



SEGURIDAD ALIMENTARIA SOSTENIBLE EN EL OCCIDENTE DE EL SALVADOR:

Agroecología, Empoderamiento, Innovación y participación.

CSO-LA/2020/421-767

FINANCIADO POR LA UNIÓN EUROPEA

INFORME FINAL DE CONSULTORIA



**CONSULTOR
DIEGO LEOPOLDO MEMBREÑO GIRÓN**

DICIEMBRE, 2022

El presente estudio fue realizado bajo el Contrato para la Prestación de Servicios 2022: “Consultoría: Preparación de extractos acuosos a partir de la pulpa de café fresco y la extracción de aceites esenciales a partir de especies aromáticas” financiado por la Unión Europea” en el marco del Proyecto Seguridad Alimentaria Sostenible en el Occidente de El Salvador: agroecología, empoderamiento, participación e innovación” CSO-LA/2020/421-767.

La presente publicación ha sido elaborada con el apoyo financiero de la Unión Europea. Su contenido es de responsabilidad exclusiva de ADEL Sonsonate y Co-ejecutores: Asociación Nuevo Amanecer El Salvador, Universidad de El Salvador, Università degli Studi di Milano-Bicocca (UNIMIB), Movimiento África 70 y Asociación El Bálsamo; y no necesariamente refleja los puntos de vista de la Unión Europea.

Equipo técnico

Diego Leopoldo Membreño Girón

Equipo técnico-científico del Proyecto:

MSc. Israel Ernesto Mendoza, Coordinador del Proyecto

Dr. Marvin J. Núñez, Coordinador del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador

MSc. Morena L. Martínez

MSc. Amy Morán

Lic. Ulises G. Castillo

Br. Jennifer Paola Hernández

Br. Fátima Vanessa Chávez

Br. Jorge Ernesto Araujo Montoya

Br. Mónica Yeremy Fuentes



INDICE	Pag
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
PARTE I: EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y ANTIOXIDANTES DE LA PULPA DE CAFÉ	9
a) Recolección de granos de café	9
b) Determinación de humedad en Pulpa de café	9
c) Extracción de polifenoles y antioxidantes	9
d) Liofilización de extractos acuosos	10
1e) Ensayo de Fenoles totales	10
2e) Ensayo antioxidante mediante el método DPPH	11
f) Resultados y discusión de resultados	11
g) Conclusiones	13
PARTE II: ESPECIES VEGETALES FUENTE DE ACEITES ESENCIALES DE LOS DEPARTAMENTOS DE SONSONATE Y AHUACHAPÁN	14
a) Viajes de bioprospección	14
b) Listado de especies vegetales identificadas	13
c) Listado de especies vegetales aromáticas identificadas	27
d) Selección y recolección de especies vegetales aromáticas	28
e) Extracción de aceites esenciales por medio del método Clevenger (USP 34-NF 29, 2011; modificado)	28
f) Cuantificación de aceites esenciales en especies aromáticas seleccionadas	30
g) Puesta a punto de la actividad antioxidante en el aceite esencial de “Limón”	32
h) Actividad antioxidante de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas en los viajes de bioprospección	35
i) Actividad antimicrobiana en aceites esenciales	36
j) Resultados y discusión de resultados	39
k) Conclusiones	51
PARTE III: EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AROMÁTICAS PARA LA FABRICACIÓN DE FITOCOSMÉTICOS	52
a) Recolección y extracción de especies aromáticas para la fabricación de fitocosméticos	52
b) Cuantificación de los aceites esenciales por medio del Método Clevenger	54
c) Actividad antioxidante de los aceites esenciales	56
d) Análisis microbiológico	57
e) Resultados y discusión de resultados	59
f) Conclusiones	59
BIBLIOGRAFÍA	60



Figura		Pag
Fig 1.	Determinación de Fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto liofilizado de café (<i>Coffea arabica</i> variedad Pacamara).	13
Fig 2.	Viajes de bioprospección realizados a la Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate.	15
Fig 3.	Viaje de bioprospección a La Golondrinera, Cantón Pushtán, Nauhizalco, Sonsonate.	20
Fig 4.	Viajes de bioprospección a la Laguna Verde, Apaneca, Ahuachapán.	22
Fig 5.	Viaje de bioprospección a la Laguna Las Ninfas, Apaneca, Ahuachapán.	24
Fig 6.	Viaje de bioprospección a la Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapúa, Ahuachapán.	25
Fig 7.	Especies aromáticas seleccionadas para extracción de aceites esenciales.	28
Fig 8.	Puesta a punto del método Clevenger con hojas del "Limón".	29
Fig 9.	Extracción de aceites esenciales por Método Clevenger de las especies seleccionadas.	30
Fig 10.	Desarrollo del método de cuantificación de actividad antioxidante en el aceite esencial de "Limón".	34
Fig 11	Controles positivos para ensayo microbiológico del aceite de "Limón" frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i> .	40
Fig 12	Primer ensayo microbiológico del aceite de "Limón" frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	42
Fig 13	Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de "Limón" frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i>	44
Fig 14	Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de hoja de <i>Ocotea veraguensis</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i>	45
Fig 15	Especies vegetales aromáticas recolectadas en la Finca Quinta Marisol, Coatepeque, Santa Ana.	48
Fig 16	Viajes de recolección de especies vegetales aromáticas utilizadas en la fabricación de fitocosméticos.	49
Fig 17	Fraccionamiento de especies vegetales para extracción de aceites esenciales.	53
Fig 18	Cuantificación de la actividad antioxidante en aceites esenciales.	54
Fig 19	Esquema de placa de 96 micropocillos	57
		59

Tabla		Pag
Tabla 1.	Polifenoles contenidos en fruto de café expresado en mg de ácido gálico contenido en 1 gramo de fruta fresca.	12
Tabla 2.	Antioxidantes contenidos en fruto de café (<i>Coffea arabica</i> variedad Pacamara) expresado en ug equivalentes de Trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca.	12
Tabla 3.	Viajes de bioprospección realizados en los Departamento de Sonsonate y Ahuachapán en 2022.	14
Tabla 4.	Listado de especies vegetales observadas en la Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate (28 junio, 26 de julio y 26 de octubre).	16
Tabla 5.	Listado de especies vegetales observadas en La Golondrineria, Cantón Pushtán, Municipio de Nahuizalco, Departamento de Sonsonate (28 abril).	20
Tabla 6.	Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (10 febrero y 19 julio).	22
Tabla 7.	Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Las Ninfas, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (19 de julio).	24
Tabla 8.	Listado de especies vegetales observadas en Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapúa, Municipio de Jujutla, Departamento de Ahuachapán (7 de junio).	25
Tabla 9.	Especies vegetales aromáticas identificadas en los viajes de bioprospección.	27
Tabla 10.	Resultados de los ensayos de extracción y rendimiento de las hojas de “Limón” mediante el aparato Clevenger.	29
Tabla 11	Resultados de la cuantificación de aceites esenciales de especies vegetales por medio del Método Clevenger.	31
Tabla 12	Cantidad de aceite esencial extraído en 1Kg muestra de especies vegetales.	32
Tabla 13	Ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante en aceite esencial de “Limón”.	34
Tabla 14	Actividad antioxidante de <i>Piper standleyi</i> , <i>Ocotea veraguensis</i> , <i>Zanthoxylum culantrilo</i> y <i>Persea americana</i>	35
Tabla 15	Viajes de recolección de especies aromáticas a la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Coatepeque, Santa Ana.	53
Tabla 16	Rendimiento de aceites esenciales por medio del Método Clevenger.	54
Tabla 17	Comparación de rendimientos obtenidos y rendimientos de estudios de otras investigaciones utilizando el método de hidrodestilación usando el aparato Clevenger.	55
Tabla 18	Cantidad de aceite esencial extraído en 1 Kg muestra de especies vegetales.	56
Tabla 19	Actividad antioxidante de <i>Citrus x aurantifolia</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Eucalyptus citriodora</i> .	56

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS

CAS: Identificación numérica para compuestos químicos.
Col: Colaboración
CV: Coeficiente de variación
BHA: Butilhidroxianisol
BHT: Butilhidroxitolueno
DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
ERO: Especies reactivas del oxígeno
GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia
PAMC: Plantas aromáticas medicinales aromáticas
pH: Potencial de hidrógeno
RL: Radical libre
ROS: Formas reactivas del oxígeno
TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxílico
UV-Vis: Espectroscopia ultravioleta-visible.
% v/m: porcentaje volumen sobre masa.
% m/m: porcentaje masa sobre masa.
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
S. enterica: *Salmonella enterica*
E. coli: *Escherichia coli*
P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*
°C: Grados centígrados
μM: Micromolar
μL: Microlitro
DMSO: Dimetilsulfóxido

ACRÓNIMOS

ADEL Sonsonate: Asociación Agencia para el Desarrollo Económico Local del Departamento de Sonsonate
ANADES: Asociación Nuevo Amanecer El Salvador
CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
FQF: Facultad de Química y Farmacia
LIPN: Laboratorio de Investigación en Productos Naturales
MUHNES: Museo de Historia Natural de El Salvador
UES: Universidad de El Salvador



INTRODUCCIÓN

La presente investigación forma parte del proyecto “Seguridad alimentaria sostenible en el Occidente de El Salvador: agroecología, empoderamiento, participación e innovación” CSO-LA/2020/421-767, en colaboración con el consorcio integrado por Agencia de desarrollo Económico Local de Sonsonate (ADEL-Sonsonate), Asociación El Bálsamo, Asociación Nuevo Amanecer El Salvador (ANADES), Universidad de El Salvador (UES), Universidad de Milano Bicocca, Italia (UNIMIB) y Movimiento África '70 (MA70), y la cual está siendo financiada por la Unión Europea.

En el primer año de este proyecto, se inició la determinación del contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de la pulpa de café fresco (*Coffea arabica*) por medio de los métodos de Folin & Ciocalteu y DPPH, respectivamente, quedando pendiente para este segundo año la normalización final de esta técnica y las cuantificaciones antes mencionadas. Así, en 2022, se determinó el contenido de polifenoles totales y se determinó la actividad antioxidante de la pulpa de café, reportándose un contenido alto de capacidad antioxidante si lo comparamos con estudios de pulpa de café realizados en la región.

Por otra parte, en ese año 2021, se iniciaron viajes de bioprospección, enlistado de especies vegetales aromáticas, extracción de aceites esenciales (no por medio del método oficial), determinación de la antioxidante y actividad microbiológica de aceites esenciales.

Todos estos datos preliminares recolectados y el mayor financiamiento para este segundo año, fueron fundamentales para llevar a cabo más viajes de bioprospección, enlistar más especies aromáticas, selección especies aromáticas y estandarización tanto la extracción como la cuantificación de los aceites esenciales por medio del método Clevenger (en el año 2021 no poseíamos este aparato), además de la estandarización y determinación de la capacidad antioxidante y actividad microbiológica, que se podrá observar más adelante en este documento.

Así, este proyecto se buscan nuevas especies vegetales fuentes de aceites esenciales que se puedan domesticar, y llevar hacia las comunidades, en ese sentido, se realizaron 8 viajes de bioprospección acompañado por el curador del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUNES) a fincas privadas y Áreas Naturales del Departamento de Sonsonate y Ahuachapán, tales como: Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Sonsonate; La Golondrinera, Cantón Pushtán, Municipio de Nahuizalco, Sonsonate; Laguna Verde y Laguna las Ninfas, Municipio de Apaneca, Ahuachapán y la Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapúa, Municipio de Jujutla, Ahuachapán.

De este modo, se identificaron 143 especies vegetales pertenecientes a 59 familias botánicas, donde se observaron especies vegetales muy interesantes desde el punto de vista medicinal, etnobotánico, fitoquímico, alimenticio, que se detallan y en algunos casos se recomienda el seguimiento y conservación de las mismos.

De las especies observadas, se enlistaron 18 especies vegetales aromáticas pertenecientes a familias botánicas, como, Lauraceae, Piperaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Aristolochiaceae, etc. Y se seleccionaron 5 especies aromáticas que se trabajaron en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, las cuales fueron: *Piper standleyi* “Lima de Montaña” (Piperaceae), *Nectandra martinicensis* “Canelón”, *Ocotea veraguensis* “Canela de monte”, *Persea americana* “Aguacate de olor” perteneciente a la familia Lauraceae y *Zanthoxylum culantrilo* “Cedro-espino” (Rutaceae). A estas especies se les determinó el rendimiento de extracción de aceites esenciales mediante el método Clevenger, se midió su capacidad antioxidante y su actividad microbiológica. Cabe destacar que en el caso de *P. standleyi* y *Z. culantrilo*, es la primera vez que se lleva cabo un estudio fitoquímico y biológico sobre aceites esenciales, actividad antioxidante y microbiológica. Así, el mayor contenido de aceites esenciales lo presentó *P. americana*, la mayor



capacidad antioxidante para el aceite esencial de *Z. culantrilo*, y por el momento, una actividad microbiología interesante, el aceite esencial de *P. standleyi*, ya que esta actividad no ha concluido todavía.

Por último, se recolectaron, extrajeron y cuantificaron los aceites esenciales de las hojas de “Limón” (*Citrus x aurantifolia*, Rutaceae), hojas de “Ciprés” (*Cupressus lusitanica*, Cupressaceae), hojas de Romero (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae), hojas de “Eucalipto” (*Eucalyptus citriodora*, Myrtaceae) y rizoma de “Jengibre” (*Zingiber officinale*, Zingiberaceae), para ser utilizadas en la fabricación de fitocosméticos a microescala por el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia. Además, se les determinó su capacidad antioxidante y queda pendiente la realización de la actividad microbiológica. Así, el mayor rendimiento de aceites esenciales y capacidad antioxidante lo posee el aceite esencial extraído de las hojas de *E. citriodora*.

Este informe presenta la investigación experimental que se llevó a cabo desde febrero hasta noviembre de 2022 en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Desarrollo en Salud (CENSALUD), ambos pertenecientes a la Universidad de El Salvador.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general:

Llevar a cabo la investigación sobre la extracción de polifenoles de la pulpa de café fresco y bioprospección, selección y extracción de aceites esenciales de especies aromáticas del Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.

Objetivos específicos

- Preparar el extracto acuoso de la pulpa de café fresco.
- Analizar la actividad antioxidante del extracto seco de pulpa de café.
- Poner a punto la extracción de aceites esenciales mediante el aparato Clevenger.
- Llevar a cabo viajes de bioprospección en Áreas Naturales y fincas del Departamento de Sonsonate y Ahuachapán.
- Seleccionar especies aromáticas como potenciales fuentes de aceites esenciales.
- Determinar el rendimiento de los aceites esenciales en las diferentes especies vegetales aromáticas de la zona.
- Determinar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de las diferentes especies vegetales aromáticas.
- Determinar la actividad microbiológica de los aceites esenciales extraídos.
- Suministrar aceites esenciales para la fabricación de fitocosméticos.



PARTE I: EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y ANTIOXIDANTES DE LA PULPA DE CAFÉ

a) Recolección de granos de café

- Se recolectaron aproximadamente 500 gramos de café cereza en plena maduración de árboles de café de una sola variedad, estos granos deben estar sanos y sin ningún daño o enfermedad observable (desde este momento las muestras deben mantenerse fuera del alcance de la luz).
- Las muestras se colocaron en bolsas ziploc y se introducen en una hielera para mantener las propiedades de los granos de café en el momento de su colecta.
- Luego se transportaron al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (LIPN-FQF-UES).
- Los granos de café se despulpan manualmente a la oscuridad y luego se pesó la cantidad correspondiente para los posteriores análisis.
- Los granos que no se utilizaron en el momento, se guardaron en bolsas ziploc a -20°C con su respectiva etiqueta hasta su posterior extracción.

El viaje de recolección fue llevado a cabo en la Finca El Milagro (Propietario: Atilio Zepeda Magaña), Cantón Taltapanca, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (Altura: 1600 msnm) y variedad de café recolectada fue Pacamara.

b) Determinación de humedad en Pulpa de café

- Se Estabilizó la termobalanza 30 minutos antes de usarla.
- Se pesó entre 0.9 a 1 g de muestra a analizar en termobalanza.
- Se abrió la termobalanza y se colocó la muestra dentro de esta.
- Se cerró e inició el análisis.
- Luego del análisis de la humedad perdida por la muestra se obtuvo el porcentaje de peso de humedad perdida por la muestra.
- El análisis se realizó por triplicado.

c) Extracción de polifenoles y antioxidantes

- La recolección de los granos de café fresco se llevó a cabo en las primeras horas de la mañana en la Finca El Milagro, Apaneca, y luego se transportó en una hielera al LIPN-FQF-UES.
- Luego se lavó y removió la pulpa de café.
- Se trasladó la pulpa de café a un Erlenmeyer, y se adiciono el agua necesaria, para proceder a la extracción por ultrasonido por 30 minutos, obteniéndose una concentración de 10% m/v.
- Luego se filtró el extracto obtenido con papel Whatman No. 91, y se almacenó en un ultracongelador (Fisher Scientific, Isotemp) a -20°C (ver Figura 1).
- Esto se llevó a cabo por duplicado
- Posteriormente se liofilizó en un liofilizador (LABCONCO, Freezone Modelo 7740030)



d) Liofilización de extractos acuosos

- Se encendió y programó el liofilizador (marca LABCONCO FreeZones, Modelo 7740030) estableciendo las condiciones de temperatura a -49° (ver Figura 1).
- Se encendió la bomba de vacío a una presión de 0.01 a 0.05 mBar y alcanzada la presión, se colocaron las muestras contenidas en los recipientes para liofilizar en las válvulas correspondientes.
- Se liofilizó entre 48 a 72 horas.
- Luego de completar el proceso se apagó la bomba de vacío y el liofilizador.
- Se retiraron los recipientes con las muestras liofilizadas y se almacenaron en desecadores.
- Por último, se pesó el residuo obtenido de cada muestra liofilizada.

1e) Ensayo de Fenoles totales (Método de Folin & Ciocalteu)

Reactivos a utilizar.

- Ácido gálico.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio al 10.75%
- Agua destilada
- Muestras liofilizadas de café

Preparación de la curva de calibración con estándar de Ácido gálico.

- Se preparó la curva de calibración de ácido gálico entre 3.12 a 100 $\mu\text{g/mL}$, con al menos 5 puntos.

Preparación de la solución de trabajo

- Se pesó una cantidad adecuada de extracto liofilizado de café para preparar una solución de 1 mg/mL .
- Se prepararon 3 soluciones de cada extracto liofilizado.

Preparación de las celdas

- Se prepararon las celdas con los siguientes componentes, de acuerdo a la sustancia a analizar (estándar, muestra o blanco)
- 40 μL de Reactivo de Folin-Ciocalteu
- 400 μL de agua destilada
- 480 μL de carbonato de sodio al 10.75%
- 80 μL de sustancia a analizar

Lectura de celdas en equipo UV

- Se Encendió el Espectrofotómetro UV - Vis. y se programó a la longitud de onda de 760 nm.
- Se leyeron la absorbancia del blanco y de los estándares.
- Inmediatamente se guardaron los datos de las absorbancias del blanco y de los estándares.
- Se ingresaron al equipo las cubetas de las soluciones de trabajo y se les asignó su respectivo código en el programa.
- Luego se midieron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 760 nm.



2e) Ensayo antioxidante mediante el método DPPH

Reactivos a utilizar

- DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil, CAS: 1898-66-4)
- Metanol
- Etanol absoluto
- Estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, CAS: 53188-07-1)
- Agua destilada
- Muestras liofilizadas de café

Preparación de la curva de calibración con estándar de Trolox

- Se preparó la curva de calibración de Trolox entre 6.25 a 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$, con al menos 5 puntos.

Preparación de la solución de DPPH [50 μM]

- Se pesó una cantidad adecuada de extracto liofilizado de café para preparar una solución de 1 mg/mL.
- Se prepararon 3 soluciones de cada extracto liofilizado y pesaron aproximadamente 5 mg de DPPH.
- Se diluyó a 1 mg/mL con metanol y se tomó una alícuota de esta solución.
- Se adicionó la alícuota y se diluyó con etanol hasta obtener una concentración final de 50 [μM] de DPPH.

Preparación de la solución de trabajo

- Se pesó una cantidad adecuada de extracto liofilizado de café para preparar una solución de 0.2 mg/mL en etanol al 5%.
- Se prepararon 3 soluciones de cada extracto liofilizado (ver Figura 1).

Preparación de las celdas (ver Figura 1)

- Se prepararon las celdas con los siguientes componentes, de acuerdo a la sustancia a analizar (estándar, muestra o blanco)
- 950 μL DPPH
- 50 μL de la sustancia a analizar

Lectura de celdas en equipo UV

- Se procedió como indica en el apartado I, literal 1.
- Se midieron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 515 nm (ver Figura 1).

f) Resultados y discusión de resultados

Ensayo antioxidante en polifenoles del extracto liofilizado de café (*Coffea arabica* variedad Pacamara).

La cuantificación de fenoles totales en el extracto liofilizado de café (*Coffea arabica* variedad Pacamara) se expresó en mg de ácido gálico contenido en 1 gramos de fruta fresca (ver Tabla 1 y Figura 1).



Tabla 1. Polifenoles contenidos en fruto de café expresado en mg de ácido gálico contenido en 1 gramo de fruta fresca.

Muestra de café	Pulpa de café (g)	Peso neto muestra liofilizado de café (g)	Humedad pulpa de café	Promedio mg de Ácido gálico/ g FF	DS	CV	mg de Ácido gálico/g de FF
1	7.500	0.562	43.62%	0.1464	0.0117	8.0193	0.1464±0.0117
2	7.504	0.552	43.62%	0.1437	0.0301	21.2147	0.1437±0.0301
3	7.508	0.542	43.62%	0.1410	0.0485	34.4101	0.1410±0.0485
Promedio	7.504	0.552	43.62%	0.1437	0.0301	21.2147	0.1437±0.0301

El contenido de fenoles totales para la pulpa fresca de café es de 0.14 mg de ácido gálico/g de FF pulpa de *Coffea arabica* (ver Tabla 1), esto representa un contenido promedio de fenoles totales, si lo comparamos con el estudio de estos metabolitos en frutas de la salvadoreña (Rivas, et al., 2020).

El contenido de polifenoles en el fruto de café podría ser mayor, si se utilizara como solvente extractor, etanol 95% (Cruzalegui et al., 2021), pero esto no se puede aplicar a nuestra investigación ya que este solvente no es adecuado para la preparación de fitocosméticos tales como el etanol, ya que estos pueden dañar o irritar la piel.

Ensayo antioxidante en extracto liofilizado de café (Coffea arabica variedad “Pacamara”)

La cuantificación de capacidad antioxidante en el Fruto fresco de café (*Coffea arabica* variedad “Pacamara”) se expresó en ug equivalentes de Trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca, y los resultados se pueden observar en la Tabla 2 y Figura 1.

Tabla 2. Antioxidantes contenidos en fruto de café (*Coffea arabica* variedad Pacamara) expresado en ug equivalentes de trolox contenido en 1 gramos de fruta fresca.

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

El contenido de antioxidantes para la pulpa fresca de café fue de 44.98 μmol equiv. de Trolox/g de FF pulpa de *Coffea arabica* (ver Tabla 2), considerándose alto, si lo comparamos con los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de 20 frutas de la flora salvadoreña (Rivas et al., 2020)

Cabe mencionar, que el contenido de antioxidantes fue mayor que el reportado para pulpa de café, reportados en Colombia (Meza et al., 2017) y Tailandia (Jaisan et al., 2015). Esto hace a el extracto de pulpa de café salvadoreño, interesante para la formulación de fitocosméticos.



Fig. 1 Determinación de Fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto liofilizado de café (*Coffea arabica* variedad Pacamara)

g) Conclusiones

En base al contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del extracto acuoso de la pulpa de café fresco, se considera como una materia prima óptima y de alta calidad para la fabricación de fitocosméticos.

Además, se le suministró pulpa de café fresco al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia, para que preparara el extracto acuoso y realizarán los ensayos que conducirán a la formulación de diferentes fitocosméticos.

PARTE II: ESPECIES VEGETALES FUENTE DE ACEITES ESENCIALES DE LOS DEPARTAMENTOS DE SONSONATE Y AHUACHAPÁN

a) Viajes de bioprospección

Los viajes de bioprospección, tuvieron por objetivo, la búsqueda de especies vegetales fuente de aceites esenciales en fincas privadas y áreas naturales del Departamento de Sonsonate y Ahuachapán. Las especies vegetales aromáticas seleccionadas, fueron sometidas a la cuantificación de aceites esenciales, además de la realización de la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Así, se llevaron a cabo **8 viajes de bioprospección**, haciéndonos en compañía del MSc. Gabriel Cerén, Curador del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES), quien desarrolló la identificación del material vegetal.

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

Los viajes de bioprospección se llevaron a cabo en los siguientes lugares (ver Tabla 3), además se registraron el número de especies vegetales y familias botánicas identificadas:

Tabla 3. Viajes de bioprospección realizados en los Departamentos de Sonsonate y Ahuachapán en 2022.

Lugar de bioprospección	Fecha del viaje	No. de especies	No. de familias botánicas
Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate	28 de junio 28 de julio 25 de octubre	63	36
La Golondrinera, Cantón Pushtán, Municipio de Nahuizalco, Departamento de Sonsonate	28 de abril	18	15
Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	10 de febrero 19 de julio	35	27
Laguna Las Ninfas, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	19 de julio	13	11
Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapua,	7 de junio	14	11



Municipio de Jujutla, Departamento de Ahuachapán			
---	--	--	--

De los 8 viajes de bioprospección realizados, se identificaron 143 especies vegetales, pertenecientes a 59 familias botánicas. A groso modo, se puede destacar, que, en todos los sitios visitados, se identificaron especies vegetales aromáticas pertenecientes a familias botánicas, como Lauraceae, Piperaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, etc., que son de interés para trabajar en el laboratorio de investigación.

b) Listado de especies vegetales identificadas

A continuación, se presentarán las especies vegetales identificadas en cada viaje de bioprospección y una breve discusión de las especies vegetales más interesantes desde el punto de vista de especies vegetales aromáticas, estado de conservación y para estudios fitoquímicos posteriores.

Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate

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

Por otro lado, de los dos viajes de bioprospección (Figura 2) realizados se identificaron 63 especies vegetales pertenecientes a 36 familias botánicas, que se presentan en la Tabla 4.





Fig. 2 Viajes de bioprospección realizados a la Finca San Jorge, San Julián, Sonsonate

Tabla 4. Listado de especies vegetales observadas en la Finca San Jorge, Cantón El Balsamar, Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate (28 junio, 26 de julio y 26 de octubre).

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1	“Sangre de perro” “Frijolón”	Fabaceae	<i>Lonchocarpus phaseolifolius</i>
2	“Uña de gato”	Fabaceae	<i>Machaerium kegelii</i>
3	“Paternillo”	Fabaceae	<i>Machaerium pittieri</i>
4	“Escalera de mono”	Fabaceae	<i>Bauhinia cf guianensis</i>
5	“Balsamillo”	Fabaceae	<i>Indeterminada</i> (Posible <i>Myrospermum frutescens</i>)
6	“Bálsamo”	Fabaceae	<i>Miroxylon pereirae</i>
7	“Frijol mono”	Fabaceae	<i>Vigna sp.</i>

8	“Sálamo”	Rubiaceae	<i>Calycophyllum candidissimum</i>
9	“Crucito”	Rubiaceae	<i>Randia cf monantha</i>
10	“Café”	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>
11	“Quina”	Rubiaceae	<i>Exostema mexicanum</i>
12	“Chorcha de pava”	Rubiaceae	<i>Pogonopus exsertus</i>
13	“Oreja de ratón”	Rubiaceae	<i>Geophyla repens</i>
14		Rubiaceae	<i>Indeterminada</i>
15	“Copalchi Montes”	Euphorbiaceae	<i>Croton sp.</i>
16	“Chichicastón”	Euphorbiaceae	<i>Cnidoscolus tubulosus</i>
17	“Tambor”	Euphorbiaceae	<i>Omphalea oleifera</i>
18	“Copalchi de monte”	Euphorbiaceae	<i>Croton sp.</i>
19	“Tecomasuche”	Bixaceae	<i>Cochlospermum vitifolium</i>
20		Piperaceae	<i>Peperomia sp.</i>
21		Piperaceae	<i>Piper tuberculatum</i>
22	“Galecita”	Piperaceae	<i>Peperomia sp.</i>
23		Cyperaceae	<i>Cyperus hermaphroditus</i>
24		Apocynaceae	<i>Gonolobus taylorianus</i>
25		Apocynaceae	<i>Matelea quirosii</i>
26	“Duerme culebra”	Alstroemeriaceae	<i>Bomarea edulis</i>
27	“Hoja del golpe”	Solanaceae	<i>Solanum diphyllum</i>
28	“Hierba del pobre”	Phytolaccaceae	<i>Rivina humilis</i>
29	“Epacina”	Phytolaccaceae	<i>Petiveria alliacea</i>
30	“Cacho de novio”	Myrtaceae	<i>Eugenia sp.</i>

31		Araceae	<i>Xanthosoma sp.</i>
32		Urticaceae	<i>Indeterminada</i>
33	“Amate”	Moraceae	<i>Ficus sp.</i>
34	“Pergamino”	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum mexicanum</i>
35	“Papaturo”	Polygonaceae	<i>Coccoloba sp.</i>
36	“Canelo montes”	Lauraceae	<i>Ocotea veraguensis</i>
37	“Barbasco”	Dioscoreaceae	<i>Dioscorea mexicana</i>
38		Scrophulariaceae	<i>Capraria biflora</i>
39		Thelypteridaceae	<i>Thelypteris sp.</i>
40		Annonaceae	<i>Indeterminada</i>
41	“Siete pellejos”	Convolvulaceae	<i>Ipomoea wolcottiana subsp. wolcottiana</i>
42	“Copalillo”	Burseraceae	<i>Bursera graveolens</i>
43	“Caña de cristo”	Costaceae	<i>Costus sp.</i>
44	“Planta Milagrosa”	Gesneriaceae	<i>Drymonia serrulata</i>
45	“Cabo de hacha”	Malvaceae	<i>Luehea speciosa</i>
46	“Tempisque”	Sapotaceae	<i>Sideroxylon capiri subsp. tempisque</i>
47	“Nispero”	Sapotaceae	<i>Manilkara chicle</i>
48	“Órgano”	Cactaceae	<i>Stenocereus eichlamii</i>
49	“Flor amarilla”	Malphiaceae	<i>Stigmaphyllon ellipticum</i>
50	“Hierba del susto”	Acanthaceae	<i>Justicia carthaginensis</i>
51	“Vaca gorda”	Bromeliaceae	<i>Hechtia guatemalensis</i>
52	“Asta de bajo”	Annonaceae	<i>Sapranthus microcarpus</i>
53	“Achote”	Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>
54	“Granadilla de hormiga”	Passifloraceae	<i>Passiflora sp.</i>
55	“Chorcha de pava”	Rubiaceae	<i>Pogonopus exsertus</i>

56	“Amatillo”	Apocynaceae	<i>Rauvolfia tetraphylla</i>
57	“Guaco”	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia salvadorensis</i>
58	“Espuela del diablo” “Tinterillo negro”	Nyctaginaceae	<i>Pisonia macranthocarpa</i>
59	“Caulote”	Malvaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i>
60	“Velazquina”	Convulvulaceae	<i>Evolvulus sp.</i>
61	“Contamal”	Fabaceae	<i>Leucaena shannoni</i>
62	“Oregano silvestre”	Verbenaceae	<i>Lippia cardiostegia</i>
63		Asteraceae	<i>Ageratum salvanaturae</i>

De las especies identificadas en la Finca San Jorge, 6 de estas pueden poseer propiedades aromáticas interesantes, según investigaciones bibliográficas llevadas a cabo: *Ocotea veraguensis* “Canela de monte” Lauraceae (Takaku et al., 2007), *Bursera graveolens* “Copalillo” Burseraceae (Young et al., 2007), *Eugenia sp.* “Cacho de novío” Myrtaceae (da Silva et al., 2017), *Croton sp.* “Copalchi de monte” Euphorbiaceae (Turiel et al., 2013), *Lippia cardiostegia* “Oregano silvestre” (Ortega-Cuadros et al., 2020) y *Myrospermum frutescens* “Balsamillo” Fabaceae (Mendoza et al., 2003); vale la pena recalcar que de “Balsamillo”, es utilizado como palanca para retorcer los trapos en el proceso de obtención de la resina de “Bálsamo” y solo se ha identificado un espécimen en la Finca San Jorge, por lo que es primordial, monitorear esta especie vegetal.

Por otro lado, *B. graveolens*, es una especie interesante y que, en otros países, como Ecuador, es conocido como “Palo Santo”. Su madera resinosa es utilizada con diversos propósitos curativos por los chamanes, así, su humo y aceite, es utilizado para curar el alma y el cuerpo de los enfermos, además de poseer propiedades antidepresivas, diaforéticas, diuréticas, depurativas, antirreumáticas, sedantes, contra el estrés y la tristeza, antisépticas y contra los hongos de la piel, por otro lado, el humo es también usado como repelente de mosquitos y contra las malas energías. Dentro de la Finca San Jorge, hemos detectado hasta el momento 4 árboles, y es necesario su monitoreo y preservación.

El caso de *Croton sp.*, es especial por dos razones, una por ser una especie en estudio desde el punto de vista botánico, que puede conducir a un nuevo registro de esta especie en el país o a una nueva especie para la ciencia, y otra, es por el rico olor que posee la corteza de especie vegetal, por lo que es importante, la determinación de la cuantificación y composición de su aceite esencial.

Otra especie que hay que monitorear en la finca, proteger y contabilizar es *Exostema mexicanum* “Quina”, utilizada en nuestro país para el tratamiento de la malaria y el dengue. Es de destacar que las 4-fenilcoumarinas aisladas de esta especie vegetal (Froelich et al., 2005), presentaron un potencial inhibidor de las ribonucleasas NPS-15 de SARS-CoV-2, en un estudio docking llevado a cabo en 2021 (Nuñez et al., 2021), por lo que estamos conduciendo en estos momentos esfuerzos a comprobar estos resultados en ensayos *in vitro*.

Desde el punto de vista alimenticio la especie *Bomarea edulis* “Duerme culebra” es muy interesante y sin referencia de uso como alimento en nuestro país. Esta especie posee un nombre común muy curioso, ya que se cree popularmente, que las culebras se encuentran en la proximidad de esta planta, pero esto, no es nada más alejado de la realidad, y, al contrario, estamos frente a una especie

alimenticia que posee unos tubérculos comestibles ricos en almidones, apreciados en Sudamérica, donde son preparados con crema. Por lo tanto, valdría la pena realizar estudios en ese sentido en la comunidad próxima a la Finca San Jorge, u otras donde abunda esta especie vegetal.

Por otra parte, hay muchas especies identificadas botánicamente, que se poseen datos interesantes, pero destacar la presencia en la Finca San Jorge de *Erythroxylum mexicanum* “Pergamino”, estrechamente relacionada con la “Coca” Suramericana; *Drymonia serrulata* “Planta milagrosa”, muy estimada en Panamá por sus usos para eliminar quistes ováricos; *Geophyla repens*, una especie rastrera utilizada en agricultura orgánica para evitar la propagación de malezas o el registro de 6 especies pertenecientes a las Familias Piperaceae, Urticaceae, Rubiaceae, Fabaceae y Annonaceae, que se encuentran actualmente en estudios botánicos, y que pueden arrojar datos muy interesantes para nuestro país y para la Finca San Jorge. Por último, destacar, la identificación de *Ageratum salvanaturae*, especie de la familia de las Asteraceae, que se creía, que era endémica del Parque Nacional El Imposible, ya que es la primera vez que se identifica fuera de este entorno, y sería muy interesante iniciar con esta especie vegetal, estudios fitoquímicos y biológicos.

La Golondrinera, Cantón Pushtán, Municipio de Nahuizalco, Departamento de Sonsonate

La Golondrinera, está conformada por una serie de cascadas comprendidas en un cañón de farellones, de aproximadamente 40 metros de altura, donde habitan, especies de aves que los lugareños las identifican como “Golondrinas”, pero según estudios llevados a cabo por biólogos en nuestro país, son aves conocidas como “Vencejos de cuello blanco” (*Streptoprocne zonaris*, Apodidae), que sobrevuelan el lugar, y que, en ocasiones, avisan de las tormentas que se acercan al cañón, y por lo escabroso de este sitio, nos avisan que es prudente abandonar el lugar.

En el viaje de bioprospección (Figura que llevamos a cabo, se identificaron 18 especies vegetales pertenecientes a 14 familias botánicas, que se presentan en la Tabla 5.





Fig. 3 Viaje de bioprospección a La Golondrinera, Cantón Pushtán, Nauhizalco, Sonsonate.

Tabla 5. Listado de especies vegetales observadas en La Golondrinera, Cantón Pushtán, Municipio de Nahuizalco, Departamento de Sonsonate (28 abril).

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1		Lamiaceae	<i>Cornutia pyramidata</i>
2		Euphorbiaceae	<i>Acalypha sp.</i>
3	“Planta milagrosa”	Gesneriaceae	<i>Drymonia serrulata</i>
4	“Pepenance”	Ebenaceae	<i>Diospyros salicifolia</i>
5	“Golondrinita”	Piperaceae	<i>Peperomia sp.</i>

6		Piperaceae	<i>Piper patulum</i>
7		Piperaceae	<i>Peperomia lancifolia</i>
8	“Guisnay”	Araceae	<i>Spathyphyllum matudae</i>
9	“Rodillera”	Commelinaceae	<i>Tripogandra serrulata</i>
10		Tectariaceae	<i>Tectaria heracleifolia</i>
11		Melastomataceae	<i>Centradenia floribunda subsp. bernoulli</i>
12		Acanthaceae	<i>Odontonema tubaeforme</i>
13		Acanthaceae	<i>Aphealandra scabra</i>
14	“Guaco”	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia grandiflora</i>
15	“Canela de monte”	Lauraceae	<i>Ocotea veraguensis</i>
16		Sapindaceae	<i>Thouinia brachybotrya</i>
17	“Anona”	Annonaceae	<i>Annona reticulata</i>
18	“Guacal de mico”	Loganiaceae	<i>Strychnos cf panamensis</i>

De las especies identificadas en La Golondrinera, 4 pueden poseer propiedades aromáticas interesantes, según investigaciones bibliográficas. Cabe mencionar, que se identificó de nuevo a *Ocotea veraguensis* “Canela de monte” Lauraceae (Takaku et al., 2007), además de *Cornutia pyramidata* Lamiaceae (Samol et al., 2011), *Piper patulum* Piperaceae (Cruz et al., 2012) y *Aristolochia grandiflora* “Guaco” Aristolochiaceae (Leitão et al., 2011).

Entre otras especies vegetales que podemos destacar se encuentran: *Drymonia serrulata* “Planta milagrosa”, *Peperomia sp.* “Golondrinita”, especie muy interesante desde el punto de vista botánico por sus particularidades, que podría considerarse un nuevo registro para el país y *Tripogandra serrulata* “Rodillera, utilizada popularmente para inflamaciones y fracturas.

Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán

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

En los viajes de bioprospección que llevamos a cabo, se identificaron 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas, que se presentan en la Tabla 6.



Fig. 4 Viajes de bioprospección a la Laguna Verde, Apaneca, Ahuachapán.

Tabla 6. Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (10 febrero y 19 julio).

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1		Malvaceae	<i>Neobrittonia acerifolia</i>
2		Malvaceae	<i>Triumfetta lappula</i>
3		Solanaceae	<i>Solanum appendiculatum</i>
4		Solanaceae	<i>Solanum sp.</i>
5	“Flor de cera”	Rubiaceae	<i>Palicourea padifolia</i>
6		Rubiaceae	<i>Arachnothryx laniflora</i>
7		Rubiaceae	<i>Rondeletia sp.</i>
8	“Sietío”	Onagraceae	<i>Fuchsia microphylla subsp. tetradactyla</i>
9	“Cordoncillo”	Verbenaceae	<i>Citharexylum donnell-smithii</i>
10		Piperaceae	<i>Peperomia sp.</i>
11	“Cordoncillo”	Piperaceae	<i>Piper amalago</i>
12	“Lima de montaña”	Piperaceae	<i>Piper standleyi</i>
13		Araceae	<i>Anthurium obtusum</i>
14		Lamiaceae	<i>Scutellaria longifolia</i>
15		Orchidaceae	<i>Cyclopogon elatus</i>
16	“Flor de gato”	Orobanchaceae	<i>Castilleja arvensis</i>

17		Phytolaccaceae	<i>Phytolacca rugosa</i>
		Poaceae	<i>Ichnanthus sp</i>
18		Rosaceae	<i>Rubus niveus</i>
19		Asteraceae	<i>Gnaphallium attenuatum</i>
20		Actinidiaceae	<i>Saurauia kegeliana</i>
21		Fabaceae	<i>Desmodium uncinatum</i>
22		Passifloraceae	<i>Passiflora adenopoda</i>
23	“Jasmín azul”	Plumbaginaceae	<i>Plumbago auriculata</i>
24	“Mano de León”	Araliaceae	<i>Dendropanax arboreus</i>
25	"Matasano"	Rutaceae	<i>Casimiroa edulis</i>
26	“Cedro-espino”	Rutaceae	<i>Zanthoxylum culantrilo</i>
27		Musaceae	<i>Ensete cf ventricosum</i>
28	"Ciprés"	Cupressaceae	<i>Cupressus lusitanica</i>
29	"Pino"	Pinaceae	<i>Pinus oocarpa</i>
30		Crassulaceae	<i>Echeveria chiapensis</i>
31	“Canelito” “Pimiento”	Lauraceae	<i>Ocotea effusa</i>
32	“Aguacate de olor”	Lauraceae	* <i>Persea americana</i>
33	“Canelón”	Lauraceae	<i>Nectandra martinicensis</i>
34	“Duraznillo”	Rhamnaceae	<i>Frangula capreifolia var. grandifolia</i>
35	“Campanilla morada”	Convolvulaceae	<i>Ipomoea sp.</i>

*Colectada en Finca El Carajo, Apaneca.

De las especies identificadas en la Laguna Verde, hasta el momento, 9 pueden poseer propiedades aromáticas interesantes, según investigaciones bibliográficas: *Citharexylum donnell-smithii* “Cordoncillo” Verbenaceae (Miller, 2010), *Piper standleyi* “Lima de Montaña” Piperaceae (Simol et al., 2011), *Scutellaria longifolia* Lamiaceae (Zahra et al., 2019), *Passiflora adenopa* Passifloraceae (Chóez-Guaranda et al., 2017), *Zanthoxylum culantrilo* “Cedro-espino” Rutaceae (Simionatto et al., 2005), *Cupressus lusitanica* “Cipres” Cupressaceae (Nteziyaremye et al., 2021), *Ocotea effusa* “Canelito” “Pimiento” Lauraceae (Takaku et al., 2007), *Persea americana* “Aguacate de olor” Lauraceae (Nasri et al., 2022) y *Nectandra martinicensis* “Canelón” Lauraceae (Macías-Villamizar et al., 2015).



En otras especies vegetales que se deben hacer notar de la flora de la Laguna Verde está, *Palicourea padifolia* “Flor de cera” (Krebs et al., 1994), unas de las pocas especies vegetales que poseen ácido fluoroacético, por lo que se consideran especies tóxicas en animales de pastoreo, causando muerte súbita.

Laguna Las Ninfas, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán

La Laguna de las Ninfas, es un lago de origen volcánico de aproximadamente 600 metros cuadrados, ubicado en el Cerro de las Ninfas, en la cordillera Apaneca-Lamatepec, a una altura de 1,640 msnm. Por su ubicación, la flora predominante es de bosque nebuloso, rodeado de cultivos de café y la temperatura oscila todo el año entre los 14° a 17° centígrados.

En el viaje de bioprospección (Figura 5) que llevamos a cabo, se identificaron 13 especies vegetales pertenecientes a 11 familias botánicas, que se presentan en la Tabla 7.



Fig. 5 Viaje de bioprospección a la Laguna Las Ninfas, Apaneca, Ahuachapán.

Tabla 7. Listado de especies vegetales observadas en la Laguna Las Ninfas, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (19 de julio).

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1	“Amate”	Moraceae	<i>Ficus sp.</i>
2	“Ahuja de arra”	Salicaceae (Ex Flacourtiaceae)	<i>Xylosma sp.</i>
3	“Culebro”	Celastraceae	<i>Zinowiewia integerrima</i>
4		Gesneriaceae	<i>Besleria sp.</i>
5		Piperaceae	<i>Peperomia sp.</i>
6	“Lima de montaña”	Piperaceae	<i>Piper standleyi</i>
7		Rubiaceae	<i>Rondeletia sp.</i>
8		Rubiaceae	<i>Arachnothryx sp.</i>

9	“Cerezo silvestre”	Primulaceae	<i>Ardisia sp.</i>
10	“Cereto”	Myrsinaceae	<i>Parathesis sp.</i>
11		Araceae	<i>Anthurium obtusum</i>
12	“Lirio”	Nymphaeaceae	<i>Nymphaeae sp.</i>
13		Menyanthaceae	<i>Nymphoides fallax</i>

De las especies vegetales identificadas en la Laguna Las Ninfas, podemos destacar la presencia de *Piper standleyi* “Lima de Montaña” (Simol et al., 2011), planta con un exquisito olor a “Lima”, que también fue localizada en la Laguna Verde, y que será incluida en el estudio de especies aromáticas.

Destacar la presencia de *Zinowewia integerrima* “Culebro”, especie vegetal perteneciente a la familia Celastraceae. Especies de esta familia botánica, están siendo estudiadas por el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia, desde hace 20 años, debido a interesantes metabolitos aislados, tales como: triterpenos, triterpenometilenquinonas, diterpenos, sesquiterpenos, etc., que poseen actividades biológicas como analgésicos, antiparasitarios, antitumorales, entre otras (Nuñez et al., 2016; Nuñez et al., 2021).

Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapúa, Municipio de Jujutla, Departamento de Ahuachapán

La Finca Esperanza de San Francisco, se encuentra ubicada en el Cantón Zapúa, uno de los 13 cantones que pertenecen al Municipio de Jujutla. Esta finca produce principalmente café y cacao, además de ser un lugar familiar para descansar rodeado de la naturaleza. Además, la finca cuenta con un cerro que posee un área de conservación de especies vegetales, que nos sorprendió por su biodiversidad y clima.

Así, en el viaje de bioprospección (Figura 6), se identificaron 14 especies vegetales pertenecientes a 11 familias botánicas, que se presentan en la Tabla 8.



Fig. 6 Viaje de bioprospección a la Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapúa, Ahuachapán.

Tabla 8. Listado de especies vegetales observadas en Finca Esperanza de San Francisco, Cantón Zapua, Municipio de Jujutla, Departamento de Ahuachapán (7 de junio).

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1		Rubiaceae	<i>Psychotria sp.</i>
2		Rubiaceae	<i>Gonzalagunia sp.</i>
3	“Ahuja de arra”	Salicaceae (Ex Flacourtiaceae)	<i>Xylosma sp.</i>
4	“Chilillo”	Salicaceae (Ex Flacourtiaceae)	<i>Casearia corymbosa</i>
5	“Cafecito”	Salicaceae (Ex Flacourtiaceae)	<i>Casearia commersoniana</i>
6	“Churumullo”	Annonaceae	<i>Annona cherimola</i>
7		Nyctaginaceae	<i>Neea sp.</i>
8	“Zapotillo”	Rutaceae	<i>Pilocarpus racemosus subsp. viridulus</i>
9	“Aceituno de montaña”	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella racemosa</i>
10	“Pacaya”	Arecaceae	<i>Chamaedorea sp.</i>
11		Malvaceae	<i>Pavonia sp.</i>
12		Vitaceae	<i>Cissus sp.</i>
13		Piperaceae	<i>Piper sp.</i>
14	“Escobo blanco”	Celastraceae	<i>Maytenus chiapensis</i>

De las especies identificadas, ninguna presentó la característica de ser una especie aromática, pero sí se registraron especies muy interesantes desde el punto de vista fitoquímico y biológico, tales como: especies del género *Casearia* y *Xylosma* (Salicaceae ex Flacourtiaceae), que poseen metabolitos secundarios tipo sesquiterpénicos con actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi*, causante del “Mal de Chagas” (dos Santos et al., 2021).

Otra especie muy interesante, y que fue encontrada como bosque mayoritario en la cumbre de esta finca fue *Pilocarpus racemosus subsp. viridulus* “Zapotillo” Rubiaceae, especie que posee un alcaloide mayoritario denominado Pilocarpina, que se utiliza para tratar el glaucoma, y la resequead en la boca ocasionado por tratamientos con radioterapia, además de usos en veterinaria, aumentando la peristalsis, consiguiendo evacuaciones más rápidas en caninos y ganado vacuno, donde también puede estimular de la musculatura del útero, incrementando las contracciones del mismo, para facilitar

la labor de parto en el ganado vacuno y eliminar el contenido uterino en el post-parto (Sawaya et al., 2011). Por otra parte, se ha identificado alcaloides tipo pilocarpina como candidatos para la inhibición de la principal proteasa del SARS-CoV-2, contribuyendo a la cura o tratamiento del Covid-19 (de Sá et al., 2021).

c) Listado de especies vegetales aromáticas identificadas en los viajes de bioprospección

De las 143 especies vegetales identificadas en los 8 viajes de bioprospección, se enlistan 18 especies aromáticas que pueden ser potencialmente estudiadas, y se presentan en la Tabla 9:

Tabla 9. Especies vegetales aromáticas identificadas en los viajes de bioprospección.

No	Nombre común	Familia	Nombre científico
1	“Canela de monte”	Lauraceae	<i>Ocotea veraguensis</i>
2	“Canelito” “Pimiento”	Lauraceae	<i>Ocotea effusa</i>
3	“Aguacate de olor”	Lauraceae	<i>Persea americana</i>
4	“Canelón”	Lauraceae	<i>Nectandra martinicensis</i>
5	“Cedro-espino”	Rutaceae	<i>Zanthoxylum culantrilo</i>
6		Lamiaceae	<i>Cornutia pyramidata</i>
7		Lamiaceae	<i>Scutellaria longifolia</i>
8	“Copalillo”	Burseraceae	<i>Bursera graveolens</i>
9	“Cacho de novío” “Incienso”	Myrtaceae	<i>Eugenia sp.</i>
10	“Copalchi de monte”	Euphorbiaceae	<i>Croton sp.</i>
11		Piperaceae	<i>Piper patulum</i>
12	“Lima de Montaña”	Piperaceae	<i>Piper standleyi</i>
13	“Cipres”	Cupressaceae	<i>Cupressus lusitanica</i>
14		Passifloraceae	<i>Passiflora adenopa</i>
15	“Cordoncillo”	Verbenaceae	<i>Citharexylum donnell-smithii</i>
16	“Guaco”	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia grandiflora</i>
17	“Balsamito”	Fabaceae	<i>Myrospermum frutescens</i>
18	“Oregano silvestre”	Verbenaceae	<i>Lippia cardiostegia</i>



De las 18 especies aromáticas enlistadas, 4 pertenecen a la familia Lauraceae, 2 a Lamiaceae, 2 a Piperaceae, 2 a Verbenaceae y 1 especie de Rutaceae, Burseraceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Cupressaceae, Passifloraceae, Aristolochiaceae y Fabaceae, respectivamente, lo que hacen un total de 12 familias botánicas.

d) Selección y recolección de especies vegetales aromáticas

En base al número de especímenes identificadas en campo, posible domesticación de la especie, novedad de la especie vegetal en la búsqueda de aceites esenciales, duración del proyecto de investigación, se seleccionaron 5 especies aromáticas para desarrollar trabajo experimental, las cuales son: *Piper standleyi* “Lima de Montaña” Piperaceae (Laguna Verde), *Ocotea veraguensis* “Canela de monte” Lauraceae (Finca San Jorge), *Nectandra martinicensis* “Canelón” Lauraceae (Laguna Verde), *Persea americana* “Aguacate de olor” Lauraceae (Finca El Carajo-Laguna Verde) y *Zanthoxylum culantrilo* “Cedro-espino” Rutaceae (Laguna Verde) (ver figura 7), para calcular el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales, y determinar de la actividad antioxidante y microbiológica.

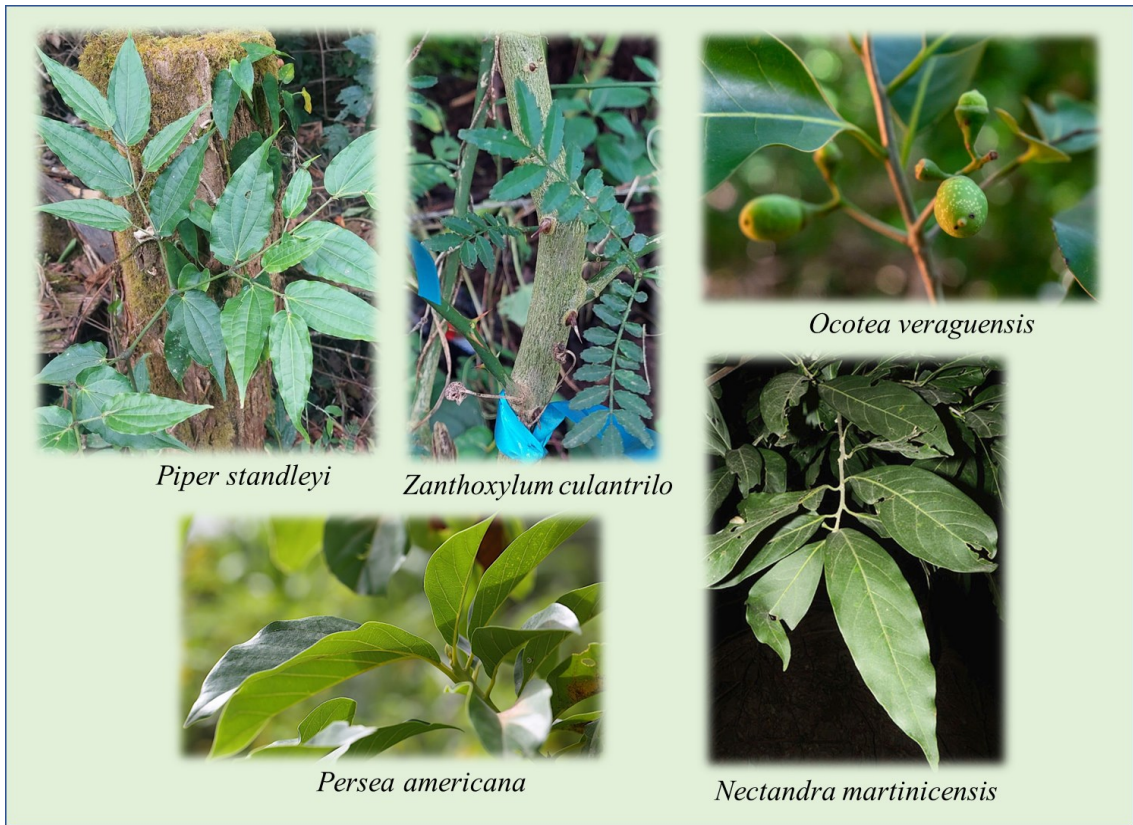


Fig 7. Especies aromáticas seleccionadas para extracción de aceites esenciales.

e) Extracción de aceites esenciales por medio del método Clevenger (USP 34-NF 29, 2011; modificado)

- Se fraccionó el material vegetal con ayuda de tijeras y se pesó el material fraccionado.

- Se transfirió el material pesado a un balón de fondo plano con capacidad de 1000 mL, hasta llegar a $\frac{2}{3}$ de su capacidad.
- Se agregó aproximadamente 300 mL de agua destilada en el balón que contiene la muestra fraccionada.
- Se procedió a armar el equipo de destilación de aceites esenciales (Aparato de Clevenger para aceites menos densos que el agua).
- Se destiló a temperatura constante (80-90°C) durante 90 minutos y se apagó el equipo.
- Se recolectó el aceite obtenido en tubos eppendorf y se calculó el peso del aceite obtenido.
- Se determinó el porcentaje de rendimiento en peso.

La puesta a punto del método Clevenger se realizó con hojas del "Limón" (*Citrus x aurantifolia*, Rutaceae), que fueron recolectadas a tempranas horas de la mañana en la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana, posteriormente se trasladaron las hojas hacia el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia, en hieleras.

Para la recolección se toma en cuenta que el material vegetal esté sano, libre de enfermedades, insectos, o materias extrañas. En el LIPN, se procedió a la extracción y cuantificación por medio del método Clevenger, donde se realizaron al menos 3 extracciones diarias (ver Figura 8), verificando el rendimiento de aceites esenciales obtenidos.

En la Tabla 10, se registran las 5 últimas extracciones y cuantificaciones llevadas a cabo, consiguiendo una desviación estándar aceptable. Cabe mencionar, que se utilizaron 1.04 Kg de hojas frescas de hojas *Citrus x aurantifolia* para obtener de 2.5 mL de aceite esencial. Esto es interesante, desde el punto de vista de futuros ensayos con otras variedades de "Limón" o especies de cítricos, y en el caso de nuestro proyecto, para llevar a cabo los cálculos del costo de la fabricación de fitocosméticos.



Fig 8. Puesta a punto del método Clevenger con hojas del "Limón".

Tabla 10. Resultados de los ensayos de extracción y rendimiento de las hojas de “Limón” mediante el aparato Clevenger.

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

f) Cuantificación de aceites esenciales en especies aromáticas seleccionadas

Se han llevado a cabo las extracciones de aceites esenciales de las cinco especies vegetales seleccionadas (ver Figura 7). El órgano vegetal y día de recolección, se detalla a continuación: hojas de *Piper standleyi* (28 de julio de 2022-Laguna Verde), hojas de *Nectandra martinicensis* (25 de agosto de 2022-Laguna Verde), hojas de *Ocotea veraguensis* (1 y 22 de septiembre de 2022- Finca San Jorge), hojas de *Zanthoxylum culantrilo* (6 de octubre de 2022-Laguna verde) y hojas de *Persea americana* (8 de noviembre-Finca El Carajo-Apaneca), a través de 6 viajes de recolección.

El procedimiento general efectuado con las muestras que ingresaron al laboratorio, consiste en fraccionar las hojas para las extracciones de sus aceites, luego colocar el peso adecuado en el balón de fondo redondo, posteriormente armar el aparato Clevenger y desarrollar la extracción durante 1 hora (ver Figura 9).



Fig 9. Extracción de aceites esenciales por Método Clevenger de las especies seleccionadas.

Los rendimientos de la extracción de los aceites esenciales de *P. standleyi*, *O. veraguensis*, *Z. culantrilo* y *P. americana*, se encuentran dentro del promedio que presentan los aceites esenciales en las especies vegetales aromáticas (0.1 a 1%), destacándose *P. americana*, ya que posee una mayor rendimiento de obtención, con una relación de 50 veces más que los otros aceites esenciales obtenidos. El caso de *N. martinicensis*, es peculiar, ya que no se observó la presencia de aceites esenciales (ver Tabla 11), pero si se percibió su olor, y este fenómeno se discute más adelante.

En el caso de *Piper standleyi*, es la primera vez que se estudia esta especie vegetal, desde el punto de vista fitoquímico y como fuente de aceites esenciales. En lo concerniente al contenido de aceites esenciales, esta especie vegetal, fue mayor que otras especies de *Piper* recolectadas en la Selva del Amazonas en Brasil, donde su promedio oscilaba entre 0.01 a 0.02 (% v/m) (de Morais et al., 2007).

En cuanto al rendimiento de aceites esenciales en las hojas de *O. veraguensis*, este fue de 0.019 (% m/m), mucho menor que el reportado para hojas (0.287% m/m) de esta especie vegetal recolectada en Costa Rica (Takaku et al., 2007). Hay que monitorear el rendimiento de aceites esenciales de esta especie vegetal en época seca y verificar su comportamiento.

Con respecto a *Zanthoxylum culantrilo*, cabe mencionar que es la primera vez que se estudia desde un punto de vista fitoquímico y biológico, ahora, en cuanto al rendimiento de aceite esencial obtenido (0.07%), fue mucho mayor que el de otras especies de *Zanthoxylum* (*Z. fagara*, *Z. acuminatum*, *Z. melanostictum* y *Zanthoxylum* sp.), pero levemente menor que *Z. monophyllum* (0.0836%) (Setzer et al., 2005).

El rendimiento obtenido de aceites esenciales procedentes de las hojas de *Persea americana* “Aguacate de olor” (0.58%) colectadas en Apaneca fue comparado frente al rendimiento de 7 variedades de *P. americana* colectadas en Maruerros en 2020, obteniéndose la siguiente relación de rendimiento: similar a la variedad Fuerte (0.5%), el doble que la variedad Ettinger (0.25%), 20 veces

más que las variedades Reed (0.024%) y Maluma Hass (0.026%) y 40 veces más que las variedades Bacon (0.016%), Hass (0.015%) y Zutano (0.014%), respectivamente (Nasri et al., 2022). En un estudio llevado en Oaxaca, México, se obtuvo un rendimiento inferior (0.24%) al obtenido en la especie salvadoreña (Granados-Echegoyen et al., 2015). Esta discusión revela que estamos ante una especie aromática con una gran expectativa para darle continuidad al estudio de extracción en otras épocas del año, la cuantificación y la determinación de la composición química del aceite esencial.

En el caso de *Nectandra martinicensis*, no se observó la presencia de aceite esencial, aunque sí unas notas fuertes de olor maderable en el alcoholato (agua que genera el vapor para la extracción) con una leve turbidez presentando algunas gotículas aceitosas, esto se puede deber a que los aceites esenciales presentes en esta especie podrían ser solubles en agua, como ocurre con los aceites esenciales de otras especies vegetales (por ejemplo en *Nepeta cataria*, “Hierba del gato”, Lamiaceae, Gonzalez et al., 2007, Patente, España). Sin embargo, en un estudio realizado en *N. amazonum* y *N. hihua*, se extrajeron aceites esenciales, y se obtuvieron rendimientos de 0.04 y 0.12%, respectivamente (Bosquiroli et al., 2017). Sería interesante llevar a cabo la extracción y cuantificación de aceites esenciales en época seca para verificar el porcentaje de rendimiento, y concluir si la época del año influye en el contenido de aceites esenciales y su composición.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación de aceites esenciales de especies vegetales por medio del Método Clevenger.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Órgano	Rendimiento %v/m (mL/g)
<i>Piper standleyi</i>	"Lima de montaña"	Piperaceae	Hojas	0.03 +/- 0.0023
<i>Nectandra martinicensis</i>	"Canelón"	Lauraceae	Hojas	No observado
<i>Ocotea veraguensis</i>	"Canela de monte"	Lauraceae	Hojas	0.02 +/- 0.0039
<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	"Cedro-espino"	Rutaceae	Hojas	0.07 +/- 0.0069
<i>Persea americana</i>	"Aguacate de olor"	Lauraceae	Hojas	0.58 +/- 0.0372

Por otra parte, el rendimiento de aceites esenciales obtenidos en las diferentes especies vegetales aromáticas (mL/Kg de planta fresca) se muestra en la Tabla 12.

Debido a que es un rendimiento bajo, se llevaron a cabo una serie de extracciones con material fresco de *P. standleyi*, *O. veraguensis*, *Z. culantrilo* y *P. americana* (1.6, 1.9, 0.87 y 1 Kg), respectivamente, obteniéndose 0.5, 0.6, 0.4 y 6 mL de aceite esencial. Estos serán utilizados para análisis de capacidad antioxidante, actividad microbiológica y determinación de la composición química en un análisis posterior en colaboración con la Dra. Ilaria Bruni, de la Universidad de Milano-Bicocca, Italia.

Tabla 12. Cantidad de aceite esencial extraído en 1Kg muestra de especies vegetales.

Nombre científico	Aceite esencial extraído (mL)
<i>Piper standleyi</i>	0.3

<i>Nectandra martinicensis</i>	No observado
<i>Ocotea veraguensis</i>	0.6
<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	0.4
<i>Persea americana</i>	6

g) Puesta a punto de la actividad antioxidante en el aceite esencial de “Limón”

En el Apartado I, literal 2e, página 11, sobre ensayo de la capacidad antioxidante de la pulpa de café, es de hacer notar que los principios y reacciones químicas que se desarrollan son las mismas que se llevarán a cabo con los aceites esenciales, la única diferencia se centra en los solventes utilizados para disolver las muestras en ambos métodos, esto es debido a las polaridades contrapuestas que presenta tanto el extracto acuoso de pulpa de café (polar) vs los aceites esenciales (no polares).

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

Preparación de la curva de calibración con estándar de Trolox

- Se procedió como lo indica el Apartado I, literal 2e, página 11 (ver Figura 10)

Preparación de la curva de calibración con estándar de ácido Ascórbico

- Se preparó la curva de calibración de Ácido Ascórbico entre 0.57 a 568 μM , con al menos 5 puntos.
-

Preparación de la solución de DPPH [50 μM]

- Se procedió como lo indica el Apartado I, literal 2e, página 11 (ver Figura 10)

Preparación de la solución de trabajo

- Se prepararon 3 soluciones de trabajo con concentraciones de aceites esenciales entre 15 a 25 mg/mL en metanol. (ver Tabla 13 y Figura 10).

Preparación de las celdas

- Procedió de la misma manera como lo indica el apartado I, literal 2e, página 11 (ver figura 10).

Lectura de celdas en equipo UV

- Se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 515 nm, con un espectrofotómetro UV-Vis, modelo GENESYS 10S UV-Vis (ver Figura 10).

La actividad antioxidante del aceite esencial de “Limón” (*Citrus x aurantifolia*) (ver Tabla 13 y Figura 10), fue llevada a cabo con unas muestras de hojas recolectadas en la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana (ver Tabla 13).

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

mg/mL, respectivamente y en el tercer ensayo se aumentó más las concentraciones trabajando con 20 mg/mL, 35 mg/ml y 50 mg/mL, respectivamente.

Debido a la variación en los resultados, se optó por concentraciones intermedias (del segundo y tercer ensayo) trabajando el cuarto ensayo con concentraciones de 15 mg/mL, 20 mg/mL y 25 mg/mL, respectivamente.

La actividad antioxidante del aceite esencial de “Limón” se expresó en IC_{50} , la cual es una medida que identifica la cantidad mínima necesaria de una especie antioxidante (aceite esencial) para reducir al 50% la concentración de una sustancia oxidante dentro de la solución de trabajo, por lo tanto, se espera que a mejor capacidad antioxidante que tenga la solución en estudio, su IC_{50} , sea menor, y se compara con el estándar de Trolox y estándar de Ácido ascórbico (ver Tabla 13).

El resultado del IC_{50} , del ensayo No. 1 fue de 283.94 ± 5.93 mg/mL, del ensayo No.2 fue $IC_{50} = 250.74 \pm 23.57$ mg/mL, del tercero tuvo un IC_{50} de 365.76 ± 0.25 mg/mL y el cuarto, fue de 175.44 ± 0.82 mg/mL.

Por lo tanto, se determinó que las concentraciones de 15 mg/mL, 20 mg/mL y 25 mg/mL, mantienen la mejor capacidad antioxidante del aceite esencial, mostrando un menor IC_{50} , (ver Tabla 13).



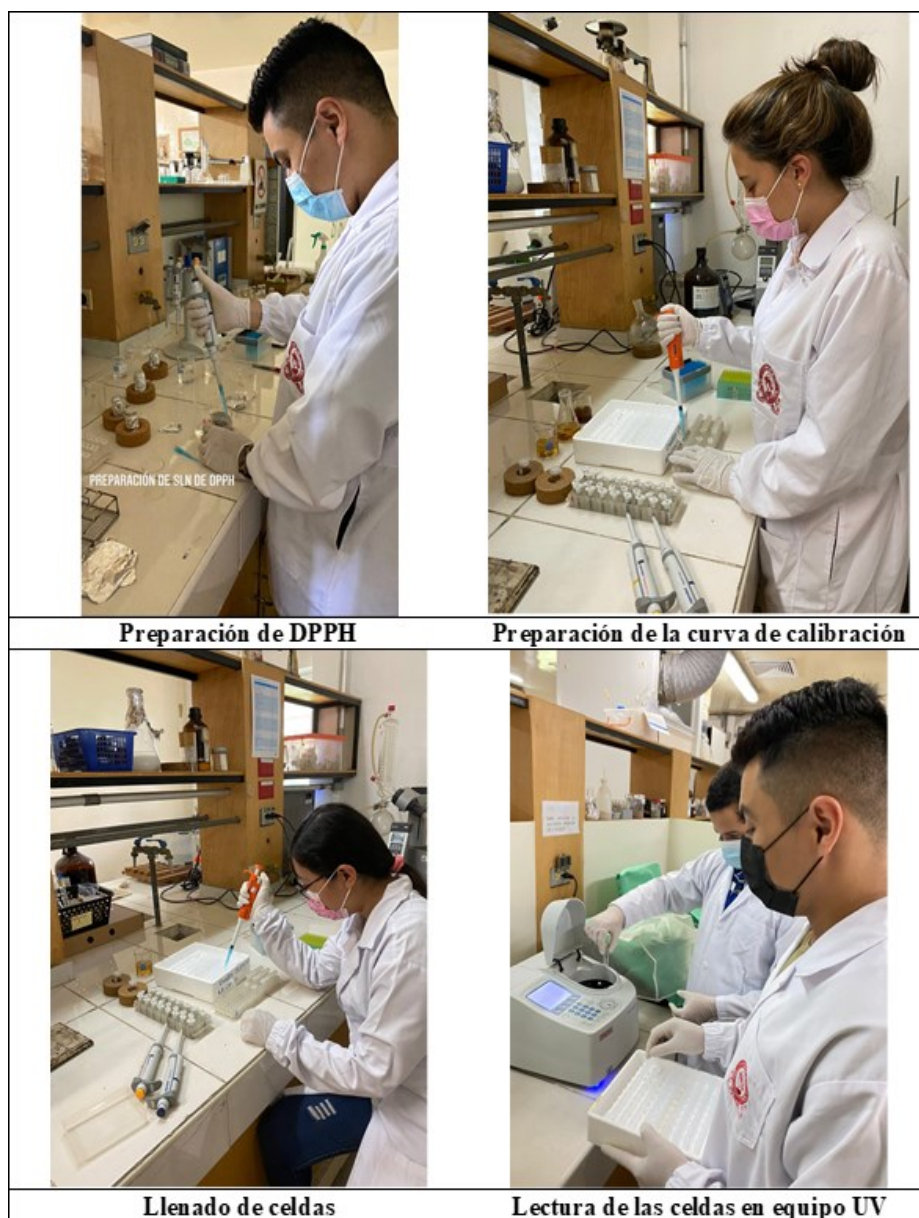


Fig 10. Desarrollo del método de cuantificación de actividad antioxidante en el aceite esencial de “Limón”.

Tabla 13. Ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante en aceite esencial de “Limón”.

Nº ensayo	1	2	3	4
Concentraciones (mg/mL)	0.7	10	20	15
	1.5	15	35	20
	3.0	20	50	25

IC ₅₀	283.94 ± 5.93 mg/mL	250.74 ± 23.57 mg/mL	365.76 ± 0.25 mg/mL	175.44 ± 0.82 mg/mL
------------------	------------------------	-------------------------	------------------------	------------------------

La actividad antioxidante de los aceites esenciales se expresó en IC₅₀, y se comparó frente a dos estándares, Trolox y ácido ascórbico, esto se debe a que son dos moléculas antioxidantes utilizadas ampliamente en ensayos antioxidantes (Gómez-Ordoñez et al., 2018) y en el caso del ácido ascórbico, es un potente agente reductor, lo que significa que dona electrones fácilmente a las moléculas receptoras el cual también y es también muy utilizado en ensayos de actividad antioxidante (Rivas et al., 2020).

h) Actividad antioxidante de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas de los viajes de bioprospección.

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

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies vegetales aromáticas (*Piper standleyi*, *Ocotea veraguensis*, *Zanthoxylum culantrilo* y *Persea americana*, ver Tabla 14), se determinó mediante el método DPPH, el cual determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso, y a mayor captación del radical libre por parte del antioxidante, habrá una mayor disminución de la absorbancia inicial del radical DPPH.

Cabe recordar que el análisis de la actividad antioxidante no se realizó en *Nectandra martinicensis*, ya que no se observaron aceites esenciales durante la extracción, como se discutió en la sección anterior.

Tabla 14. Actividad antioxidante de *Piper standleyi*, *Ocotea veraguensis*, *Zanthoxylum culantrilo* y *Persea americana*

Aceite esencial	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Piper standleyi</i>	171.32 ± 1.18
<i>Ocotea veraguensis</i>	310.25 ± 1.8
<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	44.6 ± 0.58
<i>Persea americana</i>	138.65 ± 1.15
Trolox	68.7 ± 0.7
Ácido ascórbico	54.2 ± 1.2

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

antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%, es decir a la mitad, por lo que cuanto menor sea la IC₅₀, mayor será la actividad antioxidante (Atoui et al., 2005).

En el análisis de capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos (Ver tabla 14), se observó que el aceite esencial de *Z. culantrilo*, mostró la mayor actividad captadora de radicales libre con un IC₅₀ de 44.6 ± 0.58 mg/mL en comparación con las otras especies aromáticas analizadas, e incluso mayor capacidad antioxidante que los estándares de referencia (Trolox=68.7 ± 0.7 mg/mL y ácido ascórbico 54.2 ± 1.2 mg/mL, respectivamente).

En especies de *Zanthoxylum* colectadas en Costa Rica, se ha determinado que los monoterpenoides acíclicos y monoterpenoides tipo mentano fueron los más abundantes en los aceites esenciales procedentes de las hojas y pueden ser los responsables de la actividad antioxidante (Setzer et al., 2005). Esta teórica la podremos demostrar hasta llevar a cabo el análisis de la composición química del aceite esencial mediante Cromatografía de gases-Masas, como lo indique en la sección anterior.

En el caso de la capacidad antioxidante de *P. americana* (138.65 ± 1.15 mg/mL) y *P. standleyi* (171.32 ± 1.18 mg/mL) se puede considerar moderada si lo comparamos con los estándares utilizados, por otro parte, la capacidad antioxidante de *O. veraguensis* (310.25 ± 1.8 mg/mL) es débil (ver Tabla 14).

i) Actividad antimicrobiana en aceites esenciales

La actividad antimicrobiana en aceites esenciales, es ampliamente ensayada, debido a los buenos resultados obtenidos frente a diferentes microorganismos patógenos, ahora bien, cada vez se ha observado resistencia por parte de las cepas ensayadas, por lo que es muy importante, continuar ensayándolos.

A continuación, se presenta la metodología microbiológica de Kirby-Bauer (con sus ensayos de estandarización en el aceite esencial proveniente de las hojas de “Limón”, *Citrus x aurantifolia*) que se utilizarán, tanto en los **aceites esenciales de las especies seleccionadas, como en los aceites esenciales de las especies que se utilizarán para la fabricación de fitocosméticos** (Apartado III).

Los ensayos microbiológicos para algunas especies aromáticas seleccionadas como las especies aromáticas que se utilizaran para la fabricación de fitofármacos no se han concluido, y por el momento se presentan algunos resultados preliminares interesantes.

Estandarización de bacterias

Las bacterias utilizadas en el estudio fueron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

Preparación de la suspensión madre de microorganismo para estandarización.

- Se prepararon tubos con 9 ml de solución salina (ss) y tubos con 18 ml de ss.
- De un tubo de 9 ml de ss, se extrajo 5 ml y se vertió de forma uniforme en la placa previamente inoculada con la bacteria, de modo de cubrir toda la placa con la ss.
- Se raspó el crecimiento microbiano, con la ayuda de un asa esterilizada, hasta formar una suspensión de cada una de las bacterias en estudio.
- Se extrajo la suspensión con una jeringa estéril y se colocó en un tubo estéril.
- Se transfirió 1 ml de la suspensión madre del microorganismo a un tubo con 9 mL de SS. Esto se convertirá en una suspensión estandarizada.

Determinación de absorbancia de la suspensión estandarizada de cada microorganismo.



- Se extrajo 1-2 ml de la suspensión anterior y se transfirió a una celda de lectura del espectrofotómetro UV-Vis.
- Se midió la absorbancia de cada suspensión a 620 nm. Ajustar la absorbancia de cada suspensión a 0.3-0.4 para bacterias Gram (+) ó 0.2-0.3 para bacterias Gram (-).
- El blanco utilizado fue la solución salina.

Preparación de las diluciones de suspensión estandarizada de microorganismos.

- Se hicieron las diluciones necesarias de la suspensión estandarizada, tomando 1 mL de la suspensión anterior y colocándolo en 9 mL de solución salina. Se repitió este procedimiento hasta obtener conteos bacterianos entre 25-250 UFC/placa.
- Se transfirió 1 ml de las últimas tres diluciones a una placa vacía respectivamente rotulados.
- Se vertió el agar Plate Count en la placa que contenía el mililitro de la suspensión bacteriana, y se homogeneizó el contenido de la placa.
- Las placas se incubaron a 35 - 37 °C durante 24 horas. Luego del período de incubación, se realizaron los conteos respectivos.

Método Kirby- Bauer

El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas, en este caso ocupamos aceite esencial a diferentes concentraciones diluido con DMSO al 10%, específicamente el aceite esencial de las hojas de “Limón” frente las bacterias antes mencionadas.

Preparación del DMSO al 10%

Se diluyó 1 ml de DMSO en 9 ml de ss con ayuda de una micropipeta de 1 ml, para obtener 10 ml de DMSO al 10%, que ocuparemos para hacer las diluciones de las concentraciones del aceite esencial.

Preparación de las concentraciones

- Se pesó 40mg del aceite esencial y diluir en 5 mL de DMSO al 10%, esta era nuestra solución inicial para preparar 2ml de las diferentes concentraciones:
- C1: 4,000 µg/mL
- Se transfirió de la solución inicial 750µL a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
 - Agregaron 1,250µL de DMSO al 10%.
 - Se homogeneizó y rotuló como “C1”.

C2: 3,000 µg/mL

- Se transfirió 1,666µL de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregaron 334µL de DMSO al 10%.
- Se homogeneizó y rotuló como “C2”.

C3: 2,000 µg/mL

- Se transfirió 1,600µL de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregaron 400µL de DMSO al 10%.
- Se homogeneizó y rotuló como “C3”.



C4: 1,000 µg/mL

- Se transfirió 1000µL de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregaron 1000µL de DMSO al 10%.
- Se homogeneizó y rotuló como “C4”.

Discos de sensibilidad a utilizar según bacteria seleccionada

Staphylococcus aureus: Ciprofloxacina y Vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa*: Ciprofloxacina y Norfloxacina; *Salmonella enterica*: Ciprofloxacina y Trimetoprim Sulfametoxazol y para *Escherichia coli*: Amikacina y Cefadroxilo.

Preparación del medio de cultivo: agar Müller Hinton

- Se pesó 17 g de agar Müller Hinton
- Se diluyó en 500 ml de agua destilada, se calentó y agitó hasta que el medio empezó a ebullición.
- Se enfrió y esterilizó en la autoclave por 2 horas y media.
- Se repitió el procedimiento para preparar 2 frascos de 500ml.

Preparación de las placas

- Se vertió la cantidad de 20 ml aproximadamente sobre 30 placas medianas donde se realizaron las pruebas.
- Se solidificó y rotuló con el nombre del medio y la fecha.

Preparación de frascos de 50 ml de agar Müller Hinton

Estos frascos se utilizarán para la inoculación de cada bacteria seleccionada.

- Se pesó 1.7g del agar Müller Hinton.
- Se diluyó en 50 ml de agua destilada en un frasco de vidrio limpio, seco y esterilizado, luego se calentó y agitó hasta ebullición.
- Se enfrió y se puso en autoclave por 2 horas y media.
- Se colocó en baño maría a 42-46 °C.

Desarrollo del método Kirby-Bauer

Nota: Todo el procedimiento se debe realizar en un ambiente estéril.

Se utilizarán 7 placas por cada microorganismo:

- 1 placa como control (+): donde se colocaron los discos de sensibilidad de antibióticos según la bacteria.
- 1 placa como control (-): donde se colocaron solo el DMSO al 10% en los micropocillos
- 4 placas con las concentraciones: C1, C2, C3 y C4
- 1 placa solo con el microorganismo para monitorear el crecimiento de este.

Preparación de las placas con microorganismos

- Se transfirió a un tubo con solución salina de 9 ml, 1 ml del estándar de microorganismos de 10⁹ UFC/ml, se agitó y homogeneizó.
- Se tomó 0.03ml equivalentes a 30µL de la solución anterior y se transfirió al frasco de 50 ml del agar Müller Hinton.
- Se homogeneizó y con la ayuda de una micropipeta, se vertió 4 mL sobre una placa previamente preparada de 20 ml de agar Müller Hinton.
- Se agitó a modo de cubrir toda la placa con el microorganismo y dejó solidificar.



- Se repitió el procedimiento para las 7 placas de cada bacteria. Una de las 7 placas de cada bacteria se utilizó únicamente para monitorear el crecimiento de bacterias.
- Luego de que solidifican, con ayuda de unos horadores previamente limpios, secos y esterilizados, se realizó 3 pocillos en 5 placas de cada microorganismo.

Nota: Siempre descartar las puntas para cada microorganismo.

Preparación de la placa Control (+)

- Se tomó una placa previamente inoculada con los 4 ml de microorganismos ya solidificada sin pocillos y se colocó 1 disco de sensibilidad de cada antibiótico según corresponda la bacteria, no debe colocarlo muy cerca del borde de la placa ni estar muy juntas entre ellas para poder distinguir el diámetro de cada halo después de las 24 horas de inoculación.

Preparación de la placa Control (-)

- Se tomó una de las placas que tienen pocillos y se colocó, dentro de cada pocillo, 6 gotas de DMSO al 10% y se dejó en reposo.

Preparación de las placas según concentraciones de aceite esencial

- Se tomó una de las placas con pocillos, para la primera concentración y se rotuló como “C1”, con la ayuda de una micropipeta, se colocaron 6 gotas de la concentración 1 de aceite esencial en cada pocillo y se dejó reposar.
- Se repitió el procedimiento para la concentración 2, 3 y 4.
- Se llevaron las 28 placas a la incubadora por 24 horas.

Resultados esperados

- Se observan los halos formados alrededor de cada pocillo donde se colocó el aceite esencial y los halos de cada antibiótico que se utilizó como referencia, pasado el tiempo requerido para la lectura.

Nota: *Un antibiótico susceptible debe ser mayor a 16 mm de diámetro, un antibiótico susceptible intermedio debe ser entre 12 mm y 15 mm de diámetro, debajo de estos rangos la bacteria es resistente al antibiótico o sustancia antimicrobiana.*

j) Resultados y discusión de resultados

Controles positivos frente a Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica y Escherichia coli.

Se utilizaron controles positivos, es decir, antibióticos que inhiben las bacterias seleccionadas para comparar los resultados del aceite con el que se estaba llevando a cabo la actividad antimicrobiana, estos controles positivos se observaron en placas rotuladas como “C(+)” (ver Figura 11). donde se colocaron discos de sensibilidad del antibiótico según la bacteria. A continuación, se muestran los halos formados por los antibióticos como controles positivos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (ver Figura 11).

Los antibióticos utilizados como controles positivos fueron:

- Ciprofloxacina y Norfloxacina (*Pseudomonas aeruginosa*)



- Vancomicina y Ciprofloxacina (*Staphylococcus aureus*)
- Trimetoprim sulfametoxazol y Ciprofloxacina (*Salmonella entérica*)
- Amikacina y Ceftriaxona (*Escherichia coli*)



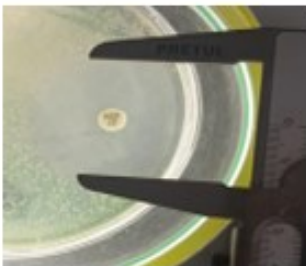
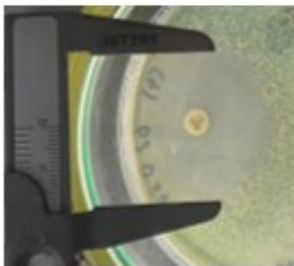
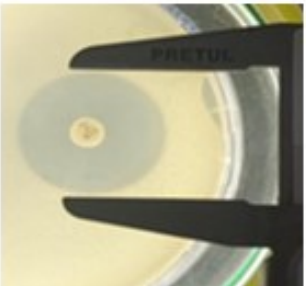

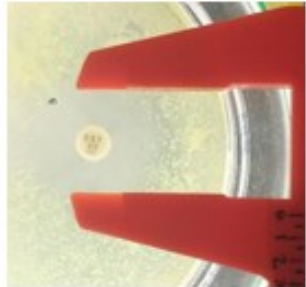
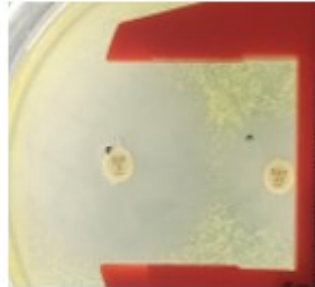
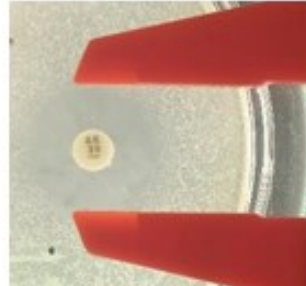
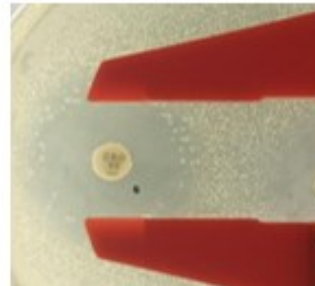
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
 <p>C5 Halo de Norfloxacina: 3.3 cm de diámetro</p>	 <p>C5 Halo de Ciprofloxacina: 3.6 cm de diámetro</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
 <p>C5 Halo de Ciprofloxacina: 2.8 cm de diámetro</p>	 <p>C5 Halo de Vancomicina: 1.8 cm de diámetro</p>
<i>Salmonella enterica</i>	
 <p>C5 Halo de Trimetoprim sulfametoxazol: 1.8 cm de diámetro</p>	 <p>C5 Halo de Ciprofloxacina: 3.7 cm de diámetro</p>
<i>Escherichia coli</i>	
 <p>C5 Halo de Amikacina: 1.9 cm de diámetro</p>	 <p>C5 Halo de Ceftriaxona: 1.8 cm de diámetro</p>

Fig 11. Controles positivos para ensayo microbiológico del aceite de “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

Como se puede observar en la Figura 11, los halos formados por estos discos, detallan el tamaño del diámetro que se formó, así, frente a *Pseudomonas aeruginosa*, el antibiótico más eficaz fue Ciprofloxacina, con un halo de inhibición de 3.6 cm de diámetro y para Norfloxacina el halo de inhibición fue de 3.3 cm de diámetro. Frente a *Staphylococcus aureus*, el antibiótico más eficaz fue Ciprofloxacina con un halo de inhibición de 2.8 cm de diámetro y en menor grado fue Vancomicina con un diámetro de halo de 1.8 cm de diámetro.

También se observar (Figura 11) que el antibiótico más eficaz contra *Salmonella enterica* fue Ciprofloxacina, con un halo de inhibición de 3.7 cm de diámetro y para Trimetoprim sulfametoxazol fue un halo de 1.8 cm de diámetro.

Por último, los antibióticos ensayados frente a *Escherichia coli* fueron Amikacina, el cual formó el mayor halo de inhibición con 1.9 cm de diámetro y Ceftriaxona con un halo de inhibición de 1.8cm de diámetro, respectivamente.

Primer ensayo del aceite de “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Este se realizó frente a *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria Gram (-) y *Staphylococcus aureus* bacteria Gram (+) (ver Figura 11).

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron las siguientes:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 1000 µg/mL
- 500 µg/mL
- 250 µg/mL
- 125 µg/mL

El aceite esencial se diluyó con solución de DMSO 10%, y se colocaron en los pocillos sobre el medio de cultivo, en la placa de Petri “C1” (ver Figura 12). Esta placa contiene la dilución con la concentración más alta de aceite esencial, luego las placas “C2” hasta “C4” (ver Figura 12), poseen las otras diluciones de aceite esencial de mayor a menor concentración. La placa de control negativo “C (-)” (ver Figura 12), sólo contenía DMSO 10%, el cual no posee capacidad antimicrobiana a la concentración utilizada en el ensayo (ver Figura 12).

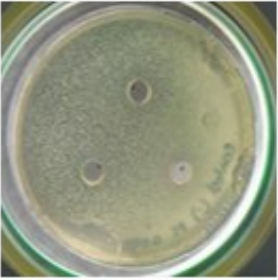
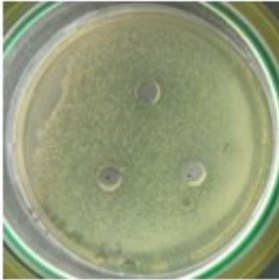
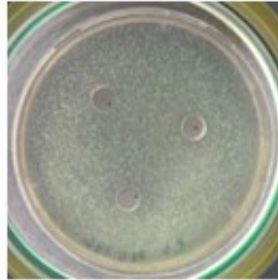
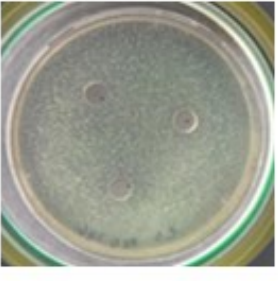
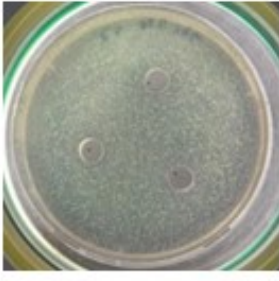
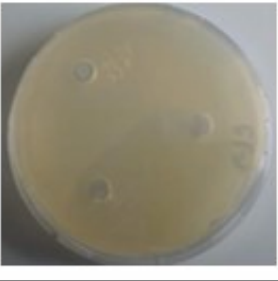



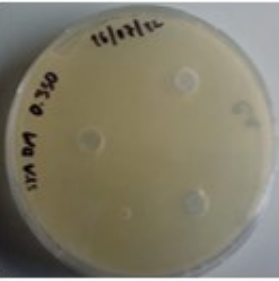
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		
C (-)	C1	C2
		Observaciones: No presenta halos en ninguna concentración de aceite esencial
C3	C4	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
		
C(-)	C1	C2
		Observaciones: No presenta halos en ninguna concentración de aceite esencial
C3	C4	

Fig 12. Primer ensayo microbiológico del aceite de “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

En el primer ensayo se observó que el aceite esencial de “Limón” no presenta formación de halos de inhibición frente a los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, esto implica que las concentraciones del aceite esencial en estas diluciones son ineficaces como agentes antimicrobianas.

Segundo ensayo del aceite esencial de “Limón” frente a Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus, Salmonella enterica y Escherichia coli

Este se realizó ensayando aceite esencial “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ver Figura 13), el cual se realizó con concentraciones más altas y con dos microorganismos más, siguiendo el procedimiento del primer ensayo.

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 3000 µg/mL
- 2500 µg/mL
- 2000 µg/mL
- 1000 µg/mL

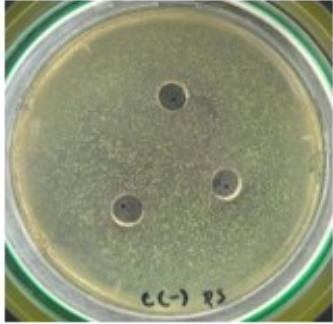
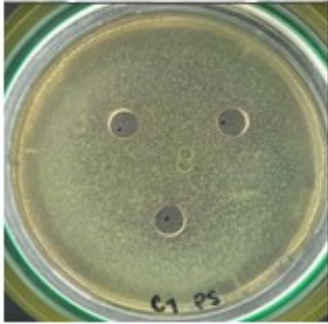
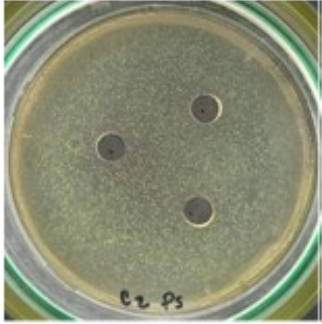
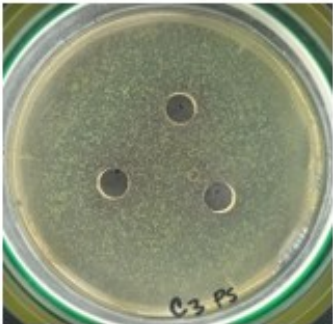
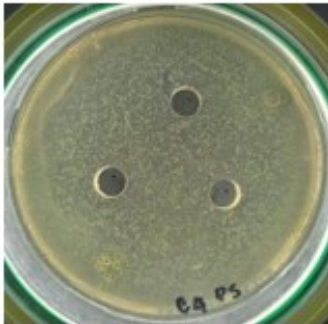
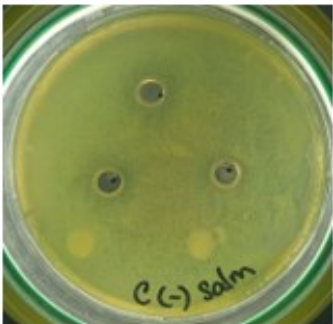
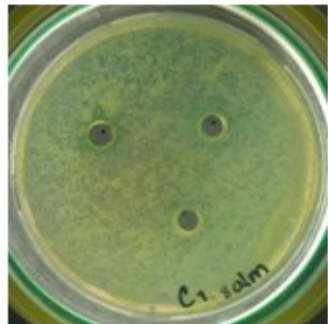
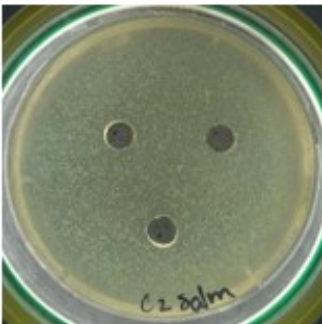
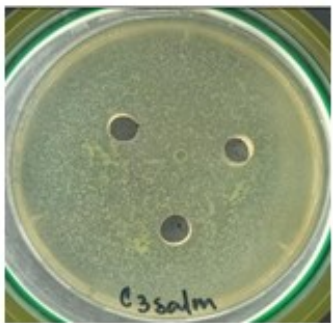
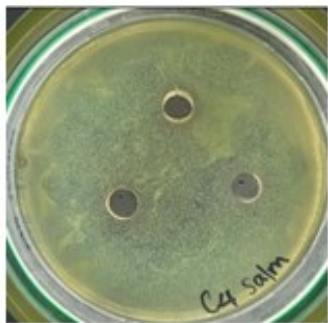
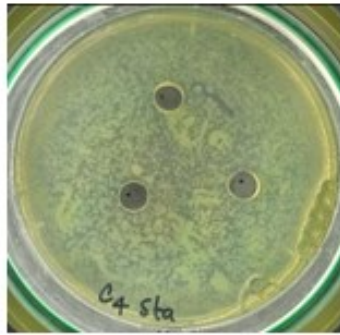
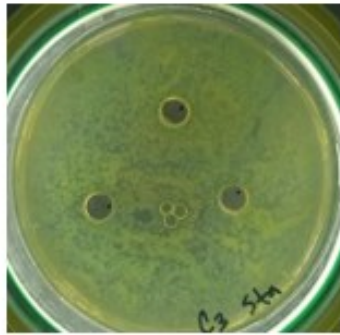
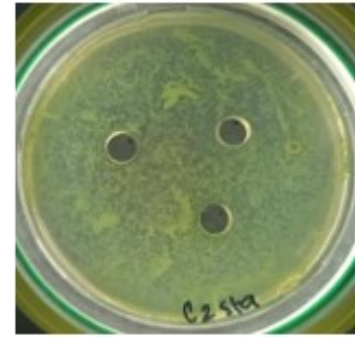
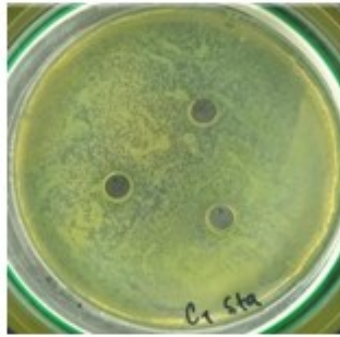
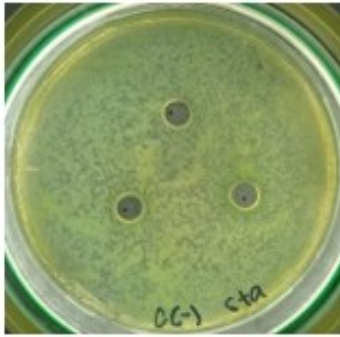
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		
		Observaciones: No presenta halos en ninguna concentración de aceite esencial
<i>Salmonella enterica</i>		
		
		Observaciones: Presenta halos pequeños de 0.8 cm de diámetro en la concentración C1 de 3000 µg/ml de aceite esencial en dos de los micropocillos realizados.

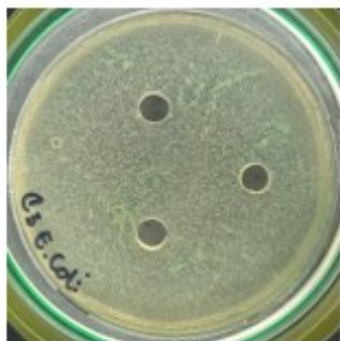
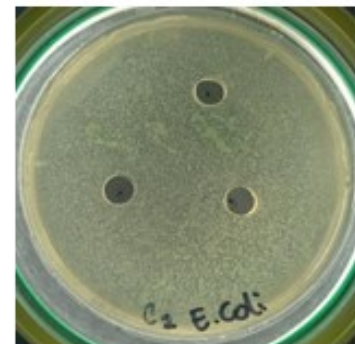
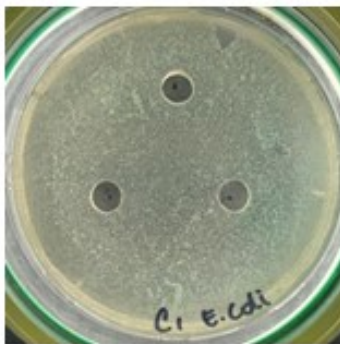
Fig 13. Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus



Observaciones: Presenta halos 0.7 cm pequeños en la concentración C1 de 3000 $\mu\text{g/ml}$ de aceite esencial en uno de los micropocillos realizados.

Escherichia coli



Observaciones: No presenta halos en ninguna concentración de aceite esencial

Fig 13. Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de “Limón” frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

Según los resultados presentados en la figura anterior, el aceite esencial de “Limón”, no presentó inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a las concentraciones ensayadas.

Por otro lado, al ensayar el aceite esencial de “Limón” a la concentración de 3000 mg/ml frente a *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, presentó halos pequeños de inhibición de 0.8 cm y 0.7 cm respectivamente, sin embargo, no determina con certeza que el aceite tenga la capacidad antimicrobiana.

Primer ensayo del aceite esencial de la hoja de *Ocotea veraguensis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Este se realizó frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bacterias Gram (-) y *Staphylococcus aureus* bacteria Gram (+).

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron las siguientes:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 125 µg/mL
- 100 µg/mL
- 75 µg/mL
- 50 µg/mL
- 25 µg/mL

El aceite esencial se diluyó con solución de DMSO 10%, y se colocaron en los pocillos sobre el medio de cultivo, en la placa de Petri “C1”. Esta placa contiene la dilución con la concentración más alta de aceite esencial, luego las placas “C2” hasta “C5”, poseen las otras diluciones de aceite esencial de mayor a menor concentración. La placa de control negativo “C (-)”, sólo contenía DMSO 10%, el cual no posee capacidad antimicrobiana a la concentración utilizada en el ensayo.

En el primer ensayo se observó que el aceite esencial de la hoja de *O. veraguensis* no presenta formación de halos de inhibición frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, esto implica que las concentraciones del aceite esencial en estas diluciones son ineficaces como agentes antimicrobianas.

Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de *Ocotea veraguensis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Este se realizó ensayando aceite esencial de la hoja de *O. veraguensis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó con concentraciones más altas, siguiendo el procedimiento del primer ensayo.

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 5000 µg/mL
- 4000 µg/mL

- 3000 µg/mL
- 2000 µg/mL
- 1000 µg/mL

Según los resultados obtenidos, el aceite esencial de la hoja de *O. veraguensis*, no presentó formación de halos de inhibición frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a las concentraciones ensayadas, lo cual indica que el aceite esencial a estas concentraciones no presenta actividad antimicrobiana.

Primer ensayo del aceite esencial de la hoja de Piper standleyi frente a Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica y Staphylococcus aureus.

Este se realizó frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica*, bacterias Gram (-) y *Staphylococcus aureus* bacteria Gram (+).

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron las siguientes:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 125 µg/mL
- 100 µg/mL
- 75 µg/mL
- 50 µg/mL
- 25 µg/mL

El aceite esencial se diluyó con solución de DMSO 10%, y se colocaron en los pocillos sobre el medio de cultivo, en la placa de Petri “C1”. Esta placa contiene la dilución con la concentración más alta de aceite esencial, luego las placas “C2” hasta “C5”, poseen las otras diluciones de aceite esencial de mayor a menor concentración. La placa de control negativo “C (-)”, sólo contenía DMSO 10%, el cual no posee capacidad antimicrobiana a la concentración utilizada en el ensayo.

En el primer ensayo se observó que el aceite esencial de la hoja de *P. standleyi* no presenta formación de halos de inhibición frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, esto implica que las concentraciones del aceite esencial en estas diluciones son ineficaces como agentes antimicrobianas.

Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de Piper standleyi frente a Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica y Staphylococcus aureus.

Este se realizó ensayando aceite esencial de la hoja de *P. standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó con concentraciones más altas, siguiendo el procedimiento del primer ensayo.

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 5000 µg/mL
- 4000 µg/mL
- 3000 µg/mL
- 2000 µg/mL

- 1000 µg/mL



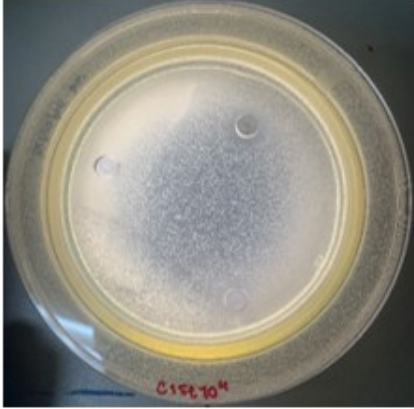
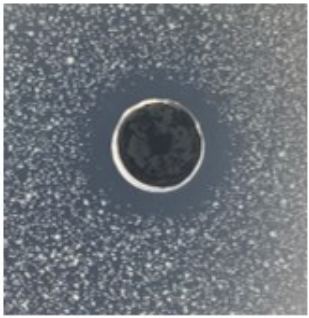
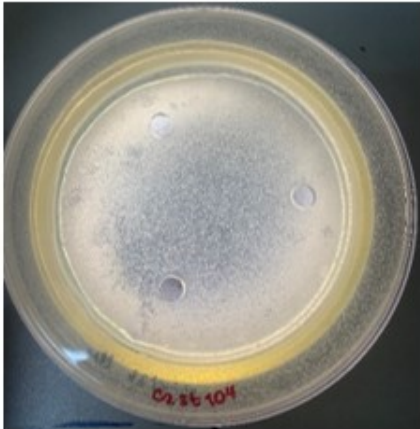
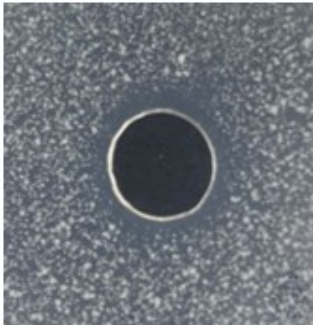
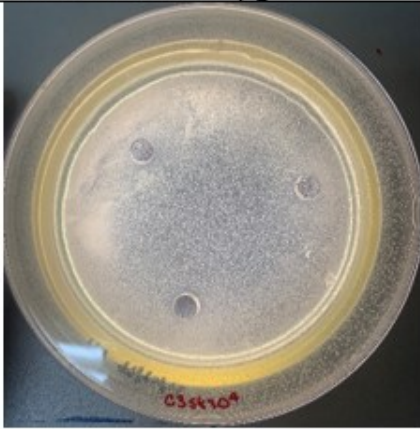

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Concentración 1: 5000 µg/mL	Halo: 12.6 mm
	
Concentración 2: 4000 µg/mL	Halo: 11.15 mm
	
Concentración 3: 3000 µg/mL	Halo: 11.1 mm
	

Fig 14. Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de hoja de *Ocotea veraguensis* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

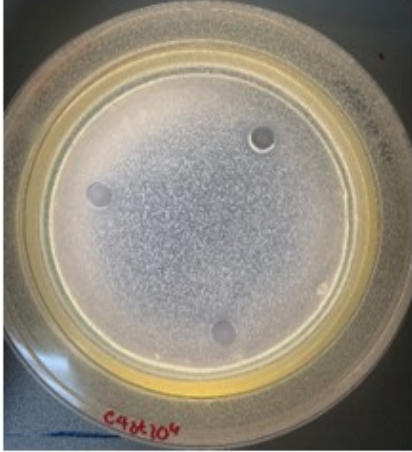

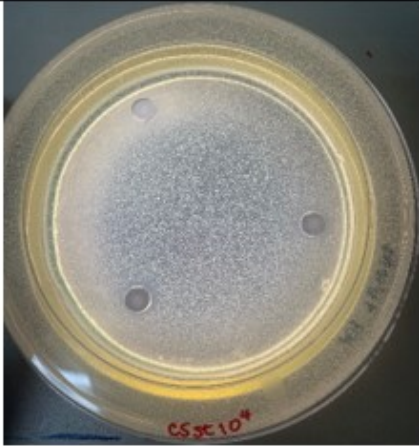

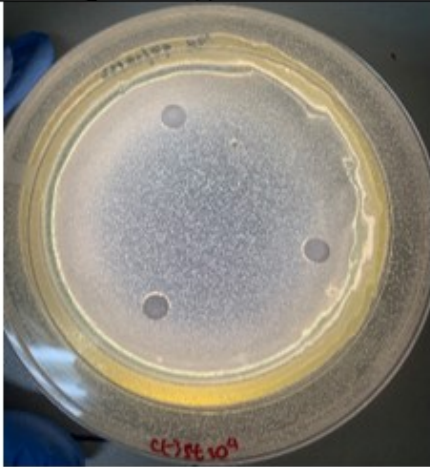

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Concentración 4: 2000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 11.05 mm
	
Concentración 2: 1000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 10.1 mm
	
Control Negativo C(-): DMSO 10%	Halo: No hay formación
	

Fig 14. Segundo ensayo microbiológico del aceite esencial de hoja de *Ocotea veraguensis* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*

Según los resultados obtenidos, el aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi*, no presentó formación de halos de inhibición frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* a las concentraciones ensayadas, lo cual indica que el aceite esencial a estas concentraciones y con estas bacterias no presenta actividad antimicrobiana.

Por otro lado, *P. standleyi* presentó formación de halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo, el tamaño del diámetro del halo no es suficiente para afirmar que la bacteria es sensible a este aceite esencial.

Cabe mencionar que, se realizarán pruebas a concentraciones más altas para determinar si hay alguna sensibilidad significativa como antimicrobiano.

Primer ensayo del aceite esencial de la hoja de Zanthoxylum culantrilo frente a Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica y Staphylococcus aureus.

Este se realizó frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, bacterias Gram (-) y *Staphylococcus aureus* bacteria Gram (+).

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron las siguientes:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 125 µg/mL
- 100 µg/mL
- 75 µg/mL
- 50 µg/mL
- 25 µg/mL

El aceite esencial se diluyó con solución de DMSO 10%, y se colocaron en los pocillos sobre el medio de cultivo, en la placa de Petri “C1”. Esta placa contiene la dilución con la concentración más alta de aceite esencial, luego las placas “C2” hasta “C5”, poseen las otras diluciones de aceite esencial de mayor a menor concentración. La placa de control negativo “C (-)”, sólo contenía DMSO 10%, el cual no posee capacidad antimicrobiana a la concentración utilizada en el ensayo.

En el primer ensayo se observó que el aceite esencial de la hoja de *Z. culantrilo* no presenta formación de halos de inhibición frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, esto implica que las concentraciones del aceite esencial en estas diluciones son ineficaces como agentes antimicrobianas.

Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de Zanthoxylum culantrilo frente a Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica y Staphylococcus aureus.

Este se realizó ensayando aceite esencial de la hoja de *O. veraguensis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó con concentraciones más altas, siguiendo el procedimiento del primer ensayo.

Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron:

- Control negativo solución de DMSO 10%

- 5000 µg/mL
- 4000 µg/mL
- 3000 µg/mL
- 2000 µg/mL
- 1000 µg/mL

Según los resultados obtenidos, el aceite esencial de la hoja de *Z. culantrilo*, no presentó formación de halos de inhibición frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* a las concentraciones ensayadas, lo cual indica que el aceite esencial a estas concentraciones no presenta actividad antimicrobiana.

Por otra parte, el aceite esencial *P. americana*, no presentó halos de inhibición frente a ninguno de los microorganismos ensayados, lo que indica que el aceite esencial no se puede considerar como un agente antimicrobiano.

Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. americana*, demostraron que el aceite esencial posee actividad antimicrobiana a concentraciones superiores a 900,000 µg/mL, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Araujo, et al., 2010)

k) Conclusiones

Se llevaron a cabo 8 viajes de bioprospección entre los meses de febrero a octubre a tres áreas naturales del Departamento de Sonsonate (Finca San Jorge, San Julián y La Golondrinería, Nahuizalco) y a tres áreas naturales del Departamento de Ahuachapán (Laguna Verde y Laguna Las Ninfas en Apaneca y Finca Esperanza de San Francisco en Jujutla). De estos viajes se identificaron 143 especies vegetales, de las cuales se enlistaron 18 especies aromáticas, principalmente de las familias Lauraceae, Lamiaceae, Piperaceae y Verbenaceae. En base a un análisis bibliográfico, disposición de material vegetal, capacidad de desarrollo experimental en el LIPN, etc., se seleccionaron cinco especies vegetales aromáticas para llevar a cabo la extracción, cuantificación de aceites esenciales, determinación de la capacidad antioxidante y microbiológica, y son: *Piper standleyi* Piperaceae, *Ocotea veraguensis* Lauraceae, *Nectandra martinicensis* Lauraceae, *Persea americana* Lauraceae y *Zanthoxylum culantrilo* Rutaceae. En el caso de *P. standleyi* y *Z. culantrilo*, es la primera vez que se lleva a cabo estudios fitoquímicos y biológicos.

Por otra parte, los rendimientos de la extracción de los aceites esenciales de *P. standleyi*, *O. veraguensis*, *Z. culantrilo* y *P. americana*, se encuentran dentro del promedio que presentan los aceites esenciales en las especies vegetales aromáticas (0.1 a 1%), destacándose *P. americana*, ya que posee un mayor rendimiento de obtención, con una relación de 50 veces más que los otros aceites esenciales obtenidos. El caso de *N. martinicensis*, es peculiar, ya que no se observó la presencia de aceites esenciales.

En cuanto al análisis de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales, se observó que el aceite esencial de *Z. culantrilo*, mostró la mayor actividad captadora de radicales libre en comparación con las otras especies aromáticas analizadas, e incluso mayor capacidad antioxidante que los estándares de referencia, Trolox y ácido ascórbico, respectivamente.

Será interesante llevar a cabo el análisis de la composición química del aceite esencial de *Z. culantrilo*, mediante Cromatografía de gases-Masas, como de los otros aceites esenciales, para determinar la composición química de los mismos, y así relacionarlos con los resultados obtenidos.

De los cuatro aceites esenciales ensayados, *O. veraguensis*, *Z. culantrilo*, *P. americana* y *P. standleyi*, frente a bacterias Gram (-) y Gram (+), solo el aceite esencial de *P. standleyi*, presentó susceptibilidad frente a *Staphylococcus aureus* un microorganismo gram positivo, importante en las



infecciones nosocomiales en pacientes con estancia hospitalaria prolongada, cirugía reciente, requerimiento de diálisis o presencia de dispositivos médicos invasivos.

PARTE III: EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AROMÁTICAS PARA LA FABRICACIÓN DE FITOCOSMÉTICOS

a) Recolección y extracción de especies aromáticas para la fabricación de fitocosméticos

La selección de las especies vegetales aromáticas para la fabricación de fitocosméticos, fue consensuada a través de las reuniones que llevaron a cabo con la Dra. Ilaria Bruni del Departamento de Biotecnología y Biociencia de la Universidad de Milano-Bicocca, Italia como con el Lic. Moisés A. Guerra del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Así, se seleccionaron las hojas de “Limón” (*Citrus x aurantifolia*, Rutaceae), hojas de “Ciprés” (*Cupressus lusitanica*, Cupressaceae), hojas de Romero (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae), hojas de “Eucalipto” (*Eucalyptus citriodora*, Myrtaceae) y rizoma de “Jengibre” (*Zingiber officinale*, Zingiberaceae) ver Figura 15.





Fig. 15. Especies vegetales aromáticas recolectadas en la Finca Quinta Marisol, Coatepeque, Santa Ana.

Estas especies vegetales fueron recolectadas en 13 viajes realizados a la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana (Figura 16), según la Tabla 15.



Fig. 16 Viajes de recolección de especies vegetales aromáticas utilizadas en la fabricación de fitocosméticos.

Tabla 15. Viajes de recolección de especies aromáticas a la Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Coatepeque, Santa Ana.

Espece vegetal/Parte de la planta	Fecha de recolección	GPS/Altitud
<i>Citrus x aurantifolia</i> “Limón”/Hojas	7, 11, 13 y 19 de julio	13°55.10'526"N, 89°31.7'641"W/804 msnm
<i>Cupressus lusitanica</i> “Ciprés”/Hojas	21, 25, 27, 29 de julio	13°55.11'53"N, 89°31.6'077"W/826 msnm
<i>Rosmarinus officinalis</i> “Romero”/Hojas	9 y 11 de agosto	13°55.10'526"N, 89°31.7'641"W/804 msnm
<i>Eucalyptus citriodora</i> “Eucalipto”/Hojas	16 de agosto	13°55.11'457"N, 89°31.7'326"W/803 msnm
<i>Zingiber officinale</i> “Jengibre”/Rizoma	23 de agosto y 5 de septiembre	13°55.10'526"N, 89°31.7'641"W/804 msnm

Las especies vegetales fueron recolectadas y trasladadas al LIPN-FQF-UES, para llevar a cabo la extracción y cuantificación de los aceites esenciales por medio del método Clevenger. Posteriormente, los aceites esenciales obtenidos serán sometidos a la determinación de la actividad antioxidante y microbiológica, además se le suministrarán los aceites esenciales al Laboratorio de

Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia para la fabricación de fitocosméticos a microescala.

b) Cuantificación de los aceites esenciales por medio del Método Clevenger

Para la extracción y cuantificación de los aceites esenciales por medio del método Clevenger se siguió la metodología de la parte II.3.y Figura 9 (pág. 30).

Así, las especies aromáticas se trasladaron en neveras a las instalaciones del LIPN-FQF-UES, donde se procedió a separar las hojas de las ramitas (ver Figura 17), excepto en *Z. officinale* (que fue rizoma). De acuerdo a los constantes procedimientos experimentales llevados a cabo en la preparación de las muestras, estas toman aproximadamente 2 horas, utilizando tres analistas para dicha operación.

Luego de fraccionar las hojas de las especies aromáticas (con tijeras) se procedió al llenado y pesado de las especies en balones de vidrio, donde se efectuaron tanto la extracción de aceites esenciales como la determinación del rendimiento por medio del método Clevenger.



Fig 17. Fraccionamiento de especies vegetales para extracción de aceites esenciales.

El promedio del rendimiento de aceites esenciales en las especies aromáticas que se utilizara para la preparación de fitocosméticos fue entre 0.05 a 0.85%, ver Tabla 16.

Los aceites esenciales con más bajo rendimiento fueron *Z. officinale* (0.05%) y *C. lusitanica* (0.09%), en el caso de *C. aurantifolia* (0.27%) y *R. officinalis* (0.29%) tuvieron un rendimiento casi idéntico, y la especie vegetal con mayor rendimiento fue *E. citriodora* (0.85%), ver Tabla 16.

Tabla 16. Rendimiento de aceites esenciales por medio del Método Clevenger.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Órgano	Rendimiento %v/m (mL/g)
<i>Citrus x aurantifolia</i>	"Limón"	Rutaceae	Hojas	0.27 +/- 0.027
<i>Cupressus lusitanica</i>	"Ciprés"	Cupressaceae	Hojas	0.09 +/- 0.021

<i>Rosmarinus officinalis</i>	"Romero"	Lamiaceae	Hojas	0.29 +/- 0.022
<i>Eucalyptus citriodora</i>	"Eucalipto"	Myrtaceae	Hojas	0.85 +/- 0.029
<i>Zingiber officinale</i>	"Jengibre"	Zingiberaceae	Rizoma	0.05 +/- 0.001

El rendimiento de los aceites esenciales obtenido fue menor que los reportados en otros estudios llevados a cabo, como se resume en la Tabla 17. Esto se puede deber al sitio de recolección, altura del cultivo, clima, interacción con otras especies vegetales, etc. Ahora bien, los rendimientos obtenidos en esta investigación, están dentro de los límites promedio para aceites esenciales.

Tabla 17. Comparación de rendimientos obtenidos y rendimientos de estudios de otras investigaciones utilizando el método de hidrodestilación usando el aparato Clevenger.

Nombre (científico)	Rendimiento obtenido % v/m (mL/g)	Rendimientos comparativos % v/m (mL/g)	Órganos	Referencia
<i>Citrus x aurantifolia</i>	0.27 +/- 0.027	0.61	Hojas	Tchameni et al., 2018
		0.40	Hojas	Miller, 2010
<i>Cupressus lusitanica</i>	0.09 +/- 0.021	0.27 +/- 0.02 0.34 +/- 0.02 0.39 +/- 0.01	Hojas	Nteziyaremye et al., 2021
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0.29 +/- 0.022	1.35 +/- 0.04	Hojas	Elyemni et al., 2019
<i>Eucalyptus citriodora</i>	0.85 +/- 0.029	1.2	Hojas	Singh et al., 2012
		2.10	Hojas	Manh et al., 2020
<i>Zingiber officinale</i>	0.05 +/- 0.001	0.14 y 0.2	Rizoma	Al-Dhahli et al., 2020
		0.28 - 0.34	Rizoma	Poudel et al., 2022
		1.2 - 1.5	Rizoma	Gunasena et al., 2022

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de aceites esenciales en mL por material vegetal fresco en kilogramos, varió entre 0.3-7.4 mL. Siendo el rendimiento más bajo para el aceite esencial de los rizomas de *Zingiber officinale* y el mayor para las hojas de *Eucalyptus citriodora* (ver Tabla 18).

Los datos expuestos en la Tabla 18, son importantes para el coste de la formulación que se están llevando a cabo en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

Tabla 18. Cantidad de aceite esencial extraído en 1 Kg muestra de especies vegetales.

Nombre científico	Aceite esencial extraído (mL)
<i>Citrus x aurantifolia</i>	2.24
<i>Cupressus lusitanica</i>	0.47
<i>Rosmarinus officinalis</i>	4.24
<i>Eucalyptus citriodora</i>	7.40
<i>Zingiber officinale</i>	0.30

c) Actividad antioxidante de los aceites esenciales

La determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales, se llevó a cabo según la metodología expuesta en el apartado II pág. 31 y Fig. 10 (pág. 34).

Así, se estimaron las actividades antioxidantes de *C. aurantifolia*, *R. officinalis*, *E. citriodora*, *C. lusitanica* y *Z. officinale* (ver Tabla 19 y Figura 18).

Tabla 19. Actividad antioxidante de *Citrus x aurantifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus citriodora*, *Cupressus lusitanica* y *Zingiber officinale*.

Aceite esencial	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Citrus x aurantifolia</i> “Limón”	175.44 ± 0.82
<i>Rosmarinus officinalis</i> “Romero”	113.50 ± 11.70
<i>Eucalyptus citriodora</i> “Eucalipto”	40.08 ± 1.60
<i>Cupressus lusitanica</i> “Ciprés”	194.73 ± 0.50
<i>Zingiber officinale</i> “Jengibre”	99.19 ± 4.50
Trolox	68.70 ± 0.70
Ácido ascórbico	54.2 ± 1.20

Los valores de actividad antioxidante se expresaron en (IC_{50}), esto significa la concentración de un antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%, así, que cuanto menor sea el IC_{50} , mayor es la actividad antioxidante (Atoui et al., 2005).

En el análisis de capacidad antioxidante de los aceites esenciales extraídos (Ver Tabla 19), se observó que el aceite esencial de *E. citriodora*, mostró la mayor actividad captadora de radicales libre con un IC_{50} de 40.08 ± 1.60 mg/mL, en comparación con las otras especies aromáticas analizadas, e incluso, se observó mayor capacidad antioxidante que los estándares de referencia (Trolox = 68.7 ± 0.7 mg/mL y ácido ascórbico = 54.2 ± 1.2 mg/mL, respectivamente).

En el caso de la capacidad antioxidante de *Z. officinale* (99.19 ± 4.50 mg/mL) se puede considerar moderada, si la comparamos con los estándares utilizados, por otro parte, la capacidad antioxidante de *R. officinalis* (310.25 ± 1.8 mg/mL), *C. aurantifolia* (175.44 ± 0.82 mg/mL) y *C. lusitanica* (194.73 ± 0.50 mg/mL) se consideran débiles (ver Tabla 19).

Cuando se obtengan los resultados de la determinación de la actividad microbiológica de los aceites esenciales de las cinco especies vegetales, se llevará a cabo un análisis de la recopilación de resultados bibliográficos sobre composición química de los mismos vs los resultados microbiológico obtenidos en esta investigación.

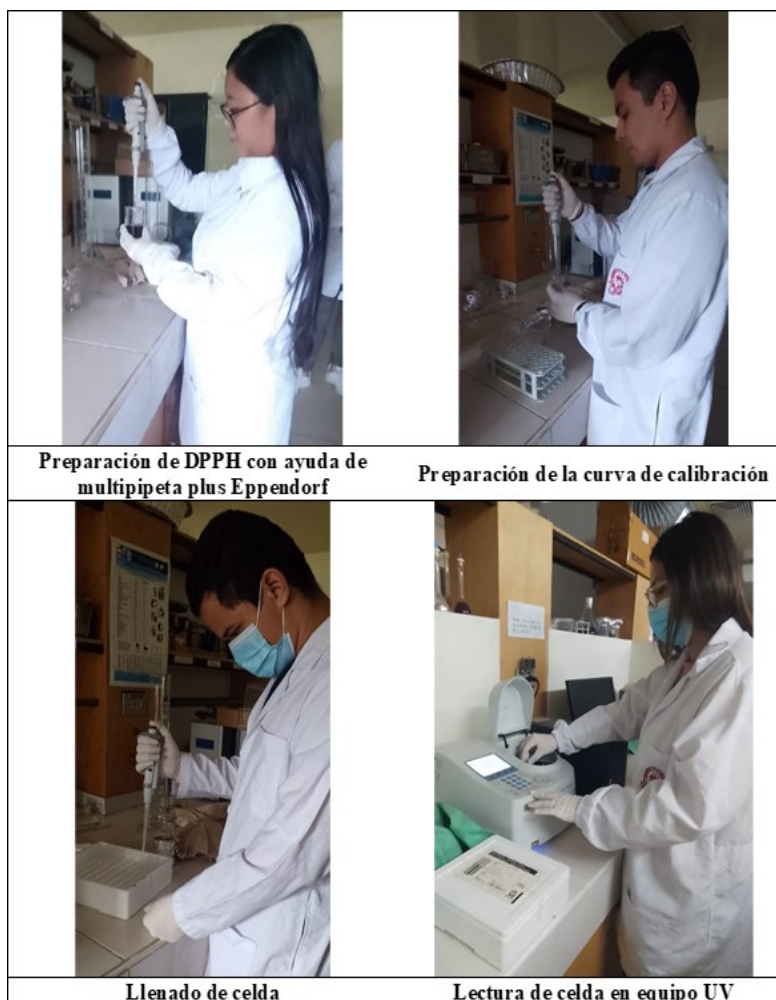


Fig. 18 Cuantificación de la actividad antioxidante en aceites esenciales.

d) Análisis microbiológico

El ensayo microbiológico llevado a cabo con los aceites esenciales que serán utilizados para la fabricación de fitocosméticos, fue la microdilución en caldo, como se explica a continuación.

Método de determinación de la concentración inhibitoria mínima: Microdilución en caldo

Este método se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima de un aceite esencial (concentración más a la que previene el crecimiento visible de un microorganismo luego de 18-24 horas de incubación).

Es más útil en comparación con otros métodos en los cuales se desea comprobar la actividad antimicrobiana de un extracto, ya que se pueden ensayar rangos de concentraciones más amplios.

Consiste en agregar volúmenes de diferentes concentraciones del extracto a analizar en 96 pocillos con fondo en forma de U. (dentro de una placa plástica estéril fabricada especialmente para este tipo de análisis) El medio de cultivo utilizado para este análisis es el caldo Mueller Hinton (Wiegand, et al, 2011).

En el análisis se debe llevar un control positivo y uno control negativo. El control positivo estará compuesto de caldo más inóculo mientras que el control negativo estará compuesto de caldo más extracto o aceite esencial a analizar. Para los ensayos de este método se realizó una estandarización de las bacterias cómo se explica en la página 36, Parte I.

Previamente a realizar el ensayo, se debe preparar lo siguiente:

- Se debe preparar suficiente caldo Mueller Hinton en este caso para un 1 Litro de caldo se necesita pesar 38 gr de este caldo en polvo, se disuelve en la cantidad apropiada de agua destilada y luego se procede a esterilizar en autoclave.
- Estandarización de los microorganismos a utilizar en el ensayo, estos serán *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Escherichia coli*. La concentración a la que deben encontrarse estos microorganismos es de 1×10^8 UFC/mL.
 - Se preparan diluciones seriadas de estos microorganismos estandarizados: Se toma 1 mL de esta suspensión estandarizada 1×10^8 UFC/mL y se coloca en un vial estéril de 25 mL el cual contiene 9 mL de solución salina, y se obtiene una concentración de 1×10^7 UFC/mL. Luego se toma 1 mL de esta última dilución y se coloca en un vial estéril con 9 mL de solución salina, para obtener una dilución 1×10^6 UFC/mL. Por último se toma 1 mL de esta dilución y se coloca en un frasco ISO estéril que contiene 19 mL de caldo Mueller Hinton; así se obtiene una concentración de 1×10^5 UFC/mL del microorganismo que será la utilizada en el ensayo.
- Se prepara solución de DMSO al 10% colocando en un vial estéril que contiene 18 mL de solución salina 2 mL de DMSO puro y luego se agita para posteriormente utilizar en el siguiente paso.
- Medio de cultivo MH con DMSO 10%: Se colocan 2 mL de solución salina en 18 mL de Caldo (colocados en un frasco ISO estéril) y agitar, esto servirá como diluyente en las diluciones seriadas del aceite esencial.
- Los antibióticos a utilizar son: Ciprofloxacina (frente a *Salmonella enterica*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*) y Vancomicina (frente a *Staphylococcus aureus*). Las concentraciones son: Ciprofloxacina 20,15,10 μ g/mL y Vancomicina 40,30, 20 μ g/mL.



- Se pesan 650 mg de aceite esencial y luego se diluye en 10 mL de solución de Caldo MH y DMSO10%. Obteniéndose así una solución stock de 65mg/mL o 65,000 $\mu\text{g/mL}$.
- Luego se preparan las diluciones seriadas del aceite esencial desde una concentración de 65,000 $\mu\text{g/mL}$ hasta 25 $\mu\text{g/mL}$.

A continuación, se presenta el esquema de las placas utilizadas durante el ensayo:

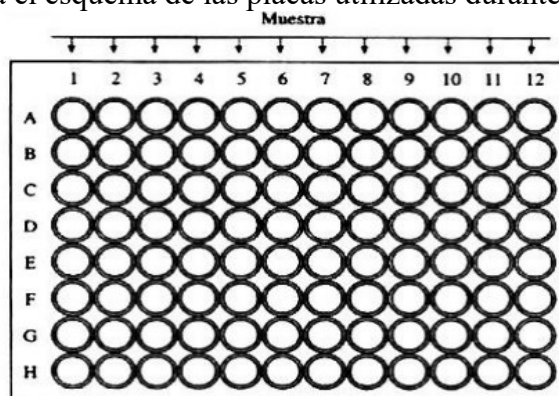


Fig. 19 Esquema de placa de 96 micropocillos

La placa de ensayo para CIM posee 96 pocillos los cuales están dispuestos en 8 filas y 12 columnas.

Para estos ensayos se llevaron a cabo 3 repeticiones por cada dilución de aceite esencial, control positivo, control negativo, y antibióticos, es decir que por cada dilución se utilizarían 3 pocillos.

- La fila A contiene las diluciones con las concentraciones más altas del aceite esencial.
- La fila B y C son las repeticiones de la fila A.
- La fila D contiene las diluciones con las concentraciones intermedias del aceite esencial.
- La fila E y F son las repeticiones de la fila D.
- Con respecto a la fila G los pocillos G1-G6 contiene las diluciones con las concentraciones más bajas del aceite esencial. G7-G9 contienen un control negativo (150 μL CMH con DMSO10%). G10-G12 contienen un control positivo (75 μL CMH + 75 microorganismo).
- Fila H: Los pocillos H1-H6 (75 μL de antibiótico + 75 μL de microorganismo), H7-H9 control negativo (150 μL de extracto puro) y H10-12 contienen 75 μL microorganismo + 75 μL solución salina.

Nota: Los pocillos con diluciones de aceite esencial contienen 75 μL de dilución de aceite esencial y 75 μL de microorganismo a ensayar. Con un total de 150 μL . Esto genera que las concentraciones del aceite esencial se reduzcan a la mitad. Las concentraciones del aceite esencial a ensayar son entonces: Desde 32,500 hasta 12.5 $\mu\text{g/mL}$.

e) Resultados y discusión de resultados

Los aceites esenciales de *C. aurantifolia*, *R. officinalis*, *E. citriodora*, *C. lusitanica* y *Z. officinale*, fueron ensayados frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, de tal manera que el único aceite esencial que presentó inhibición muy débil fue *E. citriodora* frente a *Staphylococcus aureus* (a una concentración igual o mayor 25,000

µg/mL), a *Salmonella enterica* (a una concentración igual o mayor o 22,500 µg/mL) y *Escherichia coli* (una concentración igual o mayor 25,000 µg/mL).

f) Conclusiones

Los aceites esenciales con mejor rendimiento fueron el de *Eucalyptus citriodora*, *Rosmarinus officinalis* y *Citrus x aurantifolia* y con menor rendimiento fue tanto para *Cupressus lusitanica* como para *Zingiber officinale*.

En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante, el aceite esencial que presentó la mejor actividad, fue el de *E. citriodora*, incluso mejor que los estándares utilizados. La capacidad antioxidante de *Z. officinale* se puede considerar moderada, y la de *R. officinalis*, *C. aurantifolia* y *C. lusitanica* se consideran débiles.

Solamente el aceite esencial de *E. citriodora* tuvo una inhibición muy débil frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

Los aceites esenciales extraídos, se le suministraron al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia, para la elaboración de formulados fitocosméticos a pequeña escala.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Dhahli, A.S., Al-Hassani, F.A., Alarjan, K.M., Yehia, H.M., Lawati, W.M.A., Azmi, S.N.H. y Khan, S.A. (2020). Essential oil from the rhizomes of the Saudi and Chinese *Zingiber officinale* cultivars: Comparison of chemical composition, antibacterial and molecular docking studies. *J. King Saud. Univ. Sci.*, 32(8), 3343-3350. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.09.020>
- Araujo, A. C. (2010). Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso. (Tesis de postgrado), Instituto Politécnico Nacional, México. Recuperado de: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/9532>
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. y Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 89(1), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Bosquioli, L.S.S., Ferreira, A.C.d.S., Farias, K.S., da Costa, E.C., Matos, M.d.F.C. Kadri, M.C.T., Rizk, Y.S., Alves, F.M., Perdomo, R.T., Carollo, C.A. y de Arruda, C.C.P. (2017). *In Vitro* antileishmania activity of sesquiterpene-rich essential oils from *Nectandra* species. *Pharm. Biol.*, 55(1), 2285-2291. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1407803>
- Chóez-Guaranda, I., Ortega, A., Miranda, M. y Manzano, P. (2017). Chemical composition of essential oils of *Passiflora edulis f. flavicarpa* agroindustrial waste. *Emir. J. Food Agric.*, 29(6), 458-462. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2016-10-1542>
- Cruz, S.M., Cáceres, A., Álvarez, L.E., Apel, M.A. y Henriques, A.T. (2012). Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* Species from Guatemala. *Acta. Hort.*, 964, 39-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.964.4>



- Cruzalegui, R.J., Güivin, O., Fernández-Jeri, A.B. y Cruz, R. (2021). Caracterización de compuestos fenólicos y actividad antioxidantes de pulpa de café (*Coffea arabica* L.) deshidratada de tres fincas cafeteras de la región Amazonas (Perú). *Rev. Inf. Tec.*, 32(5), 157-166. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642021000500157>
- da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Barreto, L.H., da Silva, N.C.F., Ribeiro, A.F., Montenegro, R.C. y Maia, J.G.S. (2017). Chemical composition of four Essential Oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and their cytotoxic and antioxidant activity. *Medicines*, 4(3), 51. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines4030051>
- de Moraes, S.M., Facundo, V.A., Bertini, L.M., Cavalcanti, E.S.B., Júnior, J.F.d.A., Ferreira, C.A., de Brito, E.S., Neto y M.A. de S. (2007) Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, 35(10) 670-675. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>
- de Sá, É.R.A., Costa, A.N., Costa, R.K.M., Souza, J.L., Ramos, R.M. y Lima, F.d.C.A. (2021) *In silico* study of the interactions of *Pilocarpus microphyllus* imidazolic alkaloids with the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. *Mol. Simul.*, 47(1), 74-87. <https://doi.org/10.1080/08927022.2021.18733210>
- dos Santos, A.L., Amaral, M., Hasegawa, F.R., Lago, J.H.G., Tempone, A.G. y Sartorelli, P. (2021). (-)-T-Cadinol—a Sesquiterpene Isolated From *Casearia sylvestris* (Salicaceae)-displayed *In Vitro* activity and causes hyperpolarization of the membrane potential of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Pharmacol.*, 12: 734127. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.73412>
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M. y Eloutassi, N. (2019) Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *Sci. World J.* 1(4), 6-12. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>
- Froelich, S., Siems, K., Hernández, M.A., Ibarra, R.A., Berendsohn, W. G. y Jenett-Siems, K. (2006). Phenolic glycosides from *Exostema mexicanum* leaves. *Pharmazie*, 61(7), 641-644. <https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2006/00000061/00000007/art00013?crawler=true>
- Gonzalez, Y., Jackson, S.C., Manzer, L.E. (2007). Destilación de vapor de plantas de albahaca de gato (España, No de patente: PCT/US2007/025997). Oficina Española de Patentes y Marcas. (Fecha de presentación: 20.12.2007; Fecha de publicación: 03.07.2008; Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 20.12.2007, E07867850 (5); Fecha y número de publicación de la concesión europea: 10.05.2017, EP 2121885). <https://patentimages.storage.googleapis.com/2b/79/45/de3bbcd0e4cd9/ES2634265T3.pdf>
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vázquez-López, A., Lagunez-Rivera, L. y Rojas-Olivas, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex*



quinquefasciatus (Say). *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 5(6), 463-467. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60816-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60816-7)

- Gómez, E.S.O., Tiburcio, J.E.V. y Díaz, D.R. (2018). Actividad. antioxidante y polifenoles totales de infusiones herbarias frescas, secas y comerciales. *Revia Investigacion y Amazonia*, 8(5), 26-39. <https://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/203>
- Gómez-Ordoñez, E.S., Reategui-Díaz, D. y Villanueva-Tiburcio, J.E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Sci. Agropec.*, 9(1), 113-121. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- Gunasena, M.T., Rafi, A., Zobir, S.A.M., Hussein, M.Z., Ali, A., Kutawa, A.B., Wahab, M.A.A., Sulaiman, M.R., Adzmi, F., Ahmad K. (2022). Phytochemicals profiling, antimicrobial activity and mechanism of action of essential oil extracted from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Bentong) against *Burkholderia glumae* causative agent of bacterial panicle Blight Disease of rice. *Plants.*, 13(11), 1466-1470. <https://doi.org/10.3390/plants11111466>
- Jaisan, C., Chase, S. y Punbusayakul, N. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvents extracts of *Coffea arabica* pulp. *Rev. J. Process. Energy Agric.*, 19(5), 224-227. <http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1821-4487/2015/1821-44871505224C.pdf>
- Krebs, H.C., Kemmerling, W. y Habermehl, G. (1994). Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Toxicon*, 32(8), 909-913. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90369-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90369-7)
- Leitão, G.G., Menezes, D.L.F.S., Kaplan, M.A.C., Craveiro, A.A. y Alencar, J.W. (2011). Essential oils from Brazilian *Aristolochia*. *J. Essent. Oil. Res.*, 3(6), 403-408. <https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9697974>
- Macías-Villamizar, V.E., Cuca-Suarez, L.E. y Coy-Barrera, E.D. (2015). Genus *Nectandra*: Phytochemistry and biological activity. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.*, 14(4), 317-342. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85641105007.pdf>
- Manh, H.D., Hue, D.T., Hieu, N.T.T., Tuyen, D.T.T. y Tuyet, O.T. (2020). The mosquito larvicidal activity of essential oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* species in Vietnam. *Insects*, 11(2), 128-134. <https://doi.org/10.3390/insects11020128>
- Mendoza, D.T., González, L.D.U., Ortega-Barría, E., Capson, T.L. y Rios, L.C. (2003). Five new cassane diterpenes from *Myrospermum frutescens* with activity against *Trypanosoma cruzi*. *J. Nat. Prod.*, 66(7), 928-932. <https://doi.org/10.1021/np030010o>
- Meza, S.A.C. (2017). *Determinación de antioxidantes en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia)*. (Tesis de postgrado), Universidad Técnica de Pereira, Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.utp.edu.co/items/2c457a24-bf52-45b6-b8e3-8d325499ddd0>



- Miller A.B. (2010). *Antrimicrobial and anticancer activity of essential oils from Guatemalan medicinal plants* (Thesis of degree of Master of Science), Faculty of Brigham Young University. Recuperado de <https://scholarsarchive.byu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3410&context=etd>
- Nasri, C., Halabi, Y., Aghzaf, S., Nounah, I., Brunel, M., Oubihi, A., El-Guorrami, O., Harhar, H., Costa J. y Tabyoui, M. (2022). Seven *Persea americana* varieties essential oils comparison: chemical composition, toxicity, antibacterial, and antioxidant activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 46(3): 489-490. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102468>
- Nteziyaremye, P. Cherutoi, J. Makatian, J. y Muhizi, T. (2021). Variation of yield and chemical composition of essential oil from *Cupressus lusitanica* growing in different agro-ecological zones of Rwanda. *Asian J. Appl. Sci.* 9(2): 42-56. <https://doi.org/10.9734/ajacr/2021/v9i230212>
- Núñez, M.J., Díaz-Eufracio, B., Medina-Franco, J.L. y Olmedo, D.A. (2021). Latin American databases of natural products: biodiversity and drug discovery against SARS-CoV-2. *RSC Adv.*, 11, 16051. <https://doi.org/10.1039/d1ra01507a>
- Núñez, M.J., Jiménez, I.A., Mendoza, C.R., Chávez-Sifontes, M., Martínez, M.L., Ichiishi; E., Tokuda, R.; Tokuda, H. y Bazzocchi, I.L. (2016). Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae species as anti-tumour-promoting agents: structure-activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.*, 111, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.049>
- Núñez, M.J., Martínez, M.L., López-Arencibia, A., Bethencourt-Estrella, C.J., San Nicolás-Hernández, D., Jiménez, I.A., Lorenzo-Morales, J., Piñero, J.E. y Bazzocchi, I.L. (2021). *In vitro* susceptibility of kinetoplastids to celastrols from *Maytenus chiapensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 65(6), 2236-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02236-20>
- Ordoñez, E., López, A. y Reátegui, D. (2020). Infusiones de plantas medicinales: Actividad antioxidante y fenoles totales. *Agroindustrial Science*, 10(3), 259-266. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.03.06>
- Ortega-Cuadros, M., Acosta de Guevara, E.E., Castillo, A.D.M., Castañeda, C.G., Amaris, G.C., Tofiño-Rivera, A.P. (2020). Essential oils biological activity of the shrub *Lippia alba* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 68(1), 344-359. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68i1.39153>
- Poudel, D.K., Dangol, S., Rokaya, A., Maharjan, S., Ojha, P.K., Rana, J., Dahal, S, Timsina, S., Dosoky, N.S., Satyal, P. y Setzer, W.N. (2022). Quality assessment of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil from Nepal. *Natur. Prod. Commun.*, 17(3), 1-10. <https://doi.org/10.1177/1934578X221080322>
- Puerta, E.R. (2022). *Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de Romero (Rosmarinus officinalis) y Orégano (Origanum vulgare) en aceite de SACHA INCHI*, (Tesis de grado), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas, Perú. Recuperado de: <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2793>



- Quispe, M.A., Flores, D.D.C., Hinojosa, R.A., De la Cruz, A.H. y Manyari, G.M.M. (2022). Antioxidant capacity of essential oil from *Eucalyptus* leaves (*Eucalyptus globulus*) extracted by ultrasonic energy. *J. Food Sci.*, 3(1), 19-29. <https://revistas.uncp.edu.pe/index.php/jafs/article/view/1437>
- Rivas, D.M., Dueñas, A.A. y Rodríguez, J.M. (2020). Secondary metabolites and antioxidant activity of wild tomatillo (*Solanum pimpinellifolium* L). *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*, 2(4), 26-32. <https://doi.org/10.22209/rt.ve2020n2a04>
- Rivas, M.M., Zaldaña, J., Galvez, A., Castillo, U.G., Menjivar, J., Martínez, M.L. y Nuñez, M.J. (2020). Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en frutos de la flora salvadoreña. *Rev. Minerva*, 3(2), 21-33. <https://minerva.sic.ues.edu.sv/index.php/Minerva/article/view/82/81>
- Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I. (2011). USP 34 Farmacopea Estadounidense NF 29 Formulario Nacional. *United States Pharmacopeial Convention 2009*; 34(1): 196-197.
- Samol, V., Santizo, C. y Cáceres, A. (2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 21(2), 34-43. <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v21i2.130>
- Sawaya, A.C.H.F., Vaz, B.G., Eberlin, M.N. y Mazzafera, P. (2011). Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 58(3), 471-480. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-011-9660-2>
- Setzer, W.N., Noletto, J.A., Lawton, R.O. y Haber, W.A. (2005). Leaf essential oil composition of five *Zanthoxylum* species from Monteverde, Costa Rica. *Mol. Divers.*, 9 (1-3), 3-13. <https://doi.org/10.1007/s11030-005-1298-6>
- Setzer, W.N., Schmidt, W. A., Eiter, L C., Haber, W.A (2005). Leaf essential oil composition of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. from Monteverde, Costa Rica and its biological activities. *J. Essent. Oil Res.*, 17(3), 333-335. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2005.9698923>
- Simionatto, E., Porto, C., Dalcol, I.I., da Silva, U.F. y Morel, A.F. (2005). Essential oil from *Zanthoxylum hyemale*. *Planta Medica*, 71(8), 759-763. <https://doi.org/10.1055/s-2005-864184>
- Singh, H.P., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. y Kohli, R.K. (2012). Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *Food Sci. Technol.*, 48(2), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.019>
- Takaku, S., Haber, W. A. y Setzer, W. N. (2007). Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem Syst. Ecol.*, 35(8), 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.02.003>



- Turiel, N.A, Ribeiro, A.F., Carvalho, E.E.N., Domingos, V.D., Lucas, F.C.A., Carreira, L.M.M., Andrade, E.H.A. y Maia, J.G.S. (2013). Essentials oils composition of *Croton* species from the Amazon. *Nat. Prod. Commun.*, 8(10), 1471-1472. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24354204/>
- Valerezo, E., Castillo, A., Guaya, D., Morocho, V. y Malagon, O. (2012). Chemical composition of essential oils of two species of the Lamiaceae family: *Scutellaria volubilis* and *Lepechinia paniculata* from Loja, Ecuador. *J. Essent. Oil Res.*, 24(1), 31-37. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.645638>
- Vázquez, J. (2012). Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de *Piper* nativas del Perú, (Tesis de grado), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/15589>
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://10.1038/nprot.2007.521>
- Yáñez, H.A.F. (2019). Extracción y microencapsulación de carotenoides con actividad antioxidante a partir de *Daucus carota* (Trabajo de graduación), Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/29998>
- Young, D.G., Chao, S., Casabianca, H., Bertrand, M.C. y Minga, D. (2007). Essential oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. *J. Essent. Oil Res.*, 19(6), 525-526. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699322>
- Zahra, G., Khadijeh, B., Hossein, D. y Ali, S. (2019). Essential oil composition of two *Scutellaria* species from Iran. *J. Tradit. Chin. Med. Sci.*, 6(3), 244-253. <https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2019.07.003>

