

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

FACULTAD QUÍMICA-FARMACIA
Departamento de Ciencias Farmacéuticas



Tesis en opción al título de Máster en Desarrollo de
Medicamentos de Origen Natural

**Título: Composición química y actividad
antioxidante del aceite esencial y extractos
orgánicos de las hojas de *Mosiera bullata*.**

AUTOR: Lic. Yuriam De Armas Mesa

TUTOR: Dra C. María Elisa Jorge Rodríguez
Dra C. Yanelis Saucedo Hernández

“Año del 56 de la Revolución”
2014



Hago constar que el presente trabajo de maestría fue realizado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la maestría en Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural, autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firma del Autor

Firma del Jefe de Departamento
donde se defiende el trabajo

Firma del Responsable de
Información Científico-Técnica

Pensamiento



En el arte, nada que merezca la pena se puede hacer sin genio; en ciencia, incluso una capacidad muy modesta puede contribuir a un logro supremo.

Bertrand Russell.

Dedicatoria



A mis padres por darme la vida, por haberme impulsado a alcanzar cada uno de mis sueños, por su amor, dedicación y entrega.

A mi abuela que aunque no esté, sé que su orgullo es infinito.

A mi tutora ejemplo de mujer y ser humano.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial y extractos orgánicos de las hojas de *Mosiera bullata*.

Agradecimientos



A mi familia, la de sangre y la elegida por el apoyo y el respaldo en cada una de mis decisiones, por desearme siempre cosas buenas.

A mis amigos por los momentos vividos, darme todo su aliento, por confiar en mí y ayudarme a construir la persona que soy.

A mis compañeros de trabajo por permitirme alcanzar esta meta.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Resumen



Resumen

En el presente trabajo se estudió el aceite esencial y tres extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, recolectada en el Jardín botánico de la Universidad Central de Las Villas. El aceite fue obtenido por hidrodestilación y los extractos por extracción sólido-líquido, con acetato de etilo, acetona y metanol como solventes. Fue evaluada la composición química del aceite, empleando la cromatografía gaseosa acoplada a masa (GC-MS, siglas en inglés), identificando 4 componentes mayoritarios que representan el 83,0% de los cuales el componente en mayor proporción fue el 1,8-cineol seguido del DL-Mentol y el Eugenol. Además, se determinó el perfil cromatográfico, por Cromatografía Gaseosa con detección por ionización por llama (GC-FID, siglas en inglés), del aceite y los extractos y se obtuvo coincidentemente que los compuestos mayoritarios citados se encontraban en todas las muestras. Se validó la técnica GC-FID para determinar Eugenol en las muestras evaluadas, siendo fiable en un rango de concentración entre 0,5-2,5µg/mL, obteniéndose que el aceite y los extractos de acetato de etilo, acetona y metanol contienen 0,44±0,014; 1,39±0,06; 2,15±0,05 y 2,77±0,22%, respectivamente. Se determinó el contenido fenólico en el aceite y los extractos obteniéndose un mayor contenido para el extracto metanólico, seguido del acetato de etilo y la acetona, mientras que el aceite mostró un bajo contenido de estos compuestos. Estos valores estuvieron en total correspondencia con los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante en extractos y aceite, para lo cual se emplearon diferentes métodos “*in vitro*”, que a su vez incluyen dos mecanismos de acción descritos en la literatura: la evaluación de la peroxidación lipídica y la habilidad secuestradora a los radicales libres. El aceite mostró un potencial antioxidante menor que los patrones de antioxidantes y los extractos evaluados en la totalidad de los ensayos. Los extractos presentan una actividad apreciable, similar a los patrones utilizados, siendo esta superior en el extracto metanólico.

Abstract



Abstract

Was studied the essential oil and three obtained extracts of the leaves of *Mosiera bullata*, gathered in the botanical Garden of the Central University of Las Villas. The oil was obtained by hidrodestilation and the extracts by extraction solid-liquid, with ethyl acetate, acetone and methanol. The chemical composition of the oil was evaluated, using the couple gas chromatography to mass spectrometry (GC-MS), and it was obtained 4 majority components that represent 83,0% of which the component in more proportion was the 1,8-cineole followed by the DL-menthol and the eugenol. Also, the chromatographic profile of the oil and the extracts was determined, for Gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), and was obtained that the mentioned majority compounds were in all the samples. The technical GC-FID was validated to determine eugenol in the valued samples, being reliable in a concentration range among 0,5-2,5 µg/mL, being obtained that the oil and the extracts of ethyl acetate, acetone and methanol contain $0,44\pm0,014$; $1,39\pm0,06$; $2,15\pm0,05$ and $2,77\pm0,22\%$, respectively. The phenolic content was determined in the oil and the extracts being obtained a bigger content for the methanolic extract, followed by the ethyl acetate and the acetone, while the oil showed a low contained of this parameter. These values are in total correspondence with the obtained results when evaluating the antioxidant efficiency in extracts and oil, for that which different "*in vitro*" methods were used, that in turn include two mechanisms of action described in the literature: the evaluation of the lipidic peroxidation and the free radicals scavenning ability. The oil showed a smaller antioxidant potential that the antioxidant patterns and the extracts evaluated in the entirety of the assays. The extracts present an appreciable activity, similar to the utilized patterns, being this superior in the methanolic extract.

Índice



Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.....	3
1.1. Consideraciones generales sobre plantas medicinales, aromáticas y los compuestos fenólicos presentes en ellas.....	4
1.2. <i>Mosiera bullata</i>	6
1.2.1. Aspectos generales de la planta.....	6
1.2.2. Descripción.....	6
1.3. Algunas consideraciones sobre los aceites esenciales y los extractos de plantas medicinales.....	7
1.3.1. Aceites Esenciales.....	7
1.3.1.1. Generalidades.....	7
1.3.1.2. Obtención.....	9
1.3.1.3. Clasificación de los aceites esenciales.....	10
1.3.1.4. Composición.....	11
1.3.2. Extractos.....	13
1.3.2.1. Métodos de extracción.....	13
1.4. Antioxidantes. Sus usos en la salud humana.....	14
1.4.1. El estrés oxidativo en la salud humana.....	14
1.4.2. Los antioxidantes y sus mecanismos de acción.....	15
1.4.3. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.....	17
1.5. Relación de la actividad antioxidante con el contenido de fenoles presente en la planta.....	20
Consideraciones finales de la revisión bibliográfica:.....	22
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	23
2.1. Material vegetal, equipos y reactivos químicos.....	23
2.2. Metodología de obtención del aceite esencial y de los extractos orgánicos, rendimientos.....	24
2.2.1. Obtención del aceite esencial.....	24
2.2.2. Obtención de los extractos.....	25
2.2.3. Determinación del rendimiento del aceite esencial y los extractos.....	26
2.3. Determinación de la composición química del aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de <i>Mosiera bullata</i>	28
2.3.1. Determinación de la composición química del aceite esencial obtenido.....	28
2.3.2. Determinación del perfil cromatográfico del aceite esencial y los extractos por GC-FID. Identificación de componentes con el uso de patrones.....	29
2.3.3. Determinación cuantitativa de eugenol en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de <i>Mosiera bullata</i>	30
2.3.3.1. Desarrollo del método.....	30
2.3.3.2. Condiciones cromatográficas:.....	30

Lic. Yuriam De Armas Mesa

2.3.3.3. Validación del método.	31
2.3.3.4. Determinación del contenido de eugenol presente en el aceite y los extractos estudiados.	33
2.3.4. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en las muestras.	33
2.3.4.2. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en los extractos.	34
2.4. Evaluación de la actividad antioxidante en el aceite esencial y los extractos obtenidos.	35
2.4.1. Cuantificación de la actividad secuestradora de radical- El método basado en la transferencia electrónica.	35
2.4.1.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH del aceite esencial y los extractos:	35
2.4.1.2. Fuerza reducida de los aceites esenciales y los extractos.	36
2.4.1.3. Capacidad antioxidante total (TAOC).	37
2.4.1.4. Determinación del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP).	38
2.4.2. Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.	38
2.4.2.1. Método del tiocianato férrico.	38
Capítulo 3: Resultados y Discusión	40
3.1. Rendimiento del aceite esencial y extractos obtenidos de las hojas de <i>Mosiera bullata</i>	40
3.2. Resultados obtenidos en la determinación de componentes volátiles presentes en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de la <i>Mosiera bullata</i>	41
3.2.1. Composición del aceite esencial	41
3.2.2. Perfil cromatográfico del aceite y los extractos, aplicando la GC-FID.	42
3.2.3. Determinación cuantitativa del contenido de eugenol en los aceites esenciales y extractos obtenidos.	44
3.2.3.1. Validación de la técnica	45
3.2.3.2. Aplicación de la técnica validada a la determinación de Eugenol presente en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de la <i>Mosiera bullata</i>	50
3.3. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de <i>Mosiera bullata</i>	51
3.3.1. Determinación del contenido fenólico total.	51
3.3.2. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.	53
3.3.3. Fuerza reductora.	56
3.3.4. Determinación del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP)	57
3.3.5. Capacidad antioxidante total.	59
3.3.6. Actividad antioxidante por el método FTC.	61
3.4. Relación entre el contenido fenólico total con la capacidad antioxidante total y el poder reductor/antioxidante.	63
Conclusiones	66
Recomendaciones	67
Bibliografía	68

Introducción



Introducción.

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Se le define como el conjunto de todos los conocimientos y prácticas usados en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, y confiado exclusivamente en experiencia práctica, observación y transmitido de generación en generación, en forma oral y escrita. El uso a través del tiempo demostró la inocuidad y la eficacia de la medicina tradicional, restando en la actualidad comparar el empirismo con el cientificismo, respetándose en la investigación y evaluación de la medicina tradicional, los conocimientos y la experiencia obtenidos en la larga historia de uso de procedimientos¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica. En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones la OMS apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de mínimo riesgo para el paciente^{2,3}.

Entre las plantas medicinales utilizadas en todo el mundo a lo largo de la Historia, y aun de la prehistoria del hombre, las plantas aromáticas y sus componentes olorosos ocupan un lugar especial. Desde que *Homo sapiens* discriminó el alimento tóxico, el aire limpio del contaminado, o reconoció las virtudes del aroma de una flor o un fruto, comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su hábitat, su comportamiento, sus costumbres, sus medicinas, sus placeres y sus vicios, hasta sus recuerdos y deseos. La vida era para él, entre otras cosas, una experiencia que se genera desde el olfato y el paladar. Desde entonces, su memoria se enriquecía con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura y de su idiosincrasia⁴.

Por otra parte en la actualidad la acción antioxidante se encuentra entre las propiedades más estudiadas en el campo de la terapéutica y los antioxidantes naturales presentes en las plantas han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo (un desbalance entre las sustancias oxidantes y prooxidantes) según se ha demostrado está implicado en un gran número de afecciones de la

Lic. Yuriam De Armas Mesa

salud, lo cual produce un deterioro muy significativo en los mismos, haciendo que pierdan, la mayoría de las propiedades para las cuales fueron elaborados. Por otra parte las grasas y aceites presentes en estos productos, pueden deteriorarse fácilmente debido a la oxidación, en una serie de reacciones con participación de radicales libres, propagándose y finalmente convirtiéndose en compuestos estables oxigenados, que conllevan a la pérdida de aroma y sabor, junto con otras características indeseables que degradan la calidad del producto⁵; lo que obliga a que investigadores en todo el mundo trabajen en el descubrimiento y el suministro de antioxidantes exógenos como una alternativa importante en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades⁶. Para prevenir tales reacciones se utilizan compuestos con propiedades antioxidantes, en su amplia mayoría sintéticos, como pueden ser el Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Galato de n-Propilo, por mencionar algunos. Últimamente ha crecido la demanda de “productos de origen natural”, libres de aditivos químicos sintéticos, y se ha incrementado el estudio y el uso de sustancias que contengan antioxidantes naturales. Además, está en auge el mercado de complementos dietéticos y nutraceuticos que contengan compuestos capaces de inhibir o inactivar radicales libres, ya que estos compuestos han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares⁷.

Nuestro país no está exento de todo este rescate de la medicina popular lo cual tiene gran importancia desde el punto de vista económico y dentro del campo de la salud pública, constituyendo una alternativa a tener en cuenta por nuestros investigadores, debido a que posee una rica flora y una valiosa tradición en el uso de las plantas medicinales. Por esto desde 1992 cuenta con un programa nacional de medicina natural que se perfecciona cada año con la inclusión de nuevas especies⁸.

Este programa de medicina natural del Ministerio de Salud Pública de nuestro país incluye el uso de plantas para múltiples afecciones; son muchas las plantas aromáticas insertadas en él y cada día se realizan estudios a nuevas especies de plantas para determinar si pueden incluirse en dicho programa. Teniendo en cuenta esto en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de Las Villas existe un grupo de investigación que tiene como objetivo fundamental el estudio de las plantas medicinales, particularmente especies de plantas aromáticas. Tal es el caso de las especies de la familia *Mosiera*, género con unas 40 especies de plantas con flores que pertenece a la familia Myrtaceae. La *Mosiera bullata* es una especie de planta originaria del sur de Florida, Caribe, Centroamérica y sur de Brasil, la cual se usa tradicionalmente por sus acciones antiparasitaria, antiespasmódica, antirreumática, etc.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Para desarrollar el presente trabajo se tuvo en cuenta la poca información existente de la planta *Mosiera bullata* en la literatura y el objetivo de mantener viva la tradición herbolaria para encontrar nuevos compuestos activos con propiedades antioxidantes que actúen contra diversas enfermedades. Durante la investigación se estudiaron el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de esta planta con vistas a evaluar sus posibles potencialidades como fitomedicamento. La planta es cultivada por el equipo de investigación del Jardín Botánico de la UCLV en el área de cultivo de especies localizadas principalmente en la región central de nuestro país

Constituye, por tanto, el **problema científico** del presente trabajo que la planta *Mosiera bullata*, que crece en la región central de Cuba no posee estudios reportados que permitan proponer su uso en la medicina tradicional, industria farmacéutica y/o en la industria cosmética cubanas.

Atendiendo a ello, con el objetivo de contribuir con el programa de medicina natural y tradicional del país, este trabajo científico parte de la siguiente **hipótesis**: Si se realizan estudios que permitan conocer el rendimiento, la composición y la actividad antioxidante del aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, se realizará un aporte importante a la información necesaria para proponer su uso en la medicina tradicional, industria farmacéutica y/o cosmética.

Para fundamentar dicha hipótesis se plantea el **objetivo general** siguiente:

Determinar la composición y evaluar la actividad antioxidante de las hojas de *Mosiera bullata* para fundamentar su uso en la medicina tradicional cubana, industria farmacéutica y/o en la cosmética.

A partir de este objetivo general se precisan los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar el rendimiento del aceite esencial y los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, aplicando las técnicas tradicionales.
2. Determinar la composición del aceite esencial, obtenido por hidrodestilación, empleando la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masa.
3. Identificar y cuantificar metabolitos mayoritarios presentes en los extractos orgánicos mediante la Cromatografía Gaseosa con detector de ionización por llama.
4. Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial y los extractos orgánicos, obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, a través de ensayos *in vitro*.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Capítulo 1

Revisión Bibliográfica



Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

1.1. Consideraciones generales sobre plantas medicinales, aromáticas y los compuestos fenólicos presentes en ellas.

Desde tiempos inmemoriales, las plantas medicinales constituyeron el principal arsenal terapéutico del hombre y han demostrado ser un importante instrumento como recurso local validado y como medicamento herbario. En 1977 la OMS adoptó una resolución, propiciando así una promoción mundial de la medicina tradicional. Dicha resolución insta a los gobiernos miembros a dar importancia a los sistemas médicos tradicionales. En 1978 se llevó a cabo la conferencia de Alma-Ata donde se formuló la meta de Salud para Todos en el año 2000. Fue recomendada en dicha conferencia dar prioridad a la incorporación de fitofármacos con usos comprobados, en las políticas nacionales de medicamentos. Desde entonces muchos han sido los esfuerzos por parte de la OMS para promover este tipo de terapia³.

En las últimas décadas puede observarse como tendencia mundial, un aumento del consumo de plantas medicinales, tanto en los países industrializados como los del tercer mundo. Se estima que alrededor del 80% de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de salud. En Asia, millones de personas mantienen su salud a través del uso de hojas, raíces y cortezas de árboles. De hecho el 25% de las medicinas prescritas por los médicos europeos y estadounidenses se derivan de plantas existentes en los bosques. Según reconocidos investigadores, prácticamente todas esas plantas se han descubierto gracias a la información derivada de su uso en medicina tradicional^{9, 10}.

Entre las plantas medicinales, las plantas aromáticas juegan un rol importante, pues son aquellas que tienen un contenido sobresaliente en aceites esenciales y representan una amplia variedad de especies. Como grupo son especies valoradas por sus aromas y sabores característicos así como por sus propiedades medicinales; representan alrededor de un 0,7% del total de las plantas medicinales. El comercio de los aceites esenciales mantiene un crecimiento sostenido debido a su aplicación en diversas industrias como: cosmética, farmacéutica, alimenticia, de productos de limpieza, plaguicidas, entre otras¹¹.

Las plantas medicinales y aromáticas son una parte fundamental de los sistemas de medicina tradicional y una importante fuente de material de estudio de la Farmacognosia. A pesar de su amplio uso en países iberoamericanos, pocas se han estudiado con la profundidad que se requiere para la aplicación médica;

Lic. Yuriam De Armas Mesa

los datos de seguridad y eficacia están dispersos y disponibles solo para un número reducido de ellas en algunas farmacopeas, muchas carecen de una metodología que garantice su calidad, lo cual limita el desarrollo, producción y comercialización de fitomedicamentos, tanto en los mercados nacionales como internacionales. Por consiguiente, para contar con una alternativa terapéutica de fuente vegetal, que reúna los requisitos de calidad, seguridad y eficacia, es indispensable demostrar sobre bases científicas, la utilidad de una planta medicinal y cumplir con todo lo establecido en los lineamientos internacionales para la evaluación y control de los medicamentos herbarios^{12, 13}. Un aspecto vital para lograr este propósito es la determinación de parámetros farmacognósticos, los que constituyen una garantía de que la materia prima proveniente de los campos de cultivos ha sido procesada adecuadamente¹⁴, así como la extracción, aislamiento e identificación de constituyentes de las drogas vegetales, lo cual fundamenta en gran medida el uso de las mismas^{15, 16, 17}.

Las plantas poseen una gran variedad de principios activos, que están asociadas a los procesos vitales básicos, y los metabolitos secundarios participan activamente en el ajuste del vegetal a las condiciones ambientales así como con la interrelación con parásitos y simbioses. Para el ser humano, los metabolitos secundarios, especialmente aquellos de origen vegetal, poseen diversas aplicaciones siendo utilizadas en salud, alimentación, perfumería e higiene personal, etc¹⁸.

El consumo de plantas como fuente de antioxidantes ha crecido continuamente en años recientes, debido a que estudios epidemiológicos han sugerido asociaciones positivas entre el consumo de alimentos ricos en fenoles y la prevención de enfermedades; efectos atribuidos a los componentes antioxidantes como los flavonoides y fenilpropanoides que presentan las mismas¹⁹. Varios tipos de hierbas y especias se han utilizado en diferentes alimentos, debido a sus reconocidas propiedades antioxidantes como el Romero (*Rosmarinus officinalis*) y la Salvia (*Salvia officinalis*), ambas de la familia Labiatae, las cuales han sido reconocidas como hierbas de gran actividad antioxidante²⁰.

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal y por tanto estos son encontrados en alimentos derivados de fuentes vegetales²¹. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos y a los fenoles simples, a los ácidos hidroxycinámicos, a los fenilpropanos, a las ligninas, etc. Los mismos actúan generalmente como

capturadores y estabilizadores de radicales libres; pudiendo producir quelación de metales, aquéllos que poseen en su estructura grupos carboxílicos.

El mecanismo de protección de los fenoles (representado por AOH) ocurre en el estado inicial y más efectivamente durante el estado de propagación de la oxidación, por captura de los radicales libres (R.), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena. La transferencia de electrones desde el radical libre (R.) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes (reductonas), como el ascorbato. Los suplementos antioxidantes o los alimentos que contienen antioxidantes pueden ser usados para reducir los daños oxidativos relacionados a la edad y a enfermedades como arteriosclerosis, diabetes, cáncer, cirrosis, etc²². En estos casos es importante el estudio de las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos totales obtenidos de distintas fuentes, antes que la de los compuestos individuales, debido a la posible interacción antagonista o sinergista entre todos los compuestos presentes²³.

1.2. Mosiera bullata.

1.2.1. Aspectos generales de la planta.

Esta planta pertenece al género *mosiera*, el cual posee unas 40 especies de plantas con flores que pertenecen a la familia Myrtaceae. Es originario del sur de Florida, Caribe, Centroamérica y sur de Brasil²⁴. Este género ha sido poco estudiado, solo existe un reporte que incluye la existencia de aceite esencial en una de estas, la cual es rica en monoterpenos²⁵. La planta *Mosiera bullata* es endémica de la región central de Cuba y después de haber realizado una exhaustiva búsqueda en bases de datos especializadas no se encontraron reportes de la misma en relación a su composición química y posibles usos en el campo farmacéutico. El género fue descrito por John Kunkel Small y publicado en Manual of the Southeastern Flora 936–937, 1506, f. s.n. [p. 937]. 1933. La especie tipo es: *Mosiera longipes* (O. Berg) Small y la especie *bullata* (Britton & P.Wilson) Bisse, se reportó en la Revista del Jardín Botánico Nacional de la Universidad de la Habana, 1986.

1.2.2. Descripción.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

La especie mosiera se presenta como arbustos o árboles hasta 15 m de altura. Con tricomas de hasta 0.5 mm, unicelulares, simples, blanquecinos, amarillentos o pardo rojizos. Hojas persistentes, coriáceas, la nervadura broquidódroma, con pocos a 10 pares de nervaduras laterales unidas por una nervadura marginal que se arquea entre ellas cerca del margen foliar. Inflorescencias unifloras, axilares (poco frecuentemente un dicasio de 3 flores) o en un brote axilar bracteado con 1-3 pares decusados de flores. Flores cuatrómeras; lobos del cáliz oblongos a semiorbiculares, el cáliz generalmente no fusionado o sólo ligeramente fusionado pasando la punta superior del ovario, rompiéndose ligeramente o no entre los lobos en la antesis; pétalos submembranáceos, blancos; bractéolas generalmente pequeñas, ovado-trianguares, foliosas en una especie, caducas cerca o antes de la antesis; estambres 60-200, doblados hacia adentro en el botón, las anteras 0,3-0,7 mm, globosas, generalmente con una glándula terminal en el conectivo; ovario bilocular; óvulos 3-40 por lóculo, la placenta no marcada, los lóculos algunas veces conectados por una apertura. Frutos en bayas, subglobosos; semillas pocas, subreniformes, la testa dura, brillante o en una especie coriácea y glandular, la pared externa de 1 a varias células de grosor, las células superficiales redondeadas a alargadas, la parte central de la semilla algunas veces suave; embrión aceitoso, en forma de "C", blanquecino, los cotiledones reflexos o derechos, menos de 1/4 de la longitud del embrión²⁶.

1.3. Algunas consideraciones sobre los aceites esenciales y los extractos de plantas medicinales.

1.3.1. Aceites Esenciales.

1.3.1.1. Generalidades.

Los aceites esenciales son los compuestos odoríferos naturales que se encuentran en las plantas y son aislados de las mismas. Generalmente, son líquidos (en algunas ocasiones semisólidos y muy raras veces sólidos) poco solubles en agua pero si volatilizables con vapor, se evaporan a diferentes velocidades bajo presión atmosférica. Estos componentes volátiles provenientes de plantas han atraído la atención del hombre desde la antigüedad como principios aromáticos o especies de gran complejidad en su composición. El estudio de los aceites esenciales como materias primas básicas para la industria de fragancias, sabores y medicinal, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importante para muchos países. Inicialmente fueron considerados como material de desecho del

metabolismo de las plantas, la importancia biológica de los aceites esenciales ha sido reconocida sólo recientemente²⁷.

Estos aceites en su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados. El aceite esencial dentro de la planta se encuentra confinado en un tejido el cual se le denomina micela, de lo contrario, podría tener influencia en la transpiración de la planta, e inhibir la formación de clorofila, esto es perjudicial o beneficioso, dependiendo del tipo de planta, si es clorofila o no. De lo anterior se puede concluir que los aceites esenciales generados por la planta son de diferentes utilidades, según su género, especie o variedad.

Los aceites esenciales tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano, las propiedades básicas que caracterizan a estos aceites son la volatilidad y el origen vegetal. El término popular más común con el que se conocen estas sustancias es el de esencias, también se conocen por el nombre de aceites volátiles o etéreos. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos^{28, 29, 30}. Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides³¹. Son inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco) y son aceptados como sustancias seguras por la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA, por sus siglas en inglés)³².

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy amplias, aunque básicamente están orientadas a la perfumería; la cosmética; la industria farmacéutica, como aditivo e insumo para sintetizar compuestos; la alimentaria, como aditivo y como insumo para la fabricación de productos de higiene personal y de limpieza doméstica. La industria farmacéutica requiere de aceites esenciales “desterpenados”, o sea, libres de terpenos, porque se busca sólo los principios activos farmacológicos de la planta, comúnmente los terpenos y sesquiterpenos oxigenados, para complementar un medicamento. En los últimos años, la aromaterapia ha tenido un gran crecimiento y aceptación en el mercado mundial. La comercialización de los aceites esenciales puros, como ingredientes de los productos aromaterápicos, ha creado una mayor

demanda y ha motivado la búsqueda de nuevos aromas, más exóticos y con propiedades pseudo-farmacológicas^{28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39}.

La aromaterapia de estos compuestos se utiliza en sinergia con otras terapias farmacológicas⁴⁰ incluyendo propiedad antiinflamatoria⁴¹, antituberculosis⁴², antimicrobiano⁴³, antifúngico^{44, 45}, antitumoral, protector del tracto gastrointestinal⁴⁶, anticonvulsivante⁴⁷, espasmolítica y anestésica⁴⁸. Además múltiples ensayos químicos *in vitro* han permitido evaluar estos compuestos como antioxidantes, constituyendo así, junto a la acción antimicrobiana, la actividad farmacológica más estudiada en la actualidad para este tipo de compuesto^{48, 49, 50}.

1.3.1.2. Obtención.

Los aceites esenciales son obtenidos, a partir del material vegetal por métodos de extracción que involucran el uso del agua, llamados comúnmente: destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodestilación, hidrodifusión o hidroextracción. Sin embargo, no existe un nombre claro y conciso para definir el proceso, debido a que se desconoce exactamente lo que sucede en el interior del equipo principal y porque se usan diferentes condiciones del vapor de agua para el proceso. Es así que, cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado “destilación por arrastre de vapor”. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor, se le llama “hidrodestilación”⁵¹. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia no está en contacto con el agua generadora, sino con un reflujo del condensado formado en el interior del destilador y se asumía que el agua era un agente extractor, se le denominó “hidroextracción”⁵².

En el presente trabajo se empleó la técnica de hidrodestilación por lo que a continuación se exponen los aspectos más importantes sobre la misma.

- Destilación con agua (hidrodestilación): Cuando se emplea este método se pone en contacto directo el material vegetal con agua hirviendo. El material puede flotar en el agua o quedar totalmente sumergido en dependencia de su peso específico o de la cantidad del mismo que se emplee; el agua ebulle por aplicación del calor, que puede ser directo, por enchaquetamiento o serpentines cerrados. El rasgo característico de este método radica en el contacto directo entre el agua en ebullición y el material vegetal, por lo que la acción química del agua sobre el material es máxima. Este método se emplea generalmente cuando el material es seco y no se altera por ebullición; aunque presenta algunos inconvenientes:

Lic. Yuriam De Armas Mesa

componentes como los ésteres son sensibles a la hidrólisis, mientras que otros componentes tales como los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos o los aldehídos, son susceptibles de polimerización, los compuestos oxigenados, tales como los fenoles, tienden a ser parcialmente solubles en el agua de destilación, hecho por el cual es imposible la remoción completa de estos compuestos y los tiempos requeridos de destilación son demasiado largos, lo cual se asocia a un detrimento de la calidad del aceite obtenido.

Este método aparece reportado en la mayoría de las investigaciones relacionadas con aceites esenciales, que incluyen su extracción. Algunos ejemplos de los artículos publicados en los últimos años muestran su amplio uso⁵³⁻⁶¹.

1.3.1.3. Clasificación de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia, los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de páprika, de pimienta negra, de clavo, etc.)²⁷.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio, jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por 12 procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por Ej. Hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. Copaiba, pino, junípero, etc.) Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. Clavo, canela, anís, etc.)

1.3.1.4. Composición.

La composición química de los aceites esenciales es variada, en una misma especie la composición cambia. Se pueden encontrar más de cincuenta compuestos químicos en una planta en proporciones considerables, para ser tomados en cuenta como componentes importantes del aceite. Hay componentes químicos, cuya cantidad presente en el aceite esencial, no es considerable cuantitativamente, pero si influye cualitativamente. Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides, de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química⁶²:

- Compuestos alifáticos de baja masa molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos,
- Fenilpropanos.

Para el estudio de la composición química de los aceites esenciales se emplean, entre otras, las técnicas cromatográficas. Ajustando los parámetros cromatográficos, se logra separar todos los componentes. Los tres tipos más comunes son: la cromatografía en capa delgada (CCD), Cromatografía gaseosa de ionización por llama (GC-FID, por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). El acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masa es la técnica que ha recibido mayor atención desde su introducción; esta permite obtener el espectro de masas de cada componente separado por GC-FID. Se obtiene el dato de su peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas para la identificación química de muchos de los componentes de un aceite esencial u otros tipos de sustancias⁶³.

Teniendo en cuenta que estas dos técnicas son las empleadas en el presente trabajo, a continuación se describen los aspectos más importantes que se tienen en consideración para su aplicación.

✓ **Cromatografía de gases.**

La cromatografía gaseosa es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. Para el análisis de aceites esenciales suelen emplearse dos tipos de fase estacionaria: polietilenglicol de peso molecular 20000 (Carbowax 20M®), que es una fase polar, y polidimetilsiloxano y derivados, que es una fase apolar. Para la identificación de los componentes del aceites esencial mediante GC-FID se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico) con los patrones. Sin embargo los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases y esto justifica el uso de los índice de retención que se calculan a partir de los tiempo de retención y por comparación con una serie de sustancias a las cuales se le asignan valores arbitrarios de índice de retención⁶⁴.

✓ **Cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masa.**

La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de la comparación de los índices retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias polares y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial. Existe una recopilación muy importante de los índices, realizada por Adams (2001)⁶⁵.

Si bien la información que proporcionan los índices de retención respecto a la identidad de los componentes de la esencia es muy valiosa, la identificación de los mismos no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchos componentes tienen índices coincidentes en ambas columnas. Por ello es necesario aplicar otras técnicas más sensibles y específicas como detector entre las cuales se destaca la **Espectrometría de masas** que es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS, por sus siglas en inglés)⁶⁶.

Múltiples son los estudios que refieren el empleo de las técnicas de GC-FID y GC-MS para el estudio de la composición química de los aceites esenciales⁶⁷⁻⁷⁰. Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se

Lic. Yuriam De Armas Mesa

analiza la composición del aceite esencial de la *Mosiera bullata*, a continuación se citan un grupo de estudios en los cuales se aplican estas técnicas analíticas en plantas medicinales que poseen entre sus componentes 1,8 cineol, eugenol, α -pineno, entre otros componentes^{60, 61, 71-76}.

1.3.2. Extractos.

1.3.2.1. Métodos de extracción.

El proceso de extracción se define como la separación de porciones medicinales activas a partir de los tejidos de plantas y animales, mediante el empleo de disolventes selectivos, utilizando procedimientos establecidos.

Entre los procesos extractivos más empleado en las plantas medicinales para separar los componentes presentes en el material vegetal se encuentran los procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación, etc. Existen diversas técnicas de extracción consideradas “clásicas u oficiales”, siendo las más utilizadas en el campo de los productos naturales la maceración, la extracción por Soxhlet, la percolación y la hidrodestilación⁷⁷. También están las consideradas “modernas” como es el caso del ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y la extracción acelerada por disolvente (conocida también como extracción por fluido automatizado o extracción por líquido presurizado)⁷⁸; estas nuevas técnicas de extracción a pesar de ser más rápidas, utilizar menos cantidad de disolvente y en algunos casos ser automatizadas, por lo general tienen como inconveniente el elevado costo de los equipos empleados.

La extracción sólido líquido constituye el método más utilizado actualmente para obtener un extracto compuesto por los principales metabolitos de la planta. En múltiples investigaciones, las plantas fueron previamente secadas y molidas para su posterior análisis^{58, 79-84}. Luego de secadas las plantas, se realiza una extracción, la cual se han llevado a cabo con disolventes tanto polares como no polares; predominando el metanol. Según Jayasinghe y col (2003)²⁰, este es el disolvente de extracción más eficiente respecto a otros como el etanol, acetona, hexano y acetato de etilo. Shi y col (2005)⁸⁵, afirmaron que con el metanol son extraídos derivados fenólicos del tipo hidroxinámicos, flavonoles y catequinas. La gran cantidad de referencias que dan fe de lo anterior reafirman lo planteado por Shi y colaboradores. Por citar algunos ejemplos Ju-Sung y col. (2010)⁸⁶ estudiaron los extractos metanólicos de *Lespedeza cuneata*, mientras que Messaoud y col. (2010)⁸⁷ estudiaron la composición de extractos metanólicos de tres especies de *Lavandula* y Mar y col. (2011)⁸⁸ evaluaron extractos metanólicos de diferentes partes de

Lic. Yuriam De Armas Mesa

plantas en Pakistán. En todos los casos se relacionó el contenido fenólico de dichos extractos con la actividad antioxidante evaluada, aspecto que se repite en un número alto de artículos que abordan esta temática.

1.4. Antioxidantes. Sus usos en la salud humana.

1.4.1. El estrés oxidativo en la salud humana.

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento⁸⁹.

El término estrés oxidativo hace referencia a un desequilibrio entre la generación de especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante de un organismo. Este desequilibrio en favor de los oxidantes conduce a un potencial daño oxidativo sobre biomoléculas. Según Halliwell y Whiteman (2004)⁹⁰, el estrés oxidativo puede originarse por dos motivos fundamentales:

- I. Disminución de los niveles de antioxidantes debido a mutaciones que afectan la actividad de los enzimas antioxidantes, o a toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes. Por ejemplo, muchos xenobióticos son metabolizados mediante su conjugación con Glutación (GSH, por sus siglas en inglés), así, en altas dosis pueden disminuir los niveles de GSH y causar estrés oxidativo incluso si el xenobiótico en sí mismo no es un generador de especies reactivas. Dietas inadecuadas que aportan niveles bajos de minerales (Fe, Zn, Se, Mg, Cu) y/o antioxidantes pueden causar también estrés oxidativo.
- II. Incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de O₂ u otras toxinas que en sí mismas son especies reactivas (e.j. NO₂·) o son metabolizadas vía generación de especies reactivas (e.j. paraquat), o bien debido a la activación excesiva de los

mecanismos naturales que generan especies reactivas, como por ejemplo la activación inapropiada de fagocitos en la inflamación crónica.

El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de estas sustancias antioxidantes que poseen diferentes funciones⁸⁵. Es difícil intentar definir los antioxidantes naturales, pero en general el término alude a aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales y aquéllos que se forman durante la cocción o el procesamiento de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales⁹¹. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, y cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios RL⁹².

1.4.2. Los antioxidantes y sus mecanismos de acción.

Es evidente que los procesos que generan especies reactivas y radicales libres *in vivo* son muy diversos. Para contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante, integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos que resulta el fundamento para la búsqueda de las sustancias con esta actividad. Los antioxidantes son sustancias que en concentraciones normales poseen una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre⁹³. Pueden ser de origen sintético o natural que suministradas previenen o retardan el deterioro por oxidación, mediante la acción de especies reactivas como, oxígeno reactivo y especies del nitrógeno. Al presentarse en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, pueden prevenir o retardar la destrucción oxidativa del mismo⁹⁴. Los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol, el butilhidroxitolueno, la ter-butil hidroquinona y el galato de propilo, conocidos por sus siglas en inglés BHA, BHT, TBHQ y PG respectivamente, son comúnmente utilizados en la prevención de la oxidación de la materia grasa de los alimentos⁹⁵. La utilización de estos componentes sintéticos es cuestionada, debido a que altas dosis de BHT puede causar hemorragias internas y externas a ratones y curieles de laboratorio⁹⁶. El BHA, TBHQ y PG pueden actuar como promotores de carcinogénesis²⁰.

Debido a los criterios negativos que existen sobre los antioxidantes sintéticos, se ha incrementado el interés en los naturales, los que cada vez son más importantes, no solo en la industria de los alimentos, donde retardan la degradación oxidativa mejorando la calidad y el valor nutritivo de estos, sino también en la medicina, donde intervienen en la cura y ayudan a prevenir enfermedades relacionadas con el daño

Lic. Yuriam De Armas Mesa

oxidativo⁹⁷. Han sido encontradas fuentes potenciales de antioxidantes en diferentes productos de origen vegetal, tales como: frutas, cereales, vegetales, semillas, aceites de las mismas, hojas, corteza, raíces, especias e hierbas⁹⁶.

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Así que no hay una definición internacional para el mejor antioxidante. En la realidad, las propiedades antioxidantes de diferentes extractos, aceites esenciales y compuestos puros se podrían ser evaluados utilizando varios ensayos *in vitro* que pueden ser divididos en dos grupos: Los que evalúan la peroxidación lipídica y los que miden la habilidad secuestradora a los radicales libres⁹⁸.

➤ Evaluación de la peroxidación lipídica:

En este mecanismo de acción, la actividad antioxidante del sistema se evalúa midiendo el consumo de oxidantes y la formación de los productos intermedios y finales de la oxidación en diferentes substratos (aceites, grasas, ácido linoleico, ácidos grasos metilados, entre otros. Estas medidas se llevan a cabo en los ensayos como: Valor de peróxido, valor de ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés), contenido de ácidos grasos libres, formación de los dienos conjugados por la absorción a 232 y 268 nm, composición de los ácidos grasos, proporción de los ácidos grasos insaturados y los ácidos saturados. La mayoría de estos ensayos basados en los sustratos lipídicos necesitan las condiciones de oxidación aceleradas: incrementando presión parcial de oxígeno y la temperatura, adicionando los catalizadores de la transmisión metálica, expuesto a la luz, varios fuentes de agitación y radicales libres⁹⁹.

➤ Evaluación de la habilidad secuestradora a los radicales libres⁹⁴:

Esta evaluación se clasifica de acuerdo a las reacciones químicas involucradas:

1. Método basado en la reacción de transferencia del átomo de hidrógeno: los antioxidantes pueden apaciguar los radicales libres dándole hidrógeno: $X\cdot + AH \rightarrow XH + A\cdot$

Las reacciones son rápidas, no dependen del solvente y pH. Ellos son: inhibición de la inducción de oxidación de LDL, capacidad absorbida de los radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés).

2. Método basado en la reacción de transferencia electrónica: Esto detecta la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón a reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, grupos carbonilos y radicales.

Este método depende del valor de pH en incluye diferentes ensayos entre los cuales se encuentran: ensayo de fenólicos totales por reactivo Folin-Ciocalteu, capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés), la fuerza antioxidante

Lic. Yuriam De Armas Mesa

reducida del ión férrico (FRAP, por sus siglas en inglés), ensayo de potencial total antioxidante utilizando el complejo de Cu(II) como antioxidante. Los métodos basados en este principio incluyen que un oxidante (substrato) atrae un electrón desde el antioxidante, produciendo un cambio de color en el substrato. El grado del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante. El punto final de la reacción se alcanza cuando se detiene el cambio de color. La pendiente de la curva obtenida entre la variación de absorbancia contra la concentración de antioxidante es un reflejo de la actividad antioxidante¹⁰⁰.

Ambas transferencias pueden ocurrir simultáneamente y la reacción dominante en el sistema se puede determinar según las propiedades y la estructura de los antioxidantes, los coeficientes de partición y solubilidad, el solvente. Los resultados obtenidos por diferentes métodos no son comparables, debido a muchos factores: La estructura física del sistema del ensayo, la naturaleza de sustratos para oxidación, la presencia de la interacción de los componentes, el modo de iniciación de la oxidación, el método analítico para medir la oxidación¹⁰¹. Teniendo en cuenta esto último algunos autores Frankel (2000)¹⁰¹ y Becker (2004)¹⁰² proponen para estudiar la actividad antioxidante una metodología que incluye tres etapas en la evaluación de la muestra, según el siguiente orden: **primero**, la cuantificación de los compuestos fenólicos; **segundo**, métodos basados en la reacción de transferencia electrónica que incluyen la cuantificación de la actividad secuestradora de radical, utilizando más que un método y considerando el efecto del solvente en el mecanismo de antioxidante, y **por último**, la evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.

1.4.3. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas.

Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos. Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe, debido a que la actividad anti-radical depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies

reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes¹⁰³.

Los métodos que se utilizarán en este trabajo son ampliamente empleados por diferentes investigadores, el potencial antioxidante de los extractos de plantas, debido a su compleja composición química, debe evaluarse por dos o más métodos que den fe del efecto antioxidante total de los vegetales⁹². Las pruebas seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante se describen a continuación:

I. Cuantificación de los compuestos fenólicos – método de Folin-Ciocalteu

El ensayo espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales. Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo Folin-Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$: Heteropolianión molibdofosfowolfrámico) en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e- donado por un antioxidante. Mo (VI) (amarillo) + e- (de AH) $\rightarrow$ Mo (V) (azul)¹⁰⁴.

La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresan en μg de ácido gálico/mL de aceite esencial o mg de muestra, utilizando ácido gálico como un estándar¹⁰⁵.

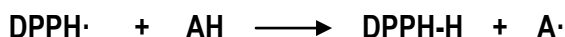
La reacción anterior también es aplicada para determinar la capacidad antioxidante total (TAOC, por sus siglas en inglés) en la técnica conocida también por el método del molibdato de amonio. Este ensayo refleja la capacidad de un sistema de defensa antioxidante no enzimático. En el método, llamado también método del fosfomolibdeno, el molibdeno VI (Mo^{6+}) se reduce para formar un complejo de color verde de fosfato/ Mo^{5+} a pH ácido. Valores altos de absorbancia indican que la muestra posee actividad antioxidante significativa¹⁰⁶.

II. Método basado en la reacción de transferencia electrónica.

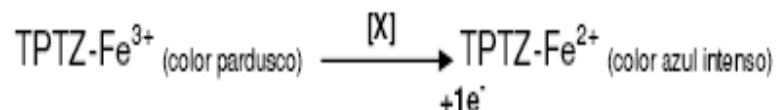
A. Actividad secuestradora del radical libre DPPH

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 517nm de la reducción del radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). La absorbancia característica de este radical, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R). Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH¹⁰⁷.

Lic. Yuriam De Armas Mesa



B. Ensayo de potencial antioxidante total usando el complejo de Cu (II) como un oxidante (conocido como Fuerza reducida): Es una medida de la habilidad reductora de los antioxidantes y es evaluada por la transformación del Fe (III) a Fe (II) en presencia de las muestras de extractos. La habilidad de reducir el Fe (III) puede estar atribuida a la donación de hidrógenos de los compuestos fenólicos, lo cual está relacionado con la presencia de agentes reductores. Además, el número y posición de grupo del hidroxilo en los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la actividad del antioxidante¹⁰⁸. Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora del compuesto o compuestos ensayados¹⁰⁹.



A. Ensayo de la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP)

Este método es mayormente conocido por sus siglas en ingles FRAP, fue desarrollado como metodología por Benzie y Strain (1996)¹⁰⁹, con el objetivo de estimar la capacidad de reducir el ion férrico que contiene el plasma, como medida de su estado antioxidante. En este método se determina la cantidad del catión férrico que se reduce a ferroso en presencia de un agente acomplejante, el denominado TPTZ (2,4,6-tri(pyridyl)-1,3,5-triazine). El complejo de TPTZ y el hierro III actúan con las sustancias antioxidantes dando como producto un ion complejo de hierro II, TPTZ y sustancias oxidadas. Este ion complejo $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ resultante es de color azul intenso y tiene una absorción máxima a 595 nm. Este ensayo es llevado a cabo a pH ácido (pH 3,6)⁹⁴.

III. Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.

Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC, por sus siglas en inglés)

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, transcurre en tres fases: iniciación, propagación y terminación¹¹⁰. Durante la oxidación de ácido linoleico, los peróxidos se forman en que los cuales oxidan el Fe^{2+} al Fe^{3+} (Figura 3). La última forma iónica establece un complejo con tiocianato de potasio dando el color rojo y presenta una absorbancia máxima a longitud de onda 500nm. Mayor absorbancia indica la oxidación mayor de la emulsión de ácido linoléico^{50, 111}.

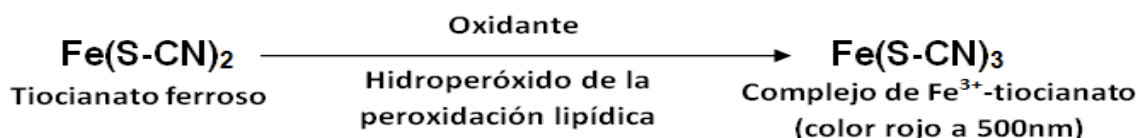


Figura 1.2. Formación del complejo Fe^{3+} -tiocianato desde el complejo Fe^{2+} -tiocianato por hidroperóxido.

El porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en la emulsión de ácido linoléico se calcula por la siguiente ecuación:

Ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés)

Los productos finales de la peroxidación lipídica son muy variados: alcanos, alquenes, hidroalquenes, malondialdehído (MDA), epóxidos de ácidos grasos, etc., algunos de los cuales también contribuyen al daño celular.

Uno de los productos secundarios formados en este proceso es el MDA, que se puede evaluar por el método TBA. El TBA se usa como un indicador en el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de TBA produciendo aductos coloreados (rosa) y dando un máximo de absorción a 532 nm. La intensidad de color proporciona con la concentración de MDA y mayor sea el nivel de MDA indica un incremento de peroxidación lipídica¹¹⁰.

1.5. Relación de la actividad antioxidante con el contenido de fenoles presente en la planta.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en

Lic. Yuriam De Armas Mesa

sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc^{112, 113}. Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido siquímico y el metabolismo de los fenilpropanoides¹¹⁴. Los fenilpropanoides simples poseen un esqueleto básico de 9 carbonos (C6-C3) y derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina producidos en la ruta del ácido siquímico. Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular.

- ✓ Ácidos cinámicos (C6-C3)
- ✓ Ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2)
- ✓ Flavonoides (C6-C3-C6)
- ✓ Proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)_n)
- ✓ Estilbenos (C6-C2-C6)
- ✓ Cumarinas (C6-C3)
- ✓ Lignanós (C6-C3-C3-C6)
- ✓ Ligninas ((C6-C3)_n)

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como las ligninas. Dentro de cada familia, el número de compuestos fenólicos existentes será más o menos variado. Por ejemplo, se conocen más 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias. Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, etc. En los alimentos, los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos¹¹³.

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo^{115, 116}. Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos¹¹⁷. La actividad

Lic. Yuriam De Armas Mesa

antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático¹¹³. Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton¹¹⁸. Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen actividades biológicas beneficiosas para salud. Entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como ciclooxygenasa, lipooxygenasa y xantina oxidasa¹¹⁹.

Consideraciones finales de la revisión bibliográfica:

No se encontraron estudios fitoquímicos, ni reportes del uso de la *Mosiera bullata*, ni siquiera en la medicina tradicional, por lo que las investigaciones realizadas en el presente trabajo resultaran completamente novedosos para esta planta. Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se estudia la composición de las hojas de la *Mosiera bullata* y sus propiedades antioxidantes. Después de realizarse una exhaustiva revisión de la literatura especializada se puede resumir lo siguiente: (I) - Las plantas medicinales aromáticas poseen una gran cantidad y variedad de componentes, entre ellos los más conocidos son los aceites esenciales y los compuestos fenólicos; (II) – Las técnicas más empleadas para la obtención de estos componentes son la hidrodestilación y la extracción sólido – líquido; (III) – Los aceites esenciales tienen en su composición terpenos y sustituyentes aromáticos que se determinan por GC-MS; (IV) - La actividad antioxidante transcurre por diferentes mecanismos de acción, siendo las técnicas más empleadas para su evaluación la actividad secuestradora de radical libre DPPH, la fuerza reducida, el método de tiocianato férrico y método de ácido tiobarbitúrico. (V) - Los estudios reportados sobre la planta evaluada son muy escasos.

Capítulo 2

Materiales y Métodos



Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal, equipos y reactivos químicos.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde febrero 2012 hasta diciembre de 2013. El aceite y los extractos objetos de análisis se obtuvieron a partir de las hojas de *Mosiera bullata*, procedente del Jardín Botánico de la Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.

La identificación taxonómica del material vegetal se realizó en el lugar de colecta por el especialista Dr C. Alfredo Noa Monzón, se lavó con abundante agua potable y se secó con la estufa durante 3 días a 30°C para su evaluación analítica.

Se utilizó, en todos los procedimientos desarrollados, cristalería específica de laboratorio, previamente descontaminada, empleando reactivos de calidad analítica y equipos certificados como aptos para el uso.

Equipos, instrumentos de medición y reactivos.

Autoclave, RAYPA modelo AES-28 España.

Cromatógrafo de Gases, Agilent 6890N

Balanza digital, BOECO, Alemania.

Baño ultrasónico, BRANSON 1510, México.

Cristalería de laboratorio.

Espectrofotómetro UV-VIS, Thermo electrón, Genesys 10UV, Estados Unidos.

Estufa, BINDER, Bélgica.

Filtro miliporo de 0,45 µm, MILLEX-HA, Alemania

Flujo laminar, FASTER, Bélgica

Máquina sacudidora, THYS 2, Alemania

Micropipetas de 5, 20, 100, 1000 µL, EPENDORF, Alemania.

Molino de cuchillas Retsh GMBH, Alemania.

Rotoevaporador, BUCHI R200, Alemania.

Termostato, MLW, Alemania.

2,2-difenil-1-picril-hidrácilo (DPPH), SIGMA-ALDRICH.

Acetato de Etilo, Merck.

Acetona, UNI-CHEM

Ácido ascórbico, UNI-CHEM.

Ácido gálico, Panreac.

Ácido linoleico, Merck.

Ácido Sulfúrico, Merck.

Ácido tiobarbitúrico, SIGMA-ALDRICH.

Ácido tricloroacético, EPB “Carlos J Finlay”.

Agua desionizada y destilada.

α-Tocoferol, Merck.

BHA, SIGMA-ALDRICH

Lic. Yuriam De Armas Mesa

BHT, SIGMA-ALDRICH	Reactivo Folin–Ciocalteu (FCR), SIGMA-ALDRICH
Buffer fosfato (0.2 M, pH 6.6), Merck.	
Carbonato de sodio, Merck.	Sulfato de sodio anhidro, UNI-CHEM.
Cloruro férrico, Panreac.	Timol, Panreac.
Cloruro ferroso, Merck.	Tiocianato de amonio, Merck.
Etanol, UNI-CHEM.	Tiosulfato de sodio, Merck.
Eugenol, Merck	Tolueno, Panreac.
Ferricianuro de potasio, UNI-CHEM.	TPTZ, SIGMA-ALDRICH
Fosfato de Sodio, Panreac.	Triclorometano, Merck.
Hidróxido de potasio, Panreac.	Vitamina C, UNI-CHEM.
Metanol, Lichrosolv, Merck.	Yoduro de potasio, Merck.
Molibdato de Amonio, Panreac.	

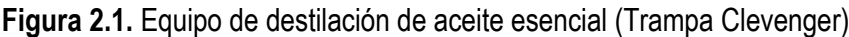
2.2. Metodología de obtención del aceite esencial y de los extractos orgánicos, rendimientos.

2.2.1. Obtención del aceite esencial.

Para la obtención del aceite se utilizaron las hojas en estadio fresco de la planta *Mosiera bullata*. El aceite se extrajo utilizando el método de hidrodestilación empleando una Trampa tipo Clevenger (Figura 2.1.).

➡ Aparato

El método tradicional más utilizado es el que prescribe la Farmacopea Europea, 2005. Se basa en efectuar una hidrodestilación de un peso conocido de material vegetal y recoger el aceite esencial en un tubo graduado (1 mL dividido en 0,01 mL) que se encuentra en un colector de destilación especialmente diseñado para este tipo de análisis (Trampa de tipo Clevenger). El colector se acopla a un matraz que contiene el material vegetal y un cierto volumen de agua, el cual se calienta mediante una manta calefactora de potencia regulable para provocar la destilación. Tras la destilación, podemos medir el volumen de esencia destilado y fácilmente calcular el contenido, que se expresa en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100 g de material vegetal).



Este método es prescrito por la Farmacopea Europea, 2005 y consiste en usar el equipo de destilación que aparece en la Figura 2.1. (llamado *Trampa de tipo Clevenger*). La extracción se realizó pesando aproximadamente 80 g de hojas frescas de la planta y se adicionó una cantidad de agua que garantizara un cubrimiento total de la planta y hasta obtener un volumen constante de aceite (6 horas). El aceite esencial se colectó en el tubo graduado, se midió su volumen y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C. Se calcula en rendimiento obtenido de aceite esencial en base de droga seca.

Los extractos se obtienen utilizando las hojas de *Mosiera bullata* previamente molinadas. Se pesaron 5 g de las hojas en cada balón y añadiendo en los mismos 50 mL de acetato de etilo, acetona y metanol respectivamente. Fueron colocados en un agitador 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se filtró el extracto utilizando filtros de papel 0,45 μm y el solvente se evaporó por un rotoevaporador en vacío a 40°C hasta la sequedad. Las muestras obtenidas se almacenaron a 4°C hasta el próximo uso. Para obtener el rendimiento, se realiza el cálculo en base de extracto seco obtenido después de la rotoevaporación (%).

Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial y extractos orgánicos de las hojas de *Mosiera bullata*.

2.2.3. Determinación del rendimiento del aceite esencial y los extractos.

Antes de proceder a realizar la determinación del rendimiento de aceite fue necesario determinar el contenido de agua en el material vegetal, lo que permitió realizar la determinación del rendimiento en base a droga seca.

- Determinación del contenido de agua en la planta por el método del tolueno.

➡ Aparato

El aparato (Figura 2.2.) está formado por un matraz de vidrio, unido por un tubo de conexión, a un tubo cilíndrico de condensación, con un tubo colector graduado. El refrigerante está situado sobre el tubo cilíndrico. El tubo colector está graduado en 0,1 mL. La fuente de calor que debe utilizarse preferentemente es un calentador eléctrico regulado por un reóstato o un baño de aceite. La parte superior del matraz y el tubo de conexión pueden estar aislados.

➡ Procedimiento

Limpiar el tubo colector y el refrigerante del aparato, enjuagar cuidadosamente con agua y después secar. En el matraz seco introducir 200 mL de *tolueno R* y aproximadamente 2 mL de *agua R*. Destilar durante 2 h, dejar enfriar durante 30 min aproximadamente y leer el volumen de agua con una aproximación de 0,05 mL. A continuación introducir en el matraz la cantidad de sustancia a examinar, pesada con una aproximación del 1 por ciento, que pueda contener de 2 mL a 3 mL de agua aproximadamente. Si se trata de una sustancia pastosa, pesarla en una navetilla constituida por una lámina de metal. Calentar suavemente el matraz durante 15 min en presencia de algunos trozos de material poroso para asegurar una ebullición regular. Cuando el tolueno empieza a hervir, destilar a la velocidad de aproximadamente 2 gotas por segundo, hasta que se haya arrastrado la mayor parte del agua, seguidamente aumentar la velocidad de destilación hasta 4 gotas por segundo. Cuando toda el agua ha sido arrastrada, enjuagar el interior del tubo refrigerante con *tolueno R*. Continuar la destilación durante 5min, parar la calefacción y dejar enfriar el tubo colector hasta temperatura ambiente. Hacer caer cualquier gota de agua adherida todavía a la pared del tubo. Cuando el agua y el tolueno se hayan separado, leer el volumen de agua y calcular en porcentaje la concentración en agua de la sustancia a examinar a partir de la siguiente relación:

$$1000(n_2-n_1)/m$$

Lic. Yuriam De Armas Mesa

m = masa en gramos de la muestra a examinar.

n1= número de mililitros de agua obtenidos en la primera destilación.

n2= número total de mililitros de agua obtenidos en las dos destilaciones.

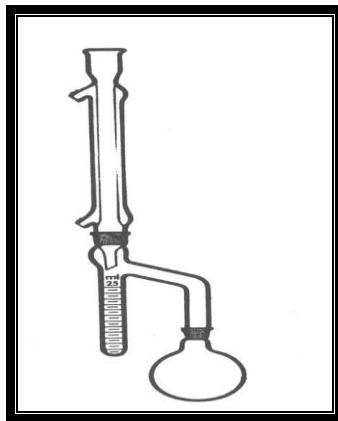


Figura 2.2. Equipo de arrastre de agua en aceites esenciales (método del tolueno)

- Determinación del rendimiento de aceite esencial.

Tras la destilación se midió volumen de esencia destilado y se calculó el contenido, que se expresó en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100 g de material vegetal) en base a la droga seca.

- Determinación del rendimiento de los extractos orgánicos.

Tras el secado, se pesaron los balones (Previamente tarados) con extractos secos y se calculó el contenido, expresado en gramo, a través de la siguiente expresión de cálculo:

$$M = \frac{(M_2 - M_1)}{10} \times 100$$

Donde: **M**: Peso del extracto obtenido.

M₁: Peso del balón vacío.

M₂: Peso del balón con extracto.

2.3. Determinación de la composición química del aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*.

2.3.1. Determinación de la composición química del aceite esencial obtenido.

La composición química en el aceite esencial de *Mosiera bullata* (hojas) se realizó empleando la técnica de GC-MS. Fue utilizado un GCMS-QP5050A Shimadzu, siguiendo las preparaciones y condiciones analíticas siguientes:

➡ Preparación de la muestra:

Se realizó la identificación a partir del aceite obtenido por el método de Hidrodestilación. Se realizaron las siguientes diluciones:

- 50 μ L de aceite esencial fue diluido en 1 mL de acetona (Solución A).
- 20 μ L de la Solución A fue diluido en 1 mL de acetona (muestra diluida).

➡ Los espectros obtenidos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Se utilizó una columna capilar DB-5MS.
- Como gas portador se utilizó He.
- Programa de temperatura del horno: temperatura de la columna se mantiene a 60°C durante 1 min, luego aumentándola a razón de 4°Cmin⁻¹ hasta 120°C y aumentar nuevamente a razón de 2°C por minuto hasta 150°C manteniéndolo durante 10 min. Seguidamente se programa hasta 230°C a razón de 10°Cmin⁻¹ manteniendo la temperatura de 230°C durante 10 min y finalmente alcanza hasta 280°C a razón de 20°C por minuto manteniéndolo durante 5 min.
- Temperatura del detector: 280°C.
- Temperatura del inyector de 250°C.
- Flujo del gas a través de la columna de 1 mL/min.
- Temperatura de la interface de 290°C.
- La cantidad relativa de cada componente expresado en por ciento (%) fue calculado comparando su área media con el área total.
- Espectrometría de masa: Intervalo de barrido de masas de 50-500 amu registrado a 70 eV; una velocidad de barrido de 2000 y un voltaje de 0,80 kV.

- ⇒ Índices de retención: fueron calculados para todos los componentes volátiles utilizando una serie homogénea de n-alcano C₈-C₂₀, empleando la ecuación de Van den Dool and Kratz (1963) siguiente:

$$RI_x = 100n + 100 \times (t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n) \text{ donde:}$$

- **RI_x** es índice de retención de temperatura programada de interés.
- **t_n; t_{n+1}; t_x**: son tiempo de retención en minutos de dos n-alcanos estándares que contiene n y n+1 carbonos y de interés, respectivamente.

2.3.2. Determinación del perfil cromatográfico del aceite esencial y los extractos por GC-FID. Identificación de componentes con el uso de patrones.

- ⇒ **Perfil cromatográfico**: Se realizó empleando la cromatografía gaseosa con un detector de ionización por llama (GC-FID).
- Desarrollo de la técnica: Fue ejecutada en un Cromatógrafo gaseoso AGILENT, empleando el siguiente procedimiento.
 - Preparación de la muestra:
Se realizó el perfil cromatográfico del aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*. El aceite esencial se diluyó 50 µL en 2 mL con acetona y se inyectó 1 µL de cada muestra en el modo splitless, mientras que los extractos se diluyeron 100 µL de la solución madre de cada extracto en 1 mL de acetona.
 - Condiciones cromatográficas:
La cromatografía se llevó a cabo utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el trabajo por Luis (2012)¹²⁰ en el cual se estandarizaron las condiciones cromatográficas para obtener perfiles cromatográficos de compuestos volátiles presentes en aceites esenciales:
 - ✓ Columna capilar de sílice fundida de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno.
 - ✓ Nitrógeno para cromatografía como gas portador.
 - ✓ Programa de temperatura: temperatura de la columna a 60°C durante 1 min, luego aumentándola a una velocidad de 2°C por minuto hasta 120°C por 40 min y aumentar nuevamente a razón de 10°C por minuto hasta 220°C.
 - ✓ Inyectar aproximadamente 1 µL de la disolución de referencia y la muestra problema.

- ✓ Detector de ionización por llama, 250°C.

2.3.3. Determinación cuantitativa de eugenol en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*.

2.3.3.1. Desarrollo del método.

La determinación de eugenol presente en el aceite de *Mosiera bullata* se realizó por la técnica de cromatografía de gases (CG-FID)

Preparación de las Muestras:

Solución madre: Se tomó 50 µL de aceite esencial, se disolvió en 1000 µL de acetona (A).

Solución de estándar interno (Alcanfor): Se pesó 100 mg de alcanfor y se disolvió en 5 mL de acetona (B).

Disolución problema de aceite de Mosiera: Se toma 10 µL de la solución madre de Mosiera, se añade 20 µL de la solución de estándar interno y se completó volumen hasta 1000 µL de acetona. Se procedió a inyectar en el cromatógrafo de gases 1 µL de esta solución.

Disolución problema del extracto de Mosiera bullata: los extractos se diluyeron 100 µL de la solución madre de cada extracto en 1 mL de acetona.

Disolución de referencia (Eugenol):

Solución madre: Se pesó 100 mg de eugenol, se disolvió en 5 mL de acetona (A).

Solución de estándar interno (alcanfor): Se pesó 100 mg de alcanfor y se disolvió en 5 mL acetona (B).

Disolución de referencia (eugenol): Se toma 100 µL de la solución madre de eugenol, se añade 100 µL de la solución de estándar interno y se completó volumen hasta 1000 µL de acetona. Se procedió a inyectar en el cromatógrafo de gases 1 µL de esta solución.

2.3.3.2. Condiciones cromatográficas:

- Fase Estacionaria: Columna capilar de Sílice fundida de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno (250°C durante 55 min) Polimetilsiloxano 5% DB5
- Fase móvil: Nitrógeno e hidrógeno para cromatografía R, como gas portador y auxiliar, respectivamente, a un caudal de 1,3 mL/min,
- Detector: Ionización por llama (T=280°C.)

Lic. Yuriam De Armas Mesa

- Inyector: Modo *Splitless* y la T=250°C
- Programa de temperatura: temperatura de la columna a 60°C durante 1 min, luego aumentándola a una velocidad de 2°C por minuto hasta 120°C por 40 min y aumentar nuevamente a razón de 10°C por minuto hasta 220°C.

Se calculó la concentración (%) de eugenol utilizando la siguiente expresión:

$$\%Eugenol = \frac{C_p * 100}{C_m}$$

C_p: Concentración del patrón en la muestra (mg/mL) (Calculada por la ecuación de la recta)

C_m: Concentración de la muestra (mg/mL).

A continuación se realizan los ajustes de las diluciones realizadas para finalmente calcular los mg de Eugenol por g de aceite y extracto, teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos en cada caso para esta planta.

2.3.3.3. Validación del método.

Se evaluaron algunos parámetros de desempeño para este método, según la literatura consultada ICH., (2005)¹²² y Validación de métodos analíticos, CEDMED., (2007)¹²³. El procesamiento de los resultados se realizó utilizando las posibilidades de cálculo estadístico del *Microsoft Office Excel*, 2003.

✓ Linealidad

Procedimiento: Se construyó una curva de calibración del patrón en el intervalo de concentraciones siguiente:

Preparación del estándar interno (alcanfor)

Se preparó una solución A de 100 µL de (alcanfor) en 5ml de acetona, constituyendo la solución madre,

Preparación del Patrón (eugenol)

Se pesó 100 mg del eugenol, se enrasó a 5 ml acetona constituyendo la solución madre de las cuales se tomaron las alícuotas siguientes: 25, 50, 100, 125 y 150 µL. Se procedió a inyectar en el cromatógrafo de gases.

Criterios adoptados: r: Coeficiente de correlación múltiple (Criterio ≥ 0.9900); C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas (Criterio $< 5\%$); Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente (Criterio $< 2\%$); Error típico (Et) Desviación Standard de Y (Sy) Criterio $Et < Sy$; $a \pm tSa$ y $b \pm tSb$

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Límites de confianza del intercepto y de la pendiente respectivamente (Criterio: Para a Contener el cero y para b no contenerlo). También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se determinó el coeficiente de calidad (CC) (Criterio $CC < 2,5\%$)

✓ Precisión

Procedimiento: Este parámetro incluyó la repetibilidad y la precisión intermedia para las muestras del aceite esencial y los tres extractos estudiados, siguiendo la preparación de muestra descrita en el epígrafe 2.3.5.1.

Para la repetibilidad se procesaron seis muestras (concentración 100%) a las cuales se les aplicó la técnica a validar en condiciones homogéneas, un mismo analista y en un mismo día; mientras que la precisión intermedia consistió en un procedimiento similar, con la misma concentración, realizado en diferentes días. En ambos casos se determinó el coeficiente de variación de los resultados.

Criterios adoptados: El coeficiente de variación (CV) para la repetibilidad $CV \leq 1,5\%$ y para la precisión intermedia $CV \leq 3\%$. Para evaluar la precisión intermedia se usó, además, el Test de Cochran, el Coeficiente de Variación de Horwitz y un análisis de varianza.

✓ Exactitud

Procedimiento: Se utilizó el método de adición del patrón. Las muestras (concentración 10%) se analizaron por triplicado, aplicándoles el procedimiento de muestra. Para ello se adicionaron a una cantidad conocida de la muestra (10%) cantidades crecientes del patrón de eugenol (Concentración: 20 mg/mL) 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L. En cada caso se completó a 100 μ L con acetona. Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones añadidas. Las concentraciones añadidas y recuperadas se representaron en un gráfico y se evaluó el recobrado como el valor obtenido para la pendiente del mismo. Además, se calcularon los porcentajes de recuperación para cada una de las muestras analizadas.

Criterio adoptado: Recobrado en el intervalo 97–103% según Fernández A., (1996)¹²⁴.

✓ Especificidad

Procedimiento: Se compararon los tiempos de retención de las sustancias presentes en la muestra y en el patrón. Se midió, el ancho de la semialtura y se calcularon los factores de simetría de los picos en los cromatogramas correspondientes a once inyecciones de patrón y once de muestras; se determinó la media y la varianza del patrón y de la muestra, se halló la T de Student y se calculó la F de Fisher, se compararon los valores de T y de F con los tabulados, con el objetivo de descartar posibles solapamientos

de picos. Para ello se calcularon los límites de confianza para los factores de simetría por la siguiente ecuación.

Cálculo de los Límites de Confianza para los factores de simetría:

$$\bar{X} \pm \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Para comparar los factores de simetría de los picos para el patrón y la muestra, se calcularon los intervalos de confianza de dichos factores, de forma tal que unos intervalos incluyan a los otros.

✓ Límite de detección y Límite de cuantificación

Procedimiento: Como una medida de la sensibilidad se tomó el valor de la pendiente de la curva así como los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Los cálculos se realizaron por el criterio de 3S y 10S, es decir el límite de detección (LD) como la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco (criterio 3σ de la IUPAC) bajo las condiciones experimentales óptimas. Por su parte el límite de cuantificación (LC) la concentración de analito que produce una señal igual a diez veces la desviación estándar del blanco bajo las condiciones experimentales óptimas. Una vez calculados los LD y LC se comprobaron los mismos, aplicando las dos técnicas evaluadas.

2.3.3.4. Determinación del contenido de eugenol presente en el aceite y los extractos estudiados.

Se aplicó la técnica de Cromatografía Gaseosa, descrita y validada según la metodología del epígrafe 2.3.5.1 al aceite y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata* y se determinó el contenido de eugenol en cada muestra, aplicando la fórmula descrita en el propio epígrafe.

2.3.4. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en las muestras.

El contenido total de compuestos fenólicos en el aceite esencial de *Mosiera bullata* fue determinado con reactivo Folin-Ciocalteu tal como se procede en el método aplicado por Nurmi et al, (1996)¹²¹, utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia.

2.3.4.1. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en el aceite esencial.

Desarrollo de la técnica.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

1. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

- Solución madre de ácido gálico (patrón): Se pesó 2 mg del mismo y disolver en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de ácido gálico las siguientes alícuotas: 50, 100, 150, 200, 250 μ L y se adicionó a continuación 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na₂CO₃ 7% y se enrasaron con H₂O destilada hasta un volumen de 5 mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como el blanco.

2. Preparación del aceite esencial:

- Se pipetearon 200 μ L del aceite esencial de las hojas de *Mosiera bullata* y se disolvieron a 1 mL con acetona (disolución madre del aceite). A partir de la disolución madre del aceite esencial, se tomaron 100 μ L de cada uno.

Procedimiento: Se tomaron 100 μ L de cada muestra en un volumétrico de 5 mL y se adicionó a continuación 200 μ L de reactivos de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na₂CO₃ 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5 mL con H₂O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada muestra se determinó en μ g equivalentes a ácido gálico/mL de aceite esencial, utilizando la ecuación obtenido de la curva de calibración de ácido gálico.

2.3.4.2. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en los extractos.

Desarrollo de la técnica.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

- Solución madre de ácido gálico (patrón): Se pesó 2 mg del mismo y disolver en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de ácido gálico las siguientes alícuotas: 50, 100, 150, 200, 250 μ L y se adicionó a continuación 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na₂CO₃ 7% y se enrasaron con H₂O destilada hasta un volumen de 5mL. Transcurridos 30 minutos se

Lic. Yuriam De Armas Mesa

midíó la absorbancia a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como el blanco.

Preparación de los extractos:

- Se pesaron por separado 30 mg de los extractos de las hojas de *Mosiera bullata* y fueron disueltos directamente en 1 mL de metanol 75% (disolución madre de cada extracto).

Procedimiento: Se tomaron 100 μ L de cada muestra en un volumétrico de 5 mL y se adicionó a continuación 200 μ L de reactivos de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na_2CO_3 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5mL con H_2O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada muestra se determinó en μ g equivalentes a ácido gálico/g de extracto seco, utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración del ácido gálico.

2.4. Evaluación de la actividad antioxidante en el aceite esencial y los extractos obtenidos.

2.4.1. Cuantificación de la actividad secuestradora de radical- El método basado en la transferencia electrónica.

2.4.1.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH del aceite esencial y los extractos:

➤ Preparación de la solución de DPPH:

Para una disolución de DPPH 0,004% (p/v), se pesó 0,004 g de DPPH, se disolvió con metanol y se completó a 100 mL con el mismo solvente. Así, se obtiene una solución de DPPH de 0,01 mM.

➤ Preparación de las disoluciones problemas:

Los antioxidantes sintéticos: BHT y eugenol fueron usados como controles positivos. Las disoluciones madres de los antioxidantes sintéticos y vegetales, los aceites esenciales y los extractos se prepararon en metanol y se realizaron las curvas de calibración correspondientes los datos se muestran en la (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Rango de concentraciones de la curva de calibración (μ g/mL) de las muestras.

BHT	aceite esencial	Extracto acetato etilo	Extracto acetona	Extracto metanólico	eugenol
50	200	0,143	0,159	0,258	10
87,5	300	0,429	0,477	0,516	20
125	400	0,715	0,795	0,774	30
162,5	500	1,001	1,113	1,032	40

Lic. Yuriam De Armas Mesa

➡ Procedimiento:

A 1 mL de cada disolución problema se le adicionó 3 mL de una solución de DPPH de concentración 0,004% (p/v). Después las muestras fueron colocadas durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia de cada una a 517 nm, frente a un blanco según el método descrito por Shimada et al., (1992)¹²⁵. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

➡ Cálculo:

El por ciento de inhibición del radical libre DPPH fue calculado por:

$$\% \text{ Efecto secuestrador} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_s}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Donde: A_{DPPH} es la absorbancia del control (contiene todos los reactivos excepto la muestra).

A_s es la absorbancia de la muestra.

El valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50% los radicales libres) fue calculado a partir de la ecuación de regresión, preparada a partir de diferentes concentraciones del aceite esencial, los extractos y de los antioxidantes de referencia y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales libres.

2.4.1.2. Fuerza reducida de los aceites esenciales y los extractos.

La fuerza reducida de cada muestra analizada se determinó por el método descrito por Seneviratne et al., (2006)¹²⁶, utilizando los antioxidantes sintéticos y vegetales como referencia: eugenol y Vitamina E.

➡ Procedimiento:

Preparación de las disoluciones de referencia:

Se pesó de cada antioxidante de referencia 50mg y se enrasó a 5mL en un volumétrico aforado con etanol 75%. Se obtuvieron las disoluciones madres de cada muestra de referencia.

De cada disolución madre de referencia, se tomaron 4 alícuotas diferentes: 125, 250, 375 y 500 μL , se completó el volumen a 5 mL con etanol 75% en matraz volumétrico. De cada disolución se pipeteó 1 mL y se trasvasó a un tubo de ensayo y a continuación se añadió 1 mL de buffer fosfato 0.2 M, pH=6,6 y 1 mL de ferricianuro de potasio 1 g/L. De forma inmediata, se incubaron estos tubos de ensayo a 50°C durante 20 minutos. Se enfriaron rápidamente y se mezclaron con 1mL de ácido tricloruro acético al 10%. Las

Lic. Yuriam De Armas Mesa

disoluciones obtenidas, se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos en caso de ser necesario. Posteriormente, se tomaron 2,5 mL del sobrenadante de cada tubo y se adicionó a cada uno 2,5 mL de FeCl_3 0,1%. Finalmente se midió la absorbancia a 700 nm contra el blanco preparado de forma similar pero sin la muestra.

Preparación de las muestras (aceite esencial y extractos):

Para obtener las disoluciones de los extractos y el aceite de *Mosiera bullata* se tomaron diferentes alícuotas de cada muestra para obtener las concentraciones 1,25; 2,5; 3,75 y 5 mg/mL, el aceite esencial se preparó en acetona a una concentración de 10 mg/mL y los extractos secos en etanol 75%. A partir de las disoluciones anteriores se siguió un procedimiento similar al desarrollado para los antioxidantes sintéticos y vegetales. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los valores de absorbancia obtenidos para los estándares de referencia, el aceite esencial y los extractos fueron graficados y se realizó una comparación de la actividad antioxidante entre todos.

2.4.1.3. Capacidad antioxidante total (TAOC).

La capacidad antioxidante total (TAOC) en el aceite esencial y los extractos de *Mosiera bullata* fue determinado por el método del molibdato de amonio según el método de Umamaheswari y Chatterjee (2008)¹²⁷, utilizando ácido ascórbico como sustancia de referencia.

Preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico

Solución madre de ácido ascórbico: Se pesó 5 mg del compuesto se disolvió en H_2O destilada y se enrasó a un volumen de 1 mL para obtener una solución madre con concentración 5 mg/mL (Disolución A). Se pipetearon a partir de la disolución A las siguientes alícuotas: 20, 40, 60, 80 y 100 μL y se completaron a 1 mL con H_2O destilada para obtener la curva de calibración.

Procedimiento: Se tomó 300 μL de cada disolución de la curva, se adicionó 3 mL de la mezcla de los siguientes reactivos (1 mL de ácido sulfúrico 0,6 M, 1 mL de fosfato de sodio 28 mM y 1 mL de molibdato de amonio 4 mM). Las muestras se calentaron durante 90 minutos a 95°C, se enfriaron y se midió la absorbancia a 695 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

Preparación de los extractos:

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Solución madre de cada extracto: Se pipeteó 80 µL de cada disolución de los extractos de las hojas (concentración 10 mg/mL) y se disolvió en 1 mL con metanol.

Procedimiento:

Se tomó 300 µL de cada disolución de cada muestra y se siguió el mismo procedimiento descrito para la curva de calibración del ácido ascórbico. La capacidad antioxidante total en cada extracto se determinó en mg equivalente de ácido ascórbico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración de ácido ascórbico.

2.4.1.4. Determinación del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP).

Preparación del reactivo (FRAP): 10 volúmenes de buffer fosfato 300 mM volumen de 2,4,6/tripiridil/s/triazina (TPTZ) 10 mM y 1 volumen de cloruro férrico 20 mM.

➡ Preparación de las muestras:

Aceite Esencial: Se toman 100 µL del aceite esencial y se diluyen en 1 mL de agua destilada

Extractos: Se toman 50 µL del extracto de acetato de etilo, 25 µL del extracto acetona, 15 µL del extracto metanólico se diluyen en 1 mL de agua destilada.

Procedimiento: Se toman 200 µL de cada muestra, se le adiciona 3,8 mL del reactivo FRAP. Transcurrido 5 minutos se realiza la lectura a 593 nm.

2.4.2. Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.

2.4.2.1. Método del tiocianato férrico.

La actividad antioxidante del aceite esencial fue determinada empleando el método del tiocianato férrico (FTC) en la emulsión del ácido linoleico con algunas modificaciones al método propuesto por Haraguchi et al., (1992)¹²⁸.

➤ Preparación de cada muestra:

Se pesaron 0,01g de eugenol, timol, Vitamina E, los aceites esenciales de la hoja de *Mosiera bullata* y se disolvieron de forma independiente en etanol absoluto y se enrasaron a mL (Disolución A) (10 mg/mL). En

los extractos se tuvo en cuenta los rendimientos de cada uno y se tomaron los volúmenes equivalentes a 10 mg, completando igualmente el volumen a un mL.

Se pesó 0,1255 g de ácido linoleico, se disolvió en etanol absoluto y se enrasó a un volumen de 5 mL en matraz aforado (solución obtenida 2,51%).

Preparación de la emulsión de ácido linoleico.

➤ Procedimiento:

En este método, el medio de reacción contiene 0,5 mL de cada muestra y se le adicionó 0,5 mL de la emulsión de ácido linoleico 2,51%, 0,4 mL de buffer fosfato 0,04 M, pH=7 y 0,38 mL de agua destilada. La mezcla de cada muestra fue mezclada e incubada a 70°C en oscuridad. El mismo medio de reacción, la disolución de ácido linoleico, se empleó como el control negativo. Cada 3 horas, durante la incubación, 0,05 mL de cada mezcla se diluyó con 2,85 mL de etanol 75% y siguiendo por la adicción de 0,05 mL de FeCl_2 0,02 M en HCl 3,5%. Luego de transcurridos 3 minutos, se añadió 0,05 mL de tiocianato de amonio al 30%. La absorbancia se midió a 500 nm contra el etanol 75% como blanco.

Cálculo:

El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoleico fue calculado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de la peroxidación lipídica} = 100 - \frac{A_s}{A_o} \times 100$$

Donde: A_o : Absorbancia del control negativo.

A_s : Absorbancia obtenida en presencia de la muestra de aceite esencial, extracto o control positivo.

Capítulo 3

Resultados y Discusión



Capítulo 3: Resultados y Discusión

3.1. Rendimiento del aceite esencial y extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*.

La técnica de hidrodestilación para la obtención de aceites esenciales es la técnica más usada a nivel de laboratorio debido a que el sistema es relativamente fácil de usar y el rendimiento es aceptable, además de que los costos de la destilación con este equipo son bajos. Mediante el procedimiento descrito en el acápite 2.2.3 del capítulo anterior se obtuvo un contenido de humedad de 6% para la *Mosiera bullata*. Este valor fue tomado en consideración para realizar los cálculos de rendimiento del aceite en la planta.

El contenido de aceite esencial en las hojas de *Mosiera bullata* obtenido fue de 1,8%. Este valor no se encuentra reportado en la bibliografía consultada de la planta por lo que no fue posible compararlo y por tanto el mismo constituye un aporte del presente trabajo.

Los extractos de las hojas de *Mosiera bullata* se obtuvieron utilizando tres solventes, seleccionados por su mayor posibilidad de disolver los posibles compuestos fenólicos presentes en la planta. Los solventes fueron acetato de etilo, acetona y metanol y el método de extracción empleado fue el sólido-líquido, que es el más utilizado en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica. Los valores del rendimiento de los extractos obtenidos se muestran en la (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Rendimiento obtenido para los extractos de la *Mosiera bullata*.

Extractos	Peso del polvo (g)	Extractos secos obtenidos (g)	Rendimiento (%)
Ext. acetato de etilo	10	1,43	14,3
Ext. acetona	10	1,59	15,9
Ext. metanólico	10	2,58	25,8

Como se observa el extracto metanólico tuvo un mayor rendimiento que los tres restantes, lo cual podría estar dado debido a que dicho extracto fue obtenido empleando el metanol, solvente que podría garantizar una mayor extracción de metabolitos presentes en la planta, si estos se caracterizaran por su naturaleza polar, lo cual se corresponde totalmente con lo reportado en la literatura consultada^{106, 129}.

3.2. Resultados obtenidos en la determinación de componentes volátiles presentes en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de la *Mosiera bullata*.

3.2.1. Composición del aceite esencial

La composición de los aceites esenciales es estudiada por un gran número de investigadores en todo el mundo, empleando la técnica de GC-MS gracias a la volatilidad de estos compuestos, por ejemplo Rajeswara et al., (2011)⁵⁹, Jorge et al., (2012; 2013)^{60, 61}, Singh et al., (2007)¹³⁰, Wei-Cai et al., (2011)¹³¹, Odabas-Köse et al., (2010)¹³², Ozen et al., (2011)¹³³, entre muchos otros. El cromatograma obtenido para el aceite, al aplicar la técnica GC-MS, aparece en las (Figura 3.1.).

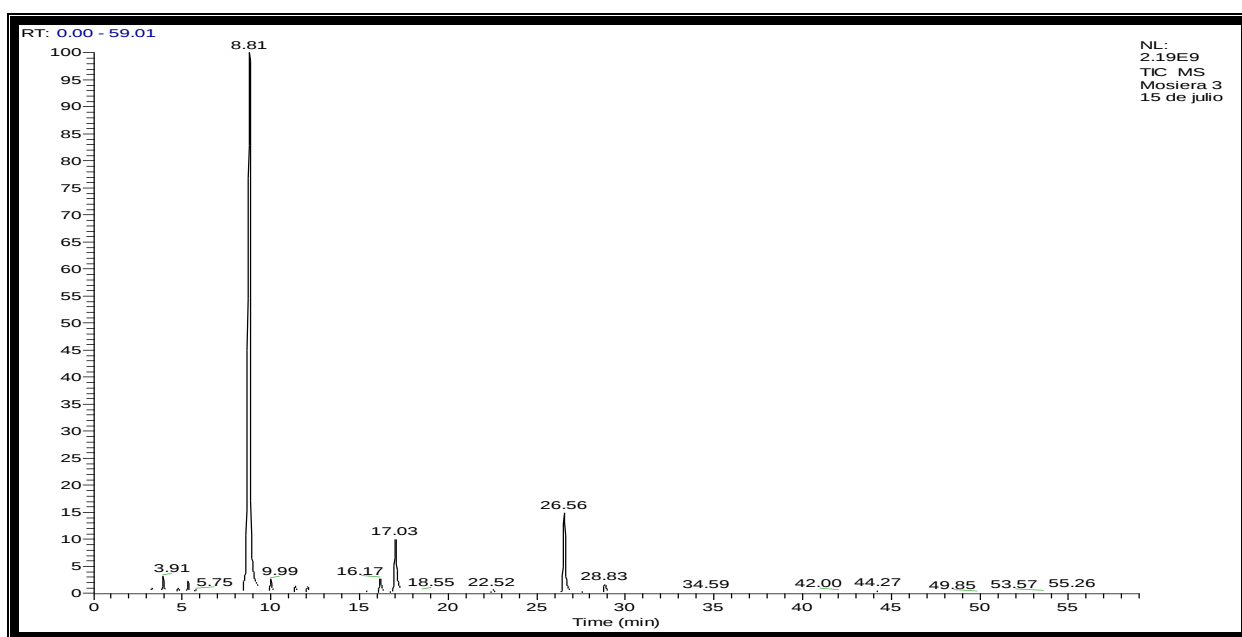


Figura 3.1. Cromatograma obtenido para el aceite, al aplicar la técnica GC-MS.

Como se observa el cromatograma del aceite se caracteriza por muy pocos picos, algo poco común en los aceites esenciales, que facilita considerablemente evaluar la composición del mismo. El análisis exhaustivo del espectro de masa de cada pico realizado con un especialista, así como con el empleo de la librería NIST, permitió identificar los 3 compuestos mayoritarios presentes en el aceite, los cuales aparecen descritos en la (Tabla 3.2.)

Lic. Yuriam De Armas Mesa

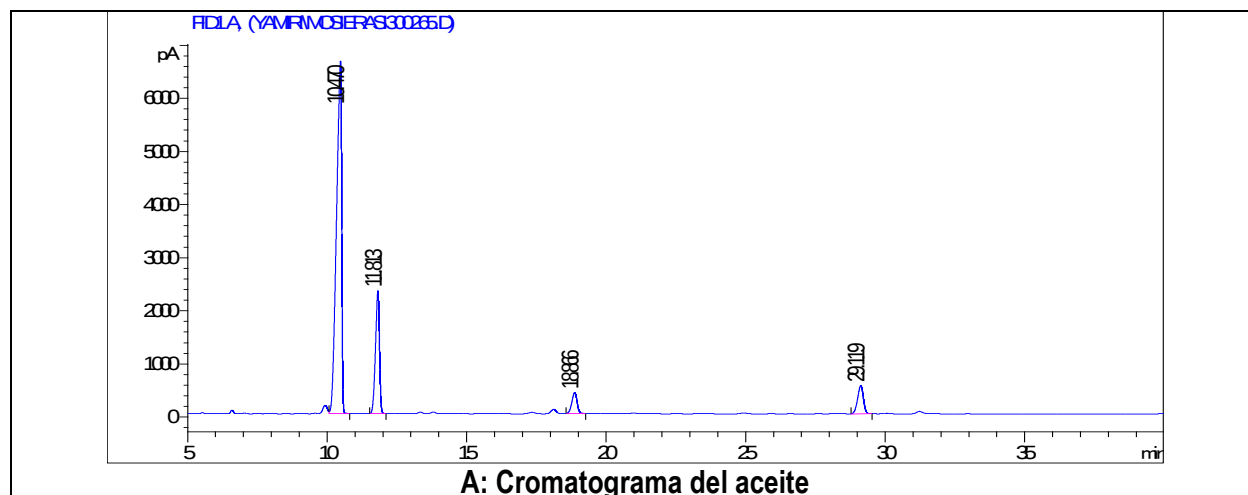
Tabla 3.2. Compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de la planta, al aplicar la técnica GC-MS.

Planta	No. Pico	Tiempo retención	% Área	RI	Compuesto identificado
<i>Mosiera bullata</i>	1	8,81	51,8	1037	1,8-cineol
	2	17,03	13.5	1358	DL-mentol
	3	26,56	17.7	1149	eugenol

Una vez identificados los tres componentes mayoritarios en el aceite se procedió a obtener los perfiles cromatográficos del mismo y de los extractos, aplicando la cromatografía gaseosa, con vistas a comparar la composición de compuestos volátiles presentes y cuantificar aquellos de los cuales se tuviera patrón disponible.

3.2.2. Perfil cromatográfico del aceite y los extractos, aplicando la GC-FID.

Con el objetivo de determinar la presencia o no de los componentes determinados por GC-MS en el aceite en los extractos evaluados y comparar la composición de los mismos en cuanto a componentes volátiles, se obtuvo el perfil cromatográfico de extractos y aceite, aplicando la técnica GC-FID con iguales condiciones cromatográficas. La (Figura 3.2.) muestra los cromatogramas obtenidos para cada muestra.



Lic. Yuriam De Armas Mesa

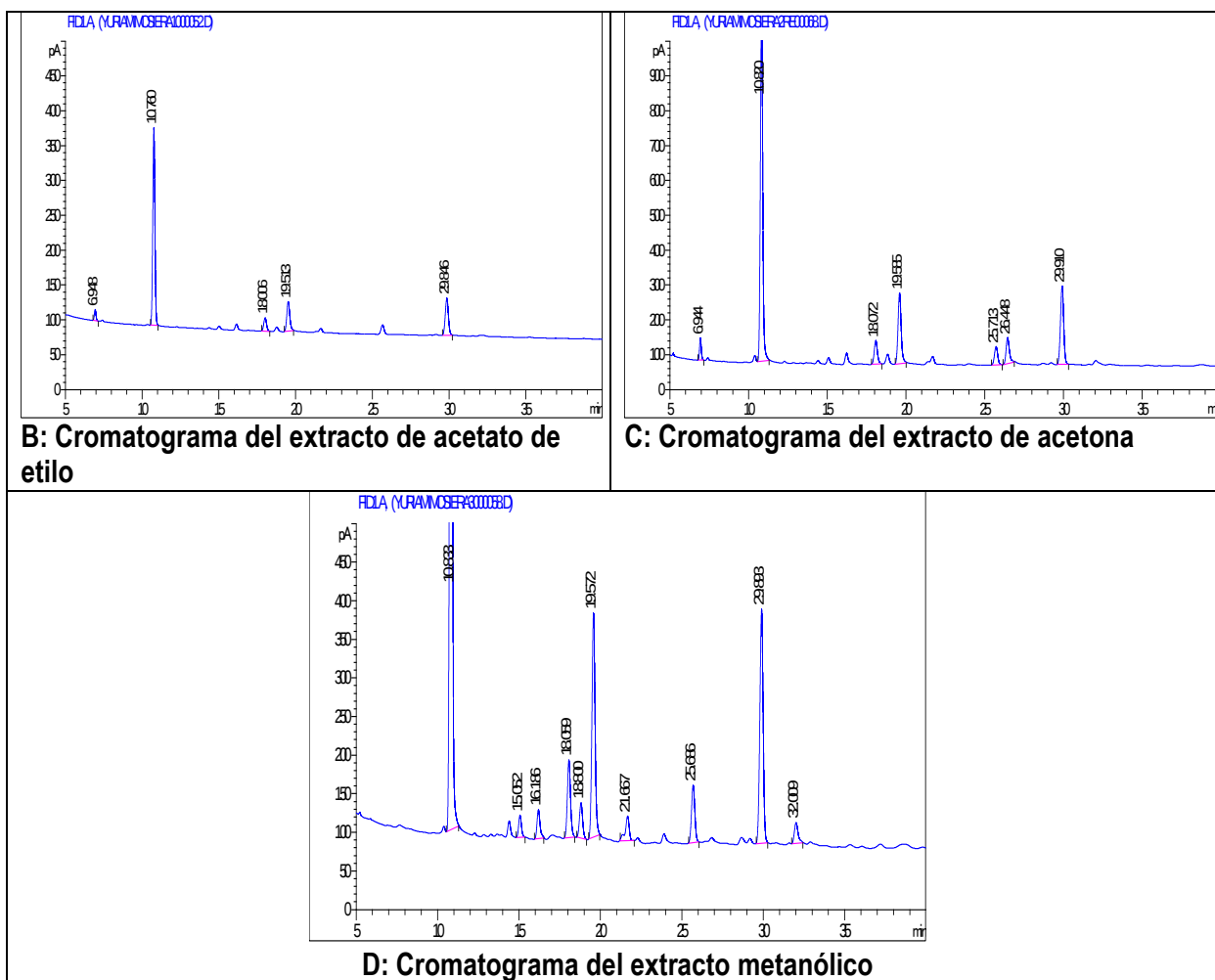


Figura 3.2. Cromatogramas obtenidos para el aceite y los extractos de *Mosiera bullata*, al aplicar la técnica GC-FID. A: Cromatograma del aceite esencial de *Mosiera bullata*, B: Cromatograma del Extracto de acetato de etilo, C: Extracto de Acetona y D: Extracto Metanólico.

Al comparar los cromatogramas del aceite y los extractos, en cuanto a la composición de compuestos volátiles presentes se puede observar claramente que hay una coincidencia en todas las muestras de los componentes mayoritarios a los tiempos de retención de 10 minutos, 19 minutos y a los 29 minutos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios GC-MS en el aceite fueron identificados el 1,8 cineol, DL-mentol y eugenol por lo que se comatografiaron patrones de estos tres compuestos (Figura 3.3) y se corroboró la presencia de estos en los perfiles cromatográficos de aceite y extractos, al aplicar la técnica GC-FID, bajo las mismas condiciones cromatográficas que la muestra

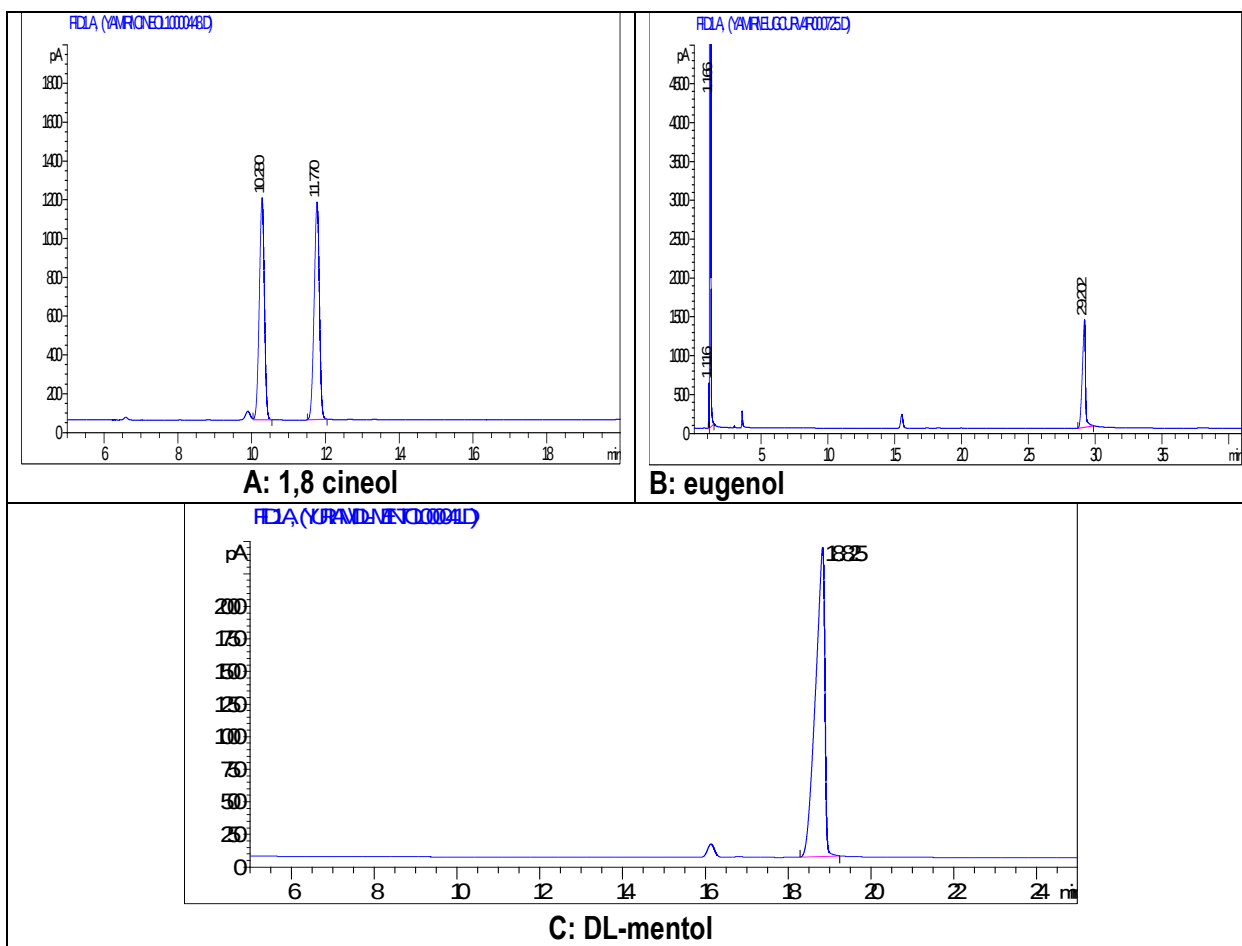


Figura 3.3. Cromatogramas de los patrones evaluados, obtenidos al aplicar la técnica GC-FID. (A: 1,8 cineol, B: eugenol y C: DL-mentol).

Considerando la composición obtenida para las muestras, el interés de evaluar en las mismas la actividad antioxidante y la existencia de investigaciones que han demostrado que el eugenol posee esta actividad comparada con antioxidantes de referencia como el Hidroxitolueno butilado (BHT) se decidió cuantificar este metabolito en las muestras, con vistas a relacionar el mismo con la existencia de actividad antioxidante. En el epígrafe siguiente se exponen los resultados de esta determinación.

3.2.3. Determinación cuantitativa del contenido de eugenol en los aceites esenciales y extractos obtenidos.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

3.2.3.1. Validación de la técnica

Una vez identificada la presencia de eugenol en las muestras se procedió a validar la técnica de Cromatografía Gaseosa para determinar este metabolito en las muestras en estudio. Para ello se tuvo en cuenta lo establecido por las normas CECMED, 2007, las cuales incluyen los parámetros linealidad, precisión, exactitud, especificidad y los límites de detección y cuantificación. A continuación se exponen, por separado los resultados para cada uno de ellos.

✓ Linealidad

La (Figura 3.4.) muestra la curva de calibración obtenida al evaluar la linealidad en la cromatografía gaseosa empleada para la determinación cuantitativa de Eugenol en el aceite. Los criterios estadísticos utilizados para evaluar el parámetro aparecen en la (Tabla 3.3.)

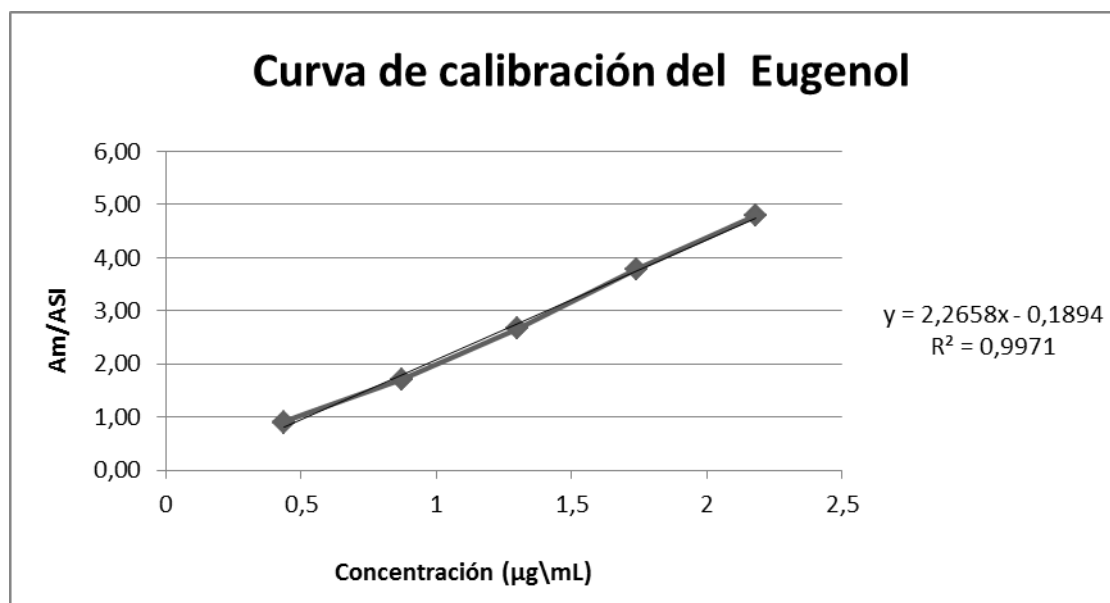


Figura 3.4. Curva de calibración para la determinación de Eugenol en aceites esenciales, empleando la GC-FID.

Si se comparan los valores obtenidos en cada parámetro con los criterios establecidos por las normas CECMED, 2007, se puede afirmar que en todos los casos se encuentran dentro del intervalo especificado: La ecuación de la recta obtenida para el eugenol fue $Y = 2,2658X - 0,1894$, con un coeficiente de correlación de 0,9971, un coeficiente de variación de los factores respuesta de 4,45% (inferior al 5%) y una desviación estándar de la pendiente de 0,0005, valor inferior que el 2%. El intervalo

de confianza obtenido para el término independiente incluyó el cero, muestra de un resultado satisfactorio para este parámetro. La fiabilidad de la ecuación se evaluó, además, a través del error típico cuyo valor es muy inferior a la desviación estándar de la variable Y. Con vistas a corroborar los resultados anteriores se realizó un análisis de varianza en el cual se obtuvo un valor de 1044.5 (F mucho mayor que el F crítico), estadísticamente significativo. Sin embargo el valor del coeficiente de calidad es muy inferior a 2,5 (0) por lo que se puede plantear que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado.

Tabla 3.3. Resultados de los criterios estadísticos utilizados para evaluar la linealidad en la técnica de GC-FID.

Parámetro	Valor obtenido	Criterio Establecido
Ecuación de la recta	Área=2,2658X – 0,1894	
r_i : Coeficiente de correlación	0,9971	$r_i \geq 0,99$
C,V,F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas.	4,45%	C.V.F $\leq$ 5%
Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente.	0,0005%	Sbrel % $\leq$ 2%
Intervalo de confianza del intercepto	+48,01 -47,63	Incluir el cero
CC: Coeficiente de calidad	0	CC < 2,5%

✓ Precisión

Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. Para el primer caso la técnica se repitió sin alterar las condiciones, mientras que en el segundo la técnica se desarrolló en diferentes días.

La (Tabla 3.4.) muestra los resultados estadísticos obtenidos al evaluar ambos parámetros. El coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad (1,08%) resultó ser menor que el establecido para este ensayo cuando es realizado a materias primas farmacéuticas (1,5%) lo que indica que la técnica posee buena repetibilidad. Por su parte en la precisión intermedia se obtuvo también un coeficiente de variación (1,60%) inferior al establecido (3%), además, en este parámetro se evaluaron otros parámetros estadísticos que garantizan la veracidad de los resultados y cuyos estadígrafos aparecen también reflejados en la misma tabla.

El análisis de varianza realizado muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos al obtenerse en la prueba Fischer una $F_{cal} < F_{crítica}$. Esto es ratificado por el Test de Cochran's ($C_{cal} =$

0,48) en el cual se obtuvo una $C_{cal} < C_{Crítica}$. Finalmente el Coeficiente de variación entre los grupos (CV (%)) = 0,45) resultó ser menor que el valor obtenido para el coeficiente de variación de Horwitz (3,53) ratificando con esto la veracidad del resto de las pruebas.

Los resultados obtenidos en ambos parámetros permiten asegurar que la técnica de Cromatografía Gaseosa es “precisa” para la determinación de eugenol en el aceite esencial y los extractos evaluados.

Tabla 3.4. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro precisión en la técnica de GC-FID.

REPETIBILIDAD			
Réplica 1 (Am/Asl)		Parámetros estadísticos	
2,288		Media SD CV (%)	2,26 0,025 1,08
2,271			
2,286			
2,221			
2,257			
2,261			
PRECISIÓN INTERMEDIA			
Día 1 (Am/Asl)	Día 2 (Am/Asl)	Parámetros estadísticos	
2,29	2,34	Media SD CV (%) Horwitz	2,291 0,037 1,60 3,53
2,27	2,27		
2,29	2,312		
2,22	2,317		
2,26	2,336		
2,26	2,329		
Dentro de los Grupos S =0,025% ; CV(%) = 1,09			
Entre los Grupos S =0,028% ; CV(%)= 0,45			
Cochrans (C calculada)= 0,48 Cochrans (C crítica) 0,59			
Horwitz 3,83			

✓ Exactitud

Existen diferentes procedimientos para evaluar la exactitud de un método. Cuando se trabaja con matrices complejas, como es el caso de los productos herbarios, cualquiera sea su forma de presentación, el procedimiento de adición de estándar es de gran utilidad, siempre que se cuente con el apropiado marcador químico o metabolito mayoritario de interés. En el presente estudio se cuenta con el eugenol como patrón. Según el método de adición de estándar la recuperación obtenida fue de 98,35% en

Lic. Yuriam De Armas Mesa

correspondencia con la pendiente de la curva de recuperación con el siguiente modelo matemático (Figura 3.5): $y = 1,028 X + 0,0195$

Estos valores demuestran una elevada exactitud en las determinaciones de eugenol, con el procedimiento utilizado. Para confirmarla, se aplicó una prueba t de Student. Al ser $t_{exp} < t_{tab}$ no existen diferencias significativas entre recuperación media y 100, por lo que el método es exacto.

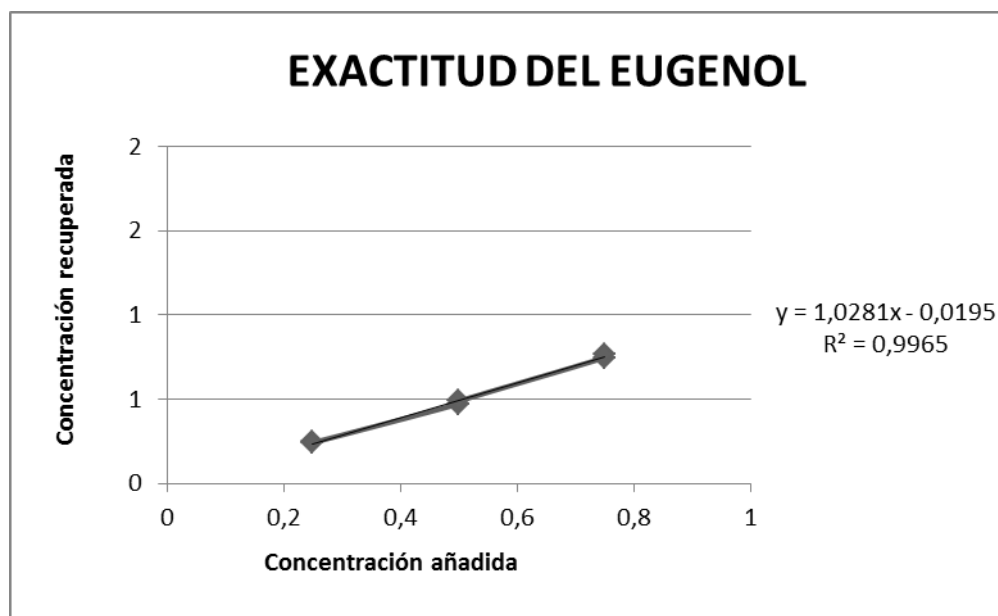


Figura 3.5. Curva de recuperación para la técnica GC-FID.

✓ Especificidad

La inyección del blanco, demostró la no existencia de interferencias al tiempo de retención de las sustancias presentes en la muestra (Figura 3.6.). Si se compara el pico cromatográfico del patrón de Eugenol (Figura 3.7.) con el pico correspondiente en la muestra bajo las condiciones óptimas de análisis, no se observaron a simple vista colas, frentes difusos ni hombros y se puede inferir que no debe existir solapamientos de picos (Figuras 3.2). Tampoco se observaron variaciones significativas en los tiempos de retención, los cuales se mantienen dentro de un intervalo de $\pm 2\%$.

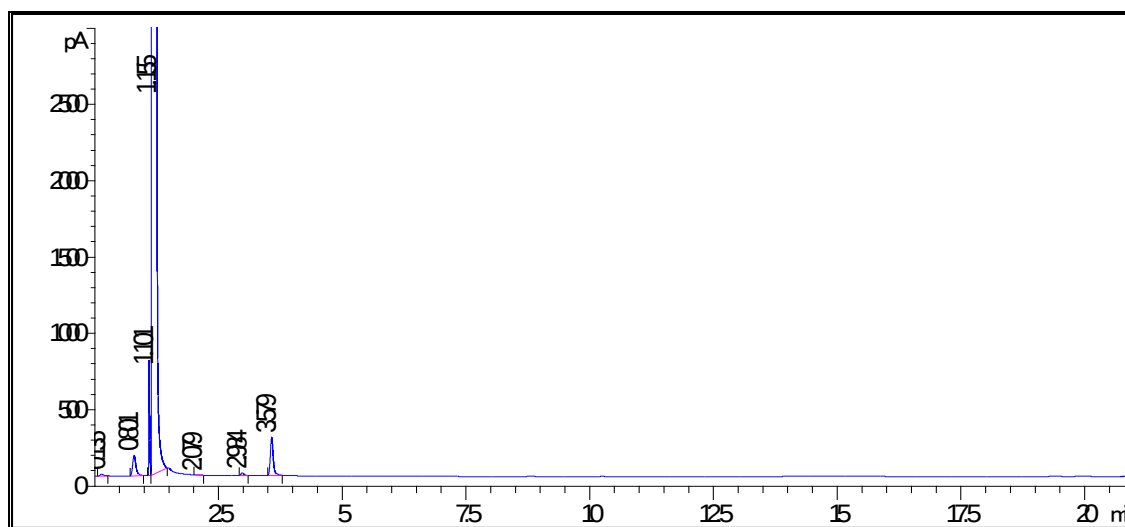


Figura 3.6. Cromatograma GC-FID correspondiente al blanco

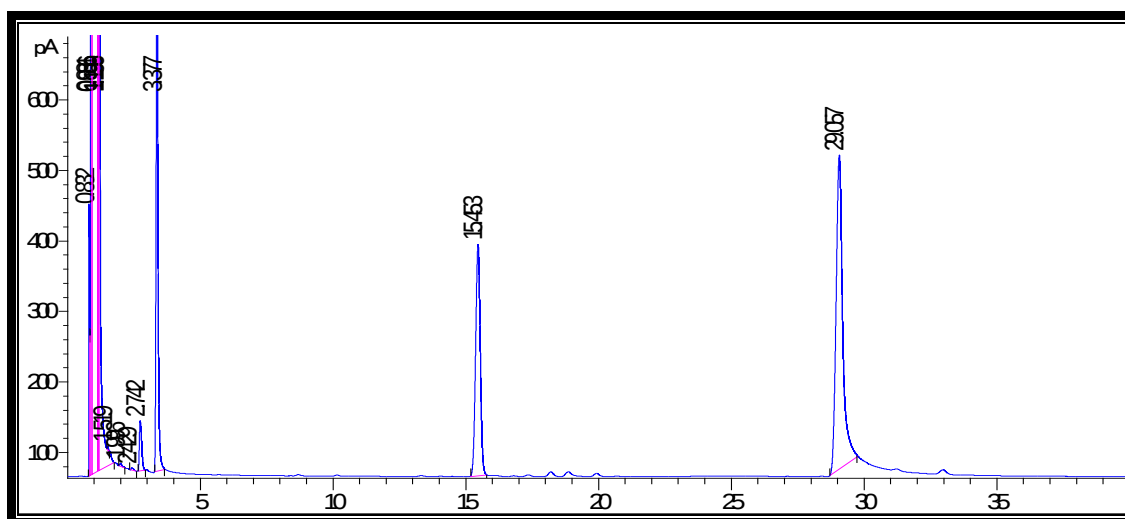


Figura 3.7. Cromatograma GC-FID correspondiente al patrón eugenol ($t_r=29,05$) con el estándar interno (Alcanfor, $t_r=15,45$).

Estos resultados muestran la no existencia interferencias apreciables que puedan afectar la determinación confiable del eugenol en los aceites esenciales. Sin embargo, con vistas a ratificar los mismos se analizaron los factores de simetría de picos del patrón y las muestras de aceites en estudio. Los intervalos de confianza de los factores de simetría de los picos para el patrón y la muestra, se incluían entre sí. Para el patrón estos intervalos van desde -0,013 hasta 0,982 y en el caso de la muestra los intervalos oscilan desde -0,011 hasta 0,860. (Tabla 3.5.).

Tabla 3.5. Resultados estadísticos al calcular el intervalo de confianza del eugenol (patrón y muestra)

Patrón	Muestra
$\bar{X} = 0,96$	$\bar{X} = 0,84$
$t = 1,83$	$t = 1,83$
$S = 0,13$	$S = 0,11$
$n = 10$	$n = 10$

✓ **Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).**

Los resultados del LD y LC para el eugenol se recogen en la (Tabla 3.6.) Como límite de detección para el eugenol se obtuvo un valor de 0,14 µg/mL y como límite de cuantificación 0,26 µg/mL, valores que se encuentran por debajo del valor más bajo de concentración evaluado en la técnica, la cual incluye un intervalo amplio de concentración, teniendo en cuenta la variabilidad de este componente en los diferentes extractos y en el aceite esencial.

Tabla 3.6. Resultados del LD y LC correspondiente al eugenol en las muestras estudiadas.

Resp. Blanco (Am/ASI)	Media	Desv. Estándar	Pendiente	Límite de detección (LD) (µg/mL)	Límite de cuantificación (LC) (µg/mL)
42,80 42,50 42,21 44,43 40,60	1,28	0,09	2,26	0,14	0,26

Teniendo en cuenta el cumplimiento de todos los parámetros de desempeño, la técnica analítica es fiable y por tanto se concluye que la técnica analítica GC-FID puede ser utilizada en la determinación cuantitativa de eugenol en las muestras evaluadas en el presente trabajo.

3.2.3.2. Aplicación de la técnica validada a la determinación de Eugenol presente en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de la *Mosiera bullata*.

Una vez validada la técnica se aplicó en la determinación del contenido eugenol presente en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de la *Mosiera bullata*. La (Tabla 3.7.) muestra los valores promedios de este compuesto obtenido para cada uno de los extractos obtenidos de la especie.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

Tabla 3.7. Valores promedios del porcentaje de eugenol presente en la *Mosiera bullata*.

Antioxidante referencia	aceite esencial	Ext. acetato de etilo	Ext. acetona	Ext. metanol
Eugenol (%)	0,44 ± 0,014	1,39 ± 0,06	2,15 ± 0,05	2,77 ± 0,27

3.3. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante en el aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*.

Tanto los extractos como los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales que son ricos en compuestos fenólicos son de interés para industria farmacéutica, alimentaria y cosmética como un ingrediente antioxidante natural. Ellos son, desde el punto de vista química, mezcla compleja constituida por varios componentes que tienen además de su actividad individual, efecto antagónico y sinérgico, lo que dificulta fundamentar las actividades biológicas que poseen los mismos¹³⁴.

La actividad antioxidante de aceite esencial y los extractos de la *Mosiera bullata* fue evaluada comparando con los antioxidantes sintéticos BHT, Vitamina E, y los patrones de origen natural eugenol y timol por diferentes métodos: actividad secuestradora del radical libre DPPH, fuerza reductora, método del tiocianato férrico (FTC), poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) y actividad antioxidante total. La selección de estos métodos obedece a incluir ensayos que abarquen los dos grupos de agentes antioxidantes, clasificados según el mecanismo de reacción: Los que miden la habilidad secuestradora a los radicales libres y los que evalúan la peroxidación lipídica¹²⁵. En el primer caso se incluyeron los ensayos, DPPH, FRAP y fuerza reductora, mientras que en el segundo caso se incluyó el estudio en ácido linoleico desarrollando el ensayo de FTC. A continuación se exponen los resultados de dichos ensayos.

3.3.1. Determinación del contenido fenólico total.

La determinación del contenido fenólico total en extractos obtenidos de plantas medicinales ha sido reportada en múltiples investigaciones, justificado por la relación directa de estos compuestos con una variedad de efectos biológicos que incluyen, entre otras, la actividad antioxidante. El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico (Figura 3.8.) y el resultado obtenido para cada muestra aparece reflejado en la (Tabla 3.8.).

Lic. Yuriam De Armas Mesa

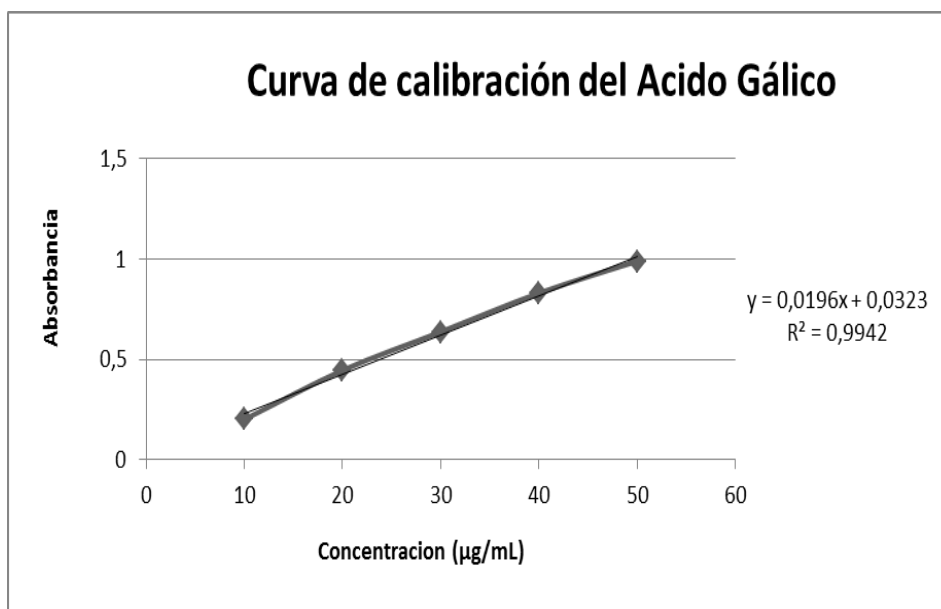


Figura 3.8. Curva de calibración del Ácido Gálico.

Tabla 3.8. Contenido fenólico obtenido para cada muestra.

Parámetro estudiado	aceite esencial	Ext. acetato de etilo	Ext. acetona	Ext. metanol
Contenido fenólico (mg ácido gálico/g extracto)	34,40	150,9	100,5	155,0

Como resultado se obtuvo que el contenido total de compuestos fenólicos obtenido es similar para el extracto de acetato de etilo y el metanólico, menor para el extracto de acetona y significativamente menor para el aceite. Estos resultados sugieren que estos tres extractos deben mostrar una similar actividad antioxidante y el aceite debe tener valores por debajo de esta. Los valores obtenidos son específicos para cada extracto y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

Si comparamos los valores obtenidos para esta planta con respecto a este parámetro obtenido en otras plantas medicinales (Tabla 3.9.) observamos que los tres extractos evaluados poseen un alto contenido fenólico, siendo muy superior al aceite.

Tabla 3.9. Ejemplo de contenido total de fenoles del extracto de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido total de fenoles (mg de ácido gálico equivalente/g de extracto seco)	Bibliografía
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Metanol 61,26 Cloroformo 43,12 Hexano 11,23 Acetato de etilo 85,17	Bajpai-Vivek et al., (2009) ¹²⁹
<i>Allium cepa</i> y <i>Allium oschaninii</i> (5 especies)	Ext. Etanólicos 1,42--17,18	Tang y Rasco (2011) ¹³⁵
<i>Pelargonium graveolens</i>	Hidrosoles 34,88 en hojas y 102 en estigmas.	Cavar y Maksimovi (2012) ¹³⁶
<i>Origanum vulgare</i> ssp	Ext. Metanólico: 0,22	Sahin (2004) ¹³⁷
<i>Thymus praecox</i>	2,78 – 6,21	Ozen et al., (2011) ¹³³
<i>Rapeseed cultivars</i>	7,56 – 13,24	Szydłowska-Czerniak et al., (2011) ¹³⁸
<i>Cuminum cyminum</i> L	Ext Acetona: 5-15	Bettaieb et al., (2011) ¹³⁹

3.3.2. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.

En este ensayo se procesaron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los patrones utilizados (BHT y eugenol), el aceite esencial y los extractos evaluados en el estudio, de las cuales se obtuvo las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada caso. La (Figura 3.9.) muestra las curvas obtenidas para los patrones antioxidantes, el aceite y los extractos evaluados las cuales permitieron determinar el valor de IC₅₀ para cada muestra, valores que aparecen descritos en la (Tabla 3.10.) Los bajos valores de IC₅₀ indican alta actividad secuestradora de radicales libres.

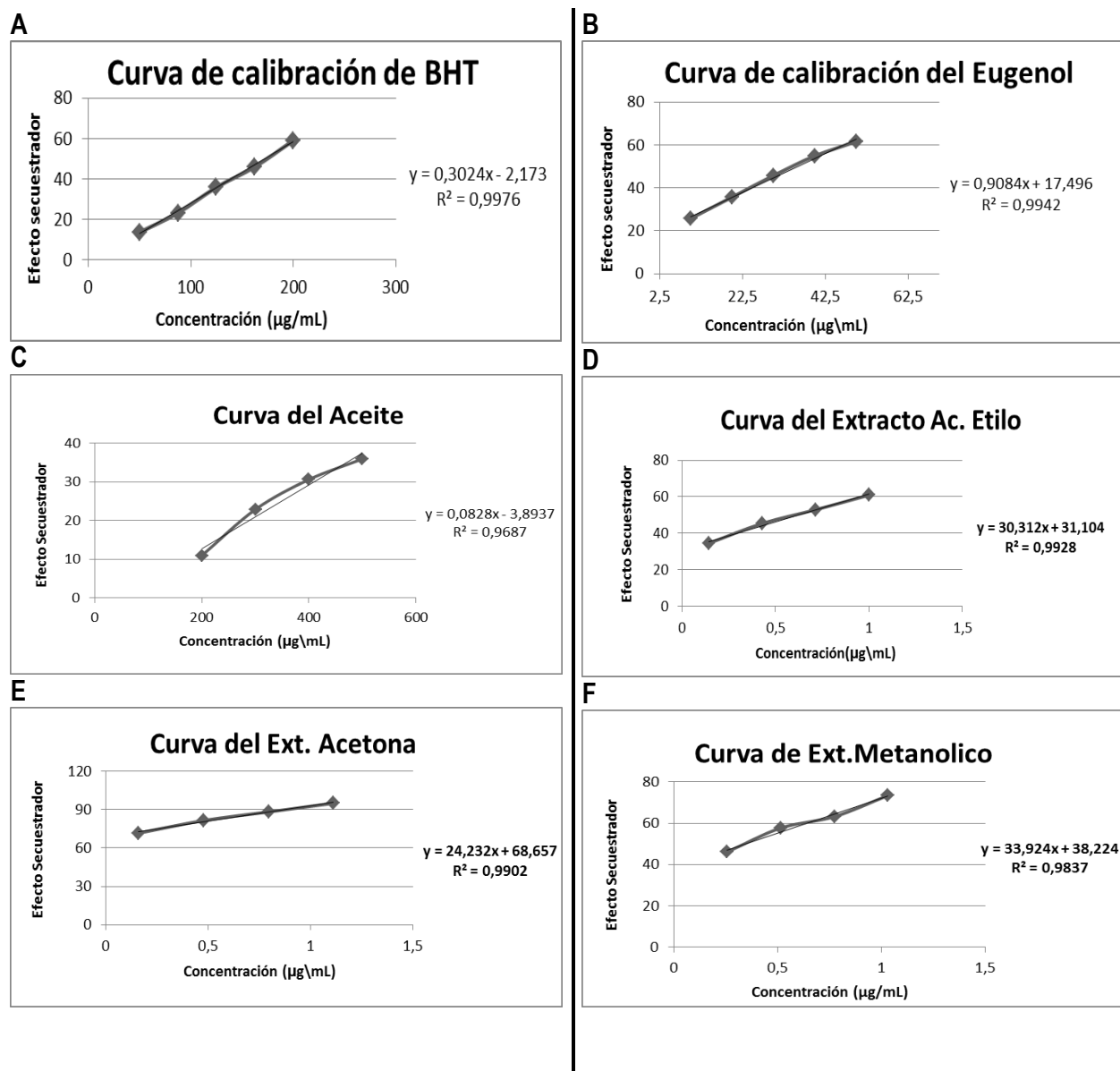


Figura 3.9. Curvas de calibración obtenidas para el aceite, los extractos y los patrones estudiados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH (A: BHT; B: eugenol; C: aceite esencial; D: Ext. acetato de etilo, E: Ext. acetona y F: Ext. metanólico).

Cada curva muestra que la actividad secuestradora se incrementa con el aumento de la concentración de la muestra debido a la reacción de donación de electrones entre las moléculas de antioxidante y los radicales libres⁹⁴. Ellas también permitieron determinar el valor de IC₅₀ para cada muestra, siguiendo la

Lic. Yuriam De Armas Mesa

metodología de Litchfield y Wilcoxon (1949)¹⁴⁰. Los valores de IC₅₀ obtenidos para las muestras evaluadas aparecen descritos en la (Tabla 3.7.).

Tabla 3.10. Resultados de la actividad secuestradora del radical DPPH de los patrones de antioxidantes, el aceite esencial y los extractos evaluados.

Muestras	Concentraciones (µg/mL)	Inhibición (%)	IC₅₀ (µg/mL)
BHT	50	13,74	128,419
	87,5	23,32	
	125	35,96	
	162,5	46,07	
	200	59,07	
eugenol	10	25,75	29,000
	20	35,72	
	30	45,79	
	40	54,92	
	50	61,56	
aceite esencial	200	10,92	329,8
	300	22,84	
	400	30,60	
	500	35,92	
Ext. acetato etilo	0,143	34,54	0,946
	0,429	45,38	
	0,715	52,92	
	1,001	62,92	
Ext. acetona	0,159	71,57	0,603
	0,477	81,47	
	0,795	88,24	
	1,113	95,00	
Ext. metanólico	0,258	46,11	0,636
	0,516	57,68	
	0,774	63,17	
	1,032	73,45	

Como se observa en la tabla los valores de IC₅₀ obtenidos para los extractos evaluados son muy inferiores con respecto a los antioxidantes sintéticos, lo que es muestra de una alta actividad para estos. Por su parte el aceite esencial posee una actividad antirradicálica muy inferior con respecto a los extractos. Estos resultados se corresponden con los resultados obtenidos para el contenido fenólico, corroborándose, una

vez más, la relación de estos metabolitos con dicha actividad. Además, existe como posible justificación que al realizar las extracciones en las hojas de la planta se suman a los compuestos volátiles otros metabolitos que también le aportan actividad antioxidante a los mismos, dando muestras del posible sinergismo que se le atribuye a las muestras obtenidas de plantas medicinales. En resumen se puede afirmar categóricamente que los extractos estudiados poseen una alta actividad antioxidante, en las concentraciones evaluadas, por este mecanismo.

El efecto secuestrador del radical DPPH de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden:

Extracto metanólico≈Extracto de acetato de etilo≈ Extracto de acetona>eugenol >BHT>>>aceite esencial.

3.3.3. Fuerza reductora.

La determinación de la fuerza reducida de los compuestos presentes en la muestra se lleva cabo por la reducción de Fe^{3+} a la forma de Fe^{2+} , el color amarillo de la solución examinada cambia en varios tonos de verde tinto o azul prusiano dependiendo en fuerza reducida de cada muestra. A mayor valor de la absorbancia, mayor será la fuerza reducida. En la (Tabla 3.11.) muestra los valores de la absorbancia de los antioxidantes patrones y los extractos evaluados en el sistema de fuerza reducida.

Tabla 3.11. Valores de la absorbancia de los antioxidantes patrones, aceite esencial y los extractos evaluados en el sistema de fuerza reducida.

Concentración (mg/mL)	Valores de absorbancia					
	Vit. E	eugenol	Ext. acetato etilo	Ext. acetona	Ext. metanólico	aceite esencial
1,25	0,296	0,586	0,129	0,992	0,664	1,698
2,50	0,707	1,167	0,614	2,092	1,172	1,985
3,75	1,437	1,487	0,908	2,653	1,678	2,430
5,00	1,464	1,865	1,147	2,919	2,025	2,643

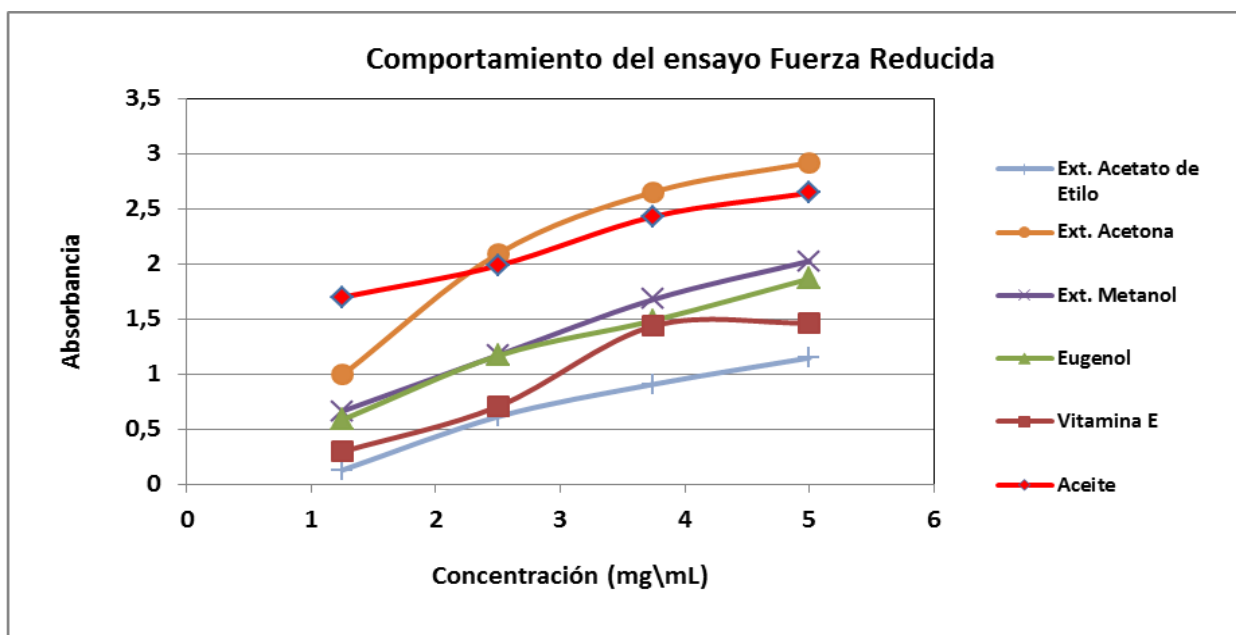


Figura 3.10. Efecto antioxidante de los antioxidantes patrones y los extractos evaluados en el sistema de fuerza reducida.

La (Figura 3.10) y la (Tabla 3.11.) muestran los resultados obtenidos en este ensayo. El incremento de la absorbancia en la mezcla de reacción es indicativo del incremento de la fuerza reducida. Estos datos muestran que la habilidad reductora se incrementa con el aumento de la concentración de la muestra, lo cual se ve reflejado en mayores valores de absorbancia en la mezcla de reacción. El aceite esencial y el extracto de acetona, a las concentraciones probadas, mostraron la mayor habilidad para reducir el Fe^{3+} , en comparación con la Vitamina E y el eugenol, que también fueron superados por los dos extractos alcohólicos, quedando con la menor actividad antioxidante el extracto de acetato de etilo. El efecto antioxidante en el sistema fuerza reducida de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden: Extracto de acetona > Aceite esencial > Extracto metanólico > eugenol > Vit E > Extracto de acetato de etilo.

Este resultado no posee total correspondencia con el ensayo anterior, lo que pudiera ser explicado por la diferencia existente en el mecanismo por el cual ocurre la captación de los radicales.

3.3.4. Determinación del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP)

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) fue calculado empleando la curva de calibración de Sulfato de Hierro (Figura 3.11.) y está expresado en mmol/L de FeSO₄ equivalentes por gramo de extracto. Los resultados obtenidos para este ensayo se reflejan en la (Figura 3.12.) donde se observa con claridad que los mejores resultados fueron obtenidos para el extracto metanólico, seguido por el extracto de acetato de etilo y de acetona. El aceite esencial no aportó resultados relevantes al compararlos con las muestras previamente mencionadas. Lo anterior muestra que los tres extractos con mayor poder reductor tienen mayor potencial que el resto para reducir el ion férrico a ion ferroso.

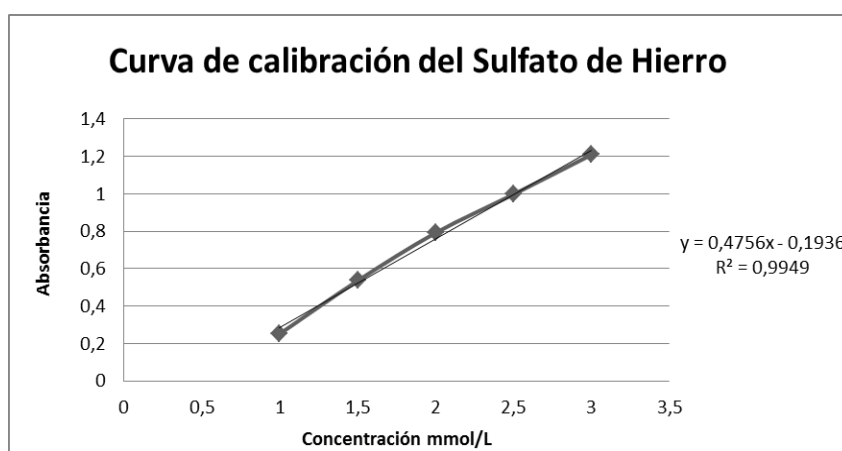


Figura 3.11. Curva de calibración del Sulfato de Hierro

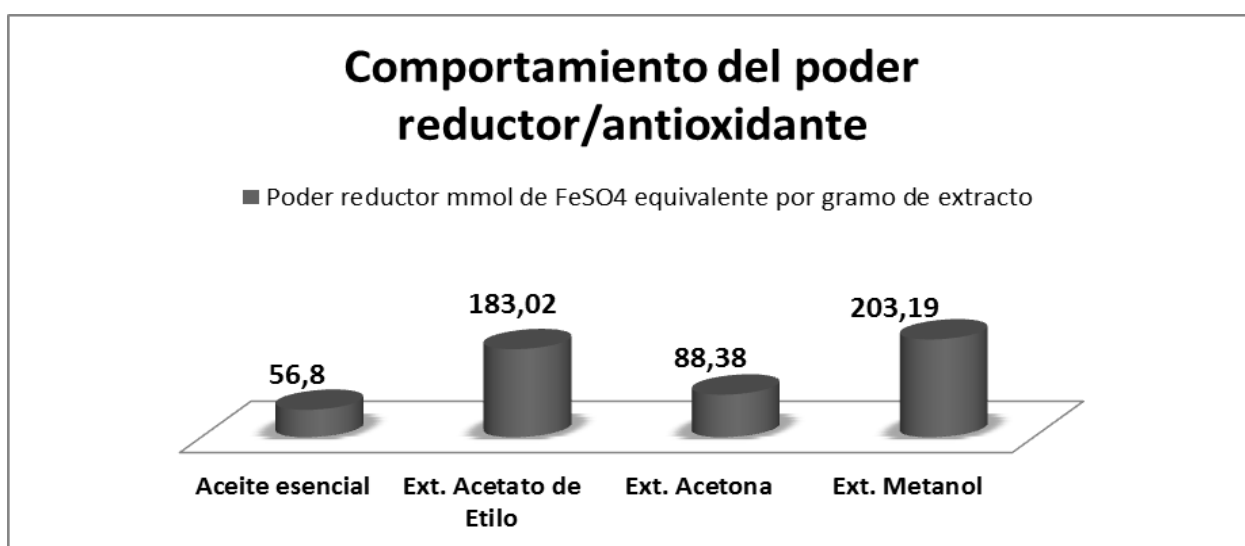


Figura 3.12. Comportamiento del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) del aceite esencial y los extractos evaluados.

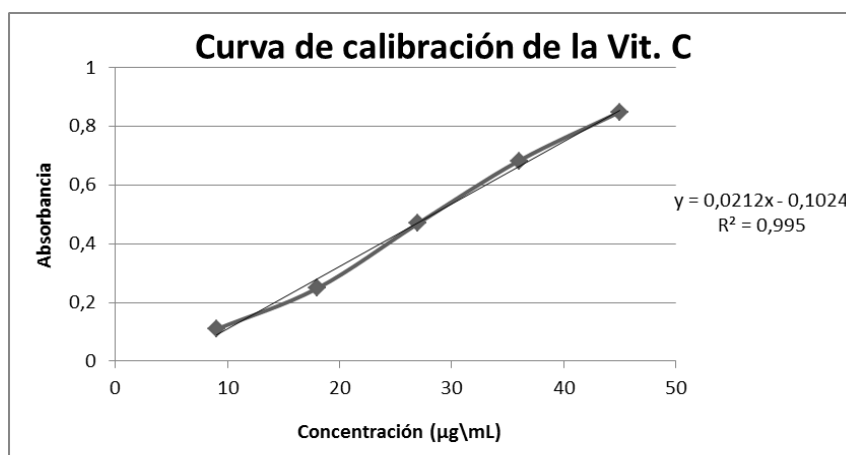
Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo con los reportados en la literatura para extractos y aceites esenciales de otras plantas medicinales (Tabla 3.12) se observa que los resultados obtenidos en las muestras evaluadas en el presente trabajo superan considerablemente lo reportado para estas plantas, lo que avala la actividad antioxidante de los extractos de las hojas de la *Mosiera bullata*. La habilidad para reducir Fe(III) podría ser atribuida a la donación de hidrógeno de los compuestos fenólicos presentes, lo cual está también relacionada a la presencia de agentes reductores, así como al número y posición de grupos hidroxilos que juegan un rol importante en la actividad antioxidante que manifiesta cualquier compuesto¹⁴¹.

Tabla 3.12. Ejemplo del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP) de extractos de plantas medicinales publicado en la literatura como mmol/L de FeSO₄ equivalentes por gramo de extracto seco para otras plantas medicinales.

Nombre de planta	Poder reductor\antioxidante férrico (FRAP)	Bibliografía
<i>Salvia lanigera</i>	6,44 ± 0,4 mmol/L	(Tenore et al., 2011) ¹⁴²
<i>Rosmarinus officinalis</i>	16,53 – 21,77 mmol/L	(Zaouali et al., 2010) ¹⁴³
<i>Zingiber officinale</i>	0,806 mmol/L	(Liu et al., 2008) ¹⁴⁴

3.3.5. Capacidad antioxidante total.

La capacidad antioxidante total fue calculada empleando la curva de calibración del ácido ascórbico (Figura 3.13.).



Lic. Yuriam De Armas Mesa

Figura 3.13. Curva de calibración del ácido ascórbico o Vitamina C

A partir de la ecuación de la recta se determinó la capacidad antioxidante total obtenida para cada extracto (Figura 3.14) como se observa el extracto metanólico y el de acetato de etilo mostraron la mayor actividad antioxidante con un valor de 4,8 y 4,7 mg de ácido ascórbico equivalentes /g de extracto, respectivamente seguido por el extracto de acetona. Por su parte el aceite esencial aportó valores muy inferiores, casi despreciable con respecto a los restantes extractos. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Nguyen et al., (2008)¹⁴⁵ para el extracto alcohólico de *Cleistocalyx operculatus* ($62,40 \pm 3,16$ mg de ácido ascórbico equivalentes /g de extracto) se puede afirmar que los resultados obtenidos en el presente trabajo para la planta en estudio superan considerablemente este valor reportado. Es importante señalar que el comportamiento obtenido en este ensayo se corresponde totalmente con el obtenido para los ensayos de DPPH y FRAP. Los valores son específicos para cada extracto y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

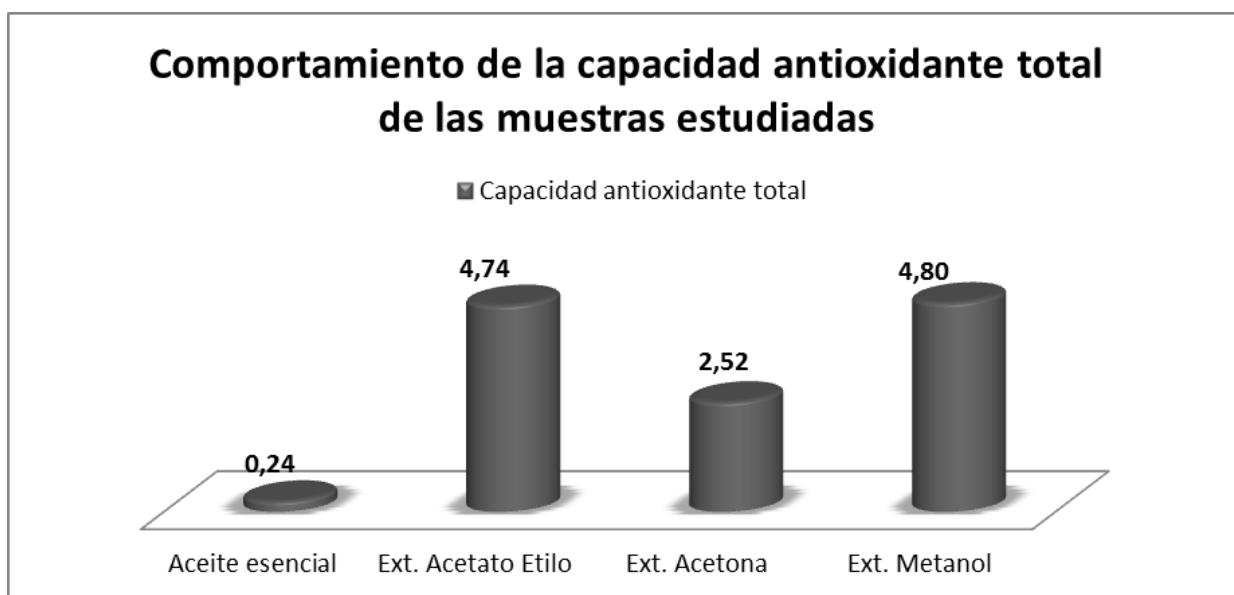


Figura 3.14. Resultados obtenidos en el ensayo de Capacidad Antioxidante Total.

La evaluación de la actividad antirradicálica de las muestras evaluadas en el presente trabajo mostró que el extracto metanólico, de acetona y de acetato de etilo poseen un buen potencial antioxidante, mientras que los valores obtenidos para el aceite esencial son muy bajos. Al comparar los resultados obtenidos en

el ensayo DPPH y de FRAP se observa una tendencia similar en ambos métodos y que el extracto metanólico muestra una alta actividad antioxidante.

A continuación se procedió a la evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado, dado que la oxidación lipídica es un proceso de multipasos, se evaluó la habilidad de los antioxidantes por un método que permite determinar la peroxidación lipídica en ácido linoleico. A continuación se muestran los resultados obtenidos para este ensayo.

3.3.6. Actividad antioxidante por el método FTC.

Es un método simple que se desarrolla en un período de tiempo de 48 horas. Bajos valores de absorbancia son indicativos de una baja concentración de peróxidos formados en la etapa inicial de la peroxidación lipídica del ácido linoleico y por tanto de una alta actividad antioxidante. Los valores obtenidos sin aditivos fueron tomados por un 100% de peroxidación lipídica. La (Tabla 3.14.) muestra el cambio de los valores de absorbancia en el tiempo con los diferentes aditivos.

Tabla 3.13. Valores de absorbancia de las muestras estudiadas y antioxidantes de referencia en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC durante 48 horas.

Muestras Estudiadas	Valores de Absorbancia en el tiempo								
	0	3h	6h	9h	12h	24h	30h	48h	% de Inhibicion
aceite esencial	0,497	0,504	0,936	0,975	1,184	0,631	0,338	0,302	77
Ext. acetato etilo	0,235	0,768	0,441	0,463	0,520	0,510	0,480	0,451	66
Ext. acetona	0,132	0,51	0,361	0,476	0,476	0,417	0,415	0,386	71
Ext. metanólico	0,128	0,502	0,355	0,468	0,453	0,398	0,456	0,308	77
Vit. E	0,473	0,310	0,202	0,173	0,108	0,138	0,177	0,119	91
eugenol	0,427	0,360	0,296	0,332	0,268	0,176	0,313	0,173	87
timol	0,248	0,500	0,348	0,313	0,338	0,337	0,389	0,233	83
Control	0,480	0,350	0,415	0,455	0,424	0,703	0,838	1,336	

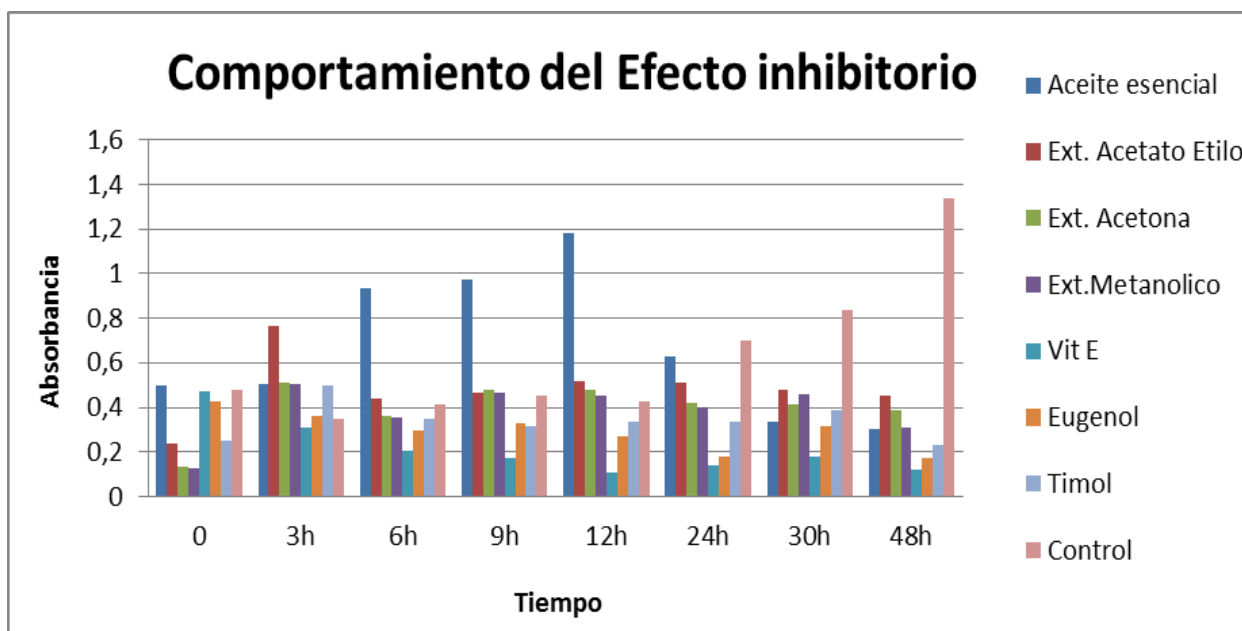


Figura 3.15. Efecto inhibitorio de los patrones de antioxidantes y los extractos en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC.

En la (Figura 3.15.) se observa que los extractos muestran un efecto inhibitorio menor que los patrones de antioxidantes evaluados simultáneamente y que no hay una diferencia marcada en los resultados obtenidos para los tres extractos a lo largo de todo el estudio, mantienen un comportamiento estable, logrando disminuciones de los valores de absorbancia con respecto al control. Por su parte el aceite esencial logra una disminución en los valores de absorbancia a partir de las 12 horas, lo que es indicio de su incidencia en la eliminación de los hidroperóxidos a partir de este tiempo. Lo anterior permite asegurar que, por este mecanismo, los extractos evaluados muestran un comportamiento antioxidante, aunque este queda por debajo de los patrones de antioxidantes evaluados.

Al determinar el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de cada muestra (Figura 3.16) se corrobora lo anterior ya que tanto extractos como el aceite esencial quedan por debajo de los valores obtenidos para los patrones de antioxidantes, aunque es importante señalar que los valores que se alcanzan en las muestras no difieren en gran medida de los patrones antioxidantes, por lo que queda ratificado el poder antioxidante de las muestras evaluadas por este mecanismo.

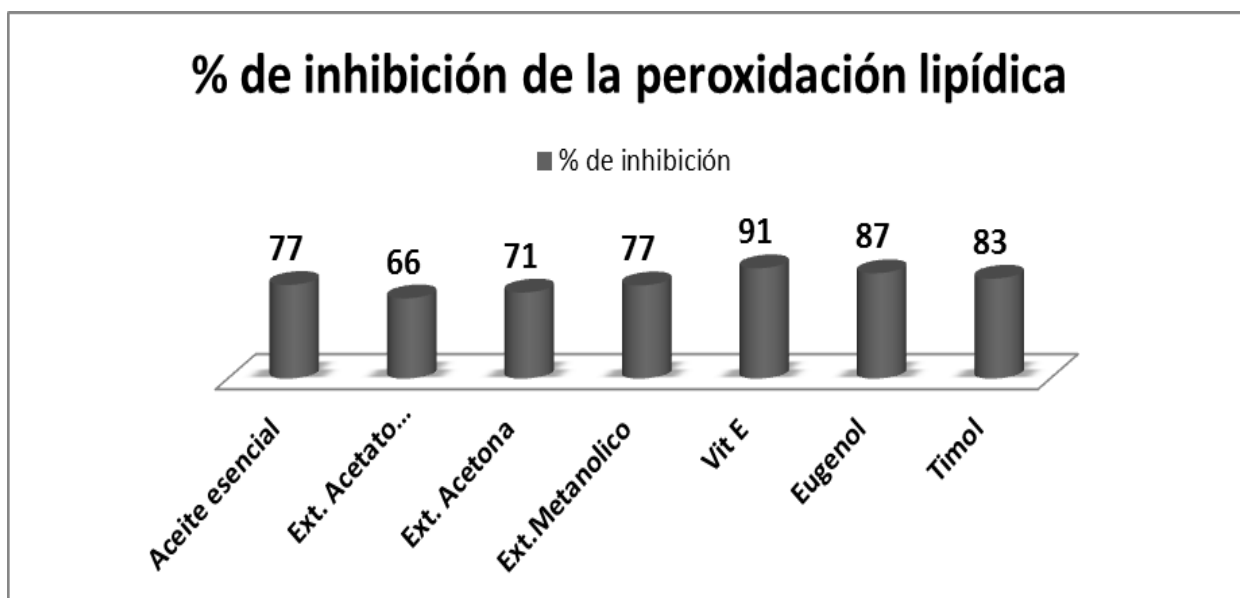


Figura 3.16. Comportamiento en cuanto al por ciento de inhibición de la peroxidación lipídica.

Los resultados obtenidos se corresponden completamente con el ensayo anterior, lo que muestra un comportamiento similar para los extractos en las dos etapas de oxidación, es decir, los extractos muestran actividad antioxidante aunque menor que el resto de los antioxidantes ante la peroxidación lipídica primaria y secundaria.

3.4. Relación entre el contenido fenólico total con la capacidad antioxidante total y el poder reductor/antioxidante.

Múltiples reportes dan cuenta de la relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total en los extractos de plantas medicinales⁵⁰.

Las (Figuras 3.17. y 3.18.) muestran las curvas de regresión que permiten correlacionar el contenido fenólico con los valores obtenidos para los ensayos de capacidad antioxidante total y FRAP, respectivamente. Para ambas combinaciones se observa una excelente relación entre ambos parámetros, con valores altos del coeficiente de correlación. Estos resultados tienen total correspondencia con los resultados obtenidos para los restantes ensayos antioxidantes incluidos en el presente trabajo.

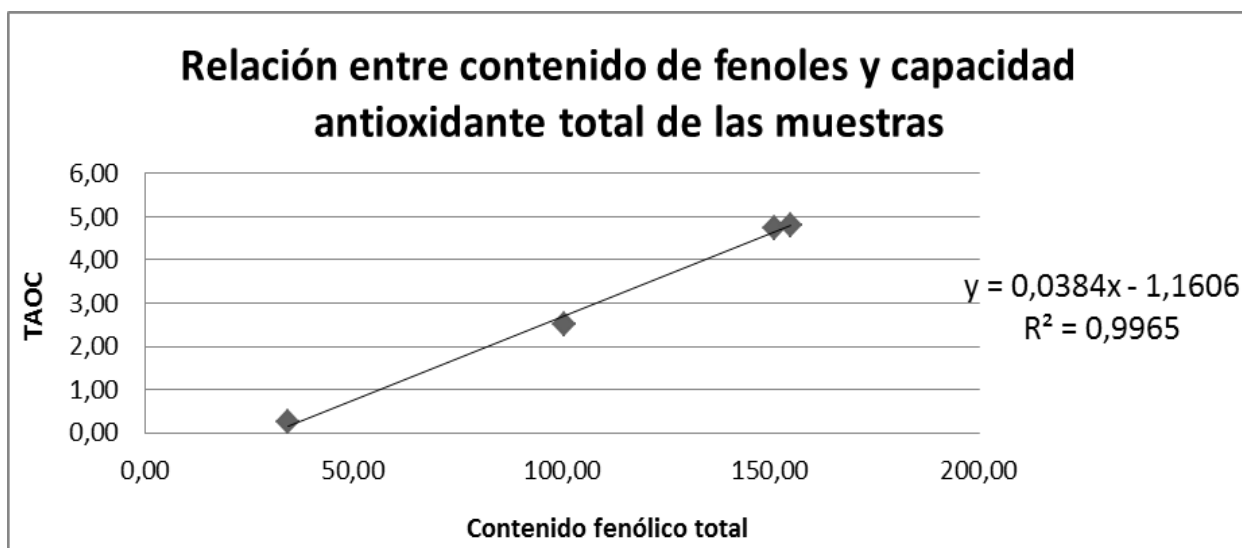


Figura 3.17. Relación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante total.

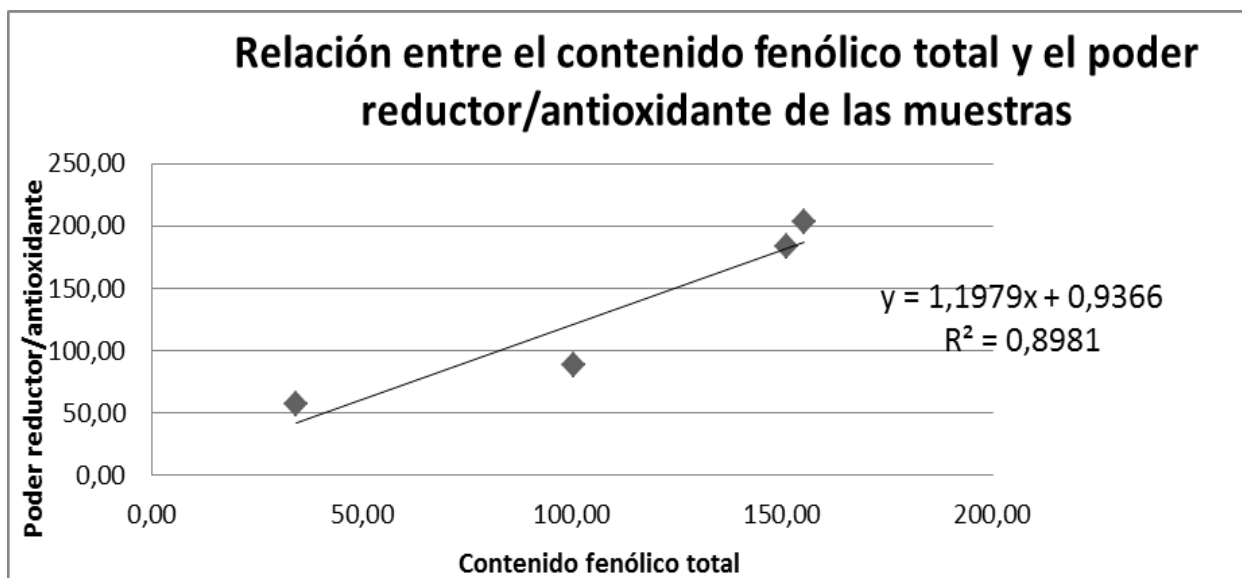


Figura 3.18. Relación entre el contenido fenólico total y el poder reductor/antioxidante.

Al analizar los resultados obtenidos en cuanto a la composición química del aceite esencial y los extractos identificados por GC-MS y GC-FID, se puede inferir que la presencia en dichas muestras del eugenol podría contribuir directamente a la actividad antioxidante ya que este compuesto tiene reportada su actividad antioxidante por varios investigadores por ejemplo Singh et al., (2007)¹³⁰, Wei-Cai et al (2011)¹³¹, Teissedre et al., (2000)¹⁴⁷, Mastelic et al., (2008)¹⁴⁸, Miguel et al., (2011)¹⁴⁹ aunque, existen reportes que apuntan que esta actividad podría ser debida al efecto sinérgico de dos o más compuestos presentes en la

Lic. Yuriam De Armas Mesa

muestra y que la mayoría de los compuestos antioxidantes naturales ofrecen un sinergismo entre ellos para producir un espectro abierto de propiedades antioxidantes que crea un sistema de defensa efectivo contra radicales libres. En resumen los extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, en mayor medida que el aceite esencial, están formados por una mezcla de compuestos orgánicos los cuales podrían producir su efecto sinérgico o antagónico en el proceso de oxidación, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en el presente trabajo

Conclusiones



Conclusiones

- 1- El contenido de aceite esencial en las hojas de *Mosiera bullata*, resultó ser 1,8%, mientras que el rendimiento de los extractos de acetato de etilo, acetona y metanol fue de 14,3; 15,9 y 25,8%, respectivamente.
- 2- La composición química del aceite, evaluada mediante GC-MS, permitió identificar la presencia de tres componentes mayoritarios (1,8 cineol, DL-mentol y eugenol).
- 3- El perfil cromatográfico de los tres extractos evaluados y el aceite esencial mostró coincidencia en la presencia de los metabolitos mayoritarios (1,8 cineol, DL-mentol y eugenol), aunque en diferente proporción.
- 4- La técnica GC-FID resultó ser fiable para la determinación de eugenol en las muestras evaluadas y se obtuvo un contenido de este metabolito de 34,4; 150,9; 100,5 y 155,0% para el aceite esencial y los extractos de acetato de etilo, acetona y metanol respectivamente.
- 5- La evaluación de la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH, FRAP y Capacidad antioxidante total (TAOC), corroborada por el ensayo de FTC, mostró que los extractos metanólico, de acetona y de acetato de etilo poseen un buen potencial, mientras que los valores obtenidos para el aceite esencial son muy bajos.
- 6- El contenido fenólico resultó ser superior para el extracto metanólico y posee correspondencia con los resultados obtenidos para los ensayos FRAP y TAOC.

Recomendaciones



Recomendaciones

1. Realizar estudios que permita demostrar la relación de la actividad antioxidante con los metabolitos mayoritarios identificados en el presente trabajo.
2. Realizar estudios antioxidantes *in vivo*, que permitan corroborar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

Bibliografia



Bibliografía

1. Berdonces J. Principios activos y preparaciones farmacéuticas. *Natura medicatrix*. 1994-1995;38(50):37-53.
2. Morin J, Bastide P. Aromatherapie. *Pharmacie Hospitalarie Francaise*. 1983;63:23-8.
3. OMS. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines. 2000. p. 1.
4. Arctander S. Perfume and flavor materials of natural origin: ALLURED; 1960.
5. Shahidi F. Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications. AOCS Press. 1997.
6. Montoya B, Lemeshko V, Lopez J, Pareja A, Urrego R, Torrez R. Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae*. 2003;10:72-9.
7. Gozález-Laredo R y col. Evaluación del efecto antioxidante y quimiprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana. *Grasas y Aceites*. 2007;58(1):5-9.
8. eciMED, editors. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos. La Habana 2010.
9. Fundación para la Innovación Agraria. Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas. Al rescate de nuestras especies nativas. Gobierno de Chile 2002.
10. Barquero A. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva*. 2007;6(2):53.
11. Davies P. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. *Plantas aromáticas y medicinales*. 2004;11:19.
12. WHO, World Health Organization. General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. In: WHO/EDM/TRM, editor.; Geneva Suiza 2000a. p. V.
13. WHO, World Health Organization. Report of the Inter-Regional Workshop on Intellectual Property Rights in the Context of Traditional Medicine. In: WHO/EDM/TRM/, editor.; Bangkok, Thailand 2000b. p. 2.
14. Acosta L, Rodríguez C. Plantas Medicinales. Bases para su producción sostenible. *Agrinfor*. 2006:9-41.
15. Dohadwalla A. Natural product. Pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs. *Trends in Pharmacological sciences*. 1985;6(2):49-53.
16. Bruhn JG. The use of natural products in modern medicine. *Acta Pharmac Nord*. 1989;1:117-30.
17. Alberson P. Medicine from plants. *Science*. 1990:247.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

18. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala In: Universidad de San Carlos de Guatemala, editors. San Carlos: Editorial universitaria; 1996. p. 350.
19. Kim H, Chen F, Wang X, Rajapakse N. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil. J Agric Food Chem. 2005;53:3696 – 701.
20. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolic composition and antioxidant activity of sweet basil. J Agric Food Chem. 2003;54:4442 – 9.
21. Wood J, Senthilmohan S, Peskin A. Antioxidant activity of procyanidin containing plant extracts at different pHs. Food Chemistry. 2001;77:155-61.
22. Siddhuraju P, Mohan P, Becker K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L): a preliminary assesment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. Food Chemistry. 2002;79:61-7.
23. Kim D, Jeoung S, Lee C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry 2003;81:321-6.
24. Royal Botanical Gardens. Mosiera. World Checklist of Selected Plant Families. [cited 2010 28 abril].
25. Alves ME, Pascoal CRF, Salvador J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological. Chemistry & Biodiversity. 2011;8:73-94.
26. Missouri, Botanical, Garden. Mosiera. [cited 2014 9 enero]; Available from: www.tropicos.org.
27. Bandoni A. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata; 2000. p. 229-31.
28. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. 4ª ed. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa; 2002.
29. Peter KV. Handbook of Herbs and Spices. London, England: Woodhead Publishing Limited; 2004.
30. Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes Aromatiques. Épices, aromates, condiments ethuiles essentielles. Paris, France: Editions Tec & Doc; 2005.
31. Cadby PA, Troy WR, Vey MGH. Consumer exposure to fragrance ingredients: Providing estimates for safety evaluation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2002;36:246-52.
32. Code of Federal Regulations. Title 21. U.S. Government Printing Office; 2003. p. 456-60.
33. Ziegler E, Ziegler H. Flavourings. Berlín, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 1998.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

34. Regnault-Roger C, Philogéne BJR, Vincent C. Biopesticidas de origen vegetal. 1ª en español ed. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa; 2004.
35. Burillo J. Investigación y experimentación de plantas aromáticas y medicinales en Aragón: Cultivo, transformación y analítica. Zaragoza, España: Gobierno de Aragón, Dirección General de Tecnología Agraria; 2003.
36. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils. *Flavour Fragr J.* 1998;13:235-44.
37. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.* 2004;18:435-48.
38. Moretti M, Sanna-Passino G, Demontis S, Bazzoni E. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2002;3(2):13.
39. Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection.* 2000(19):603-8.
40. Firuzi O, Asadollahi M, Gholami M, Javidnia K. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry.* 2010;122:117–22.
41. Tavares, A. C.; Gonçalves, M. J.; Cruz, M. T.; Cavaleiro, C.; Lopes, M. C.; Canhoto, J.; Salgueiro, L. R., Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology.* 2010;130:593–8.
42. Guzman JD, Gupta A, Evangelopoulos D, Basavannacharya C, Pabon LC, Plazas EA, et al. Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2101-7.
43. Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *FoodChemistry.* 2010;120:308–12.
44. Hashem H, Moharam AM, Zaied AA, Saleh FEM. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection.* 2010;29(10):1111–7.
45. Mimica-dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2485-9.
46. Wang X, Zhang F, Liu Z, Feng H, Yu ZB, Lu Y, et al. Effects of essential oil from *Croton tiglium* L. on intestinal transit in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;117(102–107).

Lic. Yuriam De Armas Mesa

47. Quintans-Ju'nior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NMN, Bonjardim LR, Santos MRV. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* J (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* 2008;15:619–24.
48. Bakkali F, Averbeck S, Avebeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46:446–75.
49. Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, Tundis R, Bonesi M, Saab A, et al. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* B. and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*. 2009;117:174–80.
50. Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani S, de Lampasona P, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant, antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46:3295-302.
51. Günther E. The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. New York, USA: Krieger Publishing; 1948.
52. Palomino A, Cerpa M. Hidroextracción de los aceites esenciales. Memorias de la IV Reunión de Fenómenos de Transporte; Callao, Perú1999.
53. Rezaeinodehi A, Khaghali S. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. *Pak J BiolSci*. 2008;11:946-9.
54. Al-Harrasi A, Al-Saidi S. Phytochemical analysis of the essential oil from botanically certified oleogum resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban). *Pak. J Biol Sci*. 2008;13:2181-9.
55. Cosge B, Turker A, Ipek A, Gurbuz B. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand-Mazz.) letsvaart, an endemic species toTurkey. *Molecules*. 2009;14:1702-12.
56. Miller SL, Haber WA, Setzer WN. Chemical composition of the leaf essential oil of *Casimiro aedulis* La Llave&Lex. (Rutaceae) from Monteverde, Costa Rica. *Nat Prod Commun*. 2009;4:425-6.
57. Cavara S, Maksimovic M, Vidic D. The essential oil of *Thymus aureopunctatus* (Beck) K. Malý. *Nat Prod Commun*. 2009;4:415-20.
58. Pripdeevech P, Chukeatirote E. Chemical compositions, antifungal and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Melodorum fruticosum* L. flowers. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48:2754–8.

59. Rajeswara BR, Rajput DK, Mallavarapu GR. Chemical diversity in curry leaf (*Murraya koenigii*) essential oils. FoodChemistry. 2011;126:989–94.
60. Jorge E, Ramis G, Heyden YV, Simó E, Lerma MJ, Saucedo Y, et al. Chemical Composition, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Murraya paniculata* Leaves from the Mountains of Central Cuba. Natural Product Communications. 2012; 7 (11).
61. Jorge E, Saucedo Y, Ramis G, Vander-Heyden Y, Simó E, Lerma MJ, et al. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Three Piperaceae Species Growing in the Central Region of Cuba. Natural Product Communications. 2013;8(9):1325-8.
62. Gunther E. The essential oil. New York, USA: Editorial Van Nostran Co. Inc.; 1996
63. Palomino O. Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. En: Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI): España; 2001. p. 15-23.
64. Skoog DA, Leary G, James J. Análisis Instrumental: McGraw-Hill; 2000.
65. Adams R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation; 2001. p. 108 - 12.
66. Bubbert H, Jennet H. Surface and thin films Analysis. New York: Wiley-Vch; 2002. p. 34-6.
67. Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, et al. Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. J Med Food.11(3):593-5.
68. Singh P, Shukla R, Prakash B, Kumar A, Singh S, Mishra PK, et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. And *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. Food and Chemical Toxicology. 2010;48:1734–40.
69. Joshi S, Chanotiya CS, Agarwal G, Prakash O, Pant AK, Mathela CS. Terpenoid compositions and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different Hedychium species. ChemBiodivers. 2008;5(2):299-309.
70. Koşar M, Demirci B, Demirci F, Başer-Husnu K. Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (Lamiaceae). J Agric Food Chem. 2008;56(6):2260-5.

71. Apel MA, Sardá VL, Bordignon SA, Henriques AT, Von-Poser G. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res.* 2009.
72. Mohsen H, Ali F. Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from southern Tunisia. *Molecules.* 2009;14:1585-94.
73. Aboaba SA, Ogunwande IA, Walker TM, Setzer WN, Oladosu IA, Ekundayo O. Essential oil composition, antibacterial activity and toxicity of the leaves of *Tetrapleura tetraptera* (Schum. & Thonn.) taubert from Nigeria. *Nat Prod Commun.* 2009;4:287-90.
74. Sonboli A, Gholipour A, Yousefzadi M, Mojarrad M. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Nepeta menthoides* from Iran. *Nat Prod Commun.* 2009;4: 283-6.
75. Shafaghat A, Noormohammadi Y, Zaifzadeh M. Composition and antibacterial activity of essential oils of *Artemisia fragrans* Willd. leaves and roots from Iran. *Nat Prod Commun.* 2009;4(2):279-82.
76. Yousefzadi M, Ebrahimi SN, Sonboli A, Miraghasi F, Ghiasi S, Arman M, et al. Cytotoxicity, antimicrobial activity and composition of essential oil from *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita*. *Nat Prod Commun.* 2009;4(1):119-22.
77. Miranda MM, Cuéllar AC. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2001. p. 135-58.
78. Giergielewiecz-Mozajska H, Browski LD, Namiesnik J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples some aspects of theory and practice. *Critical Review in analytical Chemistry.* 2001;31(3):149-65.
79. Bandonieni D, Pukalskas A, Venskutonis P, Gruzdiene D. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International* 2000;33:785 – 91.
80. Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais H, Vivianco J. Chemical characterization of basil found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J Agric Food Chem* 2002;50:5878 – 83.
81. Zheljazkov V, Callahan A, Cantrell C. Yield and oil composition of 38 basil. Accessions grown in Mississippi. Oil and composition. *J Agric Food Chem.* 2008;56:241 –5.
82. Guimaraes R, Barros L, Carvalho AM, Ferreira I. Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of *Rosa micrantha*: An Alternative Antioxidants Source for Food, Pharmaceutical, or Cosmetic Applications. *J Agric Food Chem.* 2010;58(10):256-61.

83. Van-Vuuren SF, Naidoo D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;130 552–8.
84. Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 2689–96.
85. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – Engineering and technology. *Food Reviews International* 2005;21:139 – 66.
86. Ju-Sung K, Myong-Jo K. In vitro antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(8):674-79.
87. Messaoud C, Chograni H, Boussaid M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and metanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48:2754–58.
88. Mar MW, Azizah A-H, Bablshah SB, Farooq A, Mandumpal CS, Mohd SP. Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pak. J. Bot*. 2011;43(3):1635-42.
89. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*. 2004;3:21-33.
90. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142:231-55.
91. Yanishlieva-Maslarova N, Heinonen IM. Origen de los antioxidantes naturales: verduras, frutas, hierbas, especias y tés: Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. In: POKORNY J, editor.: ACRIBIA; 2010. p. 248-52.
92. Maestri DM, Nepote V, Lamarque AL, Zygadlo JA. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry. Advances in Research*. 2006:105-35.
93. García L, García G, Rojo D, Sánchez E. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*. 2001;20:18-25.
94. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:1841-56.

95. Ching Man S, Tong Y, Benzie I. Antioxidant protection of edible oils. Plant foods for human nutrition. 2007;62:39-42.
96. Hakkim F, Shankar C, Girija S. Chemical composition and antioxidant property of Holy Basil leaves, stems and inflorescence and their in vitro callus cultures. J Agric Food Chem. 2007;55:9109 – 17.
97. Danesi F, Elementi S, Neri R, Maranesi M, D'antuono L, Bordoni A. Effects of cultivar o the protection of cardiomyocytes from oxidative extress by essential oils and aqueous extracts of basil. J Agric Food Chem 2008;56: 9911 – 7.
98. Sánchez-Moreno C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. Food Sci Tech Int 2002;8 (3):121–37.
99. Antolovich M, Prenzler P, Emilios P, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. Theanalyst. 2002;127:183-98.
100. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic sin foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290 - 302.
101. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J Sci Food Agric. 2000;80:1925-41.
102. Becker E, Nissen L, Skibsted L. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Eur Food Res Technol. 2004;219:561-71.
103. Aruoma O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Res. 2003: 523 – 4.
104. Boveris A, Oshino N. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochemistry. 1972;128(3):617-30.
105. Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American journal of tecnology and viticulture. 1977;28(1):49-55.
106. Lijun S, Jianbao Z, Xiaoyun L, Liyu Z, Yali Z. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology 2011:2689-96.
107. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss U-Technol 1995;28:25 – 30.

108. Huda Faujan N, Noriham A, Norrakiah AS, Babji AS. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8(3):484-9.
109. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239:70 – 6.
110. Fereidoon S, Ying Z. *Lipid Oxidation: Measurement Methods.:* Bailey's Industrial Oil and Fat Products; 2005. p. 6.
111. Gulcin I, Elmastas M, Aboul-Enein HY. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res.* 2007;21(4):354–61.
112. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Arch Latinoam Nutr.* 2000;50:5-18.
113. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:43-7.
114. Robards K, Prentzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry.* 1999;66:401-36.
115. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Technical Report series. Geneva: World Health Organization 1990.
116. World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR 1997.
117. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-47.
118. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997;2:152-9.
119. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure activity relationships. *Free Rad Biol Med.* 1997;22:749-60.
120. Luis Y. Obtención, parámetros de calidad y determinación cuantitativa de cineol de aceites esenciales obtenidos de dos especies de Mirtáceas. Santa Clara: UCLV; 2012.
121. Nurmi K, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemistry and Ecology.* 1996;22:2023-40.

122. ICH. Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 A y B, Geneva. 2005.
123. CECMED. Normas para validación de métodos analíticos. La Habana. 2007
124. Fernández A. Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. La Habana. 1996.
125. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1992;40:945-8.
126. Senevirathne M, Kin SH, Siriwardhana N, Ha J, Leel KW, Jeon Y. Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species, scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Technol Int*. 2006;12:27-38.
127. Umamaheswari M., Chatterjee T.K. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional. Complementary and Alternative Medicine* 2008;5(1):61–73.
128. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidant substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J Agric Food Chem*. 1992;40:235-9.
129. Bajpai-Vivek K, Sharif M, Ung-Kyu C, Jong-Hwi L, Sun-Chul K. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47:1876 - 83.
130. Singh G, Maurya S, de Lampasona M.P, Catalan A.N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of *cinnamon* leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45:1650–61.
131. Wei-Cai Z, Rui-Xue Z, Li-Rong J, Hong G, Yue Z, Qun S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49:1322–28.
132. Odabas-Köse E, Gökhan I, Sarıkürkçü C, Aktas Ö, Yavuz M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48:2960–65.

Lic. Yuriam De Armas Mesa

133. Ozen T, Demirtas I, Aksit H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. Food Chemistry. 2011;124:58–64.
134. Giuseppe R, Baratta M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistr. 2000;69:167-74.
135. Tang J, Rasco BA. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. Food Chemistry. 2011;129:637–44.
136. Cavar S, Maksimovi M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Herq. Food Control. 2012;23:263-67.
137. Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G, Ozer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 2004;15:549–57.
138. Szydłowska-Czerniak A, Bartkowiak-Broda I, Karlovic I, Karlovits G, Szlyk E. Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars. Food Chemistry. 2011;127:556–63.
139. Bettaieb I, Knoua S, Hamrouni I, Limam F, Marzouk B. Water-Deficit Impact on Fatty Acid and Essential Oil Composition and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Aerial Parts. J. Agric. Food Chem. 2011;59:328–34.
140. Litchfield JT, Wilcoxon FA. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 1949;96:99-113.
141. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Res. 1995;23:375–83.
142. Tenore GC, Ciampaglia R, Apostolides N, Piozzi F, Napolitano F, Rigano D, Senatore F. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. Food and Chemical Toxicology. 2011;49:238–43.
143. Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48:3144–52.

144. Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Res. Int.* 2008;41:363–70.
145. Thi Dung N, Min Kim J, Chul Kang S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46:3632–39.
146. Silva BM, Andrade PB, Valentao P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and Jam: antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4705-12
147. Teissedre PL, Waterhouse AL. Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins by Phenolic Substances in Different Essential Oils Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:3801–05.
148. Mastelic J, Jerkovic I, Blazevic I, Poljak-Blazi M, Borovic S, Ivancic-Bace I, Smrecki V, Zarkovic N, Brcic-Kostic K, Vikić-Topić D, Müller N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56: 3989–96.
149. Miguel G, Cruz C, Faleiro ML, Simões MTF, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Research.* 2011;25(5):526–41.