, de características lipofílicas solubles en solventes orgánicos, generalmente con una densidad más baja que la del agua. Se obtienen a partir de diferentes partes de la planta (flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutas, raíces, corteza).

Los AE son mezclas de compuestos naturales volátiles muy complejos, pueden presentar en promedio de 20-60 compuestos en diferentes concentraciones. En su composición química se encuentran terpenos, terpenoides, constituyentes aromáticos y alifáticos (aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, éteres), que tienen bajo peso molecular.²⁸ Los AE son considerados como una expresión de la individualidad de la especie, por ello, se les atribuye una gran variedad de funciones específicas,²⁹ algunos AE presentan propiedades antioxidantes,^{30,31} antimicrobianas,³² antifúngicas,³³ antiparasitarias e insecticidas, antisépticas, antivirales, entre otras.³⁴

2.2.2 Composición química. La mayoría de componentes de los AE son terpenos o terpenoides, una familia de compuestos numerosa y estructuralmente muy diversa, caracterizados por ser compuestos derivados de la combinación de dos o más unidades de isopreno (C_5). La estructura típica presenta esqueletos carbonados representado por $(C_5)_n$ y son clasificados como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}).³⁵

Figura 2. Unidad estructural característica de los terpenos.



Fuente: DEWICK, P. 2009.

²⁸ BAKKALI, F. y colaboradores. Biological effects of essential oils. 2008. pág. 448

²⁹ DEWICK, P. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. John Wiley & Sons. 3^a ed. 2009. pág. 255-259

³⁰ RAMOS, A. y Colaboradores. Op. cit., p. 19.

³¹ STASHENKO, E. y Colaboradores. 2004. Op. cit., p. 19.

³² PAULI, A. Op. cit., p. 19.

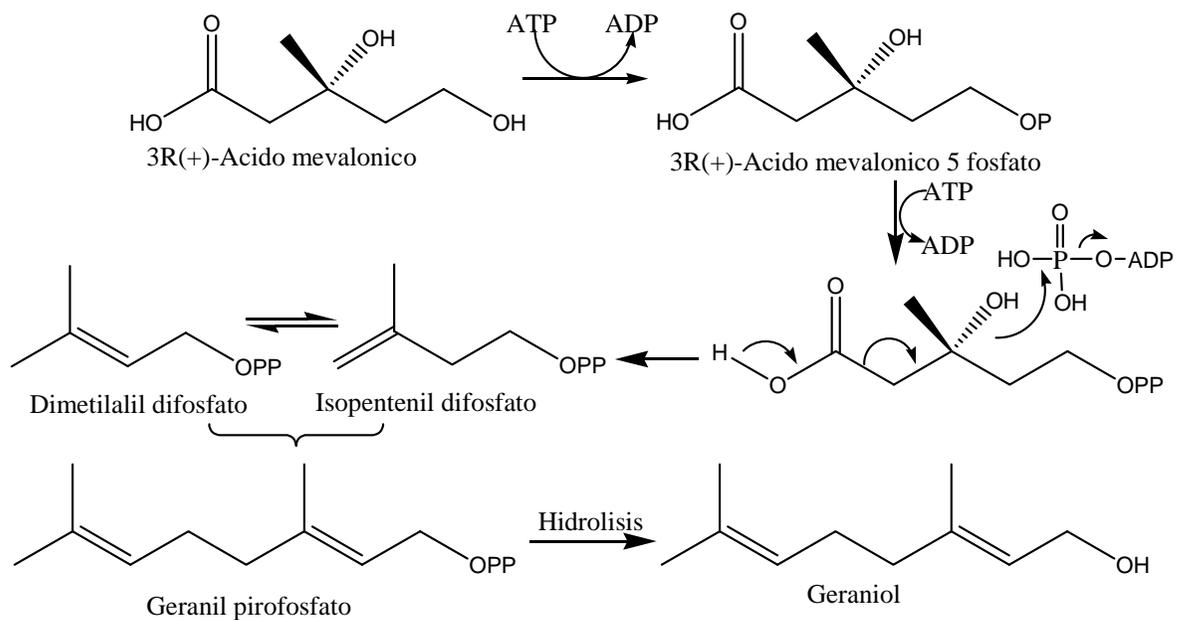
³³ SACCHETTI, G. y Colaboradores. Op. cit., p. 19.

³⁴ BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. 2004. pág. 225

³⁵ SATYAJIT, S. LUTFUN, N. Chemistry for Pharmacy Students. General, Organic and Natural Product Chemistry. John Wiley & Sons. 1^a ed. 2007. pág. 156

Bioquímicamente las unidades de isopreno pueden ser sintetizadas a través de dos rutas metabólicas, la primera es la ruta del ácido mevalónico (AMV), donde tres moléculas de Acetil-CoA reaccionan para originar el AMV, que tras sufrir fosforilación y descarboxilación conduce a la formación de isopentenil difosfato. La segunda ruta catabólica es la ruta del fosfato de metileritrol (PME), la cual conlleva al precursor biosintético de terpenos (Isopentenil difosfato), el acoplamiento de varias de estas unidades genera diversas estructuras de terpenos.³⁶ Por ejemplo, la unión del isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato genera geranil pirofosfato, el cual finalmente es hidrolizado a geraniol, un monoterpeno simple. El geranil pirofosfato es el precursor de todos los monoterpenos.³⁷

Esquema 1. Biosíntesis de terpenos. Ruta del ácido mevalónico.



Fuente: SATYAJIT, S. 2007.

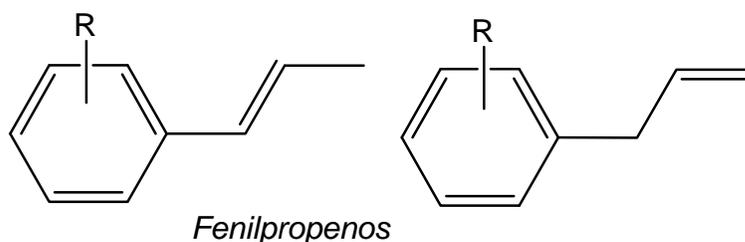
Otra clase de sustancias presentes en los AE son los fenilpropanoides, compuestos aromáticos con una cadena lateral propilo unido al anillo bencénico. La biosíntesis de los fenilpropanoides sigue la ruta del ácido shiquímico y el precursor inmediato del ácido cinámico es la fenilalanina.³⁸

³⁶ DEWICK, P. Op. cit., p. 27

³⁷ SATYAJIT, S. LUTFUN, N. Op. cit., p. 27

³⁸ Ibid., p. 28

Figura 3. Unidad estructural característica de los fenilpropanoides.



Fuente: SATYAJIT, S. 2007

2.2.3 Factores que influyen sobre la composición de los aceites esenciales. El AE extraído puede variar en calidad, cantidad y composición de acuerdo al clima, composición de los suelos, órganos de las plantas, edad y etapa del ciclo vegetativo. Por lo tanto, para obtener un AE de composición constante se hace necesario extraerlo en las mismas condiciones climáticas de cultivo y bajo iguales condiciones de extracción. Además, debido a que existen muchos métodos de extracción de AE y difieren entre ellos, el perfil químico del AE diferirá en el número de moléculas, tipo de estereoquímica, concentración, entre otros dependiendo del método usado.³⁹

2.2.4 Aplicaciones de los aceites esenciales. Dependiendo de la naturaleza del AE y su calidad, se determina en que producto finalmente es incorporado. Así, los AE son empleados en la industria alimenticia, principalmente, como saborizantes o aromatizantes; en la industria cosmética como materia prima base para la elaboración de fragancias y perfumes; en la industria farmacéutica como enmascaradores de olores y en aromaterapia, para el cuidado de la salud y la belleza. En la tabla 3 se relacionan de manera general los usos de los AE en las diferentes áreas de la industria.^{40,41}

Tabla 3. Usos de los AE en diferentes áreas de la industria.

³⁹ BAKKALI, F. y Colaboradores. Op. cit., p. 27

⁴⁰ BIOCOCOMERCIO SOSTENIBLE. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. 2003. pág. 54

⁴¹ BAUER, K. y Colaboradores. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-Vch. 5ª ed. 2006. pág. 145

<i>Industrias</i>	<i>Aplicaciones</i>
Cosmética	Perfumes, colonias Aseo y limpieza Plásticos Textiles
Alimenticia	Saborizantes Preservantes Confitería Bebidas
Tabacalera	Saborizantes Fijadores
Licorera	Aperitivos Saborizantes
Farmacéutica	Veterinaria Antisépticos Analgésicos Aromaterapia
Productos para el hogar	Jabones y detergentes Desodorantes Ambientadores
Textil	Elaboración de enmascaradores de olores Tratamiento con mordientes después de teñido
Petroquímica y minería	Utiliza esencia o terpenos derivados de ellas como vehículos flotantes y lubricantes
Pesticidas	Sprays Repelentes
Pintura	Enmascaradores de olores Disolvente biodegradable
Química Fina	Precursores químicos, ej., citral, safrol, trementina.

Fuente: Biocomercio Sostenible. 2003

2.2.5 Control de calidad de aceites esenciales. Para el control de calidad de un AE es necesario desarrollar estudios detallados de la composición química de estas mezclas, de sus características fisicoquímicas y de sus propiedades organolépticas. Por otra parte, la inocuidad del AE es importante en la implementación nuevos productos.^{42,43}

Tabla 4. Parámetros analíticos empleados para establecer la calidad de los AE

⁴² BIOCOCOMERCIO SOSTENIBLE. Op. cit., p. 29

⁴³ BAUER, K. y Colaboradores. Op. cit., p. 29

<i>Características organolépticas</i>	<i>Determinación físicas</i>	<i>Índices químicos</i>	<i>Características cromatográficas</i>
Olor	Densidad	Índice de acilo	Índices de retención
Color	Solubilidad	Índice de éster	
Textura	Poder Rotatorio	Índice de acidez	Perfil cromatográfico
Apariencia	Índice de refracción	Índice de fenoles	Identificación por CG/EM
	Rango de destilación	Índice de saponificación	
	Punto de inflamación		Cuantificación de los principales componentes
	Punto de congelación		

Fuente: Biocomercio Sostenible. 2003

2.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Desde hace mucho tiempo, el empleo de extractos naturales y aceites esenciales con propiedades terapéuticas ha sido de gran importancia para el control de muchas enfermedades en humanos y plantas.

Los AE han sido considerados como agentes potenciales para la preservación de los alimentos, de hecho, sus efectos contra un amplio rango de microorganismos se han expuesto en diferentes investigaciones.⁴⁴ Además de las marcadas actividades biológicas, numerosas investigaciones han demostrado efectos antioxidantes *in vitro* eficaces de aceites esenciales de diferentes especies vegetales.^{45,46,47} Así, recientemente los aceites esenciales han sido calificados como antioxidantes naturales y se proponen como sustitutos de los antioxidantes sintéticos.⁴⁸

2.3.1 Deterioro Oxidativo

⁴⁴ RUBERTO, G. BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. 2000. pág. 167

⁴⁵ SACCHETTI, G. y Colaboradores. Op. cit., p. 19

⁴⁶ SARIKURKCU, C. y Colaboradores Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. 2009. pág. 2479

⁴⁷ MAU, J. y Colaboradores. Composition and antioxidant activity of the essential oil from Curcuma zedoaria. 2003. pág. 583

⁴⁸ RUBERTO, G. BARATTA, M. Op. cit., p. 31

2.3.1.1 Especies reactivas de oxígeno. En los sistemas biológicos, la reducción incompleta de oxígeno genera muchos tipos de radicales libres, siendo los más relevantes los radicales del oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO).⁴⁹ De forma análoga existen especies reactivas de nitrógeno (ERN), de cloro (ERCl) y de bromo (ERBr).⁵⁰

La generación de las ERO no se ha de relacionar siempre con su toxicidad.⁵¹ Las ERO en condiciones normales existen en concentraciones bajas en células y tejidos. La función es actuar como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas. Sin embargo, en cantidades excesivas producen daño a los componentes celulares mediante una serie de reacciones en cadena,⁵² la mayoría a partir de las cadenas de transporte de electrones, destacan el radical hidroxilo (OH^\bullet), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical alcóxido (RO^\bullet), radical peróxido (ROO^\bullet), ácido hipocloroso (HClO) y ozono (O_3).⁵³

La reactividad de las ERO, puede causar daños en los sistemas biológicos y desencadenar enfermedades degenerativas como: mutagénesis, carcinogénesis, trastornos circulatorios, envejecimiento, enfermedades coronarias, enfermedad de Alzheimer, desórdenes neurodegenerativos, arterioesclerosis, cataratas y enfermedades inflamatorias.^{54,55}

2.3.1.2 Principales fuentes de ERO. Las ERO pueden generarse endógenamente o exógenamente. Las fuentes endógenas se relacionan con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa del sistema inmunitario.⁵⁶

Una de las fuentes endógenas generadoras de ERO es en el interior de la membrana de las mitocondrias donde se da la reducción de $^3\text{O}_2$ hasta H_2O (principalmente la oxidación de Ubiquinol). Durante este proceso ineludiblemente aparecen subproductos como $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^\bullet . Otra fuente, se origina cuando se activan las células fagocíticas que destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo en el que se producen grandes cantidades de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y

⁴⁹ SINGH, S. SINGH, R. *In Vitro Methods of Assay of Antioxidants*. 2008. pág. 394-397

⁵⁰ HALLIWELL, B. *Antioxidant characterization methodology and mechanism*. 1995. pág. 601-602

⁵¹ HALLIWELL, B. *The wanderings of a free radical*. 2009. pág. 531-533

⁵² URBINA, A. *Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio*. 2008. 267p.

⁵³ SINGH, S. SINGH, R. *Op. cit.*, p. 32

⁵⁴ MIGLIORE, L. COPPEDE, F. *Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging*. 2009. pág. 73-75

⁵⁵ SORG, O. *Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality*. 2004. pág. 649-651

⁵⁶ SINGH, S. SINGH, R. *Op. cit.*, p. 32

OH[•], NO[•] y OCl⁻. En los peroxisomas, cuando se activa el proceso de degradación de ácidos grasos se genera como subproducto H₂O₂, el cual provoca daños en moléculas de ADN. En la degradación de xenobióticos, mediante las enzimas del complejo citocromo P450, igualmente se generan subproductos oxidantes.⁵⁷

Las fuentes exógenas se relacionan especialmente con el medio ambiente como: la contaminación del aire, por tabaco o humo, que reaccionan con la superficie de la piel y algunas penetran dentro de la misma alcanzando la circulación; la radiación UV proveniente del sol que es absorbida por cromóforos cutáneos e inducen a la formación de varios oxidantes; la exposición a metales como hierro, cobre, arsénico o fuentes relacionadas con malnutrición o exceso de ciertos nutrientes (hierro) o a una dieta rica en ácidos grasos (saturados o trans-insaturados).^{58,59}

2.3.1.3 Antioxidantes. Gutteridge & Halliwell definen antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato”. El termino sustrato oxidable, incluye todo tipo de molécula encontrada en alimentos y tejidos vivos, incluyendo, lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. La actividad antioxidante de una sustancia depende, entre otros factores, del sustrato atacado por los radicales y del mecanismo de esta interacción.⁶⁰

2.3.1.4 Estrés oxidativo y antioxidantes. El estrés oxidativo puede ser considerado como un desequilibrio entre la producción de radicales libres/pro-oxidantes y la acción de los antioxidantes, que desencadenan cambios fisiológicos y bioquímicos, provocando daños potenciales en el organismo. Puede darse tanto por un exceso de producción de RL y ERO como por un problema de alteración en el sistema de defensa antioxidante.⁶¹ El conjunto de daños producidos por este desequilibrio, se conocen como daño oxidativo y se define como el daño biomolecular causado por el ataque de especie reactivas sobre los constituyentes de los organismo vivos.⁶²

Este daño oxidativo se da en todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas/enzimas, carbohidratos y ADN nuclear en células y tejidos. Esta oxidación indeseable conduce a fenómenos de peroxidación lipídica, modificación de proteínas y carbohidratos, daño de ADN, muerte celular inducida por la

⁵⁷ SORG, O. Op. cit., p 32

⁵⁸ Ibid., p. 33

⁵⁹ MIGLIORE, L. COPPEDÈ, F. Op. cit., p. 32

⁶⁰ HALLIWELL, B. 1995. Op. cit., p. 32

⁶¹ SINGH, S. SINGH, R. Op. cit., p. 32.

⁶² HALLIWELL, B. WHITEMAN, M. Review: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. 2004. pág. 231-233

fragmentación del ADN y lesión en las membranas celulares. Además, el exceso de especies reactivas constituye una señal de estrés capaz de activar vías específicas de señalización celular.^{63,64} En la tabla 5 se encuentran las enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

Tabla 5. Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

<i>Categoría</i>	<i>Enfermedad</i>
Enfermedades vasculares	Isquemia Arterioesclerosis Infarto de miocardio
Enfermedades neurológicas	Alzheimer Esquizofrenia
Enfermedades autoinmunes	Artritis reumatoide
Enfermedades oculares	Cataratas Retinopatías
Enfermedades pulmonares	Enfisema Neumonía Asma bronquial Bronquitis crónica Fibrosis pulmonar Síndrome de distrés respiratorio en el adulto
Otras	Cáncer

Fuente: Casadevall, V. 2009.

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Dentro de las principales técnicas para la obtención de AE se encuentran: hidrodestilación (HD), destilación por arrastre de vapor, destilación con agua y vapor, maceración y expresión. Entre estos métodos la HD ha sido aprovechada para la extracción de AE de plantas medicinales. Sin embargo, para reducir los tiempos y mejorar los rendimientos de extracción, aumentar la calidad de los extractos y también reducir los costos de operación, nuevos enfoques tales como la extracción asistida por microondas, extracción con solventes presurizados, extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por ultrasonido han sido implementados.⁶⁵

⁶³ Ibid., p. 13.

⁶⁴ SINGH, S. SINGH, R 2008. Op. cit., p. 32.

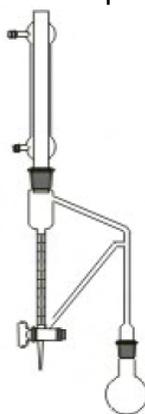
⁶⁵ GOLMAKANI, M. REZAEI, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. 2008. pág. 925

2.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación microondas. Uno de los métodos más empleados para la extracción de aceites esenciales de frutos es la hidrodestilación asistida por radiación microondas (HDMO), técnica patentada por J. Paré en 1993.⁶⁶

El equipo usado es un extractor cerrado, donde se sumerge el disolvente (agua) y el material vegetal (chilacúan fraccionado), dentro de un horno microondas, conectado a un clevenger y un condensador superior como se indica en la figura 4. Se aplica energía por un corto tiempo de operación,⁶⁷ el calor producido por la radiación microondas permite que la muestra alcance rápidamente su punto de ebullición. El AE se evapora, por efecto de la presión de vapor de agua asciende y al condensarse forma dos capas, una rica en AE y la otra en fase acuosa.⁶⁸

Esta técnica ha sido exitosamente empleada. Debido a que permite incrementar el rendimiento de obtención de aceite esencial, la transferencia de calor más eficiente permite alcanzar el punto de ebullición en un tiempo menor y por lo tanto los tiempos de extracción son más cortos. El material vegetal no entra en contacto con la fuente de calor directamente, por lo tanto, el AE se encuentran libre de productos de combustión y de otros contaminantes, además, disminuye la probabilidad de reacciones paralelas que puedan producir artifacts (componentes que no se encontraban originalmente en la planta).^{69,70,71}

Figura 4. Equipo de hidrodestilación asistido por radiación microondas.



Fuente: Saíz, M. Giral, N. 2010.

⁶⁶ PARÉ, J. BÉLANGER, J. Microwave-assisted process (MAPTM)^a: A new tool to the analytical laboratory. 1994. pág. 176-184

⁶⁷ CERPA, M. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. 2007. pág. 156

⁶⁸ KOSAR, M. y Colaboradores. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites. 2005. pág. 492

⁶⁹ Ibid., p. 35.

⁷⁰ STASHENKO, E. y Colaboradores. 2004. Op.cit., p. 19

⁷¹ FERHAT, M. y Colaboradores. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. 2006. pág. 121-126

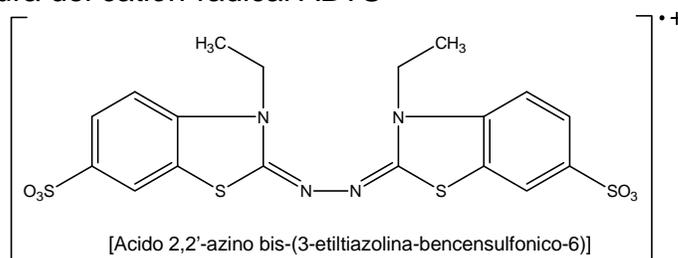
2.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*.

La capacidad antioxidante de las sustancias que se evalúan, depende del tipo de ERO que se forma, cómo, dónde y qué clase de daño se valora.⁷² Un compuesto puede ejercer actividad antioxidante de diferentes formas. Puede secuestrar directamente las ERO, inhibir la generación de las mismas o puede actuar en forma indirecta, es decir, un antioxidante *in vivo* puede actuar elevando las defensas antioxidantes endógenas.⁷³

Algunos experimentos simples pueden realizarse para medir directamente la capacidad antioxidante *in vitro* y comprobar los posibles efectos pro-oxidantes de diferentes compuestos moleculares. Estas metodologías permiten evaluar el potencial antioxidante y de esta forma establecer si los compuestos evaluados presentan algún interés biológico, ya que, un compuesto que es poco eficaz *in vitro*, probablemente no es mejor *in vivo*. Además, se puede valorar la posibilidad de efectos perjudiciales.⁷⁴

2.5.1 Método TEAC. Uno de los métodos para medir el efecto protector de los AE y sustancias de referencias es el descrito por Re, R. 1999.⁷⁵ Este método permite evaluar la capacidad antioxidante, con base en la medida de la reacción con radicales como el ABTS^{•+}. La unidad de medida o comparativa es el factor Trolox o TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).⁷⁶ El catión-radical ABTS^{•+} (2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)) se prepara luego de hacer reaccionar ABTS con persulfato potásico. La ventaja del uso de este radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. (Figura 5).⁷⁷

Figura 5. Estructura del catión-radical ABTS^{•+}



Fuente: Henríquez, C. Aliaga, C. Lissi, E. 2002.

⁷² HALLIWELL, B. 1995. Op. cit., p. 32.

⁷³ HALLIWELL, B. y colaboradores. The Characterization of Antioxidants. 1995. pág. 1341

⁷⁴ Ibid., p. 36

⁷⁵ RE, R. y Colaboradores. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. 1999. pág. 1231-1237

⁷⁶ HENRIQUEZ, C. y Colaboradores. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. 2002. pág. 659-660

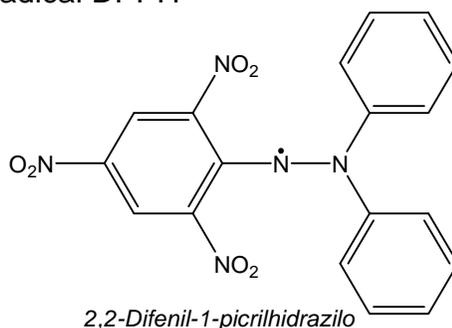
⁷⁷ RE, R. y Colaboradores. Op. cit., p. 36

El compuesto cromóforo ABTS^{•+} es una sustancia color azul/verde con máximos de absorción a 645, 734 y 815nm, es muy soluble en agua y químicamente estable.⁷⁸ Esta longitud de onda próxima a la región infrarroja, reduce la posibilidad de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias.⁷⁹

El ensayo se basa en la disminución de la absorbancia del catión-radical ABTS por acción del antioxidante (AE).⁸⁰ El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrógeno y estabilizar al radical ABTS^{•+}. La decoloración que la solución de ABTS^{•+} experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón (Trolox), bajo las mismas condiciones. El método es aplicable para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles, compuestos puros y extractos de alimentos.⁸¹

2.5.2 Método DPPH. Otro método ampliamente utilizado se conoce como "Método DPPH". El procedimiento desarrollado por Brand-Williams en 1995 utiliza como radical libre el 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) de color violeta. (Figura 6).⁸² La molécula de 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo se caracteriza por ser un radical estable, debido a la deslocalización y recambio de electrones sobre la molécula en su totalidad, de modo que, esta molécula no se dimeriza, como podría ser el caso de otros radicales libres. La deslocalización provoca la aparición de un color violeta intenso caracterizado por la banda de absorción en una solución de metanol cerca a los 520nm.⁸³

Figura 6. Estructura del radical DPPH[•]



Fuente: Molyneux, P. 2004.

⁷⁸ Ibid., p. 36.

⁷⁹ HENRIQUEZ, C. y colaboradores. Op. cit., p. 18.

⁸⁰ SINGH, S. SINGH, R. P. Op. cit., p. 32.

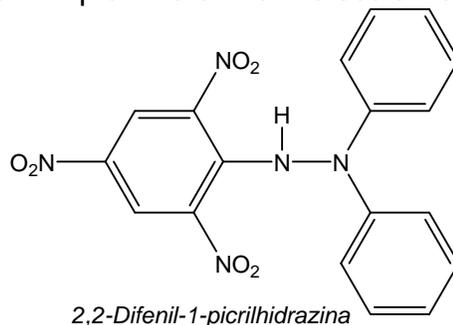
⁸¹ RE, R. y Colaboradores. Op. cit., p. 36.

⁸² WILLIAMS, B. y Colaboradores. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. 1995. pág. 25-30

⁸³ MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004. pág. 213-215

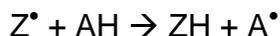
Cuando una solución de DPPH[•] se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (AE), se genera la forma reducida de la molécula, perdiendo su color violeta característico a un color amarillo. El cambio de la absorbancia de la mezcla, se mide en función del tiempo (figura 7).⁸⁴

Figura 7. DPPH₂ 2,2- difenil-1-picrilhidrazina molécula neutra, no radical.



Fuente: Molyneux, P. 2004.

Representando el radical DPPH[•] como Z[•] y la molécula donadora como AH la ecuación de la primera reacción es entonces:⁸⁵



Donde ZH es la forma reducida y A[•] es el radical producido en el primer paso. Posteriormente este radical puede sufrir otras reacciones con control de la estequiometría, esto es, el número de moléculas de DPPH reducidas (decoloradas) por moléculas reductoras. Esta reacción por tanto permite conectar las reacciones que tienen lugar en un sistema oxidante, como la auto-oxidación de un lípido u otra sustancia. La molécula de DPPH[•] (Z[•]) es entonces la representación de la forma del radical libre en el sistema, en la cual su actividad disminuye por la sustancia AH.⁸⁶

Con los datos de absorbancia medidos una vez ocurre la decoloración de la solución y utilizando diferentes concentraciones de antioxidante, se puede calcular la concentración del radical en el medio de reacción y también el porcentaje de DPPH[•] remanente.

El porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{[(\text{Absorbancia})_0 - \text{Absorbancia}_1]}{\text{Absorbancia}_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

⁸⁴ MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004. pág. 213-215

⁸⁵ Ibid., p. 38.

⁸⁶ Ibid., p. 38.

El % [DPPH*]_{Remanente} se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$\%[\text{DPPH}]_{\text{Remanente}} = \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Con estos resultados y las diferentes concentraciones se encuentra el parámetro EC₅₀ el cual indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical a la mitad y el T_{EC50}, es decir el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario. De esta manera se puede determinar la eficiencia anti-radical, que permite clasificar los antioxidantes y compararlos en términos de eficiencia anti-radical (EA). El parámetro se calcula de la siguiente manera:⁸⁷

$$\text{EA} = \frac{1}{\text{EC}_{50} \times \text{T}_{\text{EC}_{50}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Cualitativamente se clasifica en: Bajos (EA < 1x10⁻³), Medios (EA entre 1x10⁻³ y 5x10⁻³), Altos (EA entre 5x10⁻³ y 10x10⁻³) y Muy altos (EA > 10x10⁻³).⁸⁸

2.5.3 Método de la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica se relaciona con la formación de radicales libres reactivos e inestables a nivel de la membrana celular, con reacciones en cadena subsiguientes que dan pie a oxidación y muerte celular. Los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de moléculas endógenas por medio de entrecruzamiento y fragmentación de moléculas. El entrecruzamiento impone restricciones tanto estructurales como funcionales sobre las moléculas enlazadas.⁸⁹ La peroxidación lipídica destruye a los lípidos en las membranas celulares y también genera formas tóxicas endógenas como los radicales lípidos LOO[•] y LO[•] que son especies reactivas con vida media más larga y por lo tanto, tienen capacidad de difundirse hacia moléculas más distantes como es el ADN. Además de la desintegración hidrolítica del ADN por LOO[•] y LO[•], se le atribuye también la fragmentación de proteínas.⁹⁰

Todos los compuestos naturales o sintéticos, que tengan propiedades antioxidantes pueden aliviar total o parcialmente estos daños.⁹¹ De esta manera, la peroxidación lipídica se puede correlacionar con actividad antioxidante o efecto protector. Es importante tener en cuenta, que el valor medido de la actividad antioxidante depende de: el tipo de ensayo utilizado, por ejemplo, el sistema

⁸⁷ SANCHEZ, C. LARRAURI, J. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. 1998. pág. 270-276

⁸⁸ Ibid., p. 39

⁸⁹ CASADEVALL, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente estrés oxidativo en modelos celulares. 2009. pág. 48

⁹⁰ MARTÍNEZ, C. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. 1998. pág.7

⁹¹ BAFNA, AR. MISHRA, S. In vitro antioxidant activity of methanol extract of rhizomes of *Curculigo orchioides* Gaertn. 2005. pág. 125

lipídico, el modo de inducir la oxidación, la propiedad fisicoquímica que se monitorea durante este proceso.⁹²

La peroxidación puede ser inducida por diferentes métodos, a saber: radiólisis, fotólisis y/o por la reacción tipo Fenton, esta última fue la que se implementó en este estudio. La evaluación de la actividad antioxidante (el efecto protector) del AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis*, se llevó a cabo en un sistema lipídico consistente en una emulsión de ácido linoleico, que fue sometida a la peroxidación “forzada”, en la presencia de O₂ y de los iones Fe⁺². La cantidad del ácido linoleico remanente, después del ataque del oxígeno, es un indicativo del grado de oxidación del lípido. El efecto protector se calcula de acuerdo a la siguiente relación:⁹³

$$\text{Grado de proteccion \%} = 100 \times \frac{(A - A_0)}{A} \quad \text{Ecuacion 4}$$

Donde: A₀ es el área de la señal de ácido linoleico en el sistema lipídico sin sustancia de prueba y A es el área de la señal del ácido linoleico en el sistema con sustancia de prueba (antioxidante).

2.6 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

2.6.1 Cromatografía de gases (CG). La cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas más importantes para el estudio de los AE. Es un método físico de separación de mezclas complejas, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una fase estacionaria (sólida o líquida) y una fase móvil (gas N₂, He, H₂).

La CG es un método usado casi exclusivamente para el análisis cualitativo de compuestos volátiles. Los índices de retención son un criterio en la identificación de las señales cromatográficas de un compuesto. Sin embargo, debido a que dependen de muchos factores: temperatura, presión, tipo de columna, etc, se utilizan los índices de retención relativos (IRR), con el fin de eliminar una parte de la operación de variables (P, T). Para una estandarización de los cromatogramas, Van den Dool, sugirió trazar el área de las señales normalizadas relacionadas con el área de la señal principal en función de los IRR. Estos cuadros están indicados por el Comité de Métodos Analíticos (AMC). El uso de estos cuadros, permite que el cromatograma de un aceite esencial en particular sea el mismo a diferentes

⁹² STASHENKO, E. y Colaboradores. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. 2003. pág. 580-582

⁹³ *Ibid.*, p. 40.

condiciones de presión o temperatura, y que solo dependa del tipo de columna. Estos cromatogramas estandarizados representan la huella dactilar del aceite esencial y ellos pueden ser usados para la identificación.⁹⁴

Los IRR o índices de Kovats (I_K) indican el orden de elución de los compuestos respecto a parafinas lineales. Su valor se determina según la condición de temperatura con que se hizo el análisis de la muestra. La ecuación que relaciona los tiempos de retención de los compuestos de AE con los tiempos de retención de las parafinas lineales tiene la siguiente expresión.⁹⁵

$$I_K = 100n + 100N \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{Rn} - t_{Rn-1}} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

I_K : Índice de Kováts.

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés.

N : Diferencia entre el número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés y el número de átomos del n -alcano que eluye después.

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{Rn} y t_{Rn-1} : Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto x , respectivamente.

Sin embargo, para muestras complejas como los AE, la espectrometría de masas es la técnica de detección e identificación más empleada.

2.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La cromatografía de gases usualmente está acoplada a un detector de masas. Esta técnica ofrece información de gran importancia en los procesos de elucidación estructural.⁹⁶ La EM es una herramienta valiosa para la confirmación de la fórmula molecular de un componente detectado. La ventaja que ofrece la EM para el análisis de AE, es que un gran número de isómeros tienen espectros de masas semejantes. Así, compuestos de una amplia familia de terpenos, presentarán similitudes espectrales que permiten identificar su naturaleza estructural.⁹⁷

Para obtener resultados analíticos más confiables, se realiza el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), utilizando

⁹⁴ OPREAN, R. y Colaboradores. Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. 1998. pág. 651-653

⁹⁵ KITSON, F. y Colaboradores. Gas chromatography and mass spectrometry a practical guide. 1996. pág. 125

⁹⁶ Ibid., p. 41

⁹⁷ MARRIOTTA, P. y Colaboradores. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. 2001. pág. 3-5

los espectros de masas (patrones de fragmentación) y los índices de retención relativos (IRR) como criterio de identificación.

2.6.3 Cuantificación de los componentes presentes en el AE. El área bajo una señal cromatográfica es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Al calcular el área de la señal empleando una función matemática de integración, se puede determinar la concentración de un analito en la muestra original. De esta manera, la concentración de cada uno de los compuestos se puede determinar mediante la siguiente relación:⁹⁸

$$C_x = \frac{A_x \times V_f}{R_f \times W_x} \quad \text{Ecuación 6}$$

Dónde:

C_x : Concentración (mg/kg de material vegetal húmedo) del analito en la muestra.

A_x : Área del pico cromatográfico del analito, cuentas.

R_f : factor de respuesta del estándar interno, cuentas \times L/mg

V_f : Volumen final del extracto, L

W_x : Peso de la muestra de material vegetal húmedo, kg

El estándar interno no debe causar interferencias en el análisis, ni debe estar presente en la muestra. Además, debe proporcionar una señal similar a la señal del analito pero distinguible de la misma. El volumen de inyección no afecta el método, lo que es importante si se utiliza jeringas de inyección.⁹⁹

⁹⁸ KITSON, F. y Colaboradores. Op. cit., p. 41

⁹⁹ BUGLIO, B. y Colaboradores. Quantitative chromatographic analysis. 2001. pág. 159

3. METODOLOGÍA

3.1 Recolección de material vegetal.

El material vegetal empleado durante la investigación fue recolectado en el municipio de La Florida-Nariño ubicado a 27Km de la ciudad de San Juan de Pasto en el occidente del Departamento, con una altura de 2180m.s.n.m. y una temperatura promedio de 17°C (figura 8).

Se recolectó una muestra representativa de la población vegetal cosechando frutos maduros mediante un modelo de muestreo aleatorio simple en un cultivo casero de 10 árboles, hasta completar un peso aproximado de 50kg en base húmeda. La cosecha se realizó teniendo en cuenta aspectos como el color (amarillo) y tamaño del fruto (8-12cm de largo por 5-6 de ancho). Todas las recolecciones se realizaron manteniendo constante la hora de colecta (10 a.m.) durante días soleados, conservando así las mismas condiciones de recolección. Una vez colectados los frutos se empacaron en bolsas plásticas para su transporte y posterior almacenamiento en refrigeración.

Figura 8. Mapa de ubicación del área de estudio de la especie *Carica candamarcensis*.



Fuente: <http://laflorida-narino.gov.co>. Consultado el 25 de Septiembre 2011.

3.2 Identificación taxonómica.

La identificación taxonómica de la planta de la familia Caricaceae se realizó en la Universidad de Nariño en el Herbario Universidad de Nariño PSO.

Figura 9. Planta de *Carica candamarcensis*.



Fuente: Esta investigación.

3.3 Extracción del aceite esencial

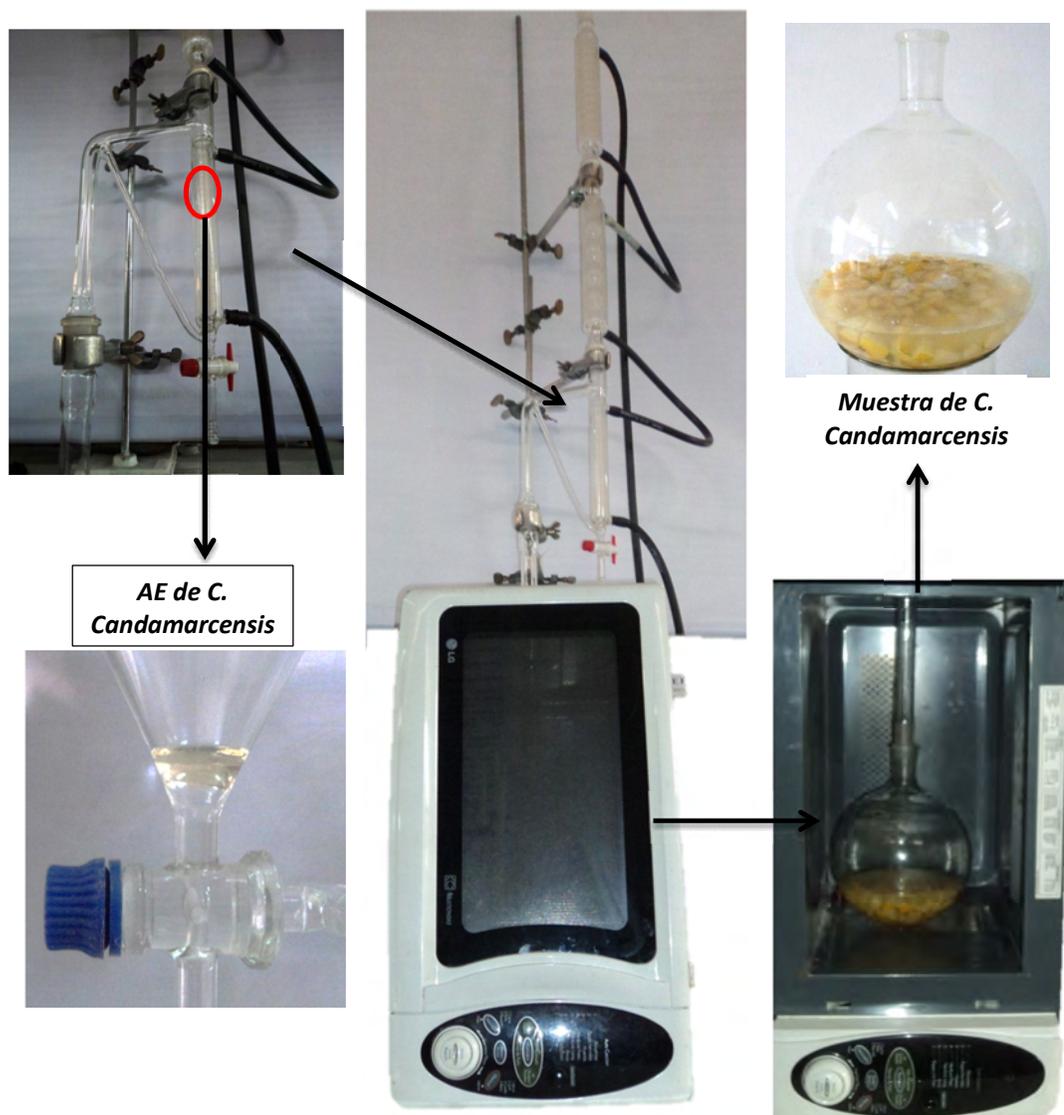
La extracción del aceite esencial (AE) de *C. candamarcensis* se llevó a cabo según las condiciones descritas por Gómez & Morán (2005)¹⁰⁰ con algunas modificaciones.

Para la extracción se empleó material vegetal fresco previamente seleccionado según los criterios anteriormente mencionados. Los frutos fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio 2% (p/V) con el fin de eliminar cualquier agente contaminante. Luego se separó el mucílago de la cáscara y pulpa, y se desechó. Se trabajó con la pulpa y cáscara, la cual se fraccionó manualmente en cuadros uniformes aproximadamente de 2cm para posteriormente realizar la extracción del AE de *C. candamarcensis*.

El AE se aisló aplicando la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas (HDMO). Se emplearon las condiciones de extracción estandarizadas que se utilizaron para la extracción del AE de *C. candamarcensis* cultivada en el municipio Florida-Nariño en el 2005 mediante la técnica HDMO.¹⁰⁰ El material vegetal se sometió a extracción en un equipo de destilación tipo Clevenger con adaptación para calentamiento por radiación de microondas mediante un horno doméstico marca LG, modelo MB-314VG con potencia de salida de 2450W, empleando experimentalmente el 60% de la potencia del horno (1470W). Se usó un balón de 2L de capacidad con 250mL de agua destilada y 500g de material vegetal para la obtención del aceite. El tiempo total de extracción fue de 90min que se dividió en intervalos de 10min. Finalmente, el aceite esencial se lo obtuvo por decantación y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El montaje del equipo de hidrodestilación asistida por microondas se observa en la figura 10.

¹⁰⁰ GÓMEZ, D. MORÁN, N. Op. cit., p. 23

Figura 10. Montaje de hidrodestilación asistida por radiación microondas (HDMO) para obtener el aceite esencial.



Fuente: Esta Investigación.

3.4 Fraccionamiento del aceite esencial

El fraccionamiento se realizó según la metodología de López (2008),¹⁰¹ con algunas modificaciones. El aceite esencial se fraccionó empleando un cartucho C18 (superclean Sepack Waters), acondicionándolo mediante la adición de 1mL

¹⁰¹ LÓPEZ, M. Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismo bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado. 2008. pág. 98

de metanol grado HPLC. Se dejó eluir 500µL del AE colectando la fracción en un vial, posteriormente para eluir la fracción retenida se adicionó una mezcla de metanol-acetato de etilo (7:3) y se recolectó la fracción 1 que se denominó AE_{F1}. El extracto obtenido, se guardó en un vial y se almacenó a 4°C protegido de la luz, para realizar los análisis de cromatografía y actividad antioxidante correspondientes.

3.5 Análisis instrumental

3.5.1 Análisis cromatográfico. El análisis cromatográfico del aceite esencial extraído (AE) y fraccionado (AE_{F1}) de *C. candamarcensis*, se realizó teniendo en cuenta las condiciones cromatográficas empleadas por Gómez & Morán (2005). La identificación preliminar del AE y la fracción se realizó en un equipo de cromatografía de gases Shimadzu 17A con un detector de ionización de llama (FID), bajo los siguientes parámetros:

Tabla 6. Parámetros cromatográficos empleados en la identificación preliminar de los compuestos mayoritarios de AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis*.

<i>Equipo</i>	<i>Shimadzu GC-17A</i>
Inyector	Split/splitless
Relación de Split	1:30
Temperatura del inyector	250°C
Columna	DB-5-MS 30m x 0.25mm, D.I. x 0.25µm
Programación de temperatura en el horno	40 °C (5min) @ 5 °C/min hasta 250 °C (15min)
Tiempo total de corrida	60min
Gas de arrastre	Helio
Flujo de gas de arrastre	1mL/min
Detector	Detector de ionización de llama FID
Temperatura del detector	280°C
Mezcla de combustible	Aire-Hidrógeno
Gas auxiliar	Helio
Flujo de gas auxiliar	80mL/min

Fuente: Esta investigación.

Se calcularon los índices de retención de Kovats para cada una de las señales presentes, teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₇ hasta C₃₂, analizados por CG/FID bajo las mismas condiciones experimentales usadas para el AE y AE_{F1}. Para su determinación se empleó la *Ecuación 5*. La comparación de los índices de retención con los reportados en la literatura provee una identificación preliminar de los metabolitos presentes en el aceite esencial y fracciones.

Figura 11. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A.



Fuente: Esta investigación.

3.5.2 Identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, *Agilent Technologies* 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*). La columna empleada en los análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60m x 0.25mm x 0.25µm]. La inyección se realizó en modo Split (30:1) con un volumen de inyección de 2µL.

La identificación de los componentes presentes en el AE y AE_{F1} se realizó con base en la comparación de sus espectros de masas, con los de la espectroteca de Adams, Wiley 138 y NIST05. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

3.5.3 Cuantificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial. La cuantificación de los componentes mayoritarios de interés presentes en el AE de *C. candamarcensis*, se realizó por cromatografía de gases (GC), en el equipo *Shimadzu GC-17A* con detector de ionización en llama (FID). En las tabla 6 se describen las condiciones cromatográficas que se usaron para este análisis. Se empleó el método del estándar interno, utilizando *n*-tetradecano, *Istd*, según la ecuación 6.

3.6 Valoración de la actividad antioxidante.

3.6.1 Determinación de la capacidad antioxidante: Método TEAC. El análisis espectrofotométrico de la captura del catión-radical ABTS^{•+} se determinó de acuerdo al método descrito por Re (1999).¹⁰²

Para la generación del catión-radical; se hizo reaccionar en medio acuoso (50mL); ABTS (0.0990g) y persulfato potásico (K₂S₂O₈ 0,0390g). La solución final se dejó en reposo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} (solución stock) una alícuota de la solución se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,700 ± 0,002 a una longitud de onda de 734nm (solución W).

Para la reacción se tomaron 3mL de la solución W y se adicionaron 30 µL de la muestra de interés (AE y AE_{F1}). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro PHARO 300, después de transcurrir 6 minutos la reacción.

Se realizó una curva de calibración con soluciones de Trolox a concentraciones de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2mM. Los resultados obtenidos se expresaron en: Capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), que se define como el número de milimoles de Trolox que tienen el mismo porcentaje de inhibición que un gramo de muestra y cuyos valores se presentaron en mmol de Trolox / mmol de sustancia. La funcionalidad del método se verificó con patrones de ácido ascórbico, ácido gálico y BHT. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.6.2 Determinación de la eficiencia antiradical: Método DPPH. La eficiencia antiradical se evaluó mediante el método desarrollado por Sánchez, (1998),¹⁰³ el cual se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH[•], por antioxidantes frente al tiempo, lo que implica un estudio cinético del mismo, mientras que el método TEAC mide de manera general la capacidad antioxidante.

Se preparó una solución stock de DPPH[•] a una concentración de 0,811mM y se dejó en reposo durante 24 horas en frío. Se realizó una curva de calibración de DPPH[•] con concentraciones de 0,090; 0,080; 0,065; 0,050; 0,035; 0,020 y 0,010mM, a una longitud de onda 515nm empleando un espectrofotómetro PHARO 300.

Para la reacción se tomó 3.9mL de solución de DPPH[•] 0,0634 mM preparado el mismo día de análisis y 0,1mL del AE y AE_{F1} respectivamente en concentraciones

¹⁰² RE, R. y colaboradores. Op. Cit., p. 36.

¹⁰³ SANCHEZ, C. LARRAURI, J. Op. cit., p. 39.

de 100 a 10% (v/v). La determinación se realizó cada 5s hasta alcanzar el estado estacionario. La funcionalidad del método se verificó con patrones de ácido ascórbico, ácido gálico y BHT. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Con los resultados obtenidos se realizaron las siguientes gráficas:

1. Absorbancia vs. [DPPH*]
2. [DPPH*] vs tiempo
3. % [DPPH*]_{Remanente} vs tiempo del estado estacionario
4. % [DPPH*]_{Remanente} vs [Antioxidante] a tiempo t.
5. % de Inhibición vs tiempo

El porcentaje de inhibición se calculó mediante ecuación 1 y el % [DPPH*]_{Remanente} según la ecuación 2. Por medio de la construcción de los gráficas 3 y 4 se calculó el EC₅₀ (concentración de antioxidante necesaria para disminuir la [DPPH*]_{Remanente} al 50%) y el T_{EC50} (tiempo necesario para alcanzar el estado EC₅₀). Estos parámetros se emplean para obtener la eficiencia anti-radical (EA), de acuerdo a expresión de la ecuación 3.

3.6.3 Determinación de la peroxidación del ácido linoleico. La peroxidación del ácido linoleico se estimó de acuerdo al método desarrollado por Stashenko (2003).¹⁰⁴

La emulsión fue preparada mezclando ácido linoleico (2,5g/L) con una solución de buffer tris (0,25mM, pH 7,4). La solución buffer se preparó diluyendo 0,756g de tris(hidroximetil)aminometano, 0,014g de KCl y 0,501g de dodecilsulfato de sodio, aforando con agua grado HPLC hasta 250mL, ajustando el pH a 7,4. La iniciación de la peroxidación se realizó tomando 4,85mL de la solución acuosa de ácido linoleico, adicionando 0,05mL de una solución de sulfato de hierro (20,01mM).

La vitamina E (-tocoferol) (100µL) se añadió a la emulsión del ácido linoleico, en concentraciones de 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 y 20,0g/L, mientras que para el AE y AE_{F1} se usó una única concentración; 100% (p/p). La solución resultante se incubó a 37° C durante 12 horas. Al final de la incubación, la mezcla se enfrió y a la emulsión simultáneamente se agregaron 100 µL de una solución metanólica de BHT, para interrumpir la reacción de oxidación en cadena, porque una vez iniciada, ésta continúa.

El progreso de la peroxidación se determinó cuantificando el ácido linoleico, en forma de su metil éster (agente derivatizante, HCl/MeOH), antes y después de la oxidación inducida. La cuantificación del ácido linoleico se realizó en ausencia (blanco) y en la presencia de antioxidante (AE, AEF1 y vitamina E). El efecto protector se calculó según la ecuación 4.

¹⁰⁴ STASHENKO, E. y Colaboradores. Op. cit., p. 40

Para la determinación del grado de oxidación del ácido linoleico se empleó un equipo de cromatografía de gases Shimadzu 17A con un detector de ionización de llama (FID), bajo los siguientes parámetros:

Tabla 7. Parámetros cromatográficos que se emplearon en la determinación del avance de oxidación del ácido linoleico.

<i>Equipo</i>	<i>Shimadzu GC-17A</i>
Inyector	Split/splitless
Relación de Split	1:10
Temperatura del inyector	250°C
Columna	DB-WAX 30m x 0.25mm, D.I. x 0.25µm
Programación de temperatura en el horno	40°C a 130°C 15°C/min @ 240 °C (15min)
Tiempo total de corrida	25min
Gas de arrastre	Helio
Flujo de gas de arrastre	1mL/min
Detector	Detector de ionización de llama FID
Temperatura del detector	280°C
Mezcla de combustible	Aire-Hidrógeno
Gas auxiliar	Helio
Flujo de gas auxiliar	80mL/min

Fuente: Esta investigación.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

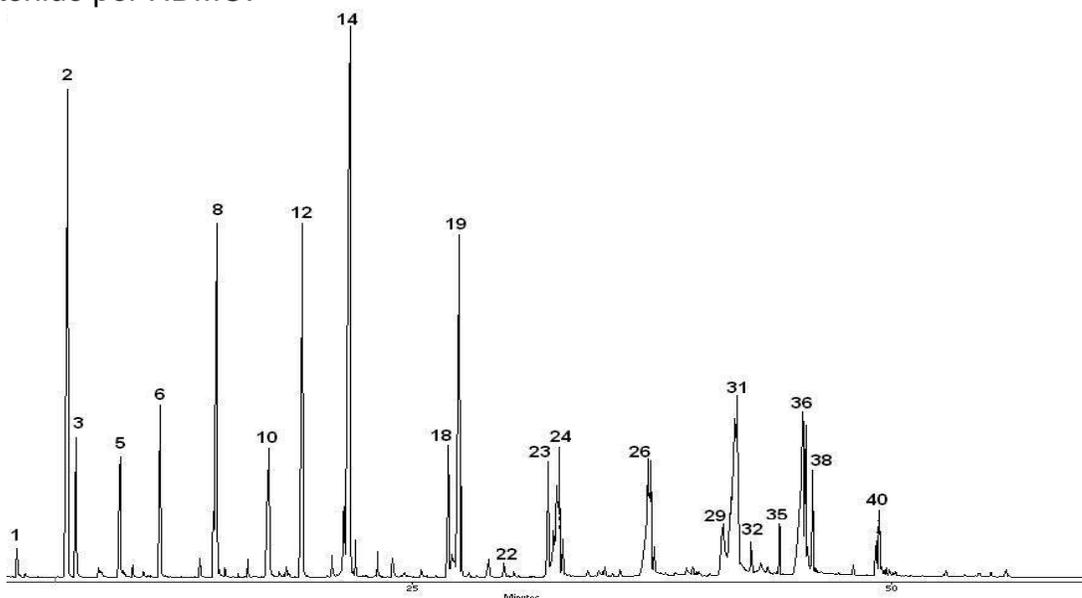
La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Universidad de Nariño (PSO) (Pasto-Nariño). Los pliegos testigos de la especie vegetal identificada, fueron almacenados en el herbario así: *Vasconcellea cundinamarcensis* (D.C) Badillo. Sinónimo de *Carica candamarcensis* Familia: caricáceas.

El aceite esencial obtenido presentó un olor agradable y dulce, su apariencia fue similar a la de una cera, sin embargo, su disolución en hexano, presentó una coloración amarilla intensa. El rendimiento del aceite esencial fue de 0.02%,(p/p) porcentaje bastante bajo considerando que el rendimiento de los aceites esenciales en general está por encima del 0.1% p/p.

4.1 Análisis de repetibilidad de los perfiles cromatográficos de AE de *C. candamarcensis*.

En la figura 12 se presenta el perfil cromatográfico del aceite esencial puro, tomado bajo las condiciones experimentales mencionadas anteriormente. Para evaluar la precisión del método cromatográfico empleado en el análisis preliminar de AE de *C. candamarcensis*, se evaluó la repetibilidad de las áreas cromatográficas, tiempos de retención e índices de retención de Kovats, inyectando por triplicado en el cromatógrafo de gases una misma muestra de AE.

Figura 12. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE de *C. candamarcensis* obtenido por HDMO.



Fuente: Esta investigación.

Tabla 8. Análisis de repetibilidad de los tiempos de retención de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*.

Compuesto ^a	Tiempo de retención (min)				S	%CV
	1	2	3	Promedio		
2	7,091	7,091	7,093	7,092	0,001	0,016
3	7,525	7,508	7,513	7,515	0,009	0,116
5	9,833	9,833	9,835	9,834	0,001	0,012
6	11,908	11,899	11,904	11,904	0,005	0,038
8	14,874	14,866	14,880	14,873	0,007	0,047
12	19,340	19,332	19,337	19,336	0,004	0,021
14	21,807	21,799	21,789	21,798	0,009	0,041
18	26,948	26,940	26,952	26,947	0,006	0,023
19	27,498	27,490	27,498	27,495	0,005	0,017
23	32,165	32,156	32,161	32,161	0,005	0,014
24	32,615	32,606	32,610	32,610	0,005	0,014
25	32,748	32,731	32,735	32,738	0,009	0,027
26	37,348	37,331	37,339	37,339	0,009	0,023
31	41,897	41,881	41,878	41,885	0,010	0,024
36	45,439	45,405	45,425	45,423	0,017	0,038
38	45,597	45,572	45,587	45,585	0,013	0,028
39	45,939	45,922	45,936	45,932	0,009	0,020

Fuente: Esta investigación.

^a señal cromatográfica en la figura 12.

En la tabla 8, se presentan los %CV para los tiempos de retención de algunos de los componentes mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*. Éstos fueron obtenidos sobre una misma muestra en tres días diferentes. Se observa que el valor de estos porcentajes no excede el 2%, valor establecido por las normas BPL (Buenas prácticas de laboratorio). ¹⁰⁵ Así, éste parámetro estadístico demuestra una alta repetibilidad en el análisis cromatográfico.

Dado que la identificación preliminar de los componentes mayoritarios del AE se estableció comparando los índices de retención de Kovats obtenidos experimentalmente y los reportados en la literatura, se realizó análogamente el análisis de repetibilidad de los valores estimados, con el fin de evitar errores en la caracterización de la muestra. En la tabla 9 se indican los índices de retención, que se calcularon teniendo en cuenta una serie homóloga de patrones de

¹⁰⁵ GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. 2009. pág. 96

hidrocarburos desde C₇ hasta C₃₂, según la ecuación 1 (Ver anexo A). Se observa que la desviación estándar y los %CV no exceden el límite establecido por las normas BPL,¹⁰⁶ demostrando una buena repetibilidad y por tanto confiabilidad en los resultados.

Tabla 9. Análisis de repetibilidad de los índices de retención de Kovats de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*.

Compuesto ^a	Índice de retención I _k				S	%CV
	1	2	3	Promedio		
2	803,73	803,73	803,78	803,75	0,029	0,004
3	814,54	814,12	814,24	814,30	0,217	0,027
5	871,99	871,99	872,04	872,01	0,029	0,003
6	923,36	923,14	923,27	923,26	0,111	0,012
8	996,31	996,11	996,46	996,29	0,173	0,017
12	1118,48	1118,25	1118,39	1118,37	0,118	0,011
14	1190,51	1190,28	1189,99	1190,26	0,263	0,022
18	1360,53	1360,27	1360,67	1360,49	0,204	0,015
19	1378,87	1378,60	1378,87	1378,78	0,154	0,011
23	1551,96	1551,62	1551,81	1551,80	0,170	0,011
24	1568,91	1568,58	1568,73	1568,74	0,170	0,011
25	1573,93	1573,29	1573,44	1573,55	0,335	0,021
26	1766,90	1766,18	1766,52	1766,53	0,363	0,021
31	1977,64	1976,89	1976,75	1977,09	0,481	0,024
36	2150,23	2148,57	2149,55	2149,45	0,837	0,039
38	2157,97	2156,75	2157,48	2157,40	0,616	0,029
39	2174,72	2173,89	2174,58	2174,40	0,444	0,020

Fuente: Esta investigación

^a señal cromatográfica en la figura 12.

En la tabla 10 se observa los compuestos cuyas señales presentan un porcentaje de área mayor a 1%. Según las normas BPL, los porcentajes de coeficiente de variación para áreas de señales cromatográficas no deben superar el 10%. En la tabla 10 se evidencia que los %CV para las áreas no supera este límite, así, se evidencia una buena repetibilidad en los análisis cromatográficos realizados para el AE de *C. candamarcensis*.

¹⁰⁶ Ibid., p. 52

Tabla 10. Análisis de repetibilidad de las áreas cromatográficas de algunos de los compuestos mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*.

Compuesto ^a	Área (cuentas)				S	%CV
	1	2	3	Promedio		
2	455177	455223	455201	455200	23,0	0,01
3	76766	78389	77659	77605	812,9	1,05
5	128159	124384	126489	126344	1891,7	1,50
6	105296	103733	103455	104161	992,4	0,95
8	336203	332784	334698	334562	1713,6	0,51
12	315641	315886	315724	315750	124,6	0,04
14	646261	715627	675982	679290	34801,1	5,12
18	110785	107440	109256	109160	1674,6	1,53
19	419578	415130	418569	417759	2332,0	0,56
23	81322	77075	78569	78989	2154,4	2,73
24	183117	170292	176985	176798	6414,5	3,63
25	98892	105313	101236	101814	3249,2	3,19
26	185820	168649	174521	176330	8727,3	4,95
31	344774	319038	333561	332458	12903,4	3,88
36	313834	277260	300989	297361	18554,9	6,24
38	120101	122210	121301	121204	1057,8	0,87
39	73245	74996	73569	73937	931,6	1,26

Fuente: Esta investigación.

^a señal cromatográfica en la figura 12

4.2 Cuantificación de los componentes mayoritarios de AE de *C. candamarcensis*.

Para la cuantificación de los componentes mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*, se determinó el factor de respuesta, el cual, representa la sensibilidad del detector (FID) respecto a los componentes muestra, en este caso del aceite esencial. Para ello se inyectó en el cromatógrafo de gases, el estándar interno, n-tetradecano a diferentes concentraciones por triplicado, según las condiciones mencionadas en el numeral 3.5.3. Los datos se muestran en la tabla 11.

Para comprobar la repetibilidad del método, se presentan los resultados como coeficientes de variación %CV. Los valores para las áreas de señales cromatográficas no debe superar el 10%. En la tabla 11 se observa que los %CV no superan este límite, evidenciando la buena repetibilidad del método.

Tabla 11. Repetibilidad del área cromatográfica de n-tetradecano a diferentes concentraciones.

Concentración Istd (ppm)	Área (cuentas)			Promedio	S	% CV
	1	2	3			
1	159	147	151	152	6,11	4,01
5	735	788	782	768	29,02	3,78
10	1410	1311	1428	1383	63,00	4,56
50	6473	6327	5912	6237	291,05	4,67
70	9688	9407	10418	9838	521,85	5,30
100	12602	12659	12343	12535	168,42	1,34
200	27981	29937	31139	29686	1593,93	5,37

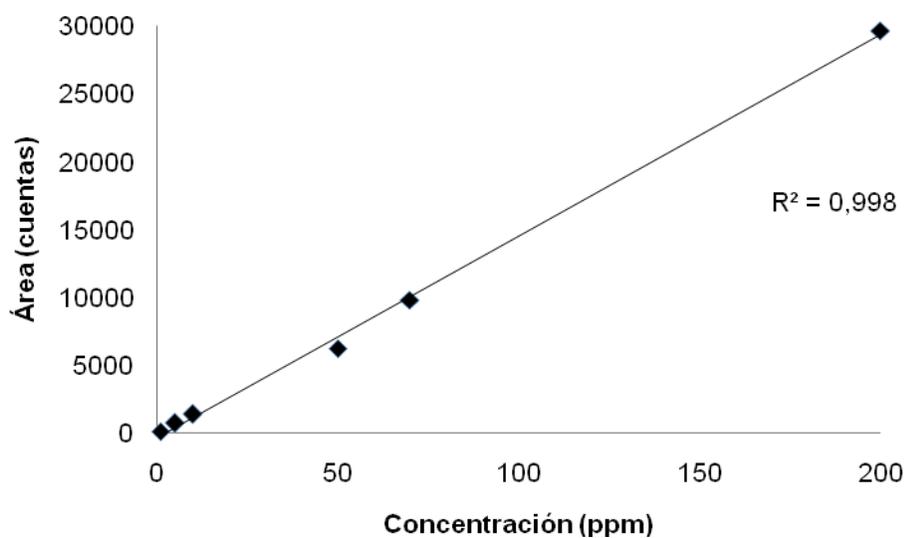
Fuente: Esta investigación.

Graficando el promedio de las áreas contra la concentración del estándar interno se calculó el factor de respuesta que corresponde al valor de la pendiente y presenta la siguiente expresión:

$$y = 148,515x - 306,103$$

El coeficiente de determinación (r^2) con un valor de 0,998 demuestra una relación lineal entre las variables. De esta manera y considerando la ecuación de la recta se determinó que el factor de respuesta necesario para la cuantificación de los componentes mayoritarios de AE de *C. candamarcensis* es 148,515cuentas×L/mg.

Gráfica 1. Curva de calibración de n-tetradecano.



Fuente: Esta investigación

En la tabla 12 se muestra la concentración de los compuestos presentes en el AE de *C. candamarcensis*, se observa que el compuesto 2 es el componente mayoritario (1,06mg/kg), seguido de los compuestos 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 35 y 39. Básicamente la composición del AE está determinada por compuestos de bajo peso molecular, cuyos tiempos de retención no superan los 25 minutos en tiempo de corrida cromatográfica.

Tabla 12. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los compuestos presentes en el AE de *C. candamarcensis*.

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo retención (min)</i>	<i>Área (cuentas)</i>	<i>Concentración (mg/Kg material húmedo)</i>
1	4,433	9985	6,72E-02
2	7,041	156984	1,06
3	7,491	19070	1,28E-01
4	8,733	2471	1,66E-02
5	9,741	22374	1,51E-01
6	10,474	1692	1,14E-02
7	11,016	1400	9,43E-03
8	11,858	21496	1,45E-01
9	13,949	1790	1,21E-02
10	14,766	61084	4,11E-01
11	16,449	1648	1,11E-02
12	17,416	21046	1,42E-01
13	18,399	1206	8,12E-03
14	19,190	41366	2,79E-01
15	21,382	7697	5,18E-02
16	21,599	78063	5,26E-01
17	22,015	2763	1,86E-02
18	23,174	1479	9,96E-03
19	23,998	2112	1,42E-02
20	26,773	12452	8,38E-02
22	27,465	5648	3,80E-02
23	27,640	29656	2,00E-01
24	28,940	1704	1,15E-02
25	31,990	8560	5,76E-02
26	32,181	2572	1,73E-02
27	32,273	4158	2,80E-02
28	32,465	4491	3,02E-02

Continúa.....

Continuación tabla 12.

29	32,573	9619	6,48E-02
30	32,765	2110	1,42E-02
31	36,973	11115	7,48E-02
32	37,181	6657	4,48E-02
33	37,356	6093	4,10E-02
34	37,531	1778	1,20E-02
35	41,397	28684	1,93E-01
36	41,864	4848	3,26E-02
37	42,539	1804	1,21E-02
38	44,022	2883	1,94E-02
39	44,914	16389	1,10E-01
40	45,197	6218	4,19E-02
41	45,330	12662	8,53E-02
42	45,447	2113	1,42E-02
43	45,680	6212	4,18E-02
44	49,122	4554	3,07E-02

Fuente: Esta investigación.

4.3 Identificación de los compuestos mayoritarios de AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis*.

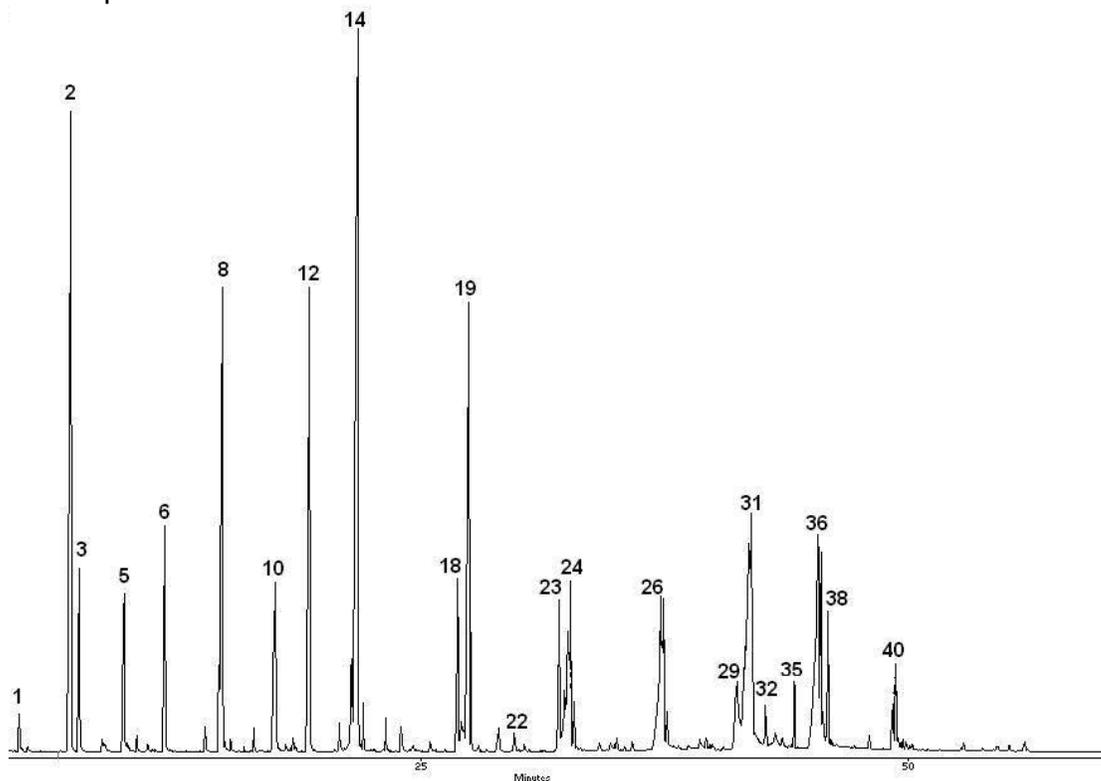
4.3.1 Análisis preliminar de los compuestos mayoritarios de AE de *C. candamarcensis*. En la figura 13, se observa el perfil cromatográfico del AE de *C. candamarcensis*, obtenido por el método de HDMO. La identificación se realizó comparando los índices de retención de Kovats, calculados para una columna DB5 y los índices de Kovats reportados en las bases de datos de Adams 2004¹⁰⁷ y Acree 2004.¹⁰⁸

Un total de 36 compuestos fueron identificados tentativamente representando el 97,3% del aceite esencial. Dichos componentes se muestran en la tabla 13 y sus estructuras moleculares se observan en el anexo B. Estos compuestos se categorizan en hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos

¹⁰⁷ ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 2004. pág. 1-469

¹⁰⁸ ACREE, T. ARN, H. Flavornet and human odor space. 2004.

Figura 13. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE de *C. candamarcensis* obtenido por HDMO.



Fuente: Esta investigación.

La identificación de los compuestos aparece en la tabla 13

Tabla 13. Identificación preliminar de los compuestos mayoritarios mediante índices de retención de Kovats del AE de *C. candamarcensis*.

Pico ^a	t_R	I_K experimental	I_K Teórico	Posibles compuestos
1	4,450	717	729	butanoato de metilo
2	7,091	804	804	butanoato de etilo
3	7,525	814	816	acetato de butilo
4	8,708	844	847	metil butanoato de etilo
5	9,833	872	871	hexanol
6	11,908	923	927	hexanoato de metilo
7	13,949	974	968	iso-hexanoato de etilo
8	14,874	996	995	butanoato de butilo
9	16,457	1039	1040	Hexanoato de isopropilo
10	17,591	1070	1068	octanol

Continúa.....

Continuación tabla 13.

11	18,515	1095	1101	acetato de hexilo
12	19,340	1118	1127	octanoato de metilo
13	20,874	1163	1151	2-octenal
			1162	borneol
14	21,807	1190	1188	hexanoato de butilo
15	22,099	1199	1197	octanoato de etilo
16	23,249	1237	1239	metil butirato de hexilo
			1234	nerol
17	24,057	1264	1262	benzoato de etilo
			1261	linalil acetato
18	26,948	1361	1361	iso-tiocianatometil-benceno
19	27,498	1379	1388	octadenoato de butilo
21	29,056	1435	1436	neril acetona
			1437	butanoato de linalil
22	29,840	1464	1467	decanoato de butilo
			1466	2-dodecenal
23	32,165	1552	1549	butanoato de geranil
24	32,615	1569	1563	nerolidol
25	32,748	1574	1576	12-metil-tridecanal
			1577	lauril alcohol
	34,764	1657	1651	tetradecanoato de metilo
			1656	6-dodecen- -lactona
26	37,438	1769	1768	dodecanoato de butilo
27	37,489	1773	1770	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona
			1773	10-epi- -eudesmol
28	39,372	1859	1852	psoraleno
			1859	-calacoreno
29	41,281	1949	1942	trimetil-fenil-butenona
30	41,897	1978	-	NI
31	42,022	1984	1993	hexadecanoato de etilo
32	42,747	2018	2010	palmitato de isopropilo
			2015	E,E-farnesilacetona
33	43,247	2043	-	NI
34	43,597	2060	2052	octadecanaldehido
35	44,222	2091	2100	n-heneicosano
36	45,439	2150	-	NI
37	45,597	2158	2159	linoleato de etilo
38	45,939	2175	2169	linolenato de etilo
39	49,264	2338	-	NI
40	49,422	2345	-	NI

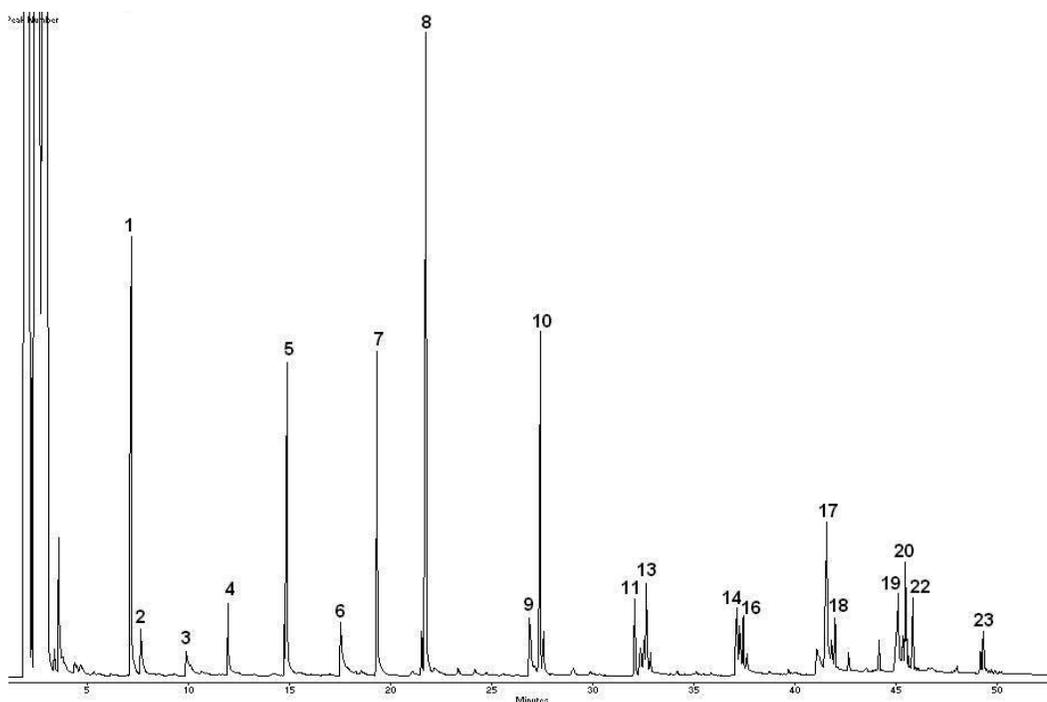
Fuente: Esta investigación.

^a Número de señal en la figura 13. NI Compuesto no identificado

4.3.2 Análisis preliminar de los compuestos mayoritarios de AE_{F1} de *C. candamarcensis*. En la figura 14, se observa el perfil cromatográfico de AE_{F1} de *C. candamarcensis* obtenido por el método de HDMO. La identificación se realizó utilizando los índices de retención de Kovats calculado para una columna DB5. Los índices de Kovats se compararon con la base de datos de Adams 2004¹⁰⁹ y Acree 2004¹¹⁰

Se identificaron tentativamente un total del 19 compuestos, representando el 93,4% de la fracción 1. Dichos compuestos se registran en la tabla 14 y sus estructuras moleculares se indican en el anexo B. Los compuestos identificados se clasificaron en hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos.

Figura 14. Perfil cromatográfico por CG-FID del AE_{F1} de *C. candamarcensis* obtenido por HDMO.



Fuente: Esta investigación.

La identificación de los compuestos aparece en la tabla 14

¹⁰⁹ ADAMS, R. Op. cit., p. 57.

¹¹⁰ ACREE, T. ARN, H. Op. Cit., p. 57.

Tabla 14. Análisis preliminar de los compuestos mayoritarios mediante índices de retención de Kovats de AE_{F1} de *C. candamarcensis*.

<i>Pico</i> ^a	<i>t_R</i>	<i>I_K</i> <i>experimental</i>	<i>I_K</i> Teórico ^b	<i>Posibles compuestos</i>
1	7,225	807	804	butanoato de etilo
2	7,716	819	816	acetato de butilo
3	9,949	875	871	hexanol
4	11,999	926	927	hexanoato de metilo
5	14,924	998	995	butanoato de butilo
6	17,599	1070	1068	octanol
7	19,390	1120	1127	octanoato de metilo
8	21,807	1191	1188	hexanoato de butilo
9	26,932	1360	1362	neril acetato
10	27,448	1377	1396	decanoato de etilo
11	32,140	1551	1549	butanoato de geranil
12	32,398	1561	1563	nerolidol
13	32,715	1573	1576	12-metil-tridecano
			1577	lauril alcohol
14	37,198	1760	-	NI
15	37,331	1766	1768	dodecanoato de butilo
				10-epi- -eudesmol
16	37,506	1774	1773	6,10,14-trimetil-2-
			1770	pentadecanona
17	41,656	1966	1942	trimetil-fenil-butenona
18	42,039	1984	1993	hexadecanoato de etilo
19	45,164	2137	-	NI
20	45,530	2155	2052	octadecanaldehido
22	45,889	2172	2169	ácido laurico
23	49,389	2344	-	NI

Fuente: Esta investigación.

^a Número de pico en la figura 14. NI Compuesto no identificado

En la tabla 14 se observa la separación de los componentes del aceite esencial puro. Estos compuestos se caracterizan por ser compuestos apolares, los cuales son retenidos en el cartucho superclean C18; una columna de carácter apolar. Mientras que los componentes que se eliminan; por ejemplo, butirato de metilo, es un compuesto que no es retenido en el cartucho superclean C18 por presentar mayor polaridad y bajo peso molecular. También se eliminaron compuestos cuya polaridad es apreciablemente mayor a la de la columna cromatográfica (etil-metil butirato). Por otra parte, se logró separar aquellos compuestos que quedaron retenidos en la columna por su apolaridad marcada y que a pesar de la adición de la fase móvil no lograron eluir (iso-tiocianatometil-benceno). Es importante notar que se emplearon diferentes fases móviles, sin embargo, con ninguna de ellas se

logró un buen fraccionamiento. Además, debido al bajo rendimiento del AE no se pudo realizar diferentes ensayos para conseguir un mayor número de fracciones, por ello se empleó como único método de fraccionamiento la cromatografía en columna en un cartucho C18 superclean.

4.3.3 Identificación de los compuestos mayoritarios del AE de *C. candamarcensis* por CG-EM. Los compuestos del AE de *C. candamarcensis* fueron identificados con base en sus espectros de masas, usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST05. En la tabla 15 aparece la identificación y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en el AE de *C. candamarcensis* analizados por CG/EM operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). Se reportaron los compuestos que por comparación presentaban más de un 80% de similitud con la base datos empleadas.

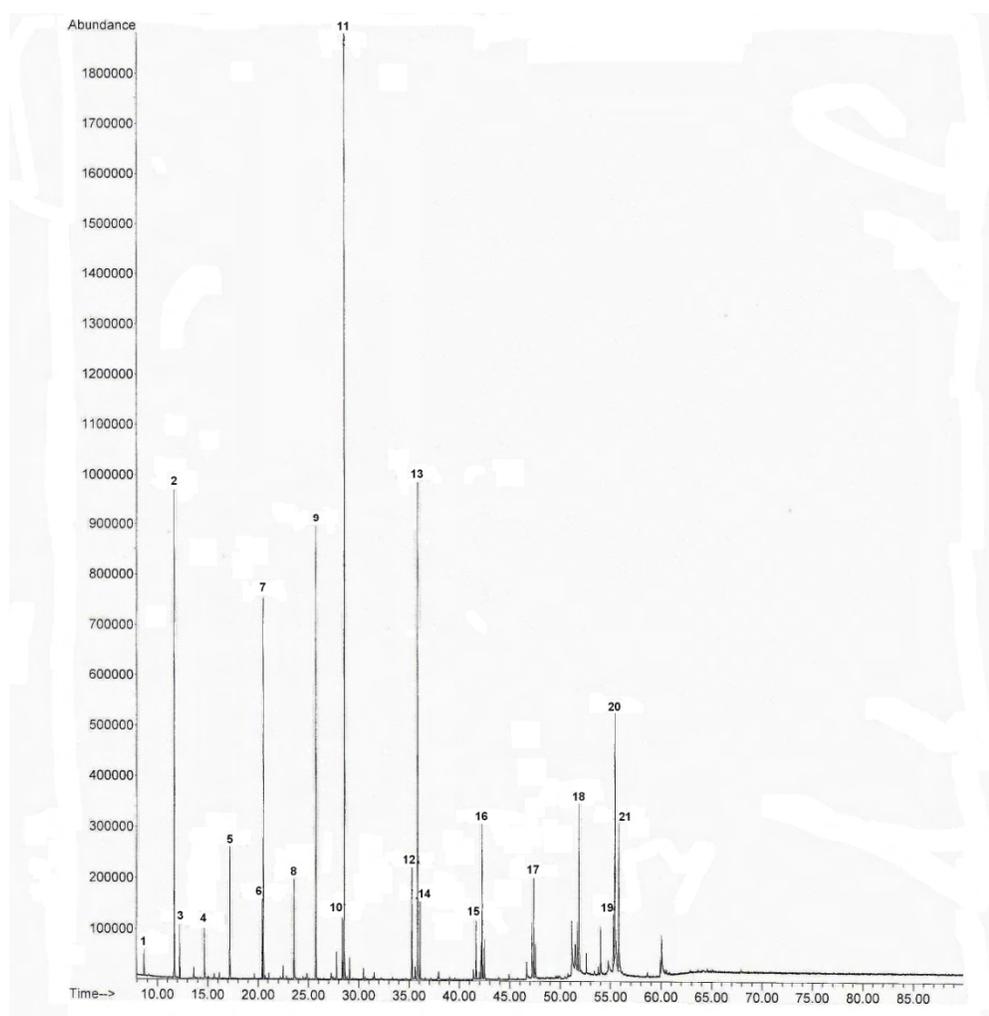
Tabla 15. Identificación, tiempo de retención y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios de AE de *C. candamarcensis* mediante CG/EM.

<i>N</i> ^o <i>pico</i> _{<i>a</i>}	<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de retención</i> (<i>min</i>)	<i>Cantidad relativa,</i> (%)
1	butirato de metilo	8,666	0,7
2	butirato de etilo	11,666	11,7
3	acetato de butilo	12,228	1,3
4	hexanol	14,668	1,1
5	caproato de metilo	17,185	2,8
6	butirato de butilo	20,396	1,7
7	caproato de etilo	20,508	8,0
8	octanol	23,583	2,2
9	caprilato de metilo	25,739	9,5
10	caproato de butilo	28,637	1,5
11	caprilato de etilo	28,562	20,2
12	isotiocianatometil-benceno	35,286	2,7
13	caprilato de butilo	35,839	12,2
14	decanoato de etilo	36,090	1,7
15	nerolidol	41,645	1,3
16	decanoato de butilo	42,261	3,2
17	laurato de butilo	47,382	2,1
18	palmitato de etilo	51,866	3,7
19	octadecadienoato de etilo	55,294	1,2
20	octadecatrienoato de etilo	55,426	6,6
21	hexadecanoato de butilo	55,816	4,5

Fuente: Esta investigación.

^a Numero de pico en la figura 15

Figura 15. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM del AE de *C. candamarcensis* obtenido por HDMO.



Fuente: Esta investigación.

En total, se detectaron 36 compuestos en el AE puro de *C. candamarcensis*, de los cuales se identificaron 21 compuestos en cantidades relativas > 0.7%. Los componentes del AE se distribuyeron en dos grupos de compuestos: monoterpenos oxigenados e hidrocarburos monoterpénicos. Este último corresponde específicamente a ésteres alifáticos (80%). Este tipo de compuestos representan un grupo ampliamente encontrado en los aceites esenciales¹¹¹ contribuyendo al aroma de casi todas las frutas. Generalmente, se forman en estado de maduración de la fruta.¹¹²

¹¹¹ KAR, A. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. New Age International (P) Ltd. 2^a ed. 2007. pág. 256

¹¹² CASTILHO, R. KAPLAN, M. Volatile Components of Oiti Fruit (*Licania tomentosa* Benth). 2010. pág. 238-241.

En la naturaleza muchos de estos ésteres se derivan de alcoholes y ácidos con número par de átomos de carbonos. Aunque el olor de los ésteres alifáticos con cadenas cortas de carbono es estrictamente frutal, pueden ser ceras o grasa cuando el número de átomos de carbono aumenta. En perfumería los ésteres alifáticos más importantes son los acetatos. Acetatos de alcoholes hasta C₆ se emplean principalmente como notas frutales, mientras que acetatos de C₈, C₁₀, y C₁₂ son empleados para fragancias de flores y notas florales en general.¹¹³

Por otra parte, los aceites esenciales que contienen ésteres se emplean a menudo por sus propiedades calmantes, antifúngicas y para ayudar a equilibrar el sistema nervioso.¹¹⁴ Además se suelen emplear como antiespasmódicos y cuando los aceites son ricos en ésteres tienen un efecto sedante pronunciado.¹¹⁵

Entre los componentes más abundantes del AE se destacan butirato de etilo (11.7%), caproato de etilo (8.0%), caprilato de metilo (9.5%), caprilato de etilo (20.2%), caprilato de butilo (12.2%) y octadecatrienoato de etilo (6.6%).

El componente más abundante presente en el AE obtenido, fue caprilato de etilo (20,2%). Este compuesto es un líquido con olor frutal y floral, se encuentra en muchas frutas y bebidas alcohólicas y se emplea como aromatizante frutal. Otro de los componentes más abundantes es butirato de etilo (11.7%). Esta sustancia se encuentra en frutas, bebidas alcohólicas y en otros alimentos como los quesos, presenta un olor frutal, que recuerda a las piñas. Grandes cantidades se emplean en perfumería y en las composiciones del *flavour*. Por su parte el caproato de etilo (8.0%), es una sustancia incolora con un fuerte olor frutal, se encuentra en muchas frutas y se lo emplea en pequeñas cantidades como notas floral-frutal en perfumería y en cantidades más grandes como aromatizante frutal.¹¹⁶

Entre los componentes del AE de *C. candamarcensis*, bajo este estudio, no se encontraron los compuestos: ácido octanoico, benzoato de butilo, farnesol, linalool, 5-metil-1-hexeno, 5-metil-1-penteno, tolueno; los cuales han sido reportados como algunos de los constituyentes mayoritarios del AE de *C. candamarcensis* cultivada en el municipio Florida-Nariño.¹¹⁷ Según Mena, 2005¹¹⁸ la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* posiblemente estaba asociada a alguno de esos compuestos como linalool, farnesol, y heneicosano que han presentado actividad antibacteriana, bactericida y antiinflamatoria y antimicrobiana respectivamente.

¹¹³ SURBURG, H. PANTEN, J. Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. 2006. pág. 246

¹¹⁴ Ibid., p. 64.

¹¹⁵ KAR, A. 2007. Op. cit., p. 63

¹¹⁶ SURBURG, H. PANTEN, J. Op. cit., p. 64

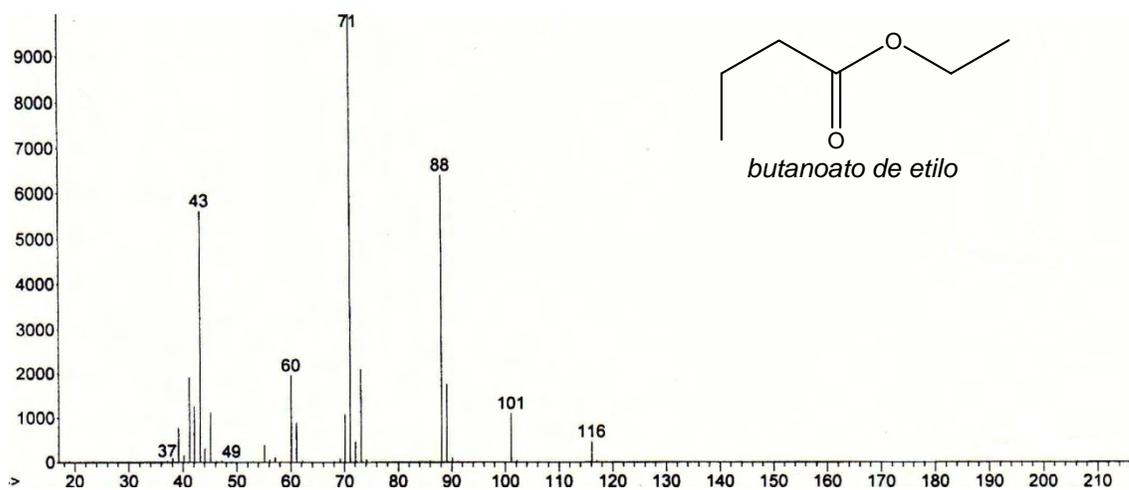
¹¹⁷ GÓMEZ, D. MORÁN, N. Op. cit., p. 23

¹¹⁸ MENA, J. y colaboradores. Op. cit., p. 19

Las rutas de fragmentación y espectros de masas para los compuestos mayoritarios del AE de *C. candamarcensis*, butirato de etilo, caproato de etilo, caprilato de metilo, caprilato de etilo, caprilato de butilo y octadecatrienoato de butilo han sido detectados previamente.^{119,120} A continuación se muestran los espectros de masas y mecanismos de fragmentación propuestos, seleccionados porque sus moléculas presentan diversidad estructural y distintos grupos funcionales. Para más registros de espectros de masas y rutas de fragmentación propuestos, Véase anexo C.

4.3.3.1 Butirato de etilo. En la Figura 16 se observa el espectro de masas del butirato de etilo (ácido butanoico, etil ester o butanoato de etilo). El posible mecanismo de ionización disociativa del butirato de etilo se muestra en el Esquema 2. La ruptura del radical etoxi a partir del ión molecular en m/z 116 conduce a la formación del pico base en m/z 71, que posteriormente, tras la pérdida de una molécula de CO da origen al fragmento en m/z 43. El rearrreglo McLafferty a partir del ión, conduce a la formación del fragmento en m/z 88, a partir de éste, se genera un reordenamiento de H y se elimina una molécula de eteno originando el fragmento en m/z 60. Finalmente, la ruptura simple del radical metilo genera el fragmento en m/z 101.

Figura 16. Espectro de masas del butanoato de etilo (EI, 70 eV).

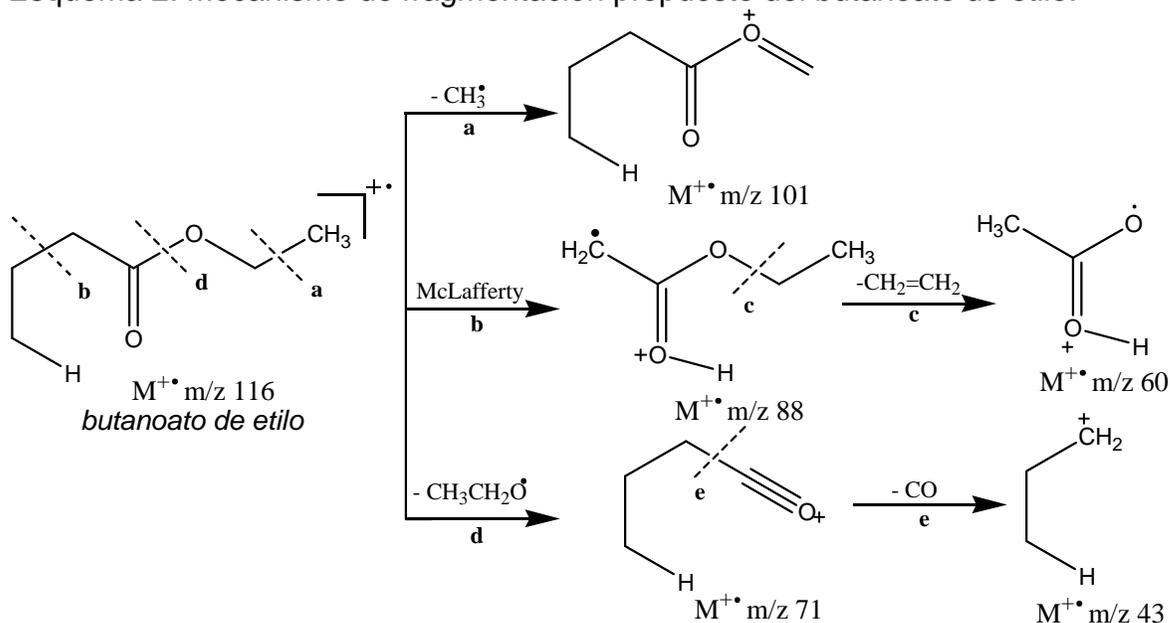


Fuente: Esta investigación.

¹¹⁹ MCLAFERTTY, F. TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. 1993. pág. 150-240.

¹²⁰ SILVERSTEIN, R. WEBSTER, F. Spectrometric identification of organic compounds. 1997. pág. 158-254

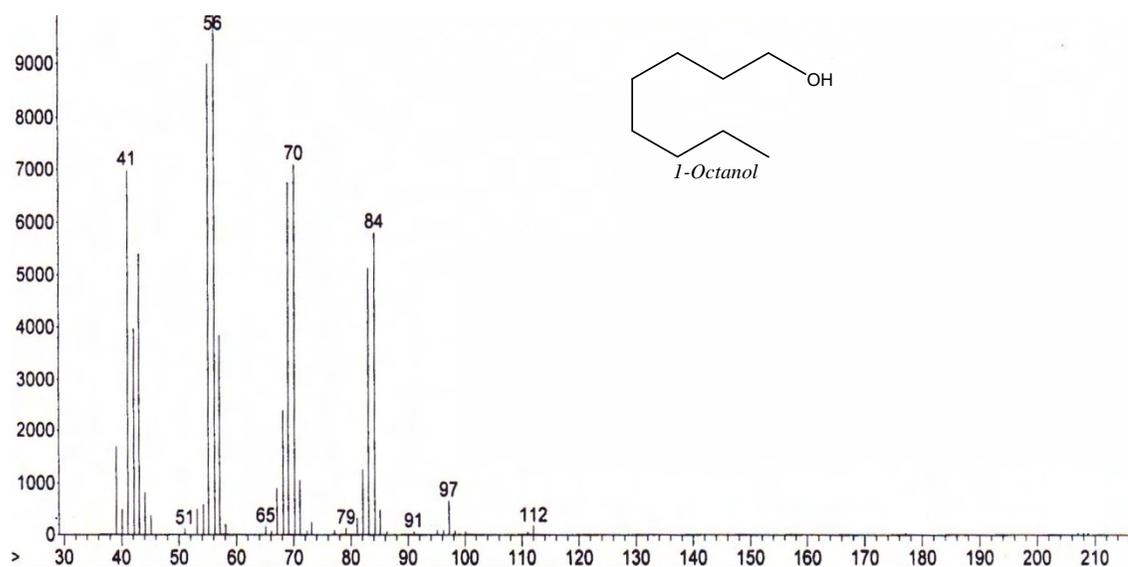
Esquema 2. Mecanismo de fragmentación propuesto del butanoato de etilo.



Fuente: Esta investigación

4.3.3.2 Octanol. En la Figura 17 se observa el espectro de masas del n-octanol. La posible ruta de ionización disociativa del n-octanol, se muestran en el Esquema 3. Este alcohol presenta su ion molecular en $m/z 130$, aunque en el espectro no se observa la señal.

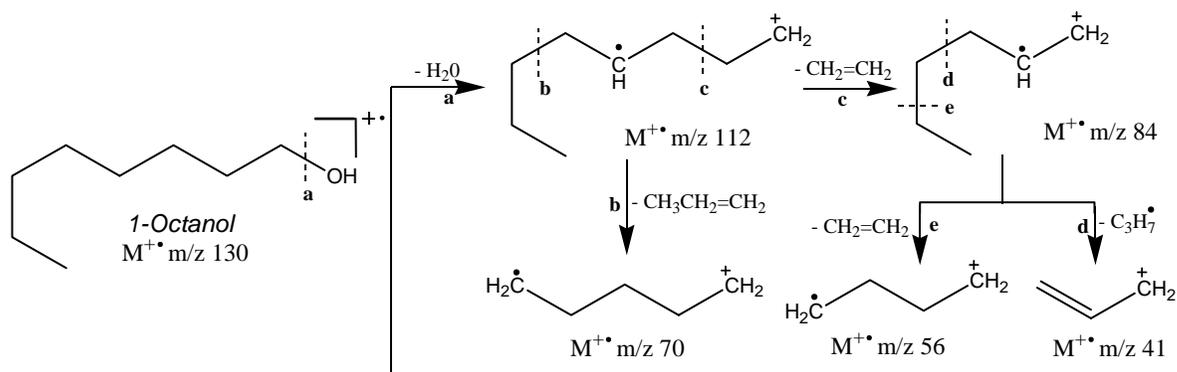
Figura 17. Espectro de masas del n-octanol (EI, 70 eV).



Fuente: Esta investigación

La eliminación de una molécula de agua genera el fragmento en m/z 112, a partir de éste se producen dos rupturas a saber: eliminación de una molécula de propeno generando el fragmento en m/z 70 y eliminación de una molécula de eteno produciendo el catión radical en m/z 84. A partir del último, se generan dos rupturas: la primera se da mediante reordenamiento de H y eliminación de una molécula de eteno, generando el pico base en m/z 56; en la segunda se presenta la eliminación del radical propano con la formación del fragmento en m/z 41.

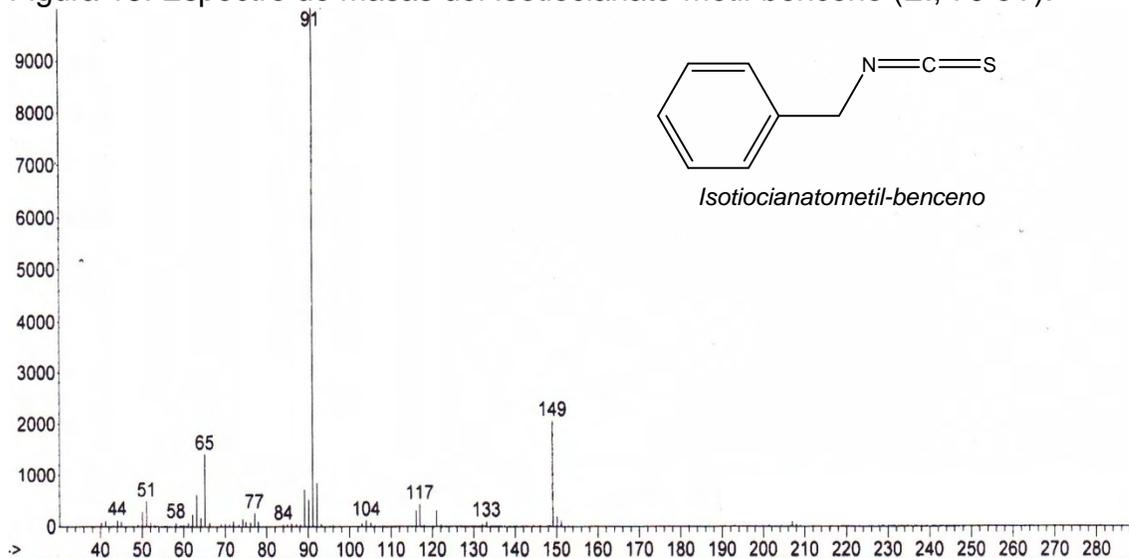
Esquema 3. Mecanismo de fragmentación propuesto del n-octanol.



Fuente: Esta investigación

4.3.3.3 Isotiocianato-metil-benceno. En la Figura 18 se observa el espectro de masas del isotiocianato-metil-benceno. El mecanismo de ionización disociativa propuesto del isotiocianato-metil-benceno se muestra en el Esquema 4.

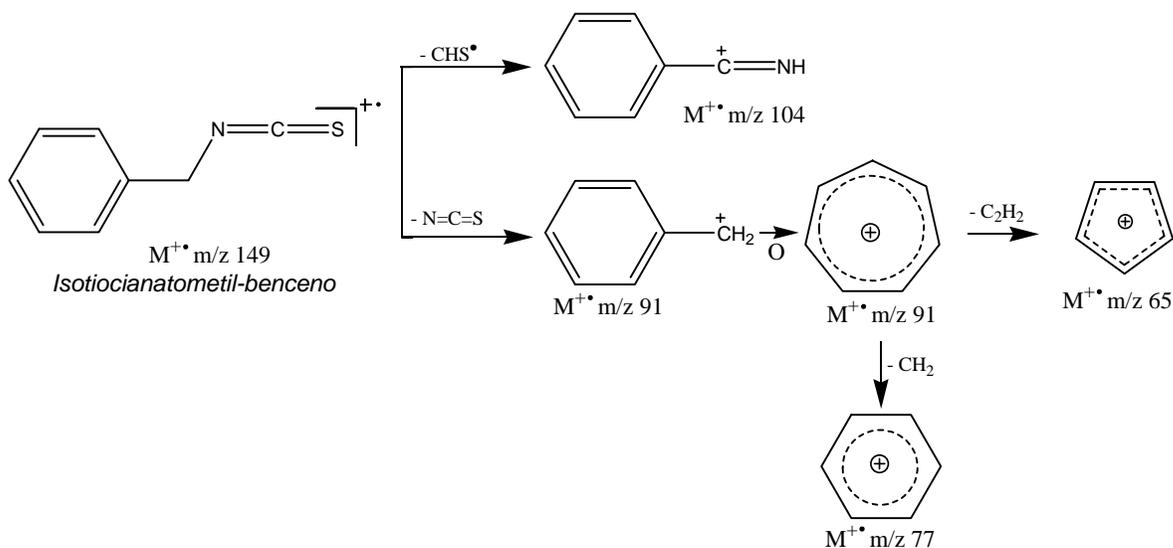
Figura 18. Espectro de masas del Isotiocianato-metil-benceno (EI, 70 eV).



Fuente: Esta investigación.

Este compuesto, presenta su ion molecular en m/z 149. La ruptura de una molécula de isotiocianato conduce a la formación del ión tropilio, pico base en m/z 91. A partir de éste se producen dos rupturas a saber: eliminación de una molécula de etino generando el fragmento en m/z 65 y eliminación del grupo CH_2 produciendo el catión radical en m/z 77. Es importante notar que el índice de coincidencia del espectro experimental con el teórico es del 81%.

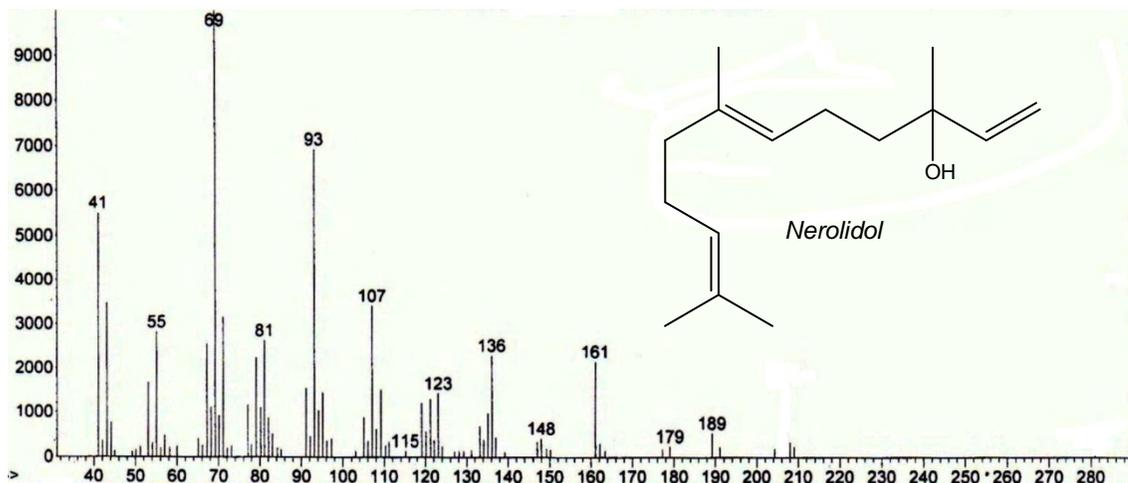
Esquema 4. Mecanismo de fragmentación propuesto del isotiocianatometil-benceno.



Fuente: Esta investigación.

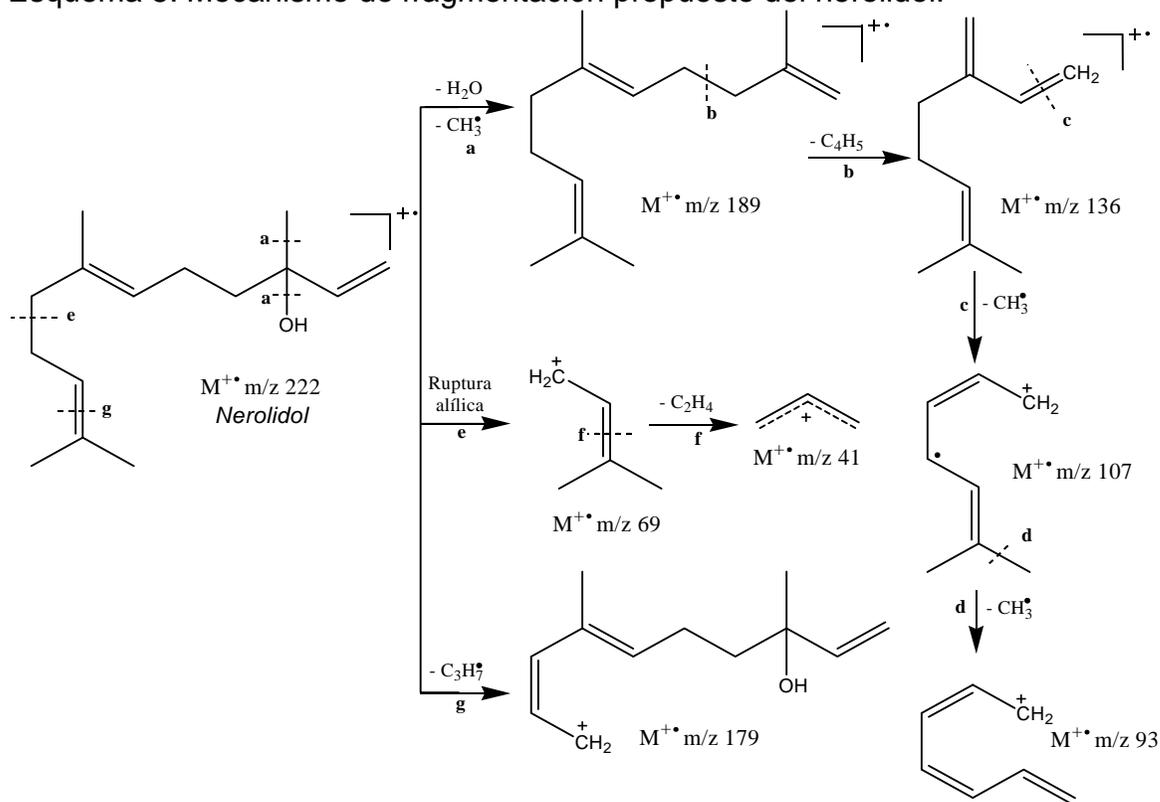
4.3.3.4 Nerolidol. En la Figura 19 se observa el espectro de masas del nerolidol. El posible mecanismo de ionización disociativa del nerolidol, se muestran en el Esquema 5. El espectro del nerolidol muestra el pico de ion molecular con intensidad baja, debido a su poca estabilidad. Rápidamente, sufre una ruptura alílica que genera el pico base en m/z 69. El fragmento formado por esta escisión, sufre pérdida de eteno con formación del catión alilo en m/z 41. La pérdida de una molécula de agua y radical metilo genera la formación del ion de m/z 189, la subsiguiente eliminación del radical metil-propeno y pérdidas consecutivas de radical metilo genera fragmentos con m/z 136, m/z 107 y m/z 93. Finalmente el ion en m/z 179 se genera por la eliminación del radical propilo a partir del ion molecular

Figura 19. Espectro de masas del nerolidol (EI, 70 eV).



Fuente: Esta investigación.

Esquema 5. Mecanismo de fragmentación propuesto del nerolidol.

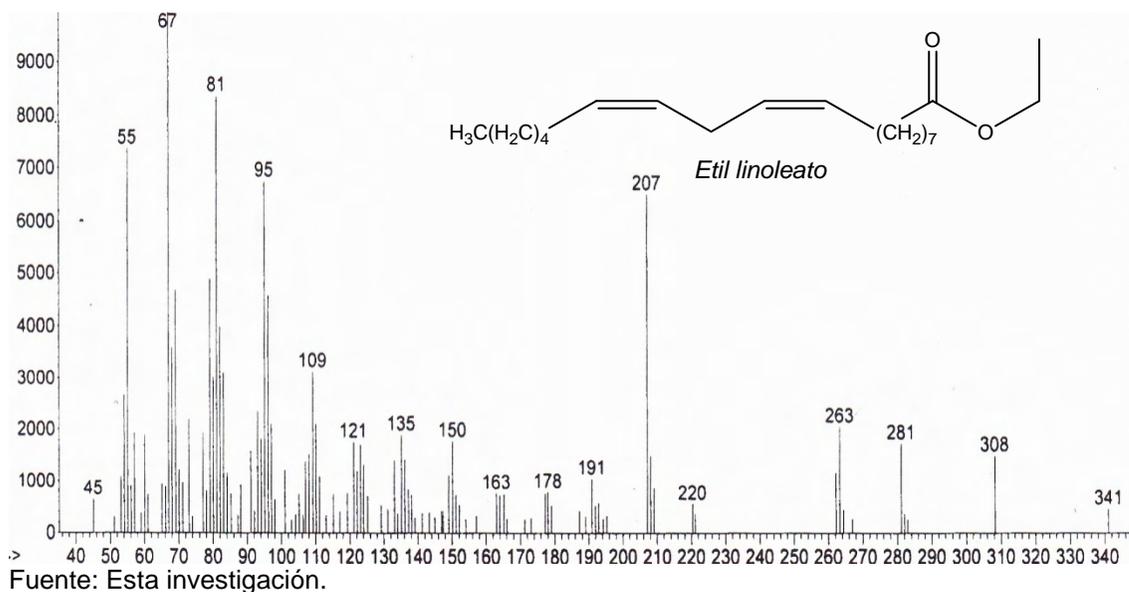


Fuente: Esta investigación.

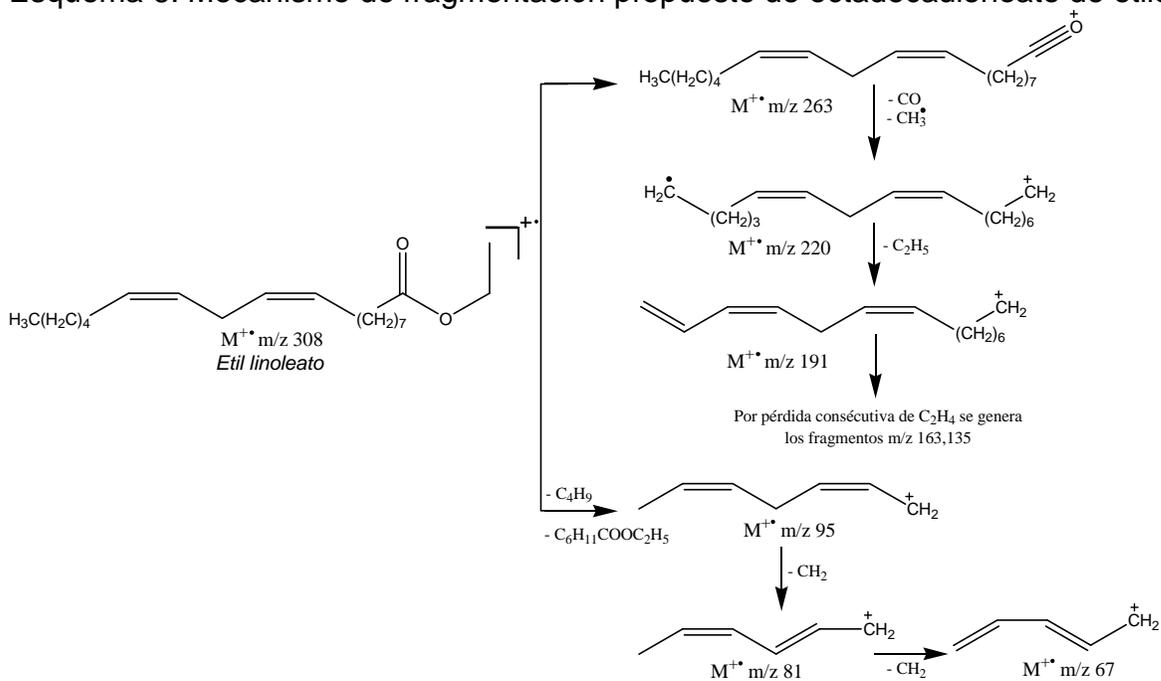
4.3.3.5 Octadecadienoato de etilo. En la Figura 20 se observa el espectro de masas del octadecadienoato de etilo. El posible mecanismo de ionización disociativa del octadecadienoato de etilo, se muestra en el Esquema 6. Esta

molécula presenta su ion molecular en m/z 308. Al eliminar el radical etóxido, se forma el catión en m/z 263, que tras la eliminación de una molécula de CO y radical metilo surge el fragmento en m/z 220.

Figura 20. Espectro de masas del octadecadienoato de etilo (EI, 70 eV).



Esquema 6. Mecanismo de fragmentación propuesto de octadecadienoato de etilo.



El fragmento m/z 200 sufre una eliminación del radical etilo y posteriormente la ruptura de moléculas de etileno, para generar los fragmentos en m/z 191, 161 y 135. La ruptura del radical butilo y la transposición de hidrógeno da origen al ión en m/z 95. A partir de éste y mediante reordenamiento de hidrógeno y eliminación de CH₂ se genera el ion m/z 81 y el pico base en m/z 67.

4.3.4 Identificación de los compuestos mayoritarios de la fracción F1 de AE de *C. candamarcensis* por CG-EM. Los compuestos de la fracción F1 del AE de *C. candamarcensis* fueron identificados con base en sus espectros de masas, usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST05. En la tabla 16 aparece la identificación y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en AE_{F1} de *C. candamarcensis* analizados por CG/EM operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (full scan).

Se detectaron 19 compuestos de AE_{F1} de *C. candamarcensis*, de los cuales se identificaron 10 compuestos en cantidades relativas > 2,1%. Se puede observar que en el fraccionamiento se conservan los compuestos mayoritarios que presenta el AE puro, sin embargo, se descartan compuestos como butirato de metilo, isotiocianatometil-benceno, nerolidol, octadecadienoato de etilo entre otros. En la fracción F1, el caprilato de etilo (28,2%) sigue siendo el compuesto mayoritario, seguido de butirato de etilo (17,0%), caprilato de butilo (15,0%), caprilato de metilo (13,0%) y caproato de etilo (11,7%). En la gráfica 2 se observa la comparación de los compuestos identificados del AE puro y la fracción AE_{F1}.

En la tabla 16 se observan los constituyentes presentes en la fracción. Se evidencia que mediante la cromatografía en columna se logró separar los ésteres de mayor peso molecular, nerolidol e iso-tiocianato-metil-benceno. Compuestos que presentan un carácter apolar pronunciado y por lo tanto quedan retenidos en el cartucho superclean C18. La fracción quedó enriquecida de los compuestos de menor apolaridad y de menor peso molecular que eluyeron tras la adición de la fase móvil (metanol: acetato de etilo). Se observa que el 80% son ésteres de cadena corta de carbonos y 20% son alcoholes igualmente de cadena corta de carbonos.

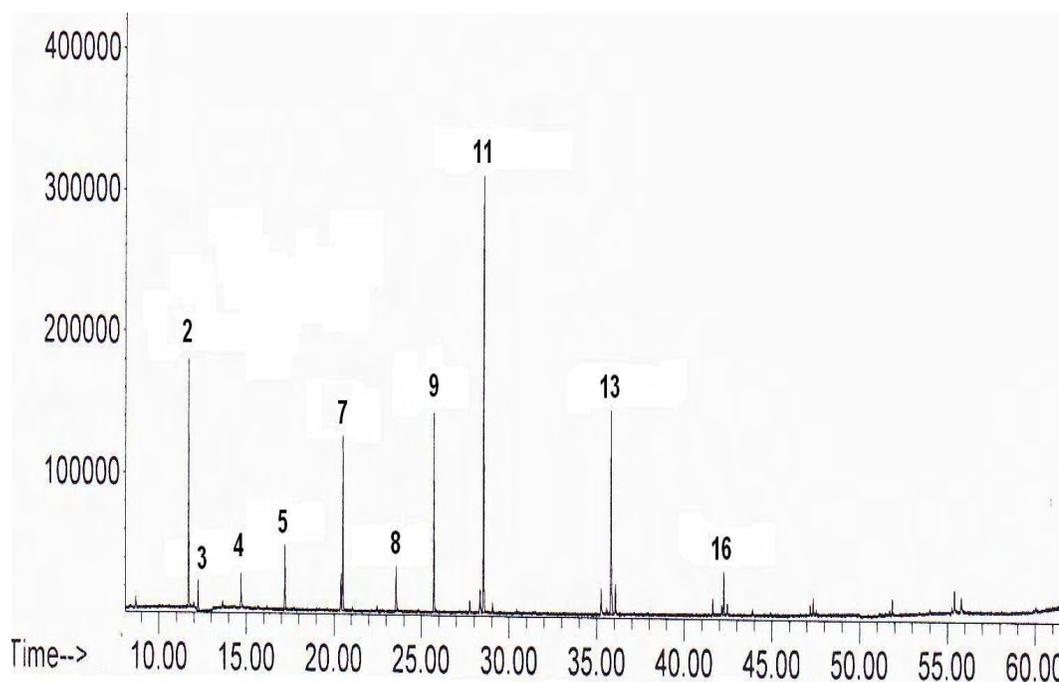
Tabla 16. Identificación y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios presentes en AE_{F1} de *C. candamarcensis* mediante CG/EM.

N° pico ^a	Compuestos	Tiempo de retención (min)	Cantidad relativa, (%)
2	butirato de etilo	11,690	17,0
3	acetato de butilo	12,260	2,2
4	hexanol	14,692	2,6
5	caproato de metilo	17,188	4,3
7	caproato de etilo	20,495	11,7
8	octanol	23,556	3,2
9	caprilato de metilo	25,707	13,0
11	caprilato de etilo	28,525	28,2
13	caprilato de butilo	35,817	15,0
16	decanoato de butilo	42,239	2,8

Fuente: Esta investigación.

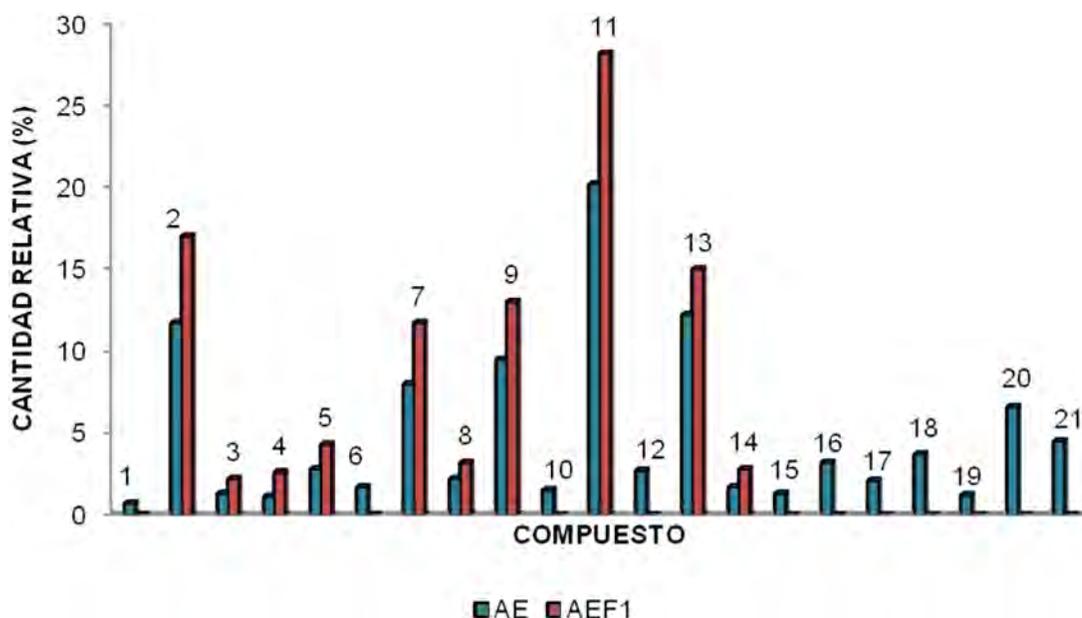
^a Numero de pico en la figura 21.

Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM de AE_{F1} de *C. candamarcensis* obtenido por HDMO.



Fuente: Esta investigación.

Gráfica 2. Comparación de los compuestos mayoritarios del AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis*.



Fuente: Esta investigación.

En la gráfica 2 se muestra que la cantidad relativa de los compuestos mayoritarios de la fracción 1 aumenta respecto al aceite esencial crudo, demostrando que el fraccionamiento enriqueció la muestra AE_{F1}, con los componentes que se encontraban en mayor cantidad, eliminando aquellos de mayor peso molecular y aquellos que se encontraban en trazas.

4.4 Actividad antioxidante

4.4.1 Parámetros estadísticos para la validación de los métodos TEAC y DPPH

4.4.1.1 Método TEAC. La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método TEAC consiste en: captura (reducción y neutralización) del radical cromóforo, debido a la ganancia de un electrón (e⁻) fácilmente donado por la sustancia antioxidante.¹²¹ Experimentalmente, se observa una disminución de la absorbancia medida a 734nm debido a la reducción del catión-radical.¹²²

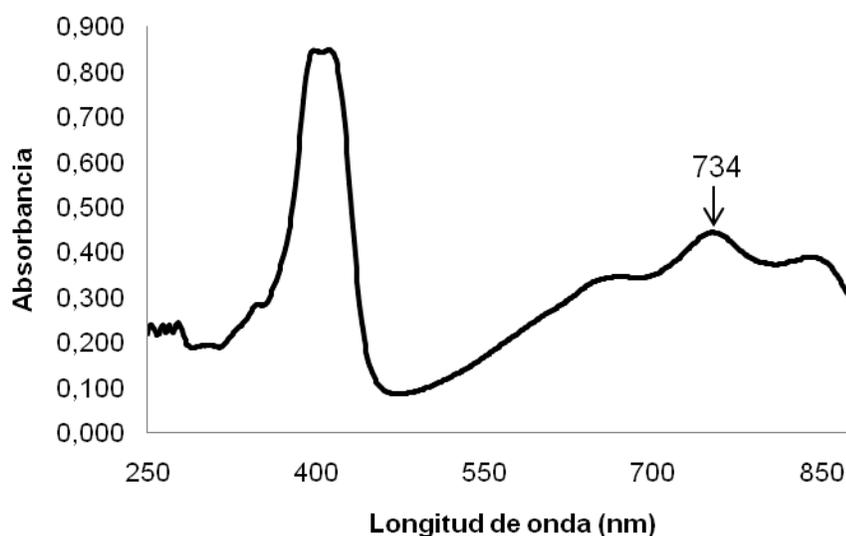
¹²¹ RE, R. y colaboradores. Op. cit., p. 36

¹²² ZULUETA, A. y Colaboradores. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. 2009. 310p.

Se realizó la validación para proporcionar un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y en la calidad de los resultados. Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico según se expresa en la USP 31, son exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango.

➤ **Determinación de la longitud de onda.** Para la determinación de los datos espectrofotométricos se empleó un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300, con un rango de señal 190-900nm. La formación del catión-radical ABTS^{•+} se puede evidenciar a través de su máximo de absorción a longitudes de onda de 645, 734 y 815nm.¹²³ Para determinar la longitud de onda más adecuada para la medición de absorbancia, se realizó un barrido por la región ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro que generó la gráfica 3.

Gráfica 3. Espectro de absorción del catión-radical ABTS^{•+}



Fuente: Esta investigación.

La solución de ABTS^{•+} presentó su máximo de absorción a una longitud de onda de 734nm. Una longitud de onda apropiada y fija para los análisis de actividad antioxidante, además coincide con la reportada por Re, 1999.¹²⁴

➤ **Curva de calibración.** La medición de los resultados se hizo por triplicado en tres días diferentes. Los datos de absorbancia de las soluciones de ABTS^{•+} se muestran en la tabla 17.

¹²³ RE, R. y colaboradores. 1999. Op. cit., p. 36.

¹²⁴ Ibid., p. 74

Tabla 17. Absorbancia de soluciones de ABTS** con diferentes concentraciones de trolox.

ÍTEM	Conc ^a (mM)	A ^b			S ^c	%CV ^d	IC ^e (95%)
		Promedio					
Blanco	0,0	0,031	5,77E-04	1,843	0,031-0,033		
		0,033	5,77E-04	1,767			
		0,031	5,77E-04	1,843			
Trolox	0,4	0,137	4,58E-03	1,832	0,135-0,138		
		0,136	5,13E-03	1,855			
		0,137	2,08E-03	1,523			
Trolox	0,8	0,241	4,62E-03	1,919	0,236-0,241		
		0,237	1,15E-03	0,487			
		0,237	1,73E-03	0,731			
Trolox	1,2	0,347	4,51E-03	1,298	0,344-0,349		
		0,345	3,51E-03	1,017			
		0,347	3,61E-03	1,039			
Trolox	1,6	0,446	6,43E-03	1,443	0,442-0,448		
		0,446	1,53E-03	0,342			
		0,444	2,52E-03	0,567			
Trolox	2,0	0,555	3,00E-03	0,541	0,555-0,559		
		0,559	1,73E-03	0,310			
		0,556	1,53E-03	0,275			

^a Concentración (mM) ^b Absorbancia (promedio de tres mediciones) ^c Desviación estándar ^d Porcentaje coeficiente de variación ^e Intervalo de confianza

Con los datos obtenidos se definen los parámetros estadísticos que garantizan que los resultados son confiables estadísticamente.

➤ Linealidad y rango. La variación de la absorbancia con respecto a la concentración de trolox resultó lineal en el rango 0 a 2,0 mM. Ésta curva de calibración presenta un coeficiente de correlación (r) de 0,999 y un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9985, lo que demuestra una buena linealidad del sistema y un alto grado de correlación entre los datos.

➤ Precisión. Para comprobar la variabilidad del ensayo, se evaluó la repetibilidad del método, expresando los resultados como coeficientes de variación (%CV) siendo el valor establecido inferior al 2%, el cual está debajo del límite

establecido para determinaciones espectrofotométricas (3%)¹²⁵ Además, los intervalos de confianza, basados en el estadístico de la *t-student*, con un nivel de confianza del 95% son resultados aceptables dentro de la técnica de análisis. El coeficiente de variación se calculó considerando la formula:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Donde el coeficiente de variación es la relación entre la desviación típica de la muestra y su media. Los intervalos de confianza se calcularon a partir de la siguiente expresión:

$$\bar{x} - z \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + z \frac{s}{\sqrt{n}}$$

En la formula, \bar{x} es la media en la muestra; z equivale a 2,31 y se obtiene de la tabla de distribución de la t student,¹²⁶ en este caso, para grados de libertad igual a 8 con una P de 95%; s es la media de la desviación y n el tamaño de la muestra.

➤ Exactitud. Para determinar la exactitud del ensayo se procedió a estimar la diferencia entre la media obtenida de la concentración de las soluciones de trolox y el valor aceptado como verdadero. Empleando el cálculo estadístico del porcentaje de recuperación. La recuperación de la concentración de soluciones trolox se comporta dentro de los valores óptimos (98,62 - 99,25). Resultados que se consideran por lo tanto aceptables. Los datos se indican en la tabla 18 y señalan la buena exactitud del método propuesto.

Tabla 18. Concentraciones experimentales de soluciones de Trolox

Conc ^a (mM)	Absorbancia *	Conc Exp ^b (mM) *	%R ^c *
0,0	0,032	0,000	-
0,4	0,137	0,395	98,75
0,8	0,238	0,790	98,75
1,2	0,347	1,187	98,92
1,6	0,445	1,578	98,62
2,0	0,557	1,985	99,25

* Promedio de tres mediciones en tres días diferentes ^a Concentración aceptada como verdadera (mM), ^b Concentración experimental (mM), ^c porcentaje de recuperación

¹²⁵ CASTILLO, B. GONZÁLEZ, R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. 1997. pág.4-6

¹²⁶ MILLER, J.C. MILLER, J.N. Estadística para química analítica. Addison-Wesley Iberoamericana. 2ª ed. 1993. pág. 23

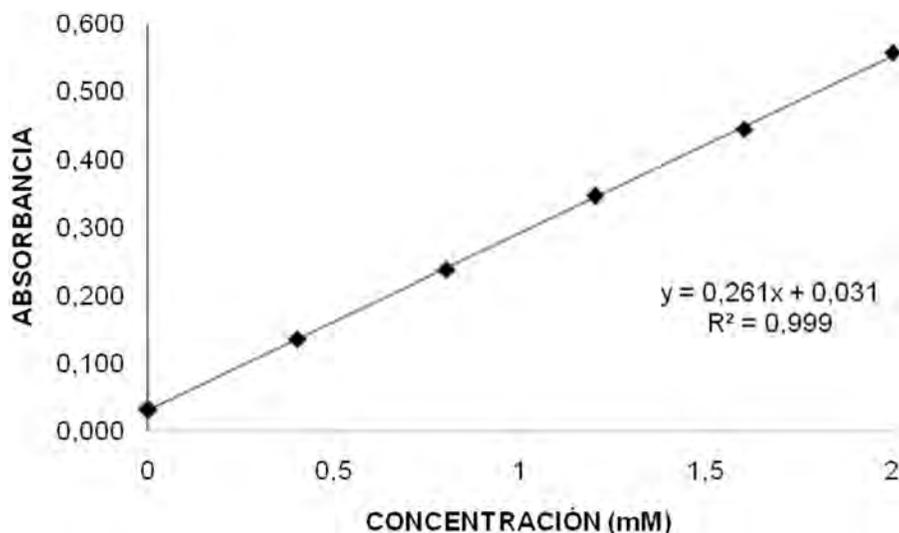
A partir de los promedios de los valores de absorbancia, se calculó el promedio final consolidando un único valor de absorbancia por tratamiento. Así, se construyó finalmente la recta de calibrado absoluta (gráfica 4). Los resultados se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Absorbancia final de las soluciones de Trolox.

Conc ^a (mM)	A ^b		S ^c	% CV ^d
	Promedio			
0,0	0,032		7,70E-04	2,422
0,4	0,137		8,39E-04	0,614
0,8	0,238		2,03E-03	0,851
1,2	0,347		1,07E-03	0,309
1,6	0,445		1,39E-03	0,312
2,0	0,557		2,04E-03	0,366

^a Concentración (mM) ^b Absorbancia (promedio de tres mediciones) ^c Desviación estándar ^d Coeficiente de variación (%)

Gráfica 4. Curva de calibración de soluciones trolox a 734nm



Fuente: Esta investigación.

Para determinar los errores aleatorios que presenta el método se calcularon los parámetros estadísticos, $S_{y/x}$, S_b y S_a , donde $S_{x/y}$ es la desviación estándar que relaciona la pendiente y ordenada, S_b y S_a las desviaciones estándar para la

pendiente (b) y la ordenada en el origen (a); correspondientes a las siguientes expresiones algebraicas:

$$S_{\frac{y}{x}} = \left\{ \sum \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$S_b = \frac{S_{\frac{y}{x}}}{\left\{ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

$$S_a = S_{\frac{y}{x}} \left\{ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

De esta forma $S_{y/x} = 0,00261$; $S_b = 0,00156$ y $S_a = 0,00184$. Los límites de confianza para la pendiente están dados por $b \pm tS_b$, donde el valor t se obtiene para un nivel de confianza del 95% para (n-2) grados de libertad. De manera similar el límite de confianza para la ordenada en el origen están dado por $a \pm tS_a$. Los valores correspondientes son:

$$b \pm 0,004$$

$$a \pm 0,005$$

➤ Límite de detección y cuantificación. Para confirmar cual es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, se determina la prueba de límite de detección, la cual establece la cantidad de analito que se encuentra por encima o por debajo de este límite. Para ello se empleó el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero, con $K=3$ estableciendo un valor de:

$$\mathbf{LD = 0,074}$$

De esta manera la concentración (mM) más pequeña que se puede detectar con seguridad razonable es 0.074mM de ABTS^{••}

Para conocer cuál es la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas en el experimento se determina el límite de cuantificación. El cual se calculó mediante el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración con $K=10$, estimando un valor de:

$$\mathbf{LC = 0,084}$$

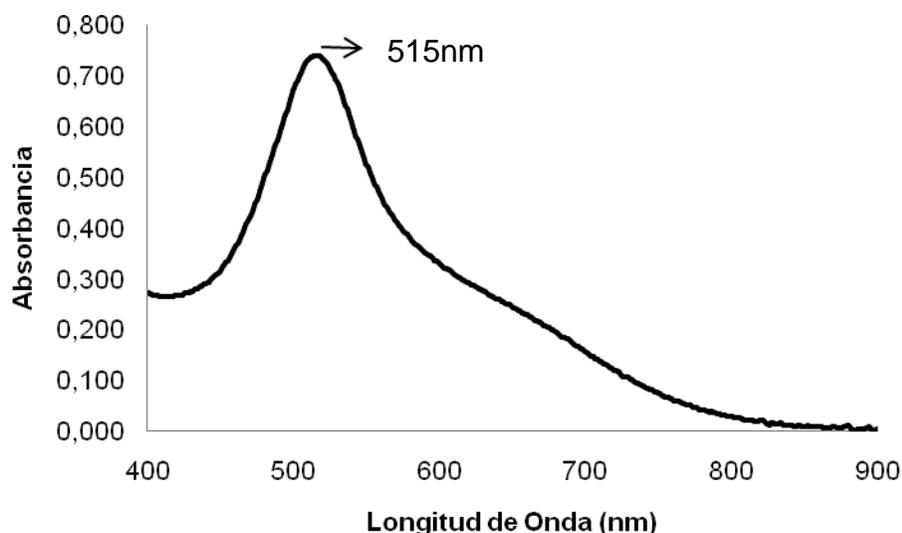
Así, la medida más pequeña que puede cuantificarse adecuadamente es 0,084mM de ABTS⁺.

4.4.1.2 Método DPPH. El método de decoloración del DPPH[•] es útil para la medición de la capacidad de captura de radical de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. En este procedimiento analítico se evitan reacciones indeseables y altas temperaturas.¹²⁷ Este método permite determinar la capacidad antirradicalaria de los aceites esenciales y de las sustancias de referencia (ácido ascórbico, ácido gálico y BHT), usando el grado de decoloración del DPPH[•] a 515nm, como criterio de valoración. El grado en que cada posible antioxidante decolore este radical, depende principalmente de su capacidad para donar hidrógeno(s).¹²⁸

Para corroborar que el ensayo de DPPH es lo suficientemente fiable para la obtención de datos, se realizó la validación del método.

➤ Determinación de la longitud de onda. Para la determinación de los datos espectrofotométricos se empleó un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300, con un rango de señal 190-900nm. Con el fin de determinar la longitud de onda más adecuada se realizó un barrido por la región visible del espectro, generando el siguiente espectro de absorción (gráfica 5).

Gráfica 5. Espectro de absorción del radical DPPH[•]



Fuente: Esta investigación.

¹²⁷ MOLYNEUX, P. Op. cit., p. 37

¹²⁸ WILLIAMS, B. y Colaboradores. Op. cit., p. 37

La solución de DPPH[•] presentó su máximo de absorción a una longitud de onda de 515nm. Una longitud de onda apropiada y fija para el análisis de eficiencia antiradical, además coincide con la publicada por Sánchez, 1998.¹²⁹

➤ Curva de calibración. El tratamiento que se realizó para la toma de datos fue por triplicado en tres días diferentes. Los datos de absorbancia de las soluciones de DPPH[•] se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Absorbancia de soluciones de DPPH[•].

<i>Conc^a (mM)</i>	$\frac{A^b}{\text{Promedio}}$	<i>S^c</i>	<i>%CV^d</i>	<i>IC^e (95%)</i>
0,090	0,906	0,0026	0,2920	0,900-0,905
	0,902	0,0012	0,1281	
	0,901	0,0040	0,4487	
0,080	0,803	0,0029	0,3596	0,808-0,827
	0,831	0,0023	0,2780	
	0,819	0,0020	0,2442	
0,065	0,662	0,0026	0,3997	0,653-0,665
	0,666	0,0023	0,3469	
	0,650	0,0070	1,0769	
0,050	0,524	0,0026	0,5049	0,510-0,522
	0,516	0,0021	0,4032	
	0,507	0,0017	0,3416	
0,035	0,363	0,0006	0,1589	0,364-0,368
	0,369	0,0015	0,4143	
	0,366	0,0010	0,2732	
0,020	0,216	0,0017	0,8019	0,215- 0218
	0,216	0,0012	0,5338	
	0,217	0,0021	0,9578	
0,010	0,117	0,0017	1,4804	0,116-0,118
	0,118	0,0017	1,4678	
	0,116	0,0006	0,4963	

^a Concentración (mM) ^b Absorbancia (promedio de tres mediciones) ^c Desviación estándar

^d Porcentaje coeficiente de variación ^e Intervalo de confianza

Con los datos obtenidos se define los parámetros estadísticos que garantizan que los resultados son confiables estadísticamente.

¹²⁹ SANCHEZ, C. LARRAURI, J. Op. cit., p. 39

➤ Linealidad y rango. Se verificó la linealidad del sistema, mediante la construcción de una curva de calibración de absorbancia vs concentración en el rango entre 0,090 y 0,010mM, alcanzando elevados coeficientes de correlación lineal y determinación: 0,999 y 0,9998. El valor de la pendiente 9,881 indica la buena sensibilidad del método.

➤ Precisión. Los coeficientes de variación del estudio de repetibilidad cumplen con los criterios de la USP XXIII ¹³⁰, el cual presenta un valor establecido menor al 2%. Mediante el test Student se calcularon los intervalos de confianza con un nivel de confianza del 95%; cuyo resultado es aceptable dentro de esta técnica, comprobando así la precisión del método.

➤ Exactitud. Los valores obtenidos como resultado del cálculo estadístico del porcentaje de recuperación están entre un rango óptimo (98,20 – 99,71%). La exactitud del método propuesto es aceptable. Los datos obtenidos se indican en la tabla 21.

Tabla 21. Exactitud del método DPPH

<i>Conc^a (mM)</i>	<i>Absorbancia *</i>	<i>Conc Exp^b (mM) *</i>	<i>%R^c *</i>
0,090	0,902	0,0894	99,33
0,080	0,814	0,0789	98,62
0,065	0,654	0,0647	99,60
0,050	0,513	0,0491	98,20
0,035	0,365	0,0347	99,14
0,020	0,217	0,0199	99,71
0,010	0,117	0,0099	98,78

Fuente: Esta investigación.

* Promedio de tres mediciones en tres días diferentes ^a Concentración aceptada como verdadera (mM), ^b Concentración experimental (mM), ^c porcentaje de recuperación

A partir de los promedios de las lecturas de absorbancia, se calculó el promedio final. Este único valor de absorbancia por tratamiento, permite construir finalmente la recta de calibrado absoluta (gráfica 6). Los resultados se muestran en la tabla 22.

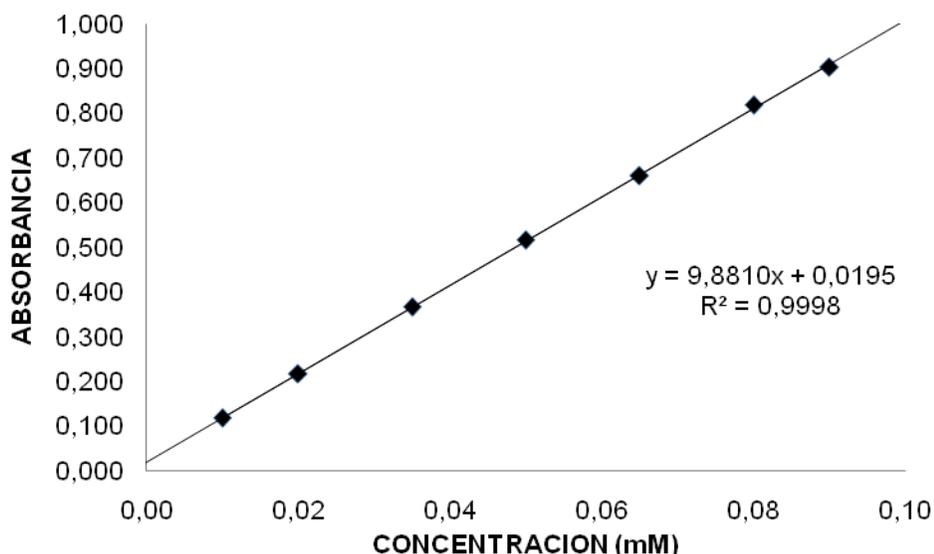
¹³⁰ CASTILLO, B. GONZÁLEZ, R. Op. cit., 76

Tabla 22. Absorbancia final de las soluciones de DPPH*.

Conc ^a DPPH (mM)	A ^b		S ^c	%CV ^d
	Promedio			
0,090	0,903		0,0028	0,3140
0,080	0,817		0,0141	1,7206
0,065	0,659		0,0082	1,2430
0,050	0,516		0,0085	1,6506
0,035	0,366		0,0027	0,7286
0,020	0,217		0,0007	0,3204
0,010	0,117		0,0008	0,7163

^a Concentración (mM) ^b Absorbancia (promedio de tres mediciones) ^c Desviación estándar
^d Coeficiente de variación (%)

Gráfica 6. Curva de calibración de soluciones DPPH* a 515nm.



Fuente: Esta investigación.

Para determinar los errores aleatorios que presenta el método se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: $S_{y/x} = 0.0419$; $S_b = 0.5680$ y $S_a = 0.00302$. De esta manera los límites de confianza de la pendiente y la ordenada con un nivel de confianza del 95% son:

$$b \pm 0,139$$

$$a \pm 0,007$$

➤ Límite de detección y límite de cuantificación. Para comprobar si los resultados analíticos corresponden a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito, se determinó el valor del límite de detección, el cual permite

establecer cuál es la mínima concentración de analito que se puede detectar. Para ello se empleó el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración a cero, con $K=3$. Así, se estimó un valor de:

$$LD = 5,59 \times 10^{-4}$$

De esta manera, los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables.

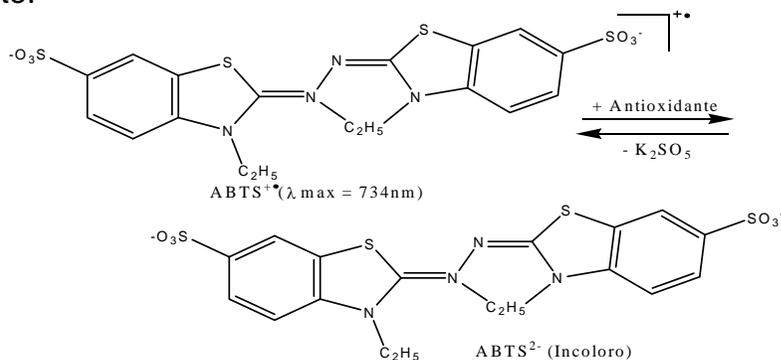
Para conocer cuál es la menor concentración que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, se estableció el límite de cuantificación. El cual se calculó mediante el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración con $K=10$. Así, se calculó un valor de:

$$LC = 1,58 \times 10^{-3}$$

La concentración más pequeña que puede cuantificarse adecuadamente es $1,58 \times 10^{-3}$ mM de DPPH*

4.4.2 Actividad antioxidante equivalente en trolox. La generación del catión radical $ABTS^{+\bullet}$ constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que más se ha aplicado a la medición de la actividad antioxidante total de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.¹³¹ Este método se emplea debido a que su procedimiento es rápido, sensible y reproducible.¹³² En el esquema 7 se muestra el diagrama de reacción.¹³³

Esquema 7. Representación de la reacción de reducción $ABTS^{+\bullet}$ en presencia de un antioxidante.



Fuente: Zulueta, A. y Colaboradores. 2009.

¹³¹ RE, R. y colaboradores. Op. Cit., p. 36

¹³² GULCIN, I. y Colaboradores. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. 2009. pág. 43

¹³³ ZULUETA, A. y Colaboradores. Op. cit., p. 73

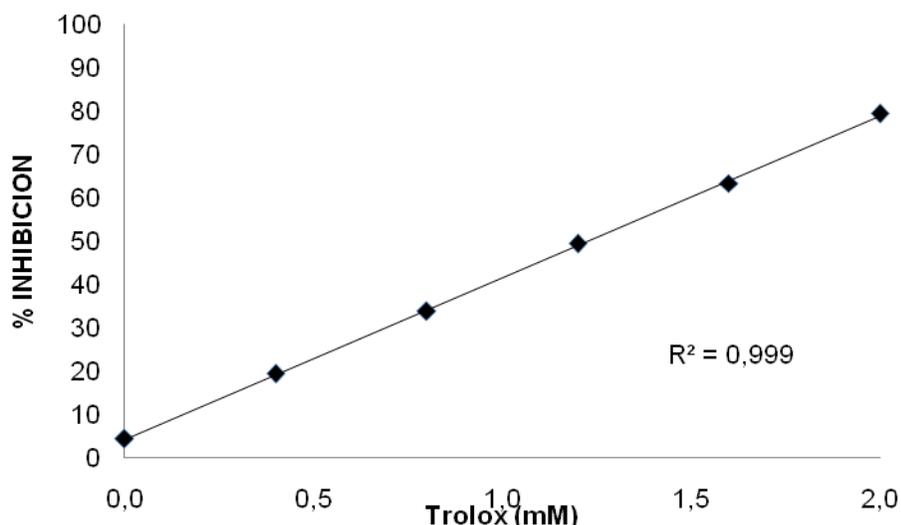
En el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, la capacidad de captura de radical se expresa como capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), para el caso de sustancias puras, o como actividad antioxidante total (AAT), para el caso de mezclas de sustancias.

En este trabajo, el reactivo de trolox se usó como estándar y ácido ascórbico, ácido gálico y BHT (di-terc-butil-hidroxi-tolueno) como sustancias de control. La capacidad antioxidante del AE, AE_{F1} y las sustancias control se determinaron respectivamente como: AAT, expresado como mmol de trolox por Kg de AE y TEAC, expresado como mmol de trolox por mmol de sustancia.

Mediante el método TEAC se puede medir la capacidad antioxidante determinada por la decoloración que sufre el ABTS⁺, a través de la medición de la reducción del catión- radical como porcentaje de inhibición a 734nm.¹³⁴ La gráfica 7 muestra la capacidad antioxidante del trolox. Se observa la relación lineal entre la concentración de trolox y el porcentaje de inhibición, es decir, el aumento progresivo del porcentaje de inhibición con respecto a la concentración de trolox utilizada. La actividad antioxidante de las sustancias de referencia, AE y AE_{F1} se calculó tomando como base la ecuación de la recta de calibrado (gráfica 4) que arrojó la siguiente relación:

$$A_{734nm} = 0.2614[Trolox] + 0.0312$$

Gráfica 7. Grado de inhibición del catión-radical ABTS⁺, en función de la concentración (mM) de trolox



Fuente: Esta investigación.

¹³⁴ MARGHITAS, L. y Colaboradores. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. 2009. pág. 878

Los valores obtenidos de la capacidad equivalente a trolox (TEAC) para las sustancias antioxidantes de control y actividad antioxidante total (AAT) para el AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* se muestran en la tabla 23. Los valores de TEAC para los antioxidantes de referencia evaluados experimentalmente concuerdan con los reportados en la literatura.^{135,136,137}

Tabla 23. Actividad antioxidante de AE, AE_{F1} de *Carica Candamarcensis* y sustancias de referencia.

Sustancia	TEAC		AAT ^b
	Experimental ^a	Reportado ^a	
Ácido ascórbico	1,15 ± 0,03	0,99 (Re, 1999)	6553 ± 183
Ácido gálico	2,30 ± 0,03	2,5 (Gil, 2000)	13533±194
BHT	0,26 ± 0,03	0,22 (Muñoz, 2009)	1201±151
AE <i>C. candamarcensis</i>	-	-	0,458±0,04
AE _{F1} <i>C. candamarcensis</i>	-	-	0,307±0,04

Fuente: Esta investigación.

^a TEAC: mmol Trolox / mmol sustancia ^b AAT: mmol Trolox / kg sustancia

Una sustancia es considerada buen antioxidante cuando presenta un TEAC mayor que 1.¹³⁸ En la tabla 23 se observa que el ácido ascórbico y ácido gálico son muy buenos antioxidantes. Si se considera las estructuras moleculares de los mismos (figura 23), se puede observar la presencia de grupos con propiedades reductoras, por ejemplo: el grupo hidroxilo puede ceder fácilmente electrones y estabilizarse mediante el sistema conjugado que presenta la molécula. Mientras que el BHT presenta un TEAC menor a 1, debido al impedimento estérico de los grupos *ter*-butilo dispuestos en posiciones *orto* con respecto al grupo hidroxilo.¹³⁹

¹³⁵ RE, R. y colaboradores. Op. cit., p. 36

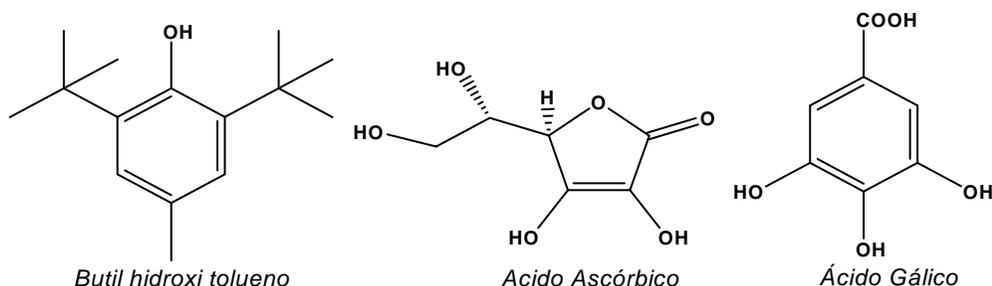
¹³⁶ GIL, M. y Colaboradores. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. 2000. pág. 4588

¹³⁷ MUÑOZ, A y Colaboradores. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol. 2009. pág. 292

¹³⁸ DIAZ, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphyllia* (*l'Her*) Britton. 2007. pág. 110

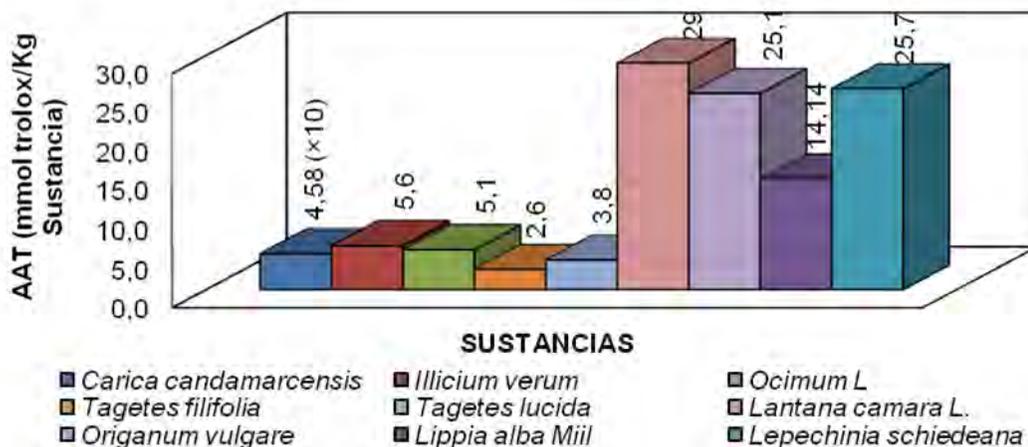
¹³⁹ DEVI, R. ARUMUGHAN, C. Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. 2007. pág. 2014-2017

Figura 22. Estructuras moleculares del ácido ascórbico, ácido gálico y butil-hidroxitolueno (BHT).



En la gráfica 8 se muestra la capacidad antioxidante de varios aceites esenciales expresada como AAT. Estos actúan bajo el mecanismo de captura de electrones. Los AE(s) con alto contenido en fenoles, presentan altos valores de capacidad antioxidante, mientras que los AEs con alto contenido en éteres aromáticos presentan valores de capacidad antioxidante relativamente bajos.^{140,141,142} Por ejemplo, los componentes que predominan en los aceite esenciales de *Origanum vulgare* (25,1mmoltrolox/Kg) y *Lippia alba Miil* (14.14mmoltrolox/Kg), son carvacrol y carvona respectivamente. Estos compuestos de tipo fenólico confieren mayor capacidad antioxidante al aceite esencial.¹⁴³ En la tabla 24 se describe la cantidad relativa de los compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales.

Gráfica 8. Comparación de la actividad antioxidante del AE de *C. candamarcensis* y otros aceites esenciales



Fuente: Esta investigación.

¹⁴⁰ BENITES, J. y Colaboradores. Composition and biological activity of the essential oil of peruvian lantana camara. 2009. pág. 383

¹⁴¹ MUÑOZ, A. y Colaboradores. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. 2009. pág. 292

¹⁴² PUERTAS, M. y Colaboradores. In Vitro radical scavenging activity of essential oils from columbian plants. 2002. pág. 380

¹⁴³ BENITES, J. y Colaboradores. Op. cit., p.86

Tabla 24. Nombres científico, común y cantidades relativas (%) de los componentes mayoritarios identificados en aceites esenciales representativos.

Nombre científico (nombre común)	Componentes	Parte de la planta	% cantidad relativa	Referencia
<i>Illicium verum</i> (anís estrellado)	Limoneno	Frutos	3,0	Muñoz (2009)
	Estragol		3,4	
	<i>trans</i> -Anetol		82,5	
<i>Ocimum sp.</i> (sígueme morado).	Eucaliptol	Hojas	6,4	Muñoz (2009)
	Linalol		11,3	
	Estragol		49,9	
<i>Tagetes filifolia</i> (anisillo)	Estragol	Hojas	27,4	Muñoz (2009)
	<i>trans</i> -Anetol		70,6	
<i>Tagetes lucida</i> (estragon invierno)	-Mirceno	Hojas	3,4	Muñoz (2009)
	Estragol		93,8	
<i>Lantana camara L.</i> (siete colores)	Carvona	Flores	75,9	Benítez (2009)
	Limoneno		16,9	
<i>Origanum vulgare</i> (Oregano)	Carvacrol	Hojas y flores	9,0	Puertas (2002)
	Terpineol		12,19	
	p-cimeno		6,86	
<i>Lippia alba Miil</i>	Limoneno	Hojas	33,0	Puertas (2002)
	Carvona		51,0	
<i>Lepechinia schiedeana</i>	Ledol	Hojas	29,1	Puertas (2002)
	Careno		18,4	
	-cadinol		9,6	

El AE de *C. candamarcensis* presentó baja actividad antioxidante (0,458mmolTrolox/Kg), con respecto a los AE(s) de la tabla 24. Esta baja actividad antioxidante del AE estudiado se atribuye a dos factores:

(i) La baja cantidad relativa (%) de compuestos con propiedades reductoras como nerolidol, hexanol y octanol. Estos compuestos presentan el grupo hidroxilo en su estructura, el cual puede actuar como donador de hidrógeno. Debido a que este tipo de compuestos se encuentran en una baja cantidad relativa (%) contribuyen muy poco a la captura del radical ABTS^{•+}.

(ii) La alta concentración de compuestos tipo éster alifático en el AE. Estos compuestos no se consideran como donantes de hidrógenos. Además no presentan capacidad de estabilizar el radical formado ni deslocalizar el electrón desapareado, por lo tanto, no presentan capacidad antioxidante en la mezcla.

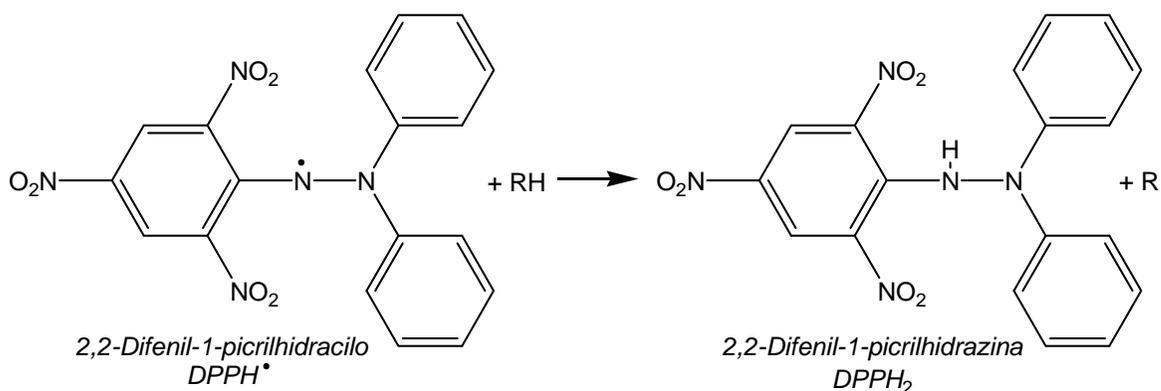
Por otra parte, la fracción F1 presentó menor actividad antioxidante, respecto al aceite puro (0,307 ± 0,04mmolTrolox/Kg). Esto se atribuye a la ausencia de nerolidol en el AE_{F1}, a pesar de que la cantidad relativa (%) de hexanol (2,6%) y octanol (3,2%) en AE_{F1} es mayor que en el AE.

Es importante considerar que aunque generalmente, los componentes mayoritarios encontrados en los aceites esenciales reflejan muy bien las características biofísicas y biológicas, la amplitud de sus efectos depende de su concentración cuando se los analizan solos o integrado en el aceite esencial. Es posible que la actividad de los componentes mayoritarios sea modulada por otras moléculas minoritarias, es decir, se ejerza un efecto sinérgico.¹⁴⁴ Por ello, se sugiere que la mezcla de nerolidol, hexanol y octanol presenta un efecto sinérgico que potencia la capacidad antioxidante.

Se concluye que la baja capacidad antioxidante expresada en términos de AAT del AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* es debida a la baja cantidad relativa de compuestos con propiedades reductoras como derivados de fenilpropanoides y fenoles. Además, la ausencia de nerolidol en la fracción AE_{F1} de *C. candamarcensis* disminuye su actividad antioxidante total.

4.4.3 Determinación de la eficiencia antiradical: Método DPPH. El radical DPPH[•] reacciona con una sustancia antioxidante para formar la molécula estable de DPPH₂. Esta reacción puede ser evaluada midiendo la absorbancia del medio de reacción a una longitud de onda de 515nm. (Esquema 8).

Esquema 8. Ecuación de la reacción de reducción de DPPH[•].



Fuente: MOLYNEUX, P. 2004
 RH=Antioxidante

Con el fin de relacionar los valores de absorbancia obtenidos y la capacidad antirradicalaria del AE y AE_{F1}, se determinó los valores de EC₅₀ para ácido ascórbico, ácido gálico, butil-hidroxi-tolueno (BHT). Estos tres antioxidantes conocidos son empleados industrialmente en la preservación de diversos productos

¹⁴⁴ BAKKALI, F. y Colaboradores. Op. cit., p. 27

La concentración de DPPH* en el medio de reacción fue calculada a partir de la curva de calibración (gráfica 5), determinada por regresión lineal:

$$A_{515nm} = 9,881[DPPH]_T + 0,0195$$

Donde $[DPPH]_T$ es expresado en mM y corresponde a un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.998$.

En la tabla 25 se muestra los valores de concentración de AE y AE_{F1} y de cada una de las sustancia de referencia. El % de DPPH* remanente se estableció mediante la siguiente relación

$$DPPH(\square)_{T=0}$$

Tabla 25. Concentración, % DPPH* remanente y tiempo en el estado estacionario de las sustancias de referencia, AE y AE_{F1}.

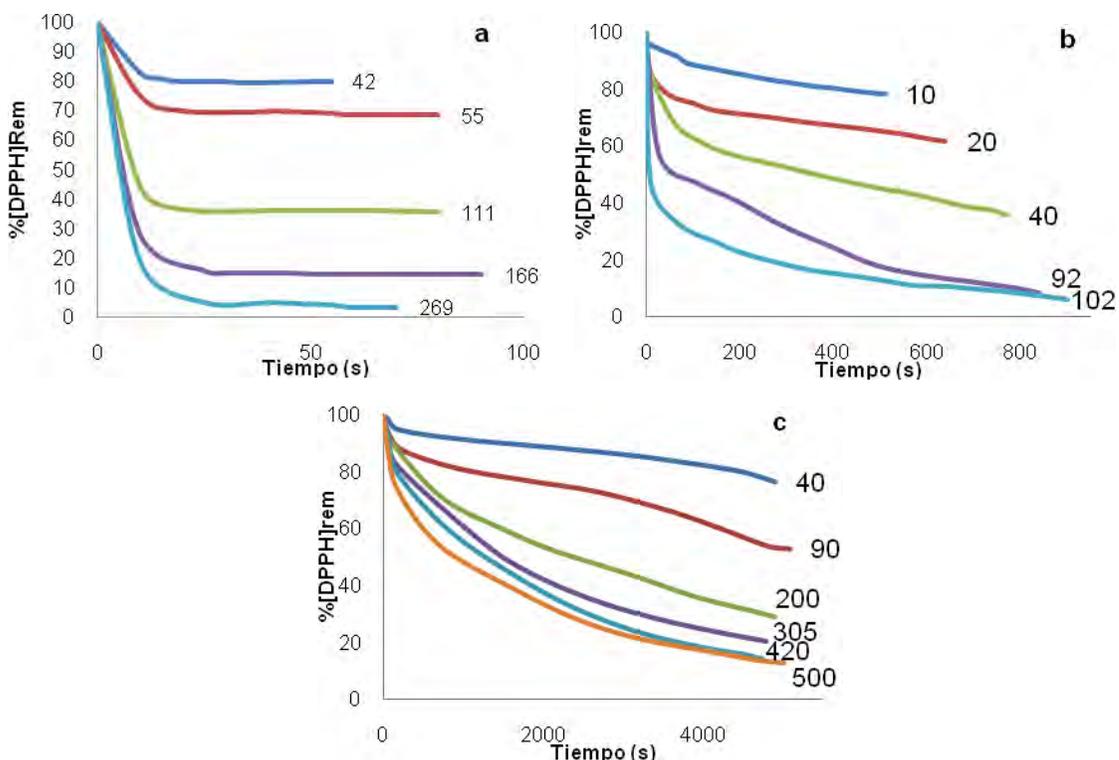
Sustancias	Concentración (g antioxidante/kg DPPH)	%[DPPH] _{Rem} en el estado estacionario	Estado estacionario (s)
Ácido ascórbico	42	79,657	55
	55	68,263	80
	111	35,580	80
	166	14,247	90
	269	3,155	70
Ácido gálico	10	78,197	510
	20	61,286	640
	40	35,360	770
	92	8,455	840
	102	6,219	900
BHT	40	76,243	4900
	90	52,905	5090
	200	28,868	4910
	305	20,122	4800
	420	14,006	4750
	500	12,672	5010
AE C. <i>candamarcensis</i>	90	76,007	240
	172	72,233	280
	249	67,892	300
	399	62,590	380
	532	58,644	420
AE _{F1} C. <i>candamarcensis</i>	295	85,755	680
	369	79,897	780
	539	74,982	860
	738	64,848	990

Fuente: Esta investigación

En el desarrollo de esta metodología, establecer el estado estacionario es fundamental para obtener valores exactos. Se determinó este estado cuando la variación en la absorbancia fue de 0,002.

En la gráfica 9 se muestra el comportamiento cinético de los antioxidantes de referencia. Un aumento en la concentración inicial de los antioxidantes incrementa la velocidad de reacción. Esto se debe a que el número total de colisiones efectivas por unidad de tiempo entre moléculas antioxidantes y de DPPH[•] es directamente proporcional a la concentración de antioxidante. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto (DPPH neutro) va disminuyendo porque se consume el sustrato de la reacción (antioxidante). En este punto, la concentración de DPPH neutro se puede considerar como esencialmente constante.

Gráfica 9. Comportamiento cinético de sustancias de referencia.



Fuente: Esta investigación

Concentración expresada como g antioxidante / kg de DPPH[•]

^a Ácido ascórbico (rápido) ^b ácido gálico (intermedio) ^c BHT (lento)

Los valores EC₅₀ de AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* y de los antioxidantes de referencia, fueron calculados graficando % [DPPH[•]]_{REM} contra la concentración estándar de cada una de las sustancias empleadas como antioxidante.

En las tablas 26 y 27 se reportan los datos experimentales y de referencia del análisis de eficiencia antirradicalaria de AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* y de las sustancias de control

Tabla 26. Concentración necesaria para disminuir el 50% de la concentración inicial del DPPH y su clasificación cinética.

Sustancia	EC ₅₀ ^a		T _{EC50} ^b		Clasificación ^c
	Exp	Reportados	Exp	Reportados	
Ácido ascórbico	78,621	76 ± 7 *	1,151	1,15 ± 0,08*	Rápido
Ácido gálico	26,970	26 ± 1 *	11,185	14,69 ± 1,10*	Intermedia
BHT	103,767	93,7 **	84,565	33,42**	Lento
AE C <i>candamarcensis</i>	789,491	-	8,501	-	Lento
AE _{F1} C. <i>candamarcensis</i>	1078,156	-	20,313	-	Lento

^a g antioxidante Kg⁻¹DPPH ^b minutos ^c Clasificación según Sánchez, 1999.
Referencias: * Sánchez, 1999. ** Bekhit, 2011.

Tabla 27. Eficiencia antirradical de las sustancias de referencia, AE y AE_{F1}

Sustancia	EA ^a		Clasificación ^b
	Exp	Teórico	
Ácido ascórbico	1,105×10 ⁻²	1,144×10 ^{-2*}	Muy alta
Ácido gálico	3,315×10 ⁻³	2,62×10 ^{-3*}	Media
BHT	1,135×10 ⁻⁴	3,193×10 ^{-4**}	Baja
AE C <i>candamarcensis</i>	1,517×10 ⁻⁴	-	Baja
AE _{F1} C. <i>candamarcensis</i>	3,608×10 ⁻⁵	-	Muy baja

^a Eficiencia antirradical = (1/EC₅₀×T_{EC50}) ^b Clasificación según Sánchez, 1999.
Referencias: * Sánchez, 1999. ** Bekhit, 2011

En el caso del ácido ascórbico y ácido gálico, cuyas estructuras se ilustran en la figura 20, la correlación entre la cantidad de DPPH[•] sin reaccionar en el estado estacionario (%DPPH_{REM}) y la concentración de cada antioxidante (g antioxidante/kg DPPH) se ilustra en las gráficas 10 y 11. De acuerdo a estas gráficas, la concentración de antioxidante que logra reducir la mitad de la concentración inicial del radical es 78,621 g AcAs/kg DPPH y 26,970 g AcGal/kg DPPH, valores que concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁵

¹⁴⁵ SANCHEZ, C. LARRAURI, J. Op. cit., p. 39

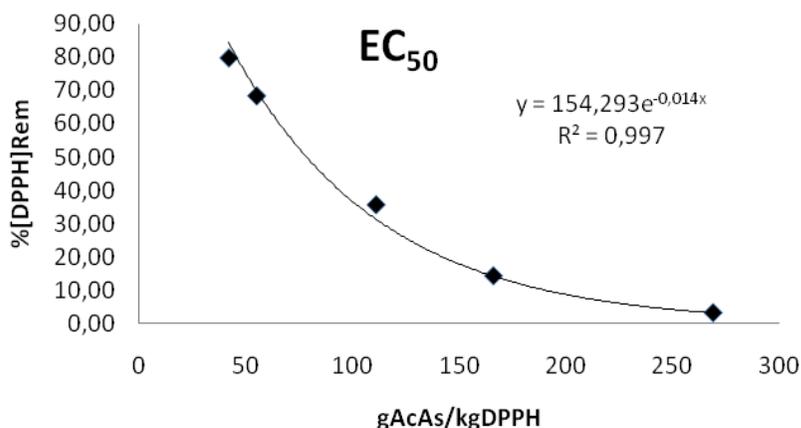
Considerando la clasificación que reporta Sánchez, 1999 sobre el comportamiento cinético de compuestos antioxidantes se puede establecer: La velocidad de reacción del ácido ascórbico es alta, pues el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario se alcanza casi a los 2 minutos. Mientras que el ácido gálico presenta un comportamiento con una cinética de reacción intermedia por presentar el tiempo estacionario en un intervalo de tiempo comprendido entre los 5 a 10 min.

Por otra parte, en la gráfica 12 se presenta la concentración efectiva media EC₅₀ del BHT. El valor obtenido fue 103.767 g de BHT / kg de DPPH. La cinética de reacción según la clasificación de Sánchez, 1999, es lenta, puesto que el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario lo consigue a tiempos muy largos, que van desde 70 min a concentraciones bajas hasta tiempos superiores a 120 min para soluciones de mayor concentración. La baja eficiencia antirradicalaria del BHT se atribuye al impedimento estérico ejercido por el voluminoso grupo t-butilo.¹⁴⁶

En las gráficas 10, 11 y 12 se observa que el comportamiento presentado por los datos obtenidos de ácido ascórbico, ácido gálico y BHT fue de tipo exponencial y corresponde a la relación:

$$\ln[\frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{Rem}}] = b [Antioxidante] + a$$

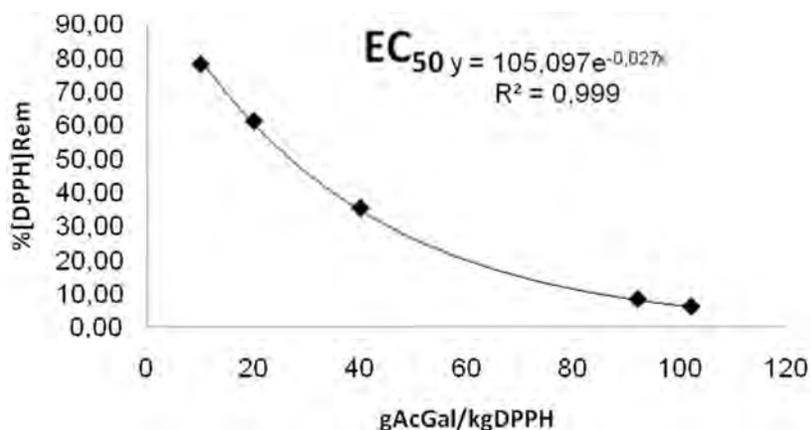
Gráfica 10. Disminución de la concentración del DPPH* en función de la cantidad de ácido ascórbico (g) por kg del radical.



Fuente: Esta investigación.

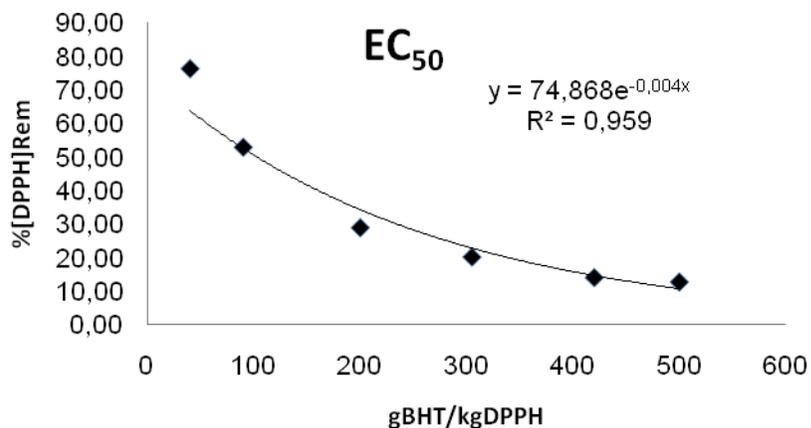
¹⁴⁶ DEVI, R. ARUMUGHAN C. Op. cit., p. 85

Gráfica 11. Disminución de la concentración del DPPH• en función de la cantidad de ácido gálico (g) por kg del radical.



Fuente: Esta investigación.

Gráfica 12. Disminución de la concentración del DPPH• en función de la cantidad de BHT (g) por kg del radical.



Fuente: Esta investigación.

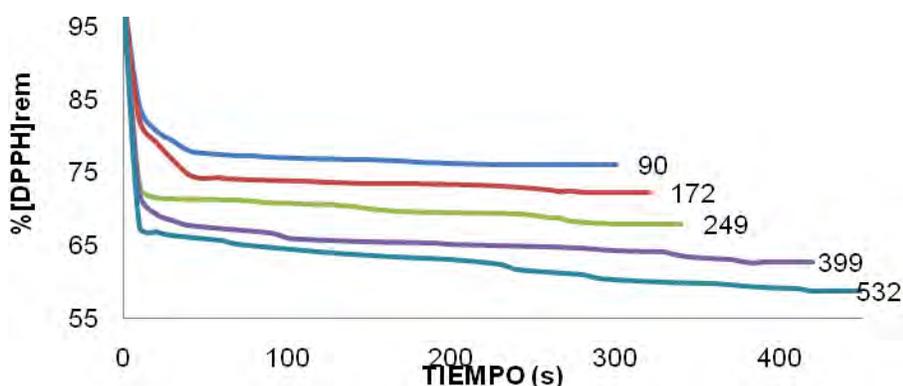
El AE de *C. candamarcensis* presentó una cinética de reacción intermedia. El tiempo que tarda el EC_{50} para alcanzar el estado estacionario varió en un intervalo de tiempo entre 240s en concentraciones bajas y 420s a concentraciones mayores. Ver gráfica 13.

Teniendo en cuenta el parámetro eficiencia antirradicalaria establecido por Sánchez, 1999 el cual relaciona los parámetros EC_{50} y $T_{EC_{50}}$ de compuestos antioxidante, la eficiencia antirradicalaria se clasifica como: bajos ($EA < 1 \times 10^{-3}$);

medios (EA entre 1×10^{-3} y 5×10^{-3}); altos (EA entre 5×10^{-3} y 10×10^{-3}) y muy altos (EA $> 10 \times 10^{-3}$).

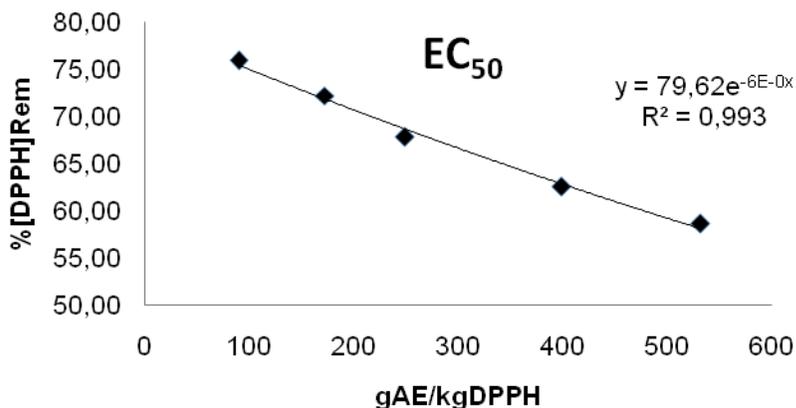
La actividad antirradicalaria que presentó el AE de *C. candamarcensis* fue baja de acuerdo a la clasificación que hace Sánchez, 1999. A pesar de que el AE presenta una cinética de reacción intermedia, el E_{C50} encontrado fue de 789,46 g de AE/Kg de DPPH (gráfica 14). Esto significa, que se necesita una concentración alta de AE para disminuir a la mitad la concentración del radical DPPH*. Además, el % de DPPH remanente no disminuye más del 50%, es decir, la concentración de los posibles compuestos antioxidantes presentes en el AE no alcanza a estabilizar más del 50% de DPPH* presente en el medio de reacción, incluso en tiempos prolongados (420s).

Gráfica 13. Cinética de la reacción del AE de *C. Candamarcensis* con el radical DPPH*.



Fuente: Esta investigación

Gráfica 14. Disminución de la concentración del DPPH* en función de la cantidad de AE (g) por kg del radical.

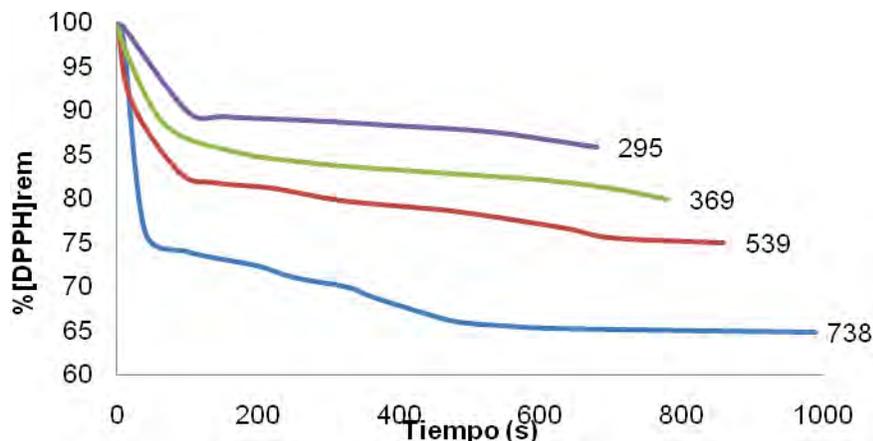


Fuente: Esta investigación

La baja actividad presentada del AE de *C. candamarcensis*, se pueden atribuir a la baja concentración de compuestos capaces de donar fácilmente hidrógenos para reducir el radical DPPH[•]. Se sugiere que su ligera capacidad antirradicalaria se deba a la presencia de compuestos como Nerolidol (1,3%), hexanol (1,1%) y octanol (2,2%). Este tipo de compuestos presentan características reductoras debido a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura, el cual puede actuar como donador de hidrógeno. Considerando la baja cantidad relativa (%) de este tipo de compuestos la contribución para reducir el radical DPPH[•].es baja.

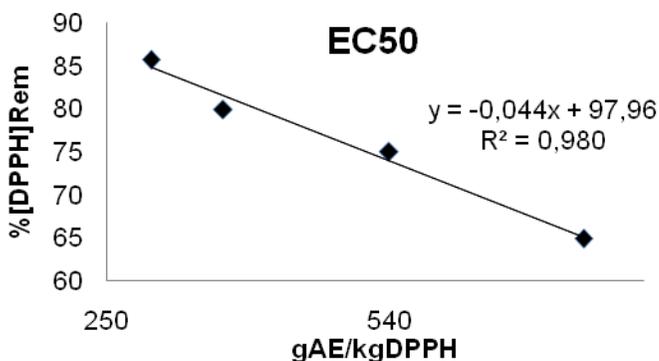
Por otro lado, la fracción F1 de *C. candamarcensis* presentó una cinética de reacción intermedia, el tiempo de reacción varió en un intervalo de tiempo de 14 en concentraciones bajas y 30min en concentraciones altas. Ver gráfica 14.

Gráfica 14. Cinética de la reacción del AE_{F1} de *C. candamarcensis* con el radical DPPH[•].



Fuente: Esta investigación.

Gráfica 15. Disminución de la concentración del DPPH[•] en función de la cantidad de AE (g) por kg del radical.



Fuente esta investigación.

De acuerdo a la clasificación que hace Sánchez, 1999, la actividad antirradicalaria que presentó la fracción F1 de *C. candamarcensis* fue baja. El EC₅₀ encontrado fue de 1078,156 g de AE_{F1}/Kg de DPPH (gráfica 15). Es importante notar que los datos obtenidos para AE_{F1} corresponden a un modelo lineal, (gráfica 15) lo cual sugiere un comportamiento diferente de captura de radicales para este tipo de mezcla.

A pesar de que la cinética de reacción del AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* es intermedia, el poder antirradicalario resultó ser bajo. Finalmente, se evidenció que la información obtenida por los dos métodos de evaluación de actividad antioxidante es congruente infiriendo que el AE y AE_{F1} no presenta un buen mecanismo de captura de radical y por lo tanto, su aplicación en productos propensos al deterioro oxidativo, eventualmente, no es muy atractivo desde el punto de vista comercial.

4.4.4 Determinación de la peroxidación del ácido linoleico. La peroxidación lipídica se relaciona con el ataque de radicales libres a los ácidos grasos insaturados, propagándose mediante un ciclo de reacción en cadena.¹⁴⁷

En esta investigación se realizó la peroxidación lipídica sobre una emulsión de ácido linoleico. Este compuesto es un ácido graso poliinsaturado con dos enlaces dobles, cuya característica estructural es 18:2 9,12; donde 18 es el número de átomos de carbono, 2 número de dobles enlaces y las cifras sucesivas al la posición de los dobles enlaces. Se empleó este ácido graso debido a que la susceptibilidad de la peroxidación lipídica aumenta conforme incrementa los niveles de insaturación en los ácidos grasos.

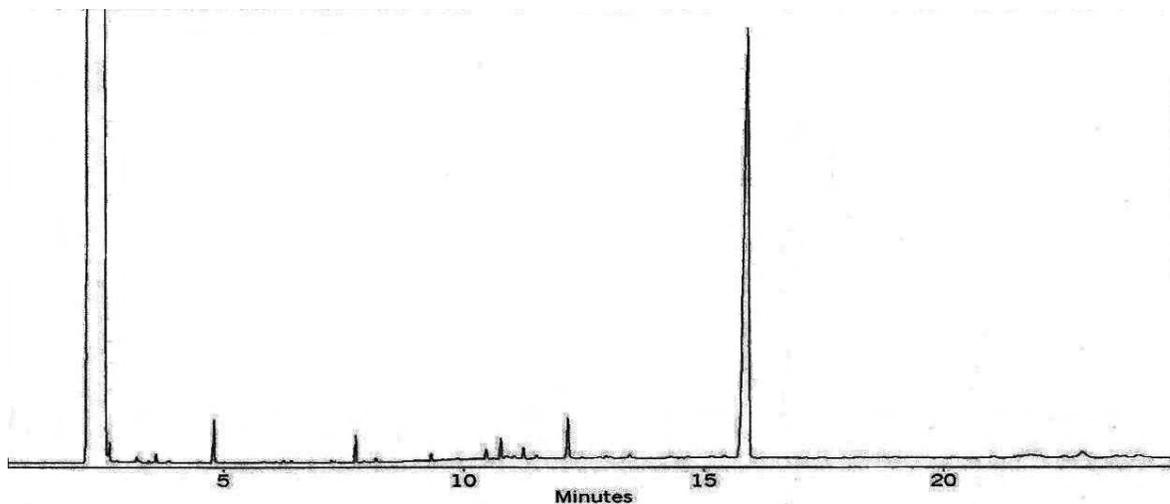
La peroxidación del ácido linoleico se indujo en presencia de oxígeno e iones Fe⁺². En esta oxidación se generan sustancias carbonílicas, entre ellas el hexanal, compuesto mayoritario que se forma durante la peroxidación. La cantidad de formación del mismo, puede emplearse como indicador del avance de la oxidación. Otro método alternativo es evaluar la cantidad de ácido linoleico que subsiste al ataque del oxígeno con respecto a un blanco de referencia. Este último aspecto se tuvo en cuenta en esta investigación.

La cuantificación de la oxidación del ácido linoleico se basó en la evaluación de las áreas cromatográficas generadas por su derivado (metil éster del ácido linoleico), realizando el control de acuerdo a la disminución relativa del área respecto al blanco (ácido linoleico sin sustancia de prueba). La identificación se realizó comparando el tiempo de retención de metil éster del ácido linoleico en cada sistema lipídico y el tiempo de retención de una muestra de ácido linoleico puro, la cual fue sometida a la derivación respectiva, (Ver figura 23).

¹⁴⁷ BAFNA, AR. MISHRA, S. Op. cit., p. 40

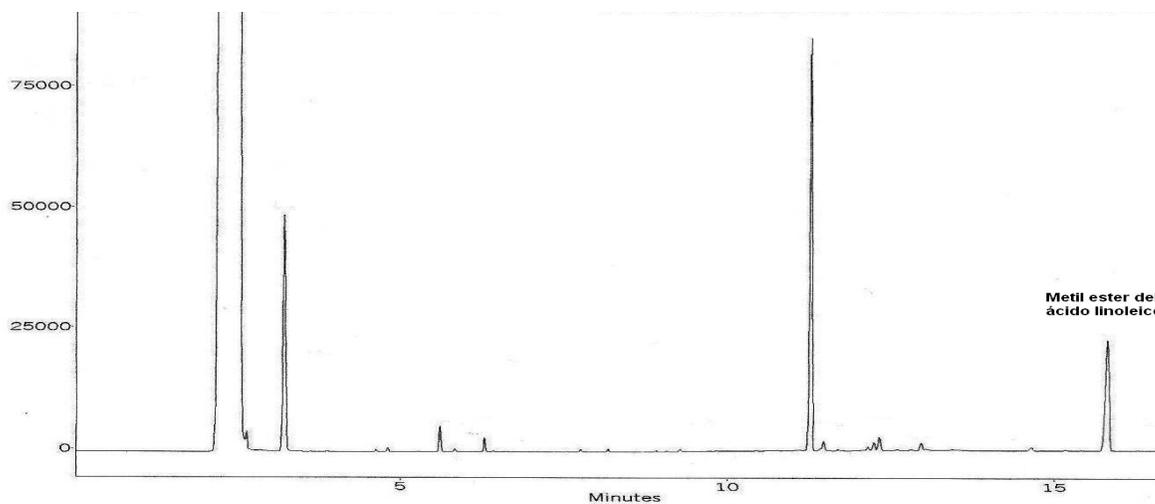
En la figura 23 se puede observar que el tiempo de retención del ácido linoleico puro sometido a derivación es de 15,932min. Este tiempo de retención se emplea para compararlo con los tiempos de retención de los derivados de metil éster del ácido linoleico que se sometieron a la peroxidación lipídica.

Figura 23. Perfil cromatográfico del ácido linoleico puro sometido a derivación



Fuente: Esta investigación.

Figura 24. Perfil cromatográfico del metil éster del ácido linoleico en el sistema lipídico sin antioxidante (blanco).



Fuente: Esta investigación

Para evidenciar la precisión del método cromatográfico utilizado en la identificación del éster del ácido linoleico, se evaluó la repetibilidad de los tiempos de retención inyectando por duplicado en el cromatógrafo de gases la respectiva muestra del sistema lipídico.

Tabla 28. Análisis de repetibilidad del tiempo de retención del éster del ácido linoleico en diferentes sistemas lipídicos.

Sustancia	Tiempo de retención ^a	S ^b	%CV ^c
Blanco	15,878	0,100	0,632
1,0g/L -tocoferol	15,962	0,042	0,261
2,5g/L -tocoferol	15,937	0,124	0,776
5,0g/L -tocoferol	15,937	0,159	0,998
10g/L -tocoferol	15,991	0,156	0,976
20g/L -tocoferol	16,078	0,076	0,475
AE	15,895	0,076	0,480
AE _{F1}	15,837	0,018	0,112

Fuente: Esta investigación

^a Promedio de dos mediciones ^b Desviación estándar ^c Porcentaje coeficiente de variación

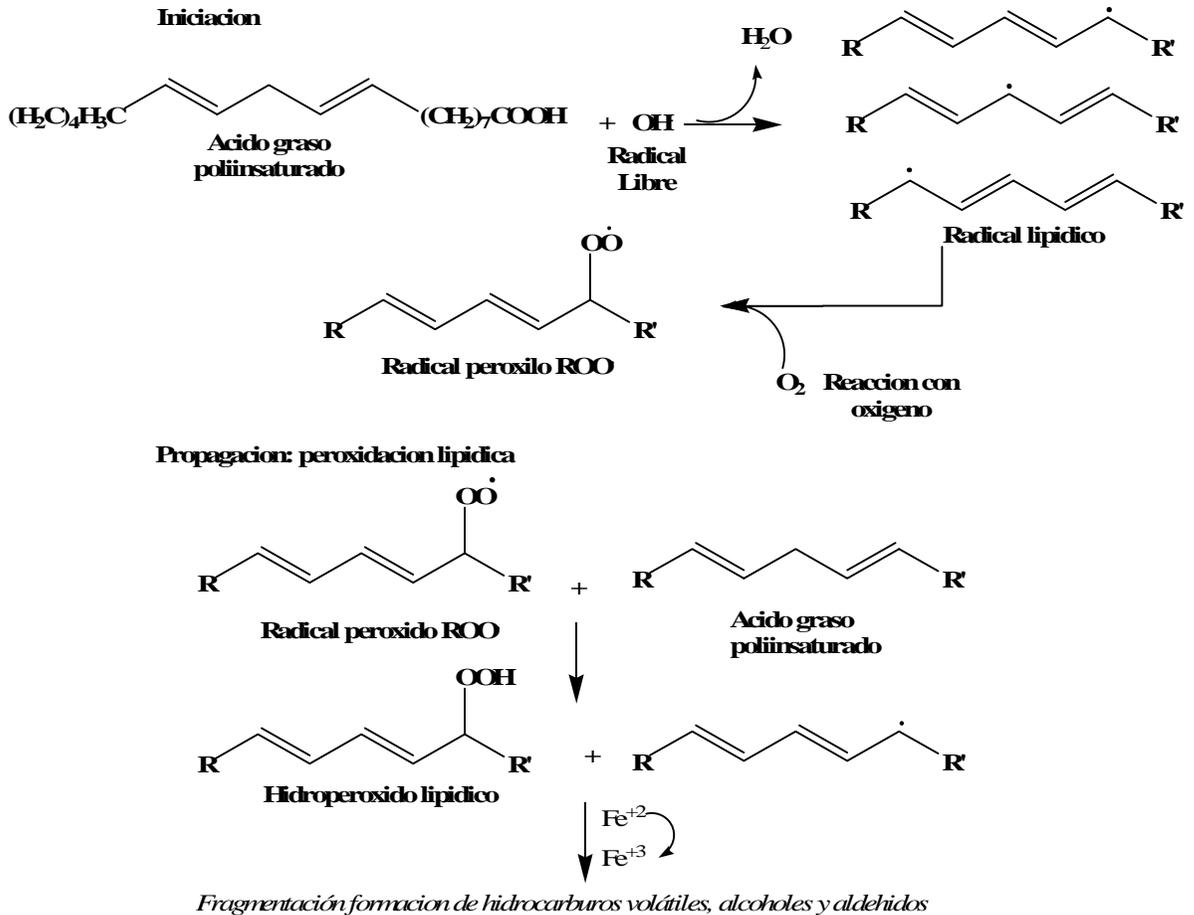
En la tabla 28, se muestran los %CV para los tiempos de retención del metil éster del ácido linoleico que se obtuvieron en el sistema lipídico: blanco, diferentes concentraciones de -tocoferol, AE y AE_{F1}. Se observa que el valor de estos porcentajes no excede el 2%, valor establecido por las normas BPL, ¹⁴⁸ así, este parámetro estadístico garantiza alta repetibilidad y confiabilidad en la obtención de resultados.

Cuando el hierro en estado reducido (Fe⁺²) suspendido en una solución amortiguadora de fosfatos, se adiciona a una emulsión de ácido linoleico, este puede estimular la formación del radical hidroxilo. Este radical es capaz de iniciar el proceso de peroxidación del ácido linoleico. Además, puede propagar dicho proceso mediante la reacción del Fe⁺² con los lipoperóxidos generados por la auto-oxidación de los radicales del ácido linoleico. Así, se generan como productos secundarios: hidrocarburos volátiles, alcoholes y aldehídos. Esta propagación se observa en el esquema 9.

Una vez iniciada la peroxidación del ácido linoleico se puede medir el avance de la reacción, correlacionando las áreas cromatográficas del ácido linoleico en el sistema lipídico sin antioxidante (blanco) y el sistema lipídico en presencia de antioxidante. El efecto protector que ejerce el antioxidante, es una medida de actividad antioxidante que provee cierta sustancia. En la tabla 29 se muestra el efecto protector observado para el AE, AE_{F1} y diferentes concentraciones de -tocoferol, ejercido en el sistema del ácido linoleico.

¹⁴⁸ GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP). Op. cit., p. 44

Esquema 9. Peroxidación lipídica del ácido linoleico.



Fuente: Casadevall, 2009.

Tabla 29. Efecto protector de AE, AE_{F1} de *C. candamarcensis* y -tocoferol contra la oxidación de la emulsión del ácido linoleico, inducida por O₂ y Fe⁺²

Sustancia	Área (cuentas) ^a	Efecto protector (%)	
		Experimental	Teórico ^b
Blanco	123140	0,0	-
1,0g/L -tocoferol	289990	57,536	23 ± 1,7
2,5g/L -tocoferol	234318	47,447	42,2 ± 0,8
5,0g/L -tocoferol	265142	53,557	55,3 ± 0,7
10g/L -tocoferol	420450	70,712	85 ± 2,5
20g/L -tocoferol	494607	75,103	72 ± 1,6
100% AE	6911	No presenta EP	-
100% AE _{F1}	115303	No presenta EP	-

Fuente: Esta investigación

^a Promedio de tres mediciones ^b Datos tomados de STASHENKO 2003. ^{EP} efecto protector

En la tabla 28 se puede observar que el efecto protector de α -tocoferol incrementa con el aumento de su concentración en el sistema, alcanzando valores altos a las concentraciones de 10g/L y 20g/L. En la figura 26 se muestra los cromatogramas del metil éster del ácido linoleico en presencia de diferentes concentraciones de α -tocoferol.

El modo de acción que presenta el α -tocoferol se relaciona con los valores altos de efecto protector. Los tocoferoles actúan a través de mecanismos de ruptura de cadena atrapando radicales alquilo, alcoxilo y peroxilo, y originan a su vez especies radicalarias antioxidantes, estabilizadas por resonancia y poco reactivas.¹⁴⁹

Por otra parte, en la tabla 28 también se observa el grado de protección ejercido por el AE de *C. candamarcensis* y la fracción AE_{F1}. Se observa que el AE de *C. candamarcensis* no presentó grado de protección (figura 27). Aunque el mecanismo de los AE no se conoce con toda certeza, se sugiere dos mecanismos de protección contra la peroxidación. El primero es a través de la degradación de terpenos (hidrocarburos insaturados). Estos compuestos pueden oxidarse más rápido y de esta manera protegen o retardan la oxidación del sustrato en este caso el ácido linoleico,¹⁵⁰ El segundo es mediante la rápida reacción entre los radicales peroxilo formados a partir de terpenos (HOO \cdot) y los radicales peroxilo de ácido linoleico (LOO \cdot).¹⁵¹

La composición mayoritaria del AE de *C. candamarcensis* son ésteres. Este tipo de compuestos no actúan bajo ninguno de estos mecanismos debido a la carencia de insaturaciones, sistema de conjugación ó compuestos que donen hidrógeno. Estas propiedades promueven la estabilización del nuevo radical formado. Por lo tanto, no es factible que este tipo de compuestos disminuya la concentración de los radicales peroxilo del ácido linoleico.

Además, en la figura 27 se evidencia que después de la adición del aceite esencial puro a la emulsión del ácido linoleico, el grado de oxidación del ácido linoleico incrementa. El área del ácido linoleico disminuye en mayor grado respecto a la del blanco, lo que sugiere que el tipo de compuesto presentes en el AE ejercen un efecto prooxidante. Además, en un estudio realizado por Ruberto, 2000, sugiere que la presencia de nerolidol y ésteres provocan un efecto pro-oxidante debido a las características moleculares que éstos presentan.¹⁵²

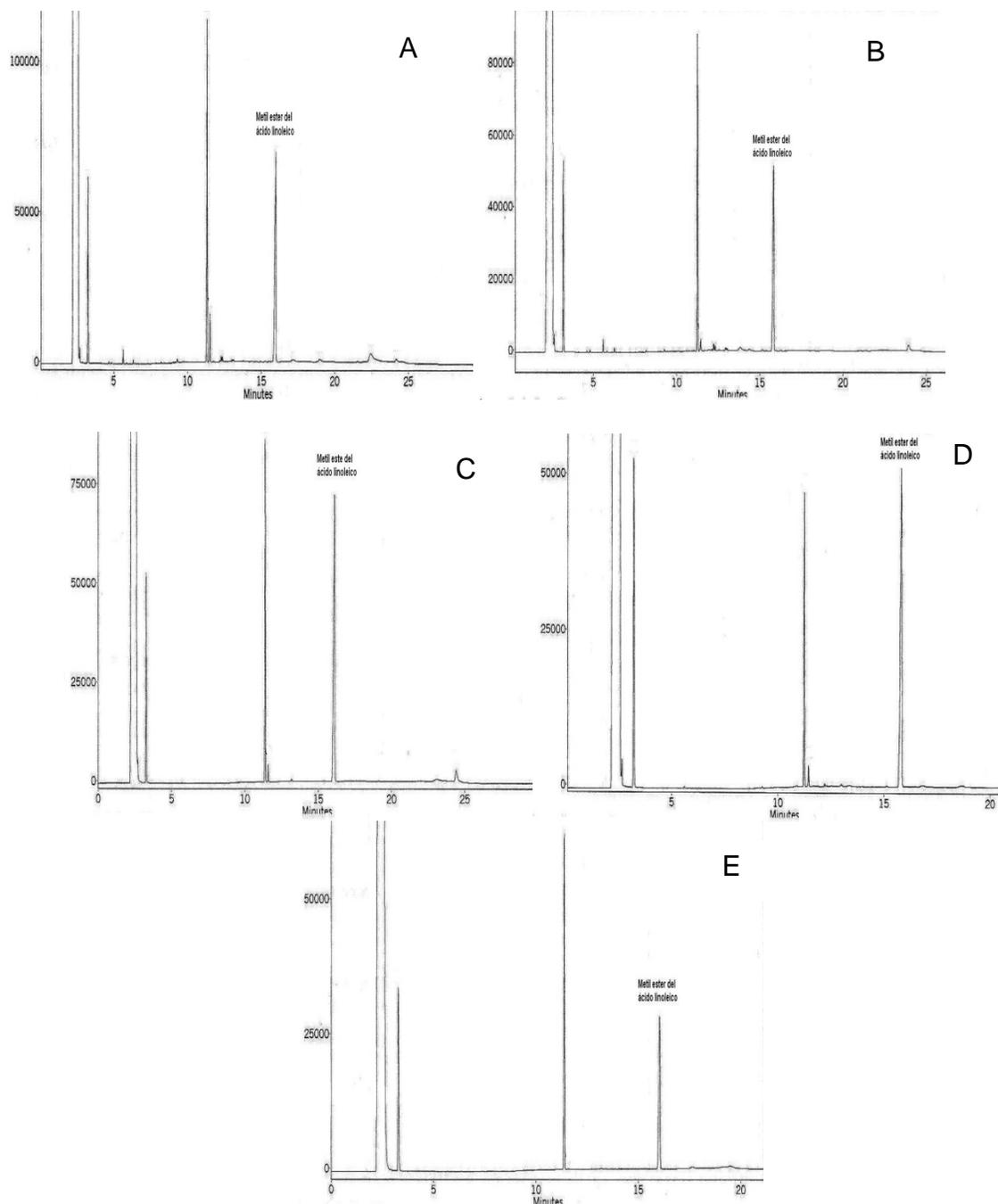
¹⁴⁹ TAFURT, G. y Colaboradores. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. 2005. pág. 50-54

¹⁵⁰ STASHENKO, E. y Colaboradores. Op. Cit., 40

¹⁵¹ TAFURT, G. y Colaboradores. Op. Cit., p. 100

¹⁵² RUBERTO, G. BARATTA, M. Op. cit., p. 32

Figura 25. Perfiles cromatográficos del metil éster del ácido linoleico con diferentes concentraciones de α -tocoferol.



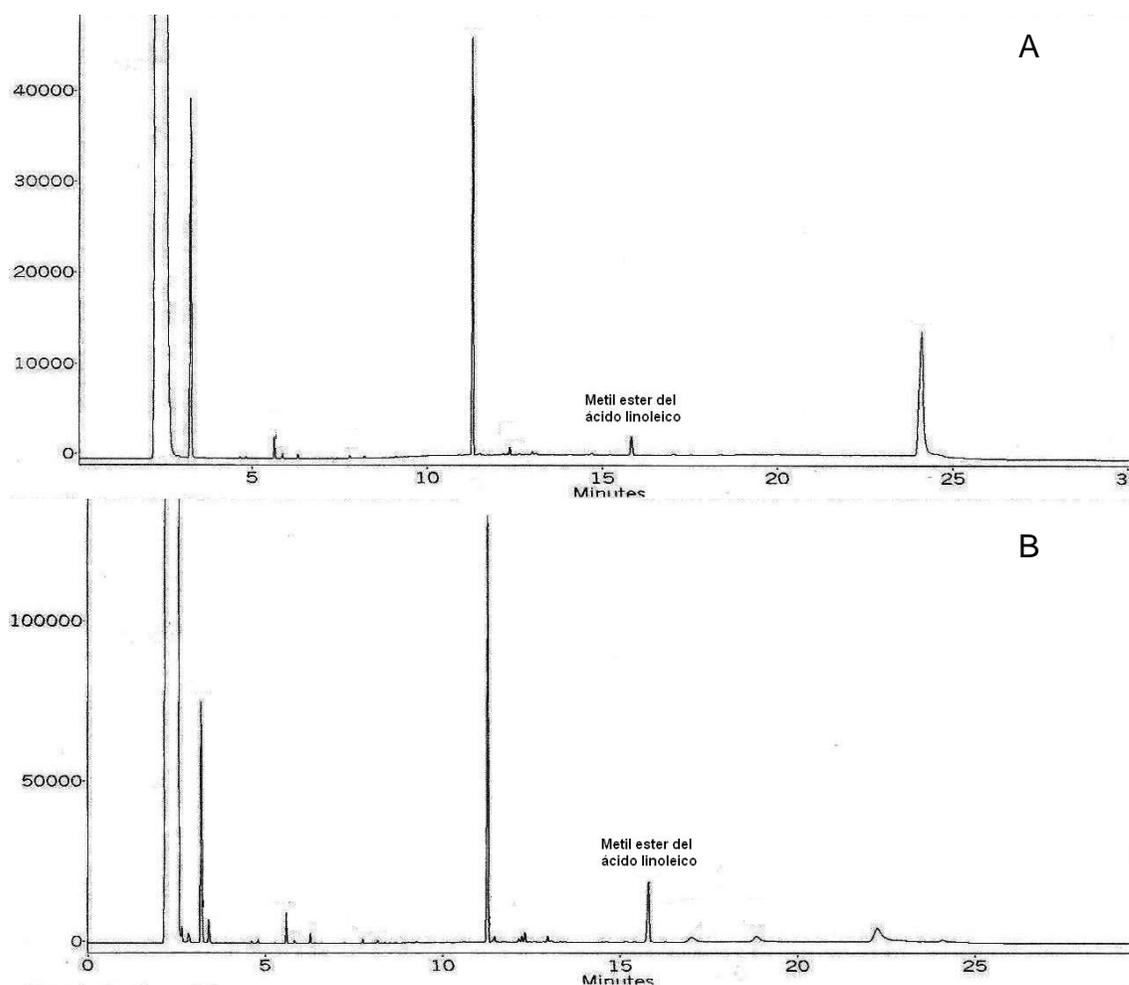
Fuente: Esta investigación.

Perfil cromatográfico del metil éster del ácido linoleico en el sistema lipídico en presencia de diferentes concentraciones de α -tocoferol A) 20,0g/L tocoferol B) 10,0g/L tocoferol, C) 5,0g/L tocoferol D) 2,5g/L tocoferol E) 1,0g/L tocoferol

La fracción 1 del AE de *C. candamarcensis* presentó mayor grado de protección respecto a AE puro (figura 27), Aunque no se observa efecto protector el mayor grado de protección de la fracción respecto al aceite puro se debe a la disminución en la cantidad de ésteres y ausencia de nerolidol.

Finalmente se concluye que el AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis* ejercen un efecto pro-oxidante en la peroxidación del ácido linoleico. Debido a este efecto, no sirven en la aplicación de productos propensos al deterioro oxidativo.

Figura 26. Perfil cromatográfico del metil éster del ácido linoleico en presencia del AE y AE_{F1} de *C. candamarcensis*.



Fuente: Esta investigación.

Perfil cromatográfico del sistema lipídico A) en presencia del AE B) en presencia de AE_{F1}

CONCLUSIONES

- ◆ El rendimiento del aceite esencial de frutos de la especie *Carica candamarcensis*, extraído por la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas fue bajo. Se obtuvo un valor de 0,02% p/p, porcentaje bastante bajo si se considera que el rendimiento de los aceites esenciales está por encima del 0.1% p/p.
- ◆ Los compuestos mayoritarios del AE de *Carica candamarcensis*, son hidrocarburos monoterpénicos. El 80% de los compuestos monoterpénicos identificados son ésteres alifáticos, sustancias usualmente presentes en los aceites esenciales y que contribuyen al aroma de los frutos. Entre ellos: caprilato de etilo, caprilato de butilo, butirato de etilo, caprilato de metilo, caproato de etilo y octadecatrienoato de etilo.
- ◆ La fracción del aceite esencial retenida en una columna C18 se identificaron como compuestos mayoritarios: caprilato de etilo, butirato de etilo, caprilato de butilo, caprilato de metilo y caproato de etilo.
- ◆ Mediante los métodos para medir capacidad antioxidante evaluados en este trabajo, tanto el aceite esencial como la fracción retenida en una columna C18, no presentaron actividad antioxidante importante en comparación a otros aceites esenciales y sustancias antioxidantes de referencia, como ácido ascórbico, ácido gálico y BHT. Mediante el ensayo ABTS^{•+} se encontró un TEAC para el AE de $0,458 \pm 0,04$ mmol trolox/kg AE y para la fracción un valor de $0,307 \pm 0,04$ mmol trolox / kg AE_{F1}. Para el ensayo DPPH se encontró una eficiencia antirradicalaria de $1,517 \times 10^{-4}$ y $3,608 \times 10^{-5}$ respectivamente. Esto evidencia que tanto el AE como la fracción obtenida no poseen eficientes componentes que generen capacidad antirradicalaria.
- ◆ En el ensayo de la peroxidación lipídica no se encontró un efecto protector. Por el contrario, se observó que el aceite esencial y la fracción de *Carica candamarcensis* presentaron un efecto pro-oxidante en un sistema lipídico de ácido linoleico. Esto posiblemente es debido a la presencia de compuestos como nerolidol y ésteres, aspectos ya publicados en la literatura científica.

RECOMENDACIONES

- ◆ Se necesita realizar un estudio más profundo de algunas variables o factores que afectan el rendimiento y producción del aceite esencial de *Carica candamarcensis*, por ejemplo, manejo agronómico y de esta forma, ofrecer un producto de alta calidad, con buen rendimiento de aceite y económicamente viable.
- ◆ Según la literatura científica el AE de *C. candamarcensis* mostró una fuerte actividad antibacteriana, se recomienda evaluar que tipo de mecanismos de acción afectan la actividad antibacteriana del aceite esencial, ya que es evidente que no lo hace mediante procesos de captura radical.
- ◆ Es necesario realizar un trabajo más detallado de las fracciones donde se obtenga familias de compuestos y se evalúen las propiedades antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

ACREE, T. ARN, H. Flavornet and human odor space. Gas chromatography - olfactometry (GCO) of natural products 2004. Citado en la página electrónica. <http://www.flavornet.org/>. Consultado el 15 de febrero de 2011.

ADAMS, R. Identificación of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. Allured publishing corporation. 2004. 469p.

BAFNA, A. MISHRA, S. In vitro antioxidant activity of methanol extract of rhizomes of *Curculigo orchioides* Gaertn. En: *Ars Pharm.* Vol. 46: 125-138p. 2005.

BAKKALI, F. AVERBECK, S. AVERBECK, D. IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. A review. En: *Food and Chemical Toxicology.* Vol 46: 446-475p. 2008.

BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Edición, Argentina, La Plata, 2000. 232p.

BAUER, K. GARBE, D. SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 5ª Edición. Germany: Wiley-Vch, Weinheim, 2006. 325 p.

BENITES, J. MOITEIRO, C. MIGUEL, G. ROJO, L. LÓPEZ, J. VENÂNCIO, F. RAMALHO, L. FEIO, S. Composition and biological activity of the essential oil of peruvian lantana camara. En: *Journal of the Chilean Chemistry Society.* Vol 54, N° 4. 379-384p. 2009.

BEKHIT, A. CHENG, V. MCCONNELL, M. ZHAO, J. SEDCOLE, R. HARRISON, R. Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion. En: *Food Chemistry.* Vol. 129: 837–845p. 2011.

BIOCOMERCIO SOSTENIBLE. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 2003. 109p.

BUGLIO, B. BEESLEY, T. SCOTT, R. Quantitative chromatographic analysis. 1ª Edición. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. 394p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. En: *International Journal of Food Microbiology.* Vol 94: 223–253p. 2004.

CARRASCO, R. ENCINA, C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. En: Revista Sociedad Química Perú. Vol 74: 108-124p. 2008.

CASADEVALL, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. 2009.

CASTILHO, R. KAPLAN, M. Volatile Components of Oiti Fruit (*Licania tomentosa Benth*). En: Records of Natural Products. Vol 4: 238-241p. 2010.

CASTILLO, B. GONZÁLEZ, R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. En: Revista Cubana de Farmacia. Vol 30. 1997.

CERPA, M. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid. 2007. 304p.

CORTÉS, C. ESTRADA, M. MANZO, S. SAAVEDRA, A. Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. En: Información tecnológica. Vol. 20: 71-81p. 2009.

DEVI, R. ARUMUGHAN C. Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. En: Food and Chemical Toxicology. Vol 45: 2014–2021p. 2007.

DEWICK, P. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. 3^a Edición. United Kingdom: John Wiley & Sons. 2009. 546p.

DIAZ, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphyllia (l'Her) Britton*, cultivada en tres regiones de Colombia. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química. Bucaramanga. 2007. 171p.

FERHAT, M. Meklati, B. Smadja, J. Chematb, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. En: Journal of Chromatography A. Vol 1112: 121–126p. 2006.

GARCIA, H. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. 2^o Tomo. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia. 1992. 271p.

GENELHU, M. ZANINI, M. VELOSO, I. CARNEIRO, A. LOPES, M. SALAS, C. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. En: Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol 31: 1129 – 1132p. 1998.

GIL, M. TOMAS, F. HESS-PIERCE, B. HOLCROFT, D. KADER, A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 48: 4581-4589p. 2000.

GOLMAKANI, M. REZAEI, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. En: Food Chemistry. Vol 109: 925–930p. 2008.

GÓMEZ, D. MORÁN, NANCELY. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica candamarcensis Hookerfilius*. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. 2005.

GÓMEZ, M. MELLO, V. RODRIGUEZ, K. BEMGUERER, M. FACA, V. SALAS, C. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. En: Planta Medical. Vol 71: 244-248p. 2005.

GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2009.

GULCIN, I. HUYUT, Z. ELMASTAS, M. ABOUL-ENEIN, H. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. En: Arabian Journal of Chemistry. Vol 3: 43–53p. 2009.

GUZMÁN, G. Guía para el cultivo de la papaya. (*Carica papaya* L). San José, Costa Rica. 1998. 138p.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. En: Biochemical Pharmacology. Vol. 49: 1341-1348p. 1995.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol. 46: 531–542p. 2009.

HALLIWELL, B. AESCHBACH, R. LOLIGER, J. ARUOMA, I. The Characterization of Antioxidants. En: Food Chemistry and Toxicology. Vol. 33: 601-617p. 1995.

HALLIWELL, B. WHITEMAN, M. Review: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? En: British Journal of Pharmacology. Vol. 142: 231–255p. 2004.

HENRIQUEZ, C. ALIAGA, C. LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. En: International Journal of Chemical Kinetics. Vol. 34: 659-665p. 2002.

HUANG, D. CHEN, H. LIN, Ch. LIN, Y. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. En: Botanical Bulletin of Academia Sinica, Vol. 46: 99-106p. 2005.

IDSTEIN, H. KELLER, T. SCHREIER, P. Volatile Constituents of Mountain Papaya (*Carica candamarcensis*, syn. *C. pubescens* Lenne et Koch) Fruit. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 33: 663-666p. 1985.

KAR, A. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. 2^a Edición. New Delhi: New Age International (P) Ltd., Publishers. 2007. 898p.

KITSON, F. LARSEN, B. McEWEN, C. Gas chromatography and mass spectrometry a practical guide. 1^a Edición. San Diego California: Copyright. 1996. 191p.

KOSAR, M. OZEK, T. GOGER, F. KURKCUOGLU, M. CAN BASER, H. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites. En: Pharmaceutical Biology. Vol. 43: 491–495p. 2005.

KULISIC. T. RADONIC. A. KATALINIC, V. MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. En: Food Chemistry. Vol 85: 633-640p. 2004.

LÓPEZ, M. Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismo bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Facultad de Química. 2008. 246p.

MCLAFERTTY, F. TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. 4^a Edición. Sausalito California. University Science Books. 1993. 330p.

MARGHITAS, L. STANCIU, O. DEZMIREAN, D. BOBIS, O. POPESCU, O. BOGDANOV, S. GRACA, M. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. En: Food Chemistry. Vol 115: 878–883p. 2009.

MARTÍNEZ, C. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. En: ARS Pharmaceutica. Vol. 39: 5-18p. 1998.

MARRIOTTA, P. SHELLIEA, R. CORNWELLB, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. En: Journal of Chromatography A. Vol 936: 1–22p. 2001.

MAU, J. LAI, E. WANG, N. CHEN, CH. CHANG, CH. CHYAU, CH. Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. En: Food Chemistry. Vol 82: 583–591p. 2003.

MENA, J. YEPEZ, M. SANTACRUZ, A. NOGUERA, E. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. En: Centro de Estudios en Salud. Universidad de Nariño. Año5. Vol 5. 13-21p. 2005.

MENA, J. EMBUS, C. ROSERO, V. NAVARRO, J. ORTIZ, I. YÉPEZ, M. Evaluación del potencial citotóxico, mutagénico y genotóxico de extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis* Hook. En: Iatreia, Revista médica Universidad de Antioquia. Vol. 23, N° 4-S. 2010.

MIGLIORE, L. COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. En: Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Vol. 674: 73–84, 2009.

MILLER, J.C. MILLER, J.N. Estadística para química analítica. Segunda edición. Editorial. Addison-Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware, E.U.A. 1993. 113p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: Songklanakarin Journal of Science and Technology. Vol. 26: 211-219p. 2004.

MORALES, A. DUQUE, C. Aroma constituents of the fruit of de mountain papaya (*Carica pubescens*) from Colombia. En: Journal agricultural of food chemistry . Vol. 35: 538-540p. 1987.

MUÑOZ, A. KOUZNETSOV, V. STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol. En: Salud UIS. Vol 41: 287-294p. 2009.

OPREAN, R. TAMAS, M. SANDULESCU, R. ROMAN, L. Essential oils analysis. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol 18: 651–657p. 1998.

PARÉ, J. BÉLANGER, J. Microwave-assisted process (MAPTM)^a: A new tool to the analytical laboratory. En: Trends in analytical chemistry. Vol 13: 176-184p. 1994.

PASCUAL, M. SLOWING, K. CARRETERO, E. SANCHEZ, D. VILLAR, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. En: Journal Ethnopharmacy. Vol 76: 204-214p. 2001.

PAULI, A.; Antimicrobial properties of essential oil constituents. En: International Journal of Aromatherapy. Vol 11: 126-133p. 2001.

PEREIRA, M. LOPES, M. MEIRA, W. SALAS, C. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. En: Protein Expression Purification. Vol 22: 249-257p. 2001.

PUERTAS, M. HILLEBRAND, S. STASHENKO, E. WINTERHALTER, P. In Vitro radical scavenging activity of essential oils from columbian plants. En: Journal of Flavour and Fragrance. Vol 17. 2002. 380p.

RAMOS, A. VISOZO, A. PILOTO, J. GARCÍA, A. RODRÍGUEZ, C. RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. En: Journal of Ethnopharmacy. Vol 87: 241-246p. 2003.

RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. RICE, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol. 26: 1231–1237p. 1999.

RUBERTO, G. BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. En: Food Chemistry. Vol. 69: 167-174p. 2000.

SACCHETTI, G. MAIETTI, S. MUZZOLI, M. SCAGLIANTI, M. MANFREDINI, S. RADICE, M. BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. En: Food Chemistry. Vol. 91: 621–632p. 2005.

SAÍZ, M. GIRAL, N. Obtención y aplicación de extractos naturales. Centro nacional de tecnología y seguridad alimentaria. Laboratorio del EBRO. San Adrian, Navarra. 2010.

SALAS, E. PAZ, M. SCHNAIDERMAN, A. Papaya curativa. Universidad Federal de Minas Gerais. 2004. 156p.

SANCHEZ, C. LARRAURI, J. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols- En: Journal of Science Food Agriculture. Vol. 78: 270-276p. 1998.

SARIKURKCU, C. ARISOY, K. TEPE, B. CAKIR, A. ABALI, G. METE, B. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. En: Food and Chemical Toxicology. Vol. 47: 2479–2483p. 2009.

SATYAJIT, S. LUTFUN, N. Chemistry for Pharmacy Students. General, Organic and Natural Product Chemistry. 1ª Edición. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 398p.

SILVA, C. GOMES, M. FERREIRA, R. RODRIGUES, K. VAL, C. LOPES, M. MELLO, V. SALAS, C. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. *Planta Med.* Vol. 69: 926-932p. 2003.

SILVERSTEIN, R. WEBSTER, F. Spectrometric identification of organic compounds. 6ª Edición. 1997. 476p.

SINGH, S. SINGH, R. P. *In Vitro* Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. En: *Food Reviews International*. Vol. 24,(4): 392-415p. 2008.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? En: *Comptes Rendus Biologies*. Vol 327: 649–662p. 2004.

STASHENKO, E. JARAMILLO, B. MARTINEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. En: *Revista académica colombiana de ciencias*. Vol. 27: 579-597p. 2003.

STASHENKO, E. JARAMILLO, B. MARTINEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. En: *Journal of Chromatography A*. Vol 1025: 93–103p. 2004.

SURBURG, H. PANTEN, J. Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. 5ª Edición: Wiley-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA, Weinheim. 2006. 325p.

TAFURT, G. MARTÍNEZ, J. STASHENKO, E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. En: *Revista colombiana de química*. Vol. 34: 43-55p. 2005.

URBINA, A. Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja? *Colombia Médica*. Vol. 39. Nº 3: 266-275p. 2008.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico. Anexo 3. Informe 36, 2002. Citado en la página electrónica: www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en.

VEGA, S. La agricultura Andina. Frutales andinos. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú. 2005.

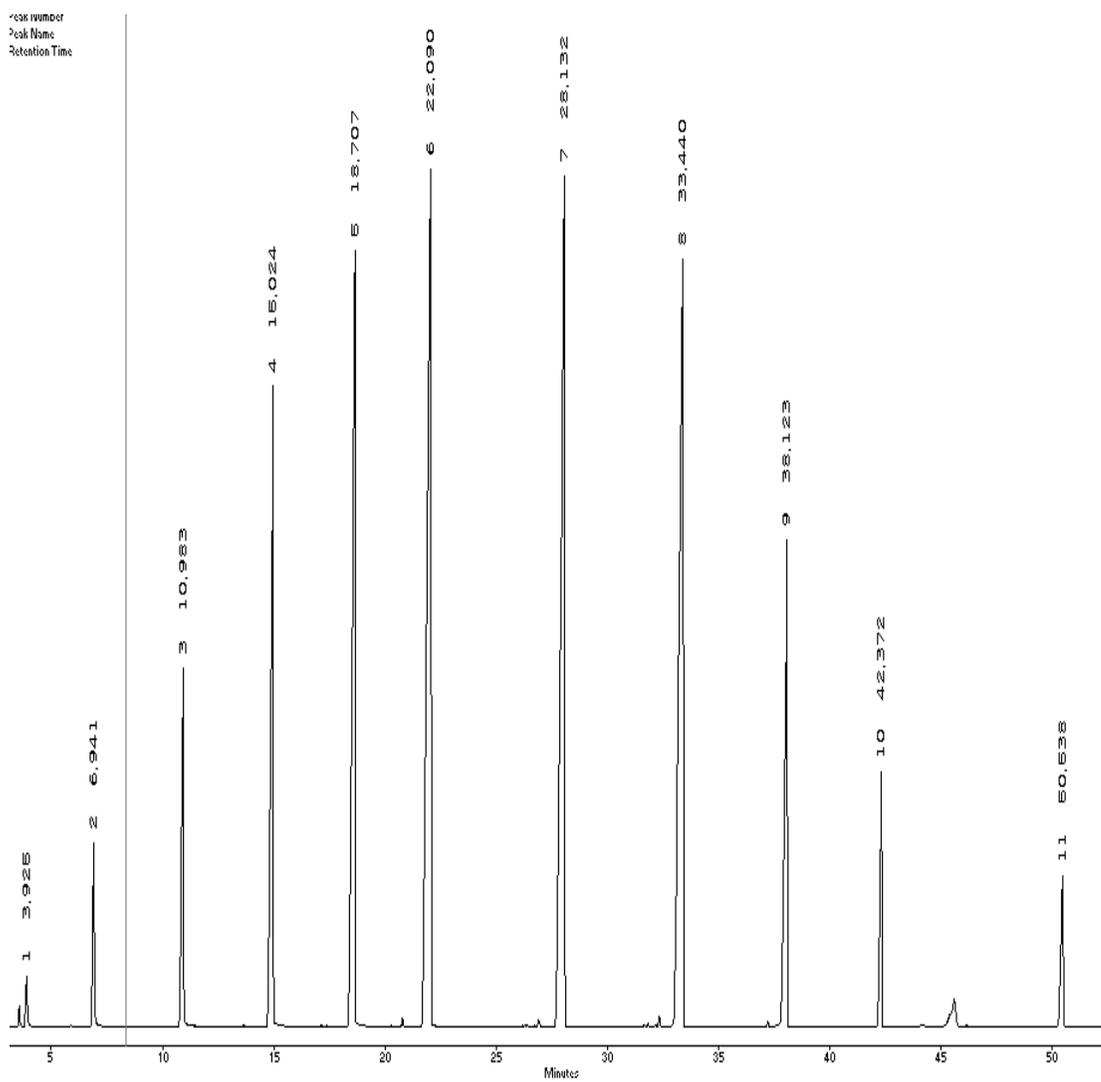
WALREAVENS, V. JAZIRI, M. VAN, J. SECHNEK, A. KLEINSCHMIDT, T. LOOZE, Y. Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. En: Biological Chemistry Hoppe-Seyler. Vol 374: 501–506p. 1993.

WILLIAMS, B. CUVELIER, M. BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. Vol. 28: 25-30p. 1995.

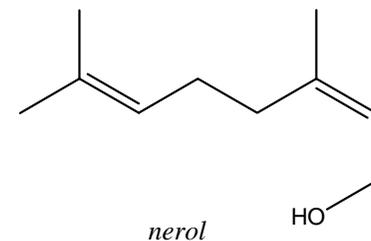
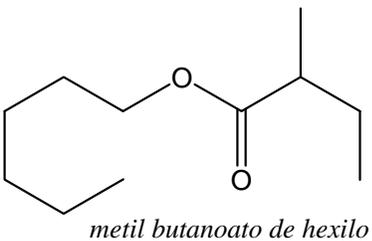
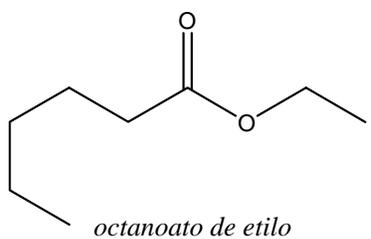
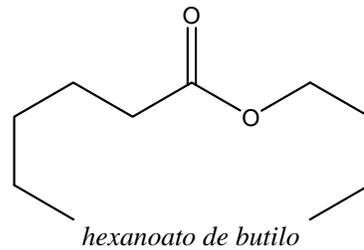
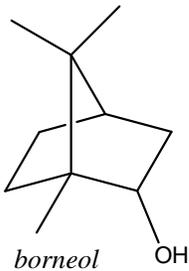
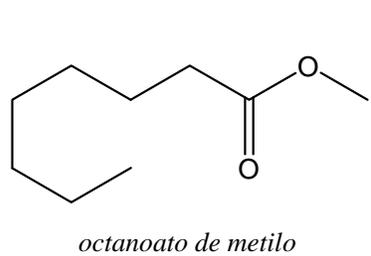
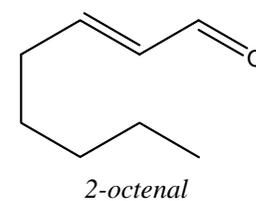
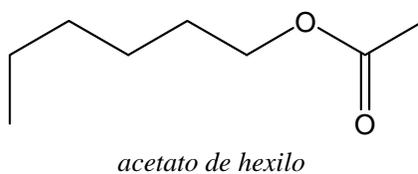
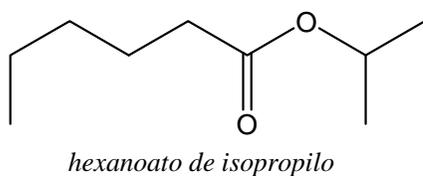
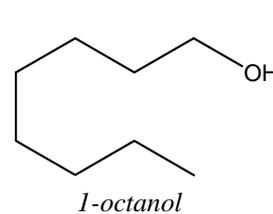
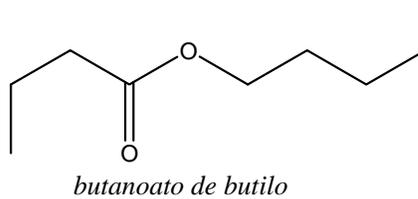
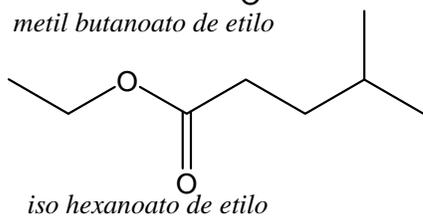
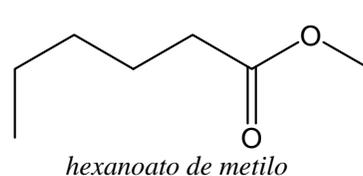
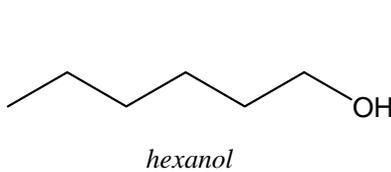
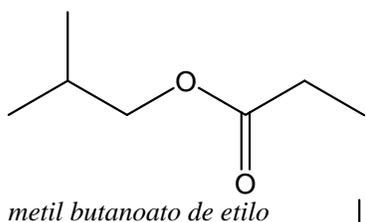
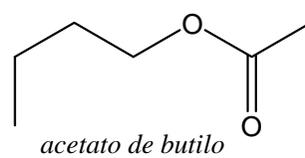
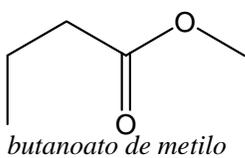
ZULUETA, A. ESTEVE, M. FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. En: Food Chemistry. Vol 114: 310–316p. 2009.

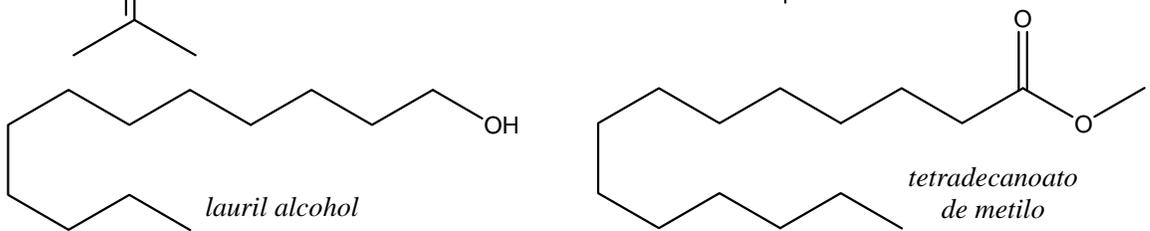
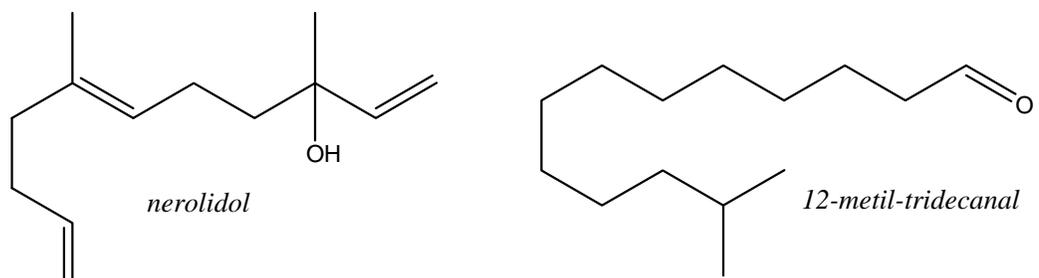
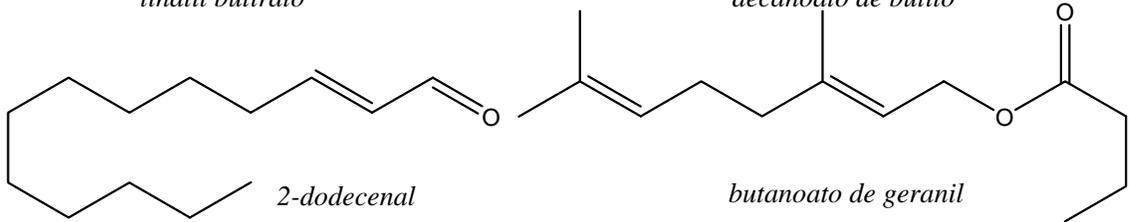
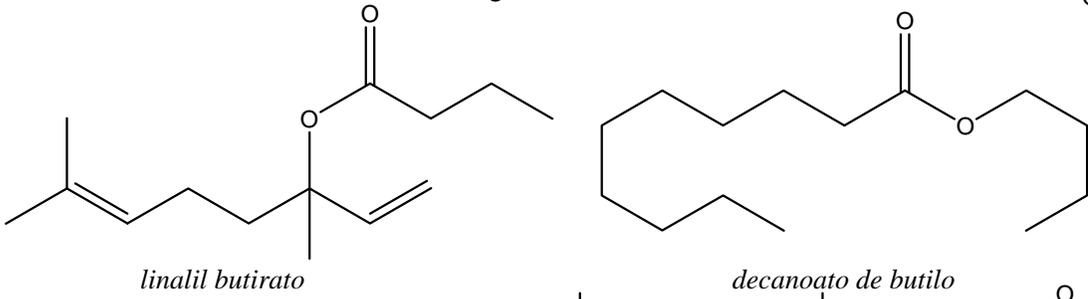
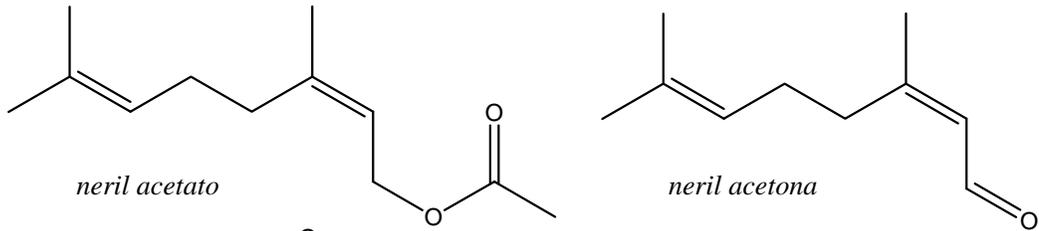
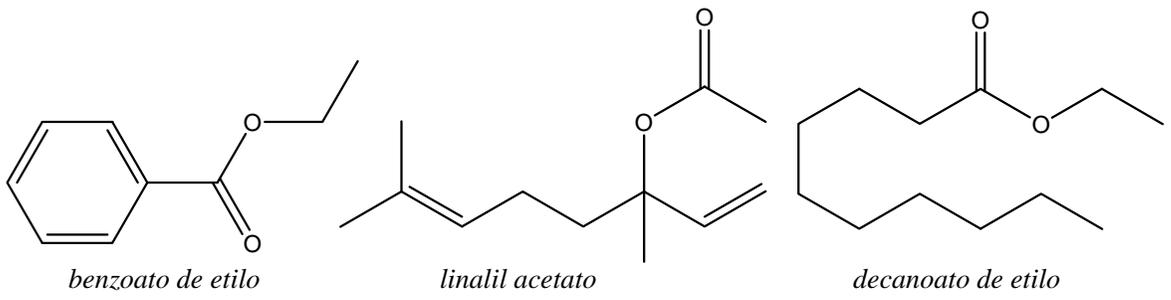
ANEXOS

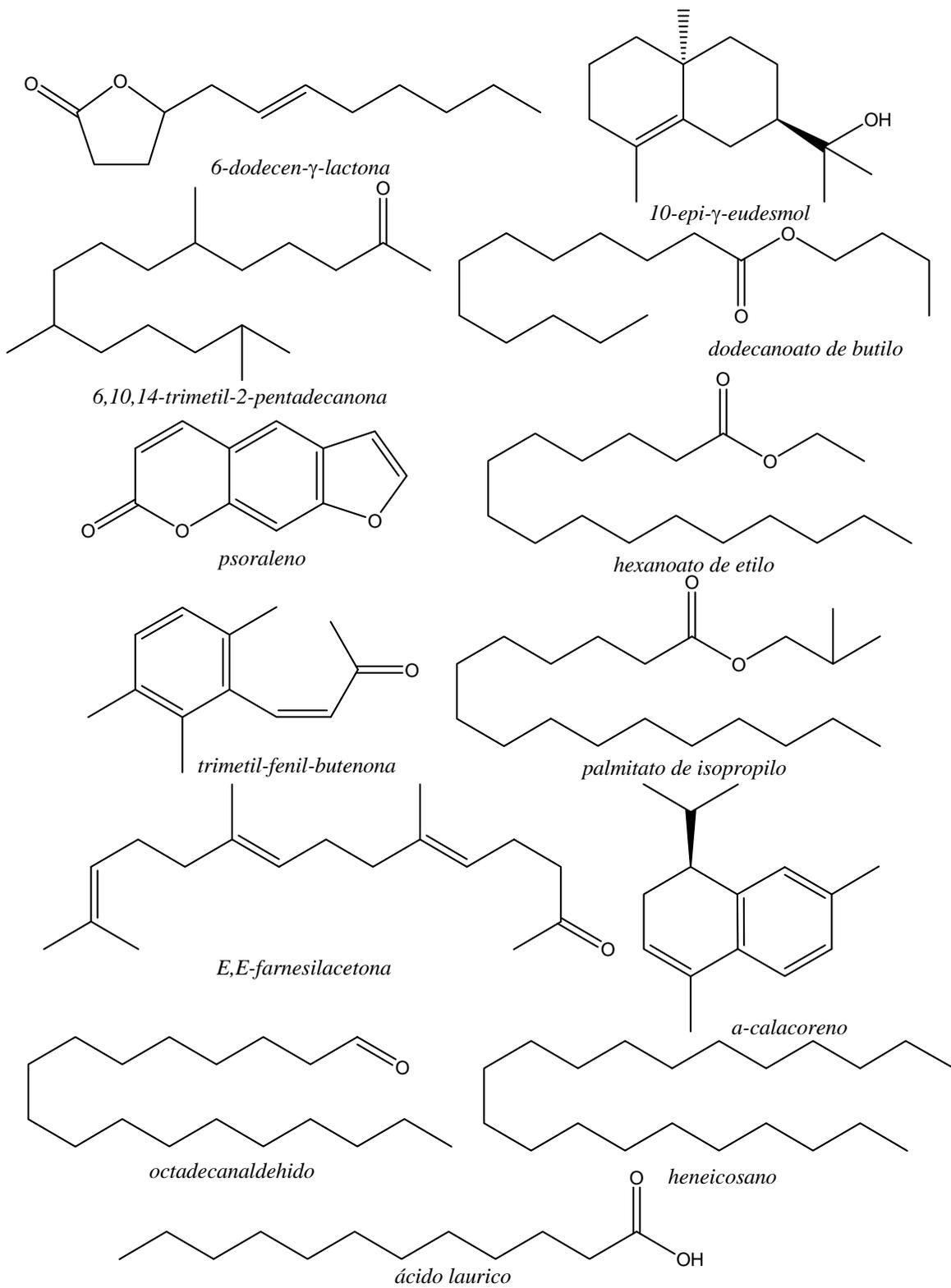
Anexo A. Perfil cromatográfico (CG-FID) de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₇ hasta C₃₂



Anexo B. Estructuras moleculares de los compuestos identificados preliminarmente por CG/FID del AE de *C. candamarcensis*

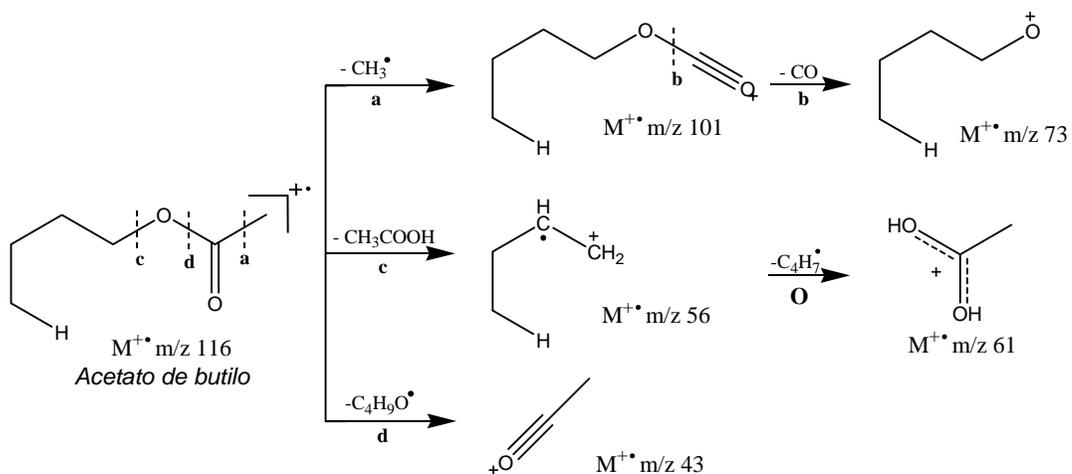
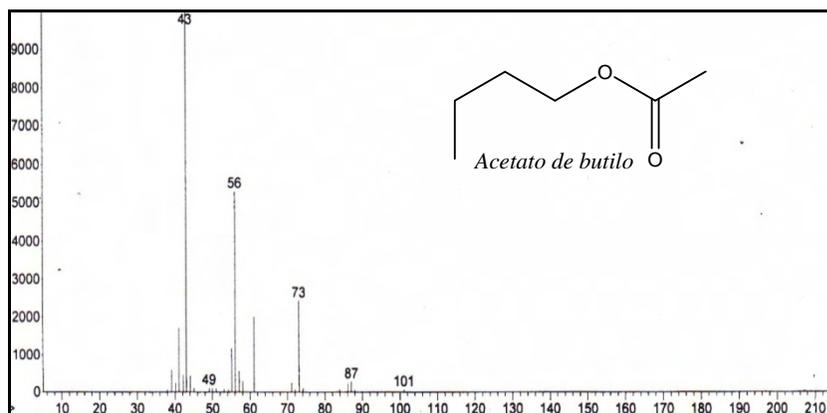




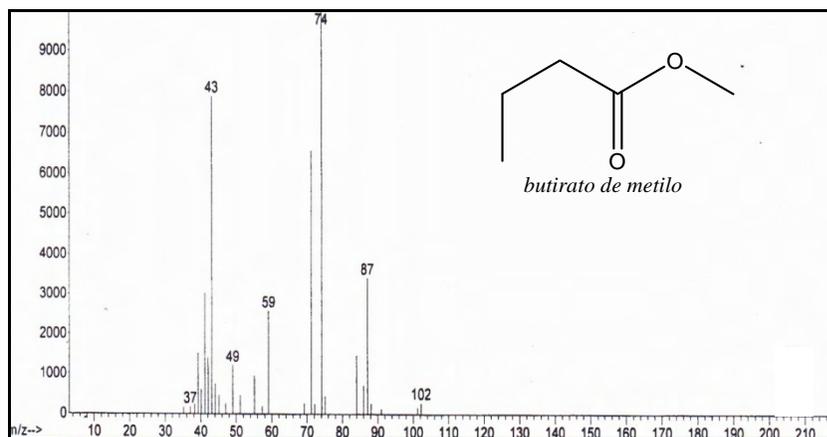


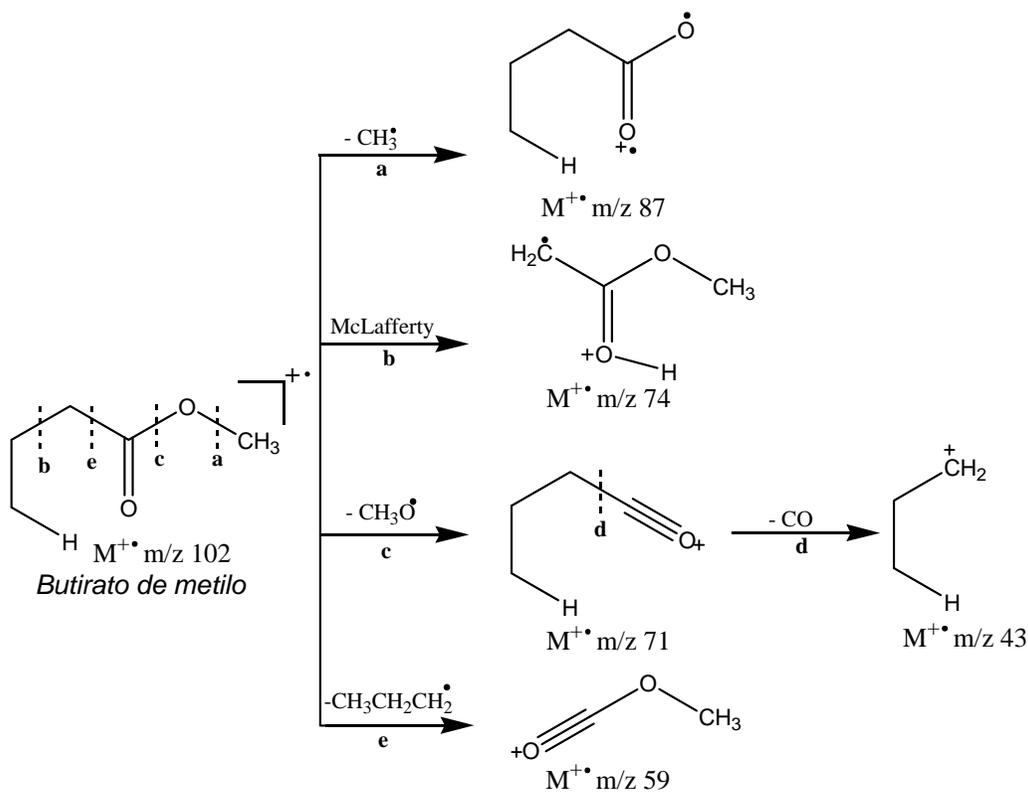
Anexo C. Espectros de masas y posibles mecanismos de fragmentación de los compuestos del AE de *C. Candamarcensis* identificados por CG/EM

Acetato de butilo

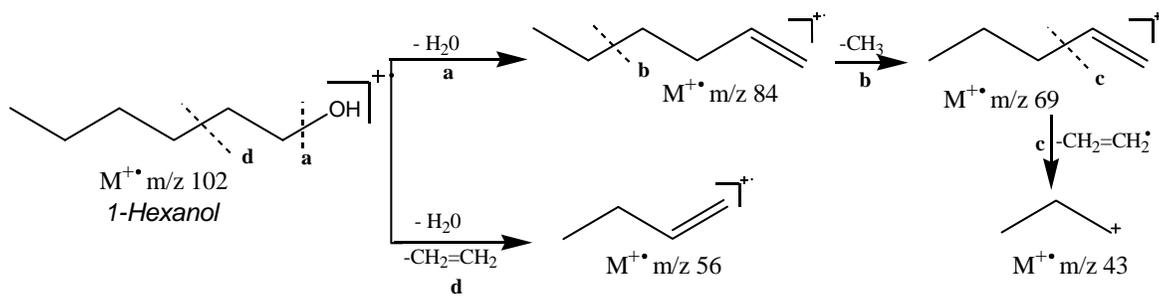
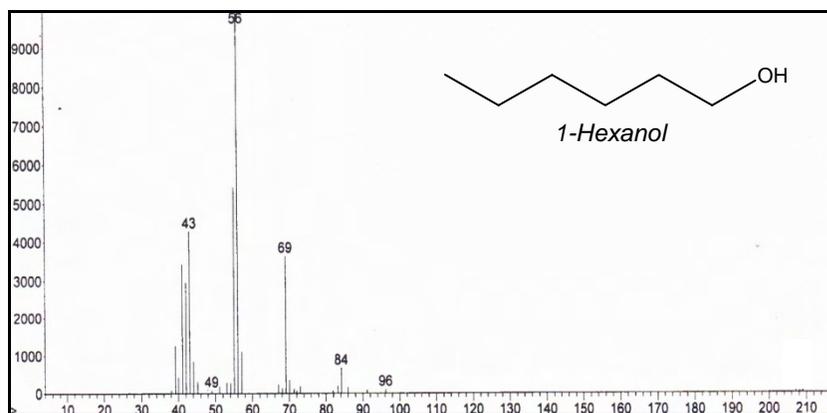


Butirato de metilo

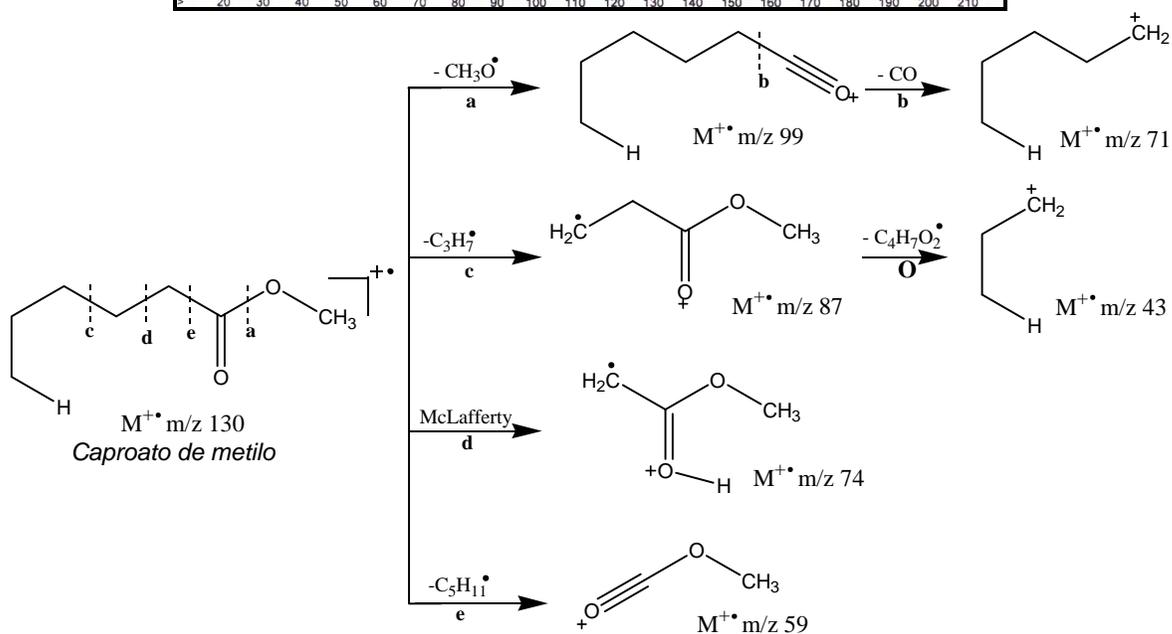
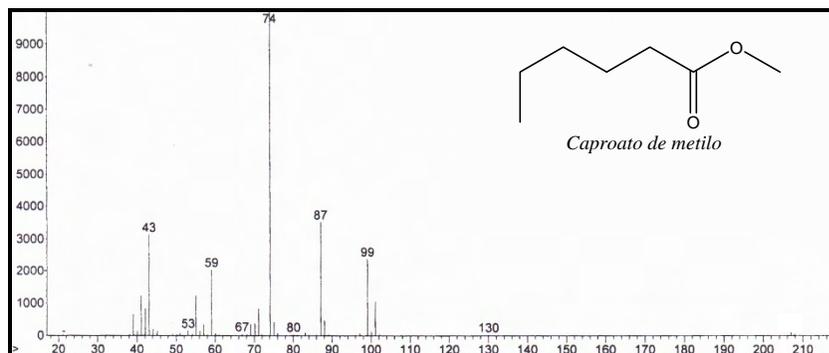




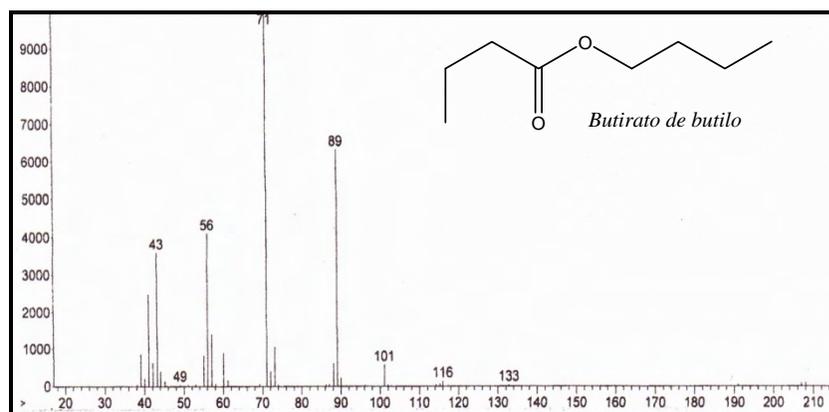
Hexanol

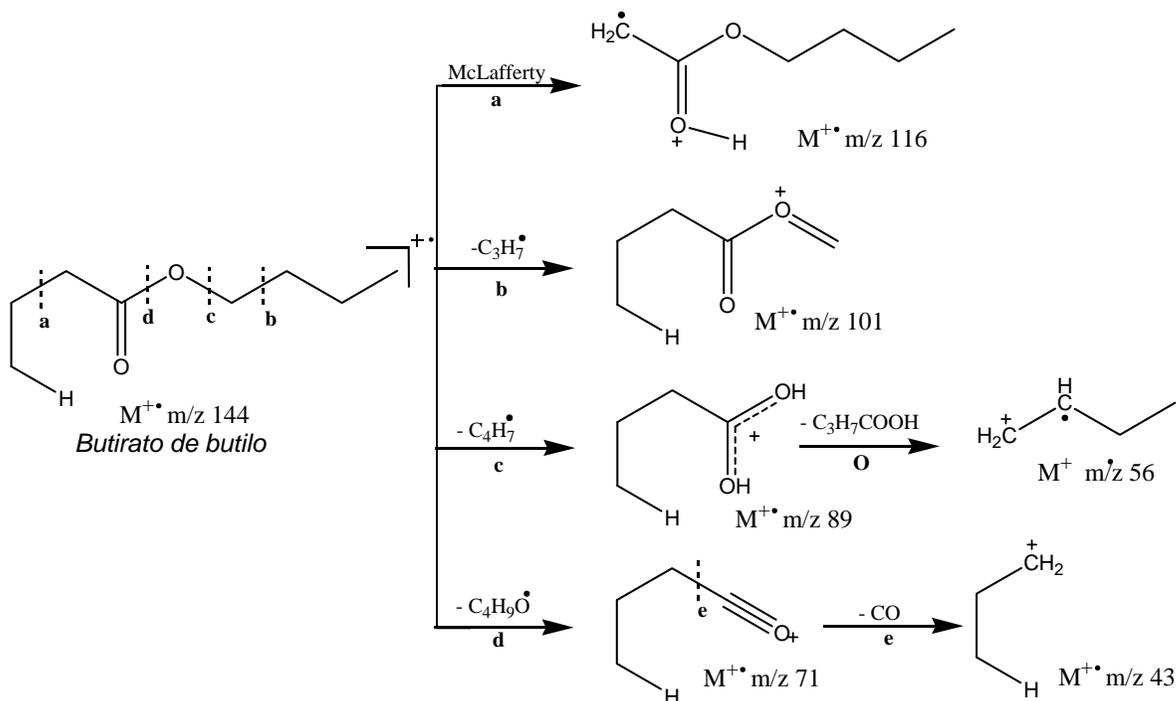


Caproato de metilo

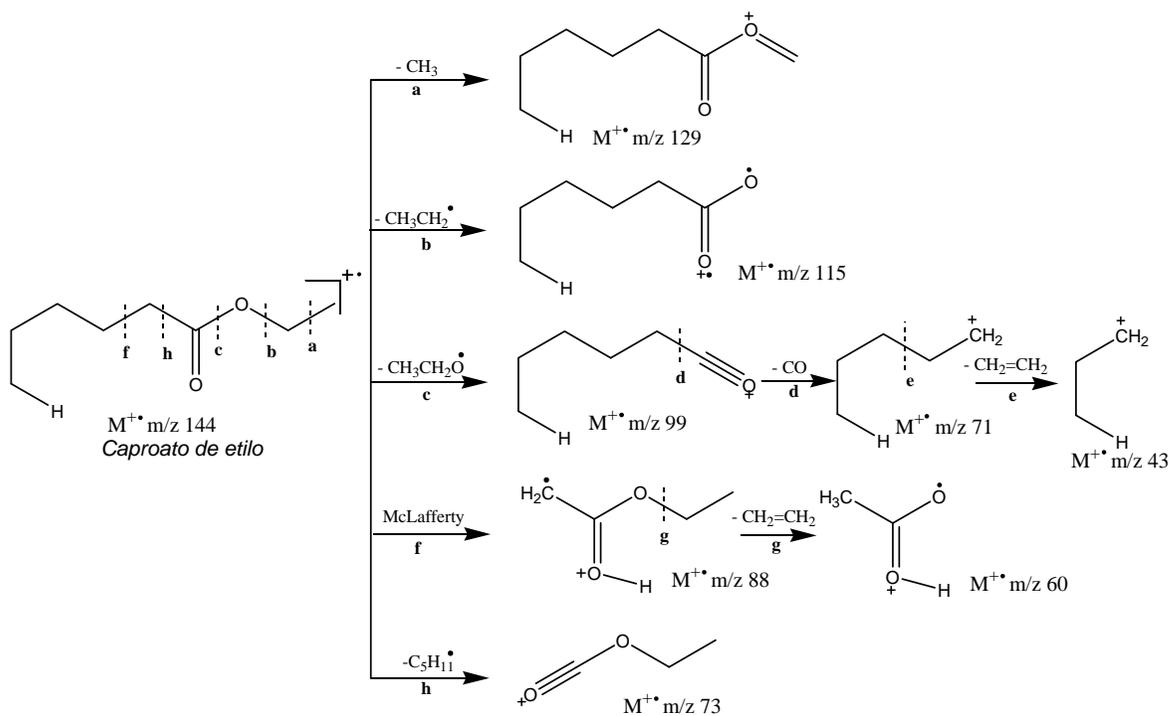


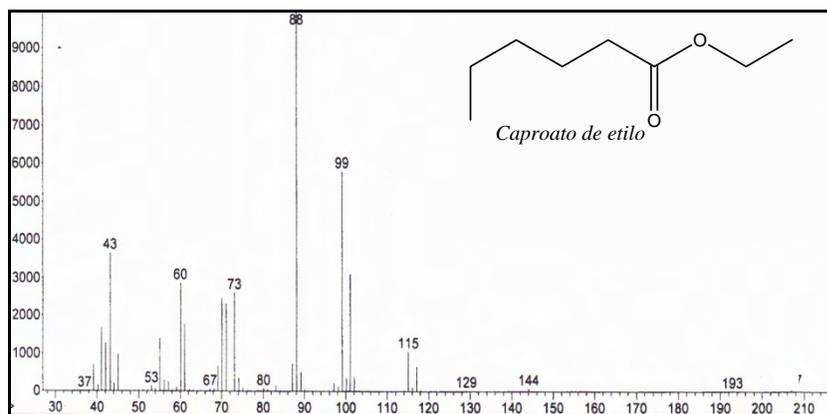
Butirato de butilo



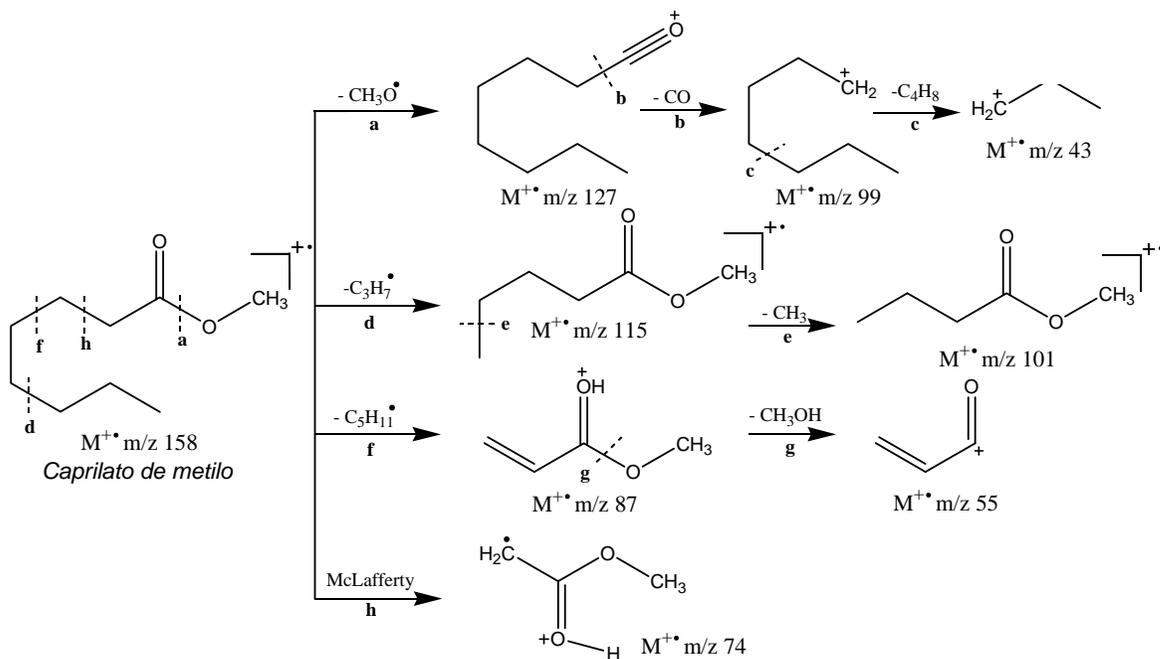
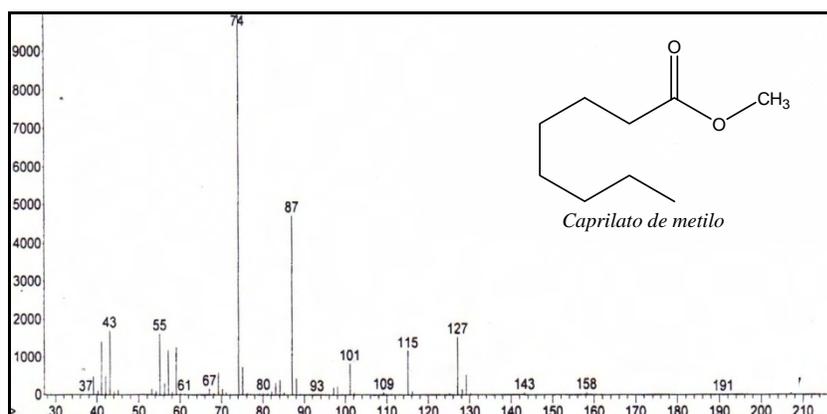


Caproato de etilo

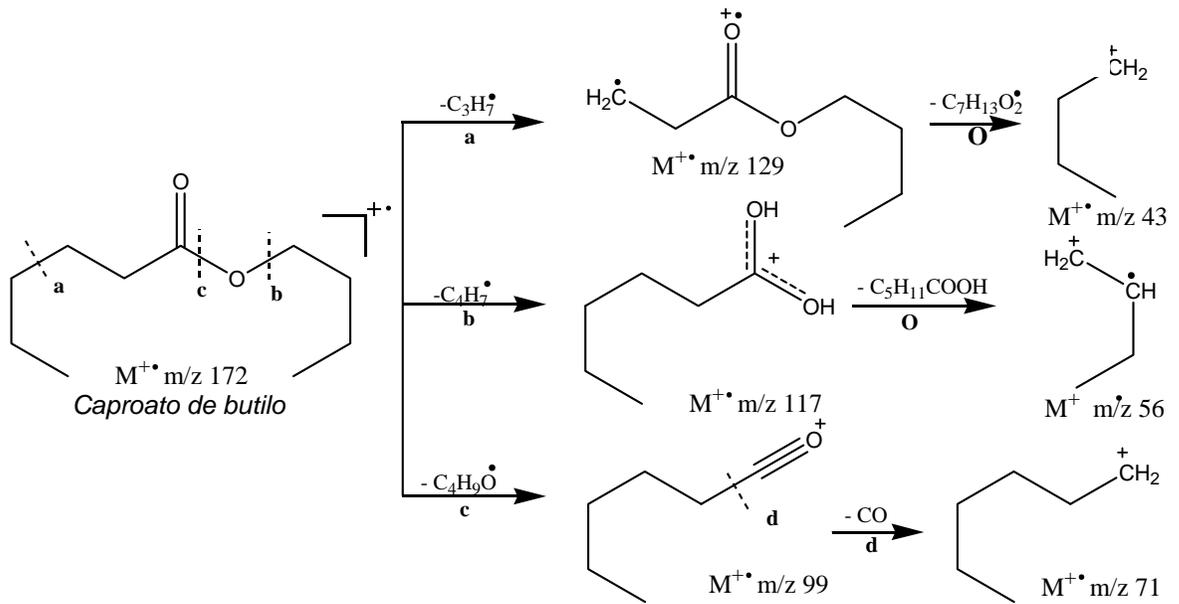
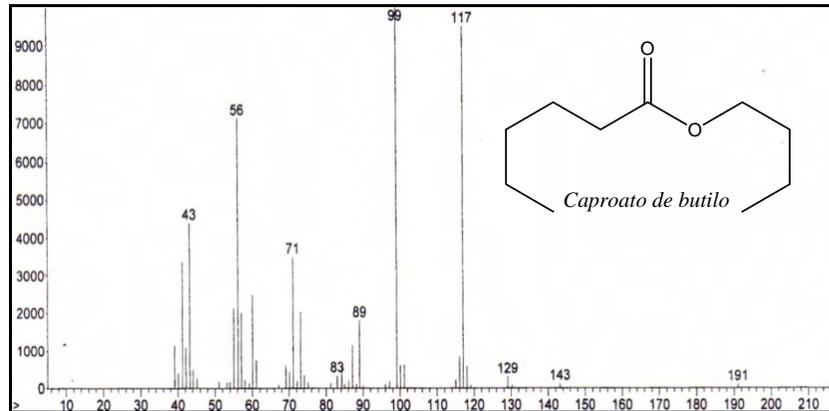




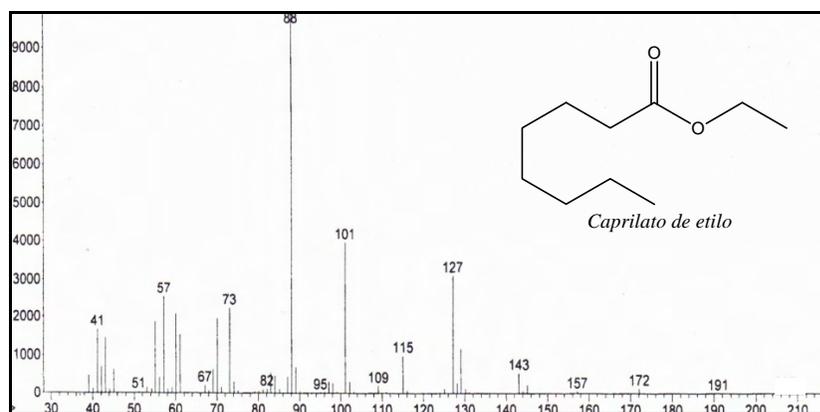
Caprilato de metilo

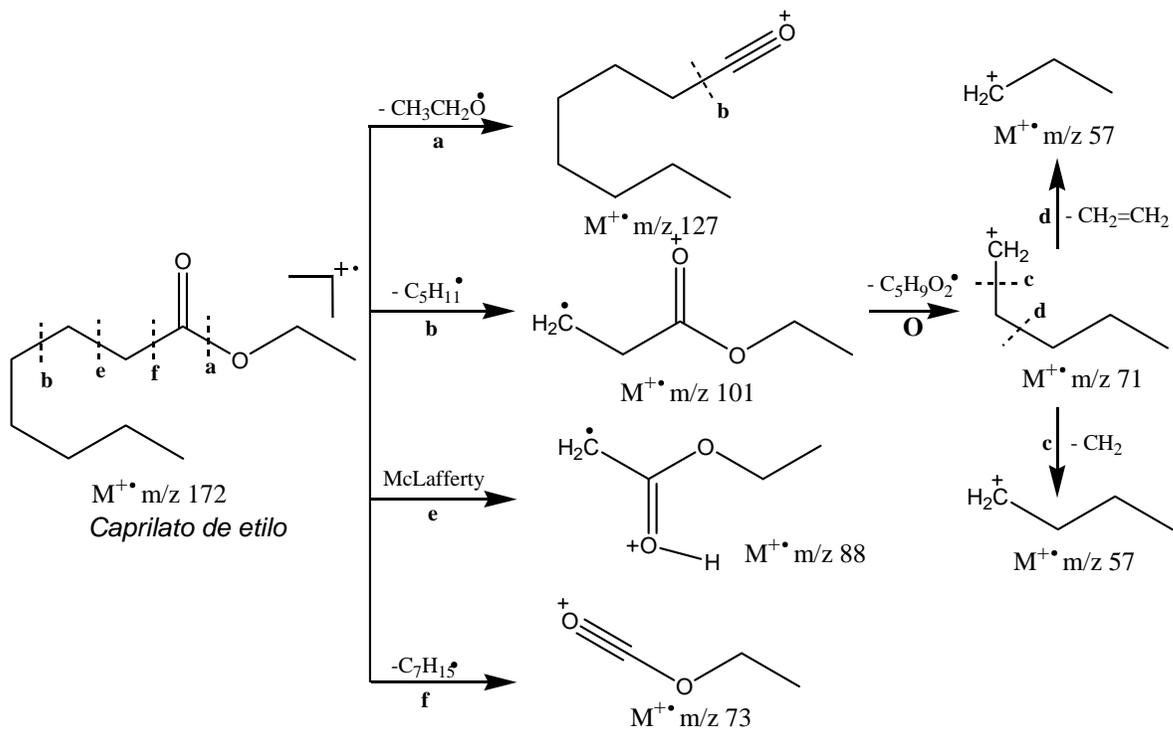


Caproato de butilo

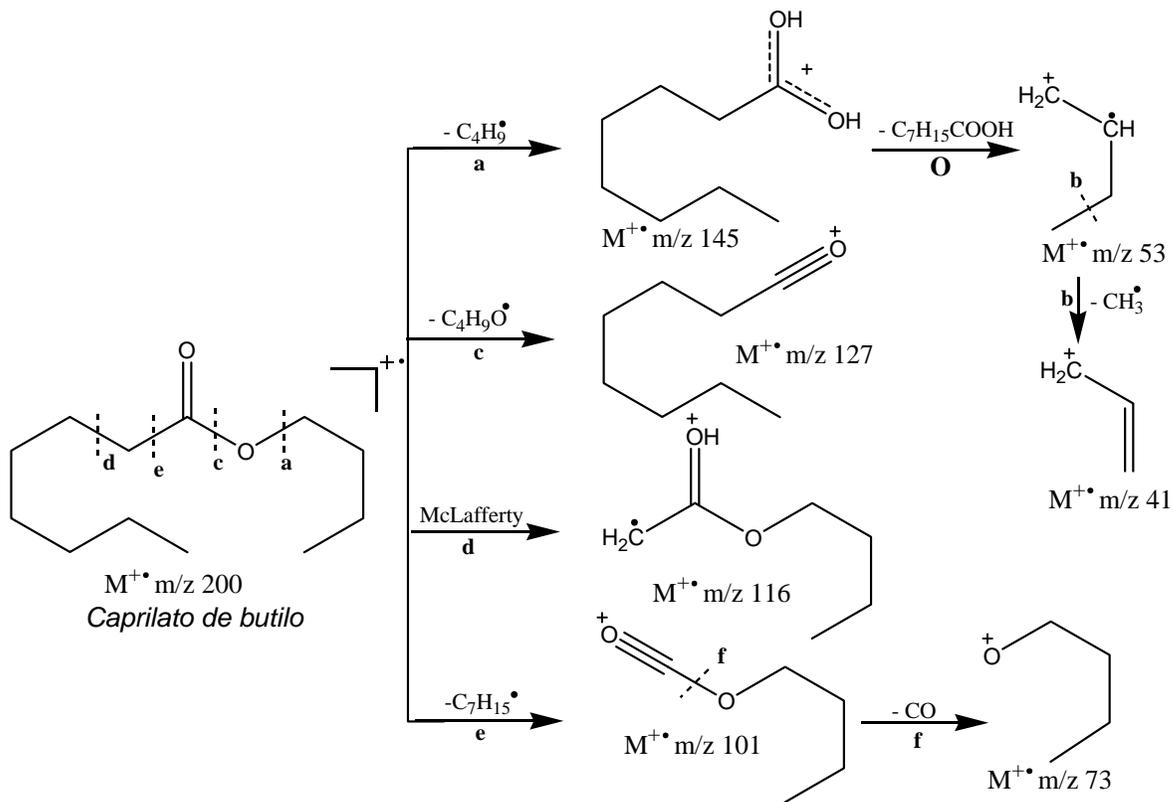


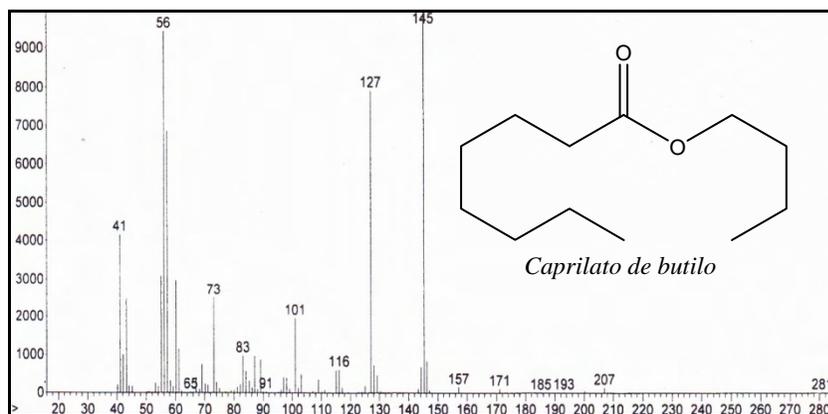
Caprilato de etilo



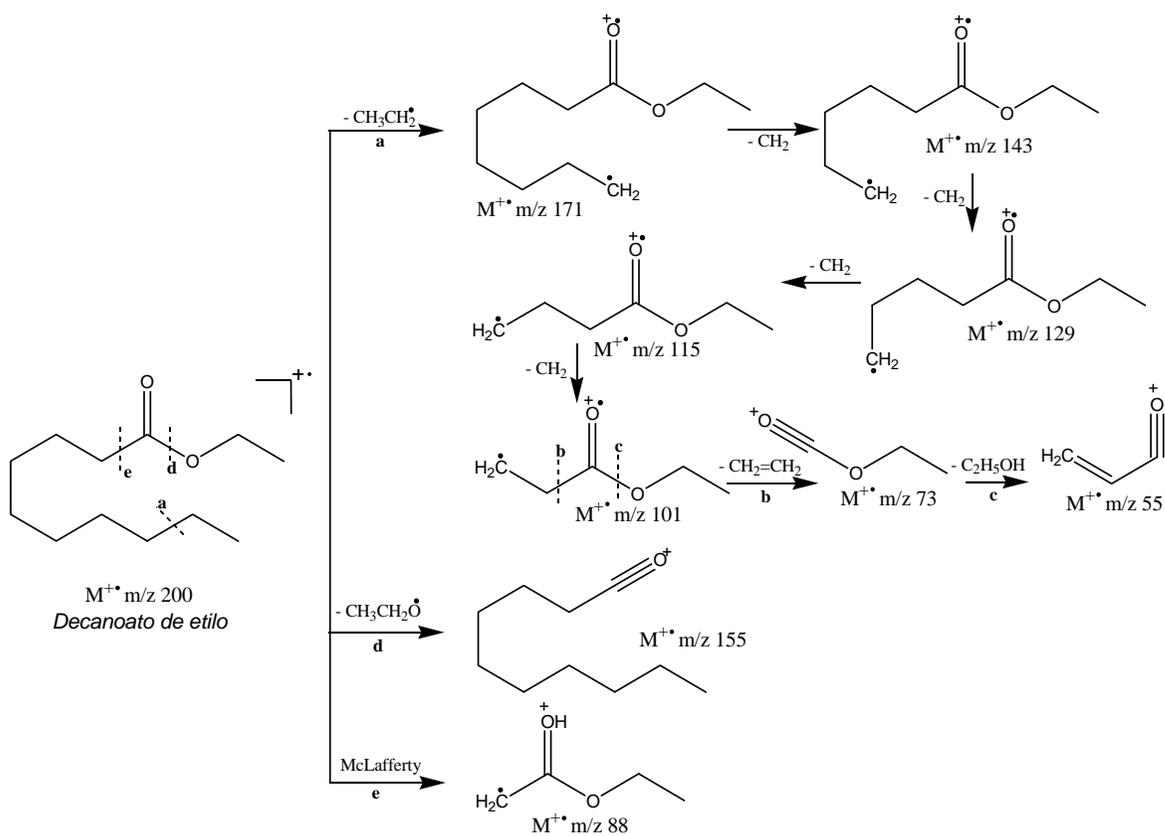


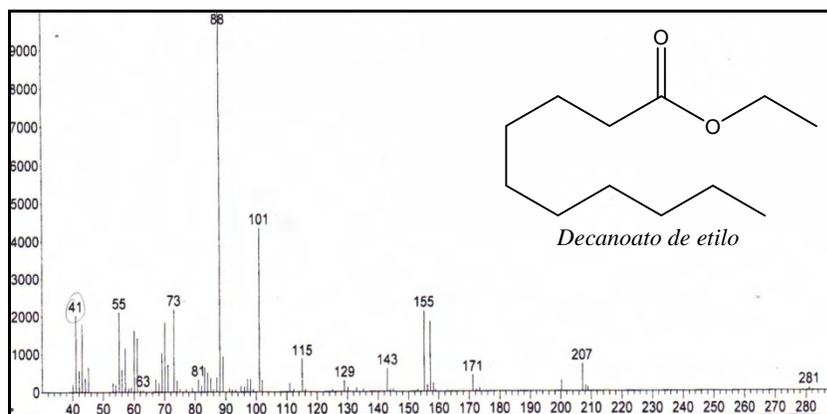
Caprilato de butilo



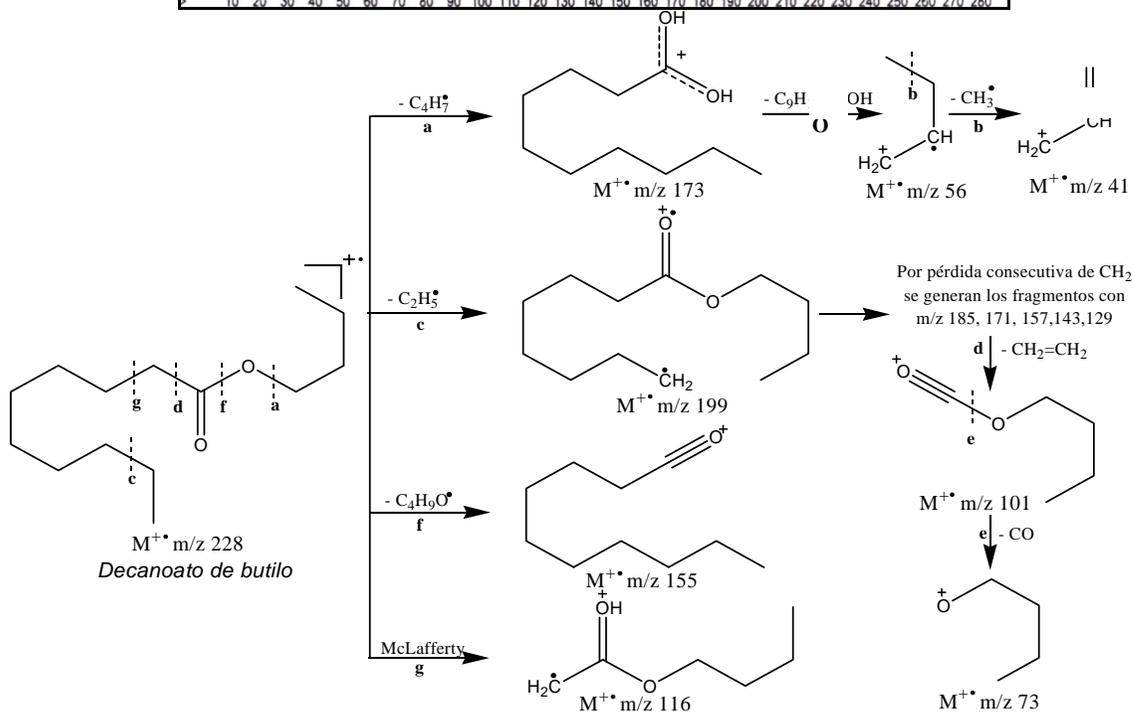
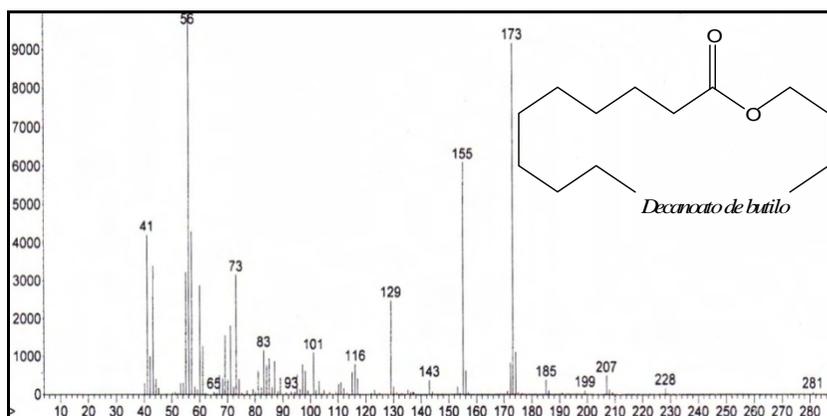


Decanoato de etilo

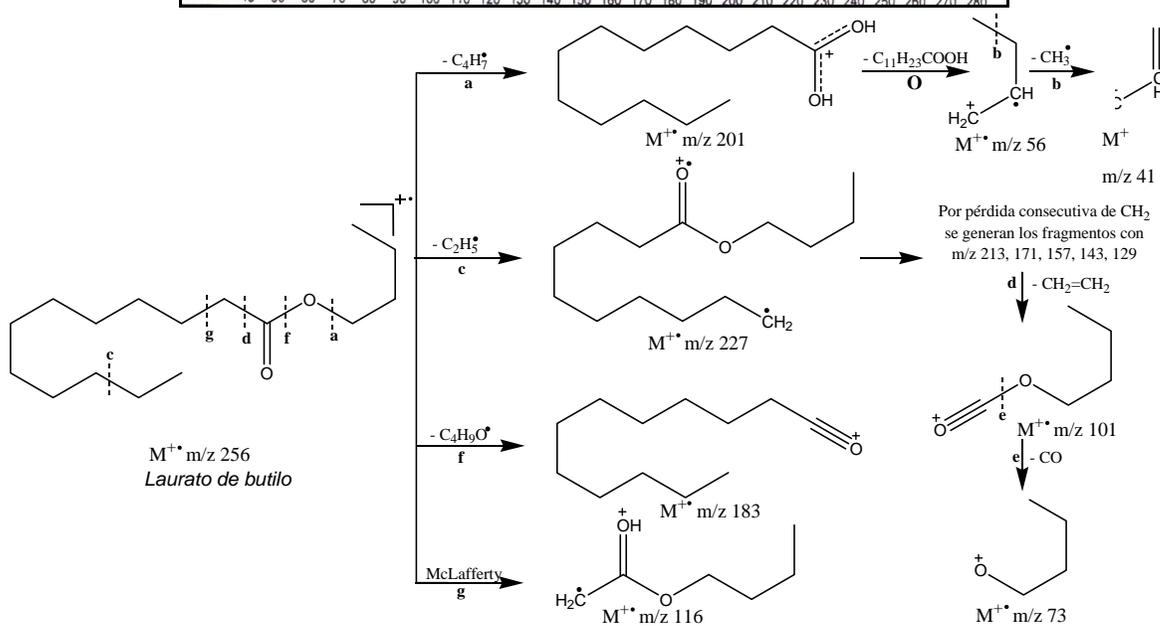
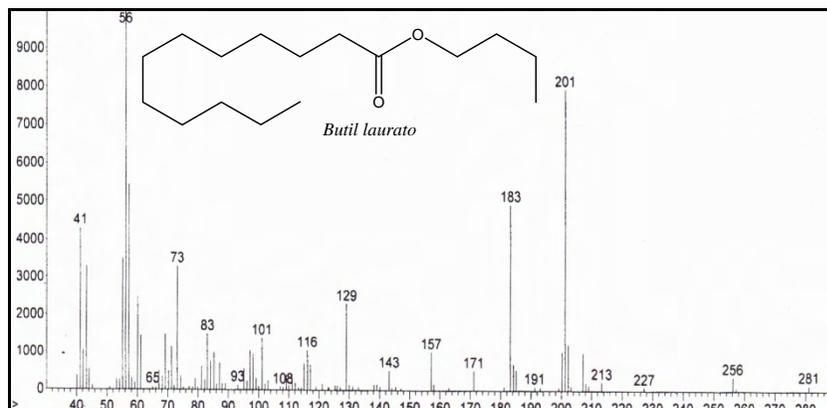




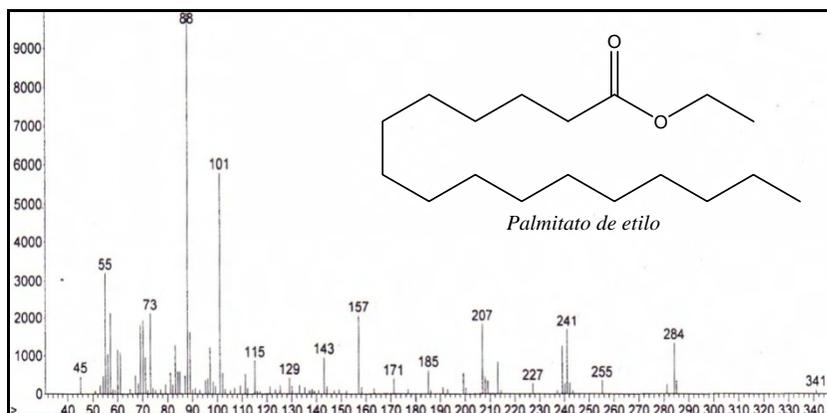
Decanoato de butilo

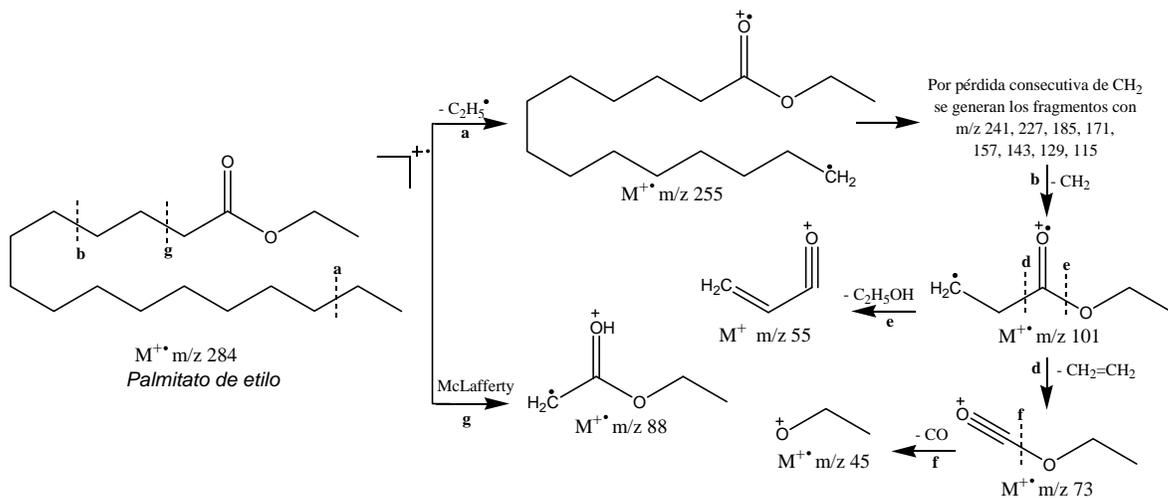


Laurato de butilo



Palmitato de etilo





Linoleato de etilo

