

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE ESPECIES  
AROMATICAS DE LA FLORA SALVADOREÑA: *Piper standleyi* Trel. Y  
*Zanthoxylum culantrilo* Kunth COLECTADAS EN LA LAGUNA VERDE,  
APANECA, AHUACHAPAN

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR:

JENNIFFER PAOLA HERNANDEZ ELIAS

DIEGO LEOPOLDO MEMBREÑO GIRON

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

FEBRERO, 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

**SECRETARIO GENERAL**

INGENIERO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

**SECRETARIA**

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

**DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO**

**DIRECTORA GENERAL**

MAESTRA ENA EDITH HERRERA SALAZAR

**TRIBUNAL EVALUADOR**

**ASESORAS DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS  
NATURALES:**

MAESTRA MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

DOCTOR DAVID FRANCISCO TORRES ROMERO

**INVESTIGADOR TITULAR**

DOCTOR MARVIN JOSÉ NUÑEZ RIVAS

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por darme la sabiduría desde el comienzo de mis estudios, por protegerme durante todo este tiempo y darme fuerzas cuando más lo necesitaba.

Agradezco a mis padres, Sonia de Hernández y Edgar Hernández, que han sido no sólo un aporte económico sino un apoyo emocional, por apoyarme en cada una de mis decisiones y por aconsejarme en cada momento y a mi hermana, Vanessa, por ser mi motivación principal para ser su mejor ejemplo, por su paciencia cuando ni yo me soportaba.

A mi incondicional apoyo, mi novio, Ignacio Pérez, por ser mi mejor amigo, por confiar en mí, por su paciencia y amor, sobre todo por demostrarme que podía ser mejor cada día.

Agradezco a cada uno de los docentes del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales por haberme compartido tanto conocimiento, principalmente gracias a Dr. Marvin José Núñez Rivas por su paciencia, por corregirme y por darme su amistad, por los buenos recuerdos durante la estancia de investigación y por haber creído en nuestro potencial.

A nuestra Maestra Amy Moran, quien me enseñó en Microbiología, me brindó sus conocimientos de la mejor manera y por su amistad y confianza, porque sabía que tenía la destreza y habilidad para desarrollarme en el área.

A mi compañero de batallas durante toda la carrera, Jorge Araujo, porque sin su excelente dedicación y trabajo no habiéramos llegado juntos a este proceso.

A todos, muchísimas gracias por formar parte de este gran paso en mi vida, que Dios los bendiga mucho.

**Paola**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios en primer lugar por siempre guardarme y guiarme con bien ya que nunca me ha abandonado.

A la Universidad de El Salvador, en especial a la Facultad de Química y Farmacia y a sus docentes, por haber contribuido en mi formación académica a lo largo de este tiempo, a través de sus conocimientos y su apoyo continuo.

A mi docente asesor, por su tiempo, orientación, dedicación y su apoyo constante durante este trabajo de graduación.

A los docentes del Laboratorio de Investigación en productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia, y Laboratorio de Microbiología de CENSALUD por haberme permitido realizar la parte experimental de mi trabajo de graduación en sus instalaciones.

A mi madre y mis hermanos ya que sin ellos nunca hubiera logrado llegar hasta este momento.

**Leopoldo**

## **DEDICATORIA**

Al Señor, mi Padre, quien me dió la vida, salud y protección durante toda la carrera.

A mis padres Sonia de Hernández y Edgar Hernández por haberme dado la oportunidad de terminar mis estudios y por siempre darme el apoyo y alentarme en todo momento a seguir adelante sin importar las dificultades.

A mi hermana Vanessa porque fue mi apoyo en muchas ocasiones sin pedir nada a cambio, por desvelarse junto a mí cuando necesitaba su ayuda.

A mi novio, Ignacio Pérez por darme la seguridad de que este proceso sería de victoria cada vez que me desanimaba, por su amor tan inmenso y por su ayuda en todo momento.

A mi abuelita, porque sé que aún en la distancia, sus oraciones siempre fueron escuchadas para que lograra terminar mis estudios.

“Encomienda a Jehová tus obras, y tus pensamientos serán afirmados”

**Proverbios 16:3**

**Paola**

## **DEDICATORIA**

A mi madre porque sin su guía y consejos no estaría donde estoy.

A mis hermanos por cuidarme y darme apoyo.

A mis maestros del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, por los consejos y el apoyo que me dieron desde el principio del proyecto.

A mis maestros de microbiología por su guía en el área.

“Nunca te rindas, ya que tú representas a todos aquellos que conociste en el camino y no lo lograron”

**Leopoldo**

## **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b>	16
----------------	----

### CAPITULO I

<b>1. INTRODUCCION</b>	XVII
------------------------	------

### CAPITULO II

#### **2. OBJETIVOS**

- 2.1 Objetivo General
- 2.2 Objetivo Específico

### CAPITULO III

<b>3. DISEÑO METODOLOGICO</b>	37
-------------------------------	----

- 3.1 Tipo de estudio 37
  - 3.1.1 Estudio experimental de laboratorio 37
  - 3.1.2 Estudio exploratorio transversal 37
- 3.2 Investigación bibliográfica 37
- 3.3 Investigación de campo 38
  - 3.3.1 Universo: 38
  - 3.3.2 Muestra: 38
  - 3.3.3 Tipo de muestreo 38
- 3.4 Parte Experimental 39
  - 3.4.1 Bioprospección, recolección, identificación y selección de especies vegetales fuentes de aceites esenciales. 39

3.4.2	Obtención del aceite esencial de <i>Citrus x aurantifolia</i> , <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i> por medio del método de hidrodestilación Clevenger.	39
3.4.3	Estandarización de la actividad antioxidante por el método DPPH.	40
3.4.4	Estandarización de la actividad antimicrobiana por medio del método Kirby- Bauer	43
3.4.5	Cuantificación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas: <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i> .	50
3.4.6	Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas: <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i> .	50
3.4.7	Procesamiento de datos	54

#### CAPITULO IV

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>51</b>
4.1	Viajes de bioprospección	51
4.2	Listado de especies vegetales identificadas	51
4.3	Listado de especies aromáticas	52
4.4	Selección de las especies aromáticas para análisis de investigación	53
4.5	Extracción y cuantificación del aceite esencial de <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i> .	54
4.6	Actividad antioxidante de <i>Piper standleyi</i> Y <i>Zanthoxylum culantrilo</i>	55
4.6.1	Análisis estadístico	57

4.7	Análisis de actividad antimicrobiana de <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i>	58
4.7.1	Controles positivos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i> .	58
4.7.2	Primer ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Piper standleyi</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	60
4.7.3	Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Piper standleyi</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	61
4.7.4	Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Piper standleyi</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	63
4.7.5	Primer ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Zanthoxylum culantrilo</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	66
4.7.6	Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Zanthoxylum culantrilo</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	66
4.7.7	Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Zanthoxylum culantrilo</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	67

4.7.8	Análisis estadístico	68
CAPITULO V		
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
CAPITULO VI		
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>65</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>72</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pag</b>
<b>N°</b>		<b>N°</b>
1	Especies aromáticas seleccionadas para extracción de aceites esenciales	54
2	Curva de calibración de estándares utilizando Trolox para la determinación de actividad antioxidante	56
3	Comparación de los IC <sub>50</sub> de las especies vegetales analizadas	57
4	Antibióticos utilizados para cada microorganismo y diámetro de los halos de inhibición	59
5	Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Piper standleyi</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	62
6	Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de <i>Piper standleyi</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	65

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°</b>		<b>Pag N°</b>
1	Viajes de bioprospección realizados en el Departamento de Ahuachapán	51
2	Listado de especies vegetales observadas en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	52
3	Listado de especies aromáticas observadas en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	53
4	Cantidad de aceite esencial en 1Kg de muestra de especies vegetales aromáticas seleccionadas	55
5	Lectura promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba de DPPH	56
6	Resultados de determinación de la actividad antioxidante en <i>Piper standleyi</i> y <i>Zanthoxylum culantrilo</i> frente a Trolox.	59

## INDICE DE ANEXOS

N°

- 1 Tabla con resultados de *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrillo* de la determinación de la actividad antioxidante.

## RESUMEN

En la presente investigación se realizaron 2 viajes de bioprospección en La Laguna Verde de Apaneca en Ahuachapán, se identificaron, con la ayuda de un profesional botánico del Museo de Historia Natural de El Salvador, 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas, 10 poseen propiedades aromáticas interesantes, se seleccionaron 2 especies vegetales fuentes de aceite esencial, *Piper standleyi* (Hojas) y *Zanthoxylum culantrilo* (Hojas), para llevar a cabo la extracción y cuantificación por medio del método de hidrodestilación con el aparato Clevenger para determinar la actividad antioxidante utilizando el método DPPH y la actividad antimicrobiana por el método Kirby-Bauer; por otro lado, se utilizó el aceite esencial proveniente de las hojas de *Citrus x aurantifolia*, para estandarizar dichos métodos. La investigación experimental fue llevada a cabo durante los meses de marzo a octubre del 2022 en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales ubicado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Los rendimientos (% v/m) de aceites esenciales de las hojas obtenidos por medio del aparato Clevenger fueron de 0.03% para *Piper standleyi* y de 0.07 % para *Zanthoxylum culantrilo*. En la determinación de actividad antioxidante, la especie *Zanthoxylum culantrilo*, exhibió mayor actividad con un IC<sub>50</sub> de 45.37±1.01 mg/mL y *Piper standleyi*, presentó un IC<sub>50</sub> de 182.50±1.95 mg/mL, exhibiendo así, una menor actividad antioxidante. En cuanto a la actividad antimicrobiana, los aceites fueron ensayados frente a 3 bacterias Gram (-): *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y una bacteria Gram (+): *Staphylococcus aureus*, a concentraciones desde 25 µg/mL hasta 10,000 µg/mL, así, solo el aceite esencial de *Piper standleyi* presentó halos de inhibición <15mm de diámetro frente a *S. aureus*, que considera como baja actividad antimicrobiana a las concentraciones ensayadas.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION

Las especies aromáticas han sido utilizadas desde los tiempos antiguos por sus propiedades medicinales, conservantes de alimentos, su importante aroma y sabor en las comidas. Las propiedades farmacéuticas de las plantas aromáticas se atribuyen parcialmente a sus aceites esenciales, ya que son complejos y multicomponentes, formados por moléculas terpénicas y no terpénicas.

El propósito de la investigación fue coleccionar 2 especies vegetales fuentes de aceites esenciales, de las cuales no existían estudios previos a nivel nacional reportados, se les determinó el rendimiento de aceites esenciales, se cuantificó la actividad antioxidante y se les determinó su actividad antimicrobiana, para contribuir, así, con la investigación fitoquímica de especies de la flora salvadoreña, además de buscar, nuevos aceites esenciales, capaces de atenuar las diferentes patologías provocadas por el estrés oxidativo y la inhibición de bacterias Gram (+) y Gram (-).

Se llevaron a cabo viajes de bioprospección de donde surgió un listado de especies vegetales identificadas por el curador del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador. Posteriormente, se enlistaron las especies aromáticas y luego se seleccionaron dos de estas para llevar a cabo la extracción y cuantificación de aceites esenciales por medio del método de hidrodestilación con el aparato Clevenger, la realización de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y el ensayo antimicrobiano por medio del método Kirby-Bauer a diferentes concentraciones frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a cada uno de los aceites esenciales extraídos.

Cabe mencionar que de ambas especies seleccionadas no se encuentran investigaciones previas que determinen estas propiedades. La extracción del aceite esencial y su respectiva actividad antioxidante se estandarizó mediante

el uso de la hoja de *Citrus x aurantifolia* “Limón” ya que es una especie que tiene previos estudios sobre su porcentaje de rendimiento del aceite esencial, su actividad antioxidante y su actividad antimicrobiana.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia y en el Laboratorio de Microbiología de CENSALUD, de la Universidad de El Salvador, entre los meses de marzo y octubre del año 2022.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Ensayar la actividad antioxidante y antimicrobiana de especies aromáticas de la flora salvadoreña: *Piper standleyi* Trel. Y *Zanthoxylum culantrilo* Kunth colectadas en la Laguna Verde de Apaneca en el departamento de Ahuachapán.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

2.2.1 Realizar la bioprospección de especies vegetales en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán.

2.2.2 Enlistar las especies vegetales aromáticas de los viajes de bioprospección realizados.

2.2.3 Seleccionar dos especies vegetales aromáticas para extraer y cuantificar el rendimiento de los aceites esenciales por el método Clevenger.

2.2.4 Determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por medio del método Kirby-Bauer de las especies vegetales seleccionadas.

**CAPITULO III**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

### 3. DISEÑO METODOLOGICO

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

##### 3.1.1 Estudio experimental de laboratorio

El procesamiento y análisis que se le aplicó a las especies vegetales seleccionadas *Piper standleyi*, *Zanthoxylum culantrilo* y la especie con la cual se realizó la estandarización de los métodos a utilizar (DPPH y Kirby-Bauer), hoja de “Limón”, todo esto se llevó a cabo en el Laboratorio de investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia y en el Laboratorio de Microbiología de CENSALUD de la Universidad de El Salvador respectivamente.

##### 3.1.2 Estudio exploratorio transversal

Actualmente en el país no se contaba con una investigación científica sobre la extracción, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*.

#### 3.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se recopiló información de especies vegetales fuente de aceites esenciales de publicaciones científicas, en ResearchGate, Google académico, ScienceDirect, Academia.edu, PubMed, y en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia y Central de la Universidad de El Salvador.
- Base de datos científico: ScienceDirect, PubMed.
- Base de datos botánicos: Tropicos.org, Dendroflora, JACQ.

- Revistas del área de productos naturales: *Journal of Natural Products*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

### 3.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

#### 3.3.1 Universo:

Especies aromáticas de la flora salvadoreña fuentes de aceites esenciales del Departamento de Ahuachapán.

#### 3.3.2 Muestra:

Dos especies aromáticas de la flora salvadoreña fuente de aceites esenciales colectadas en la Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán, en donde se tomó en consideración la disponibilidad, el acceso al lugar, época del año, el estado de la planta, antecedentes sobre aceites esenciales del género seleccionado y la delimitación de las zonas de ubicación

#### 3.3.3 Tipo de muestreo

##### 3.3.3.1 Método no probabilístico

La muestra es seleccionada en función de criterios establecidos por el individuo; en nuestro caso, se establecieron criterios tales como: disponibilidad de la especie vegetal, el acceso al lugar de la recolecta, el estado de la planta y la delimitación de las zonas seleccionadas.

##### 3.3.3.2 Muestreo por conveniencia

Las muestras que fueron seleccionadas cumplían con las consideraciones que se plantearon anteriormente. Cabe destacar que este tipo de muestreo no probabilístico es de gran utilidad para estudios piloto o de sondeo.

### 3.4 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.4.1 Bioprospección, recolección, identificación y selección de especies vegetales fuentes de aceites esenciales.

La Laguna Verde, pertenece a la cordillera de Apaneca-Illamatepec 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 dos viajes de bioprospección que llevamos a cabo, se identificaron 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas, como Lauraceae, Piperaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, etc., de las cuales 10 pueden poseer propiedades aromáticas interesantes con la ayuda del curador del MUHNES y se les asignó un número de voucher. Se seleccionaron dos de todas estas especies vegetales aromáticas para estudios experimentales: *Piper Standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo* <sup>(4)</sup>.

En el caso de *Citrus x aurantifolia* "Limón", fue recolectada en Finca Quinta Marisol, Cantón El Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana para la extracción y cuantificación del aceite esencial por medio de la columna Clevenger y así realizar la estandarización del método DPPH para la cuantificación de la actividad antioxidante y del método Kirby-Bauer para la determinación de la actividad antimicrobiana.

#### 3.4.2 Obtención del aceite esencial de *Citrus x aurantifolia*, *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo* por medio del método de hidrodestilación Clevenger.

- Fraccionar el material vegetal con ayuda de tijeras.
- Anotar el peso total del material vegetal.

- Colocar el material vegetal molido en el balón de fondo plano de capacidad 1000 mL el órgano utilizado de ambas especies fueron las hojas y la cantidad usada aproximadamente fue de 1 kg.
- Agregar aproximadamente 500 mL de agua destilada en el balón que contiene la muestra cortada.
- Armar el equipo de destilación de aceites esenciales Clevenger.
- Conectar las mangueras al chiller (refrigerante) y se encendió.
- Encender la manta de calentamiento y empezó a destilar a temperatura constante durante 90 minutos.
- Recolectar el aceite obtenido en goteros previamente esterilizados y rotulados
- Determinar el porcentaje de rendimiento a partir del volumen obtenido por triplicado.
- Lavar el equipo completamente para evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida.

Según el método oficial Farmacopea estadounidense USP 34 NF 39. Determinación de aceites volátiles <sup>(3)</sup>.

### 3.4.3 Estandarización de la actividad antioxidante por el método DPPH.

Todo el proceso experimental del laboratorio se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C) y los ensayos de actividad antioxidante, se llevaron a cabo en relativa oscuridad, debido a que el entorno fisicoquímico como la luz y la temperatura afecta los resultados de la actividad antioxidante <sup>(5)</sup> <sup>(12)</sup>. Materiales, reactivos y equipos utilizados se encontraban en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

La estandarización del método por hidrodestilación 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 tomó en cuenta que el material vegetal estuviera sano, libre de enfermedades, insectos, o materias extrañas. En el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, se procedió a la extracción y cuantificación por medio del método Clevenger, donde se realizaron al menos 3 extracciones diarias, verificando el rendimiento de aceites esenciales obtenidos. Se utilizaron 1.04 Kg de hojas frescas de hojas *Citrus x aurantifolia* para obtener de 2.5 mL de aceite esencial.

Reactivos utilizados:

DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), CAS: 1898-66-4); Metanol; Etanol; Aceite esencial de *Citrus x aurantifolia*, *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*; DMSO 10%; Estándar de Trolox (Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromon-2-carboxílico, CAS: 53188-07-1).

Así, la determinación de la capacidad antioxidante de este aceite esencial sigue la siguiente metodología:

#### 3.4.3.1 Preparación de la curva de calibración con estándar de Trolox

Preparar la curva de calibración de Trolox entre 6.25 a 500  $\mu\text{M}$ , con al menos 5 puntos (6.25  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.4.3.2 Preparación de la curva de calibración con estándar de ácido Ascórbico

Preparar la curva de calibración de Ácido Ascórbico entre 0.5700 a 5680  $\mu\text{M}$ , con al menos 5 puntos (0.5700  $\mu\text{M}$ , 0.5695  $\mu\text{M}$ , 0.5693  $\mu\text{M}$ , 0.5690 0.5685 $\mu\text{M}$ , 0.5683  $\mu\text{M}$ , 0.5680  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.4.3.3 Preparación de la solución de DPPH [50 $\mu\text{M}$ ]

- Pesar aproximadamente 5 mg de DPPH.
- Diluir a 1 mg/mL con metanol y se tomó una alícuota de esta solución.
- Adicionar la alícuota y se diluyó con etanol al 5% hasta obtener una concentración final de 50 [ $\mu\text{M}$ ] de DPPH.

#### 3.4.3.4 Preparación de la solución de trabajo

- Pesar una cantidad adecuada del aceite esencial de la hoja de *Citrus x aurantifolia* para preparar una solución de 0.2 mg/mL en metanol para analizar la linealidad del análisis.
- Preparar 3 soluciones del aceite esencial a analizar de 25, 20 y 15 mg/mL para determinar el  $\text{IC}_{50}$  de cada uno.

#### 3.4.3.5 Preparación de las celdas

- Preparar las celdas con los siguientes componentes, de acuerdo a la sustancia a analizar (estándar, muestra o blanco): 950  $\mu\text{L}$  DPPH y 50  $\mu\text{L}$  de la sustancia a analizar.

#### 3.4.3.6 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.

#### 3.4.4 Estandarización de la actividad antimicrobiana por medio del método Kirby- Bauer

##### 3.4.4.1 Estandarización de bacterias

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

##### 3.4.4.2 Preparación de la suspensión madre de microorganismo para estandarización.

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

##### 3.4.4.3 Determinación de absorbancia de la suspensión estandarizada de cada microorganismo

- Extraer 1-2 mL de la suspensión anterior y transferir a una celda de lectura del espectrofotómetro UV-Vis.

- Medir 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 es la solución salina.

#### 3.4.4.4 Preparación de las diluciones de suspensión estandarizada de microorganismos.

- Hacer las diluciones necesarias de la suspensión estandarizada, tomando 1 mL de la suspensión anterior y colocar en 9 mL de solución salina. Repetir este procedimiento hasta obtener conteos bacterianos entre 25-250 UFC/placa.
- Transferir 1 mL de las últimas tres diluciones a una placa vacía respectivamente rotulados.
- Verter el agar Plate Count en la placa que contenía el mililitro de la suspensión bacteriana y homogenizar el contenido de la placa.
- Incubar las placas a 35 - 37 °C durante 24 horas. Luego del período de incubación, realizar los conteos respectivos.

#### 3.4.4.5 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, del cual se realizaron tres ensayos.

#### 3.4.4.6 Preparación del DMSO al 10%

Diluir 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 ocupamos para hacer las diluciones de las concentraciones del aceite esencial.

#### 3.4.4.7 Preparación de las concentraciones para el primer ensayo

- Pesar 40 mg del aceite esencial y diluir en 5 mL de DMSO al 10%, esta es nuestra solución inicial para preparar 1 mL de las diferentes concentraciones:

C1: 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir de la solución inicial 125  $\mu\text{L}$  a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 875  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C1”.

C2: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C2”.

C3: 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C3”.

C4: 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C4”.

#### 3.4.4.8 Preparación de las concentraciones para el segundo ensayo

- Pesar 40 mg del aceite esencial y diluir en 5 mL de DMSO al 10%, esta es nuestra solución inicial para preparar 1 mL de las diferentes concentraciones:

C1: 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir de la solución inicial 375  $\mu\text{L}$  a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 625  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C1”.

C2: 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 833  $\mu\text{L}$  de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 167  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C2”.

C3: 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 800  $\mu\text{L}$  de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C3”.

C4: 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500 µL de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500 µL de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C4”.

#### 3.4.4.9 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.

#### 3.4.4.10 Preparación del medio de cultivo: agar Müller Hinton

- Pesar 17 g de agar Müller Hinton
- Diluir en 500 mL de agua destilada, se calentó y agitó hasta que el medio empezó a ebulir.
- Esterilizar en el autoclave por 2 horas y media.
- Repetir el procedimiento para preparar 2 frascos de 500 ml.

#### 3.4.4.11 Preparación de las placas

- Verter la cantidad de 20 mL aproximadamente sobre 30 placas medianas donde se realizaron las pruebas.
- Solidificar y rotular con el nombre del medio y la fecha.

#### 3.4.4.12 Preparación de frascos de 50 mL de agar Müller Hinton

Utilizar estos frascos para la inoculación de cada bacteria seleccionada.

- Pesar 1.7 g del agar Müller Hinton.
- Diluir en 50 mL de agua destilada en un frasco de vidrio limpio, seco y esterilizado, luego calentar y agitar hasta ebullición.

- Enfriar y llevar a autoclave por 2 horas y media.
- Colocar en baño maría a 42-46 °C.

#### 3.4.4.13 Desarrollo del método Kirby-Bauer

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

Se utilizaron 7 placas por cada microorganismo:

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

#### 3.4.4.14 Preparación de las placas con microorganismos

- Transferir a un tubo con solución salina de 9 mL, 1 mL del estándar de microorganismos de  $10^9$  UFC/mL, agitar y homogenizar.
- Tomar 0.03 mL equivalentes a 30  $\mu$ L de la solución anterior y transferir al frasco de 50 mL del agar Müller Hinton.
- Homogenizar con la ayuda de una micropipeta, verter 4 mL sobre una placa previamente preparada de 20 mL de agar Müller Hinton.
- Agitar a modo de cubrir toda la placa con el microorganismo y solidificar.
- Repetir el procedimiento para las 7 placas de cada bacteria. Una de las 7 placas de cada bacteria se utiliza únicamente para monitorear el crecimiento de bacterias.

- Luego de que solidifican, con ayuda de unos horadores previamente limpios, secos y esterilizados, realizar 3 pocillos en 5 placas de cada microorganismo.

Nota: Siempre descartar las puntas para cada microorganismo.

#### 3.4.4.15 Preparación de la placa Control (+)

Tomar una placa previamente inoculada con los 4 mL de microorganismos ya solidificada sin pocillos y colocar 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.

#### 3.4.4.16 Preparación de la placa Control (-)

Tomar una de las placas que tienen pocillos y colocar, dentro de cada pocillo, 6 gotas de DMSO al 10% y dejar en reposo.

#### 3.4.4.17 Preparación de las placas según concentraciones de aceite esencial

- Tomar una de las placas con pocillos, para la primera concentración y rotular como “C1”, con la ayuda de una micropipeta, colocar 6 gotas de la concentración 1 de aceite esencial en cada pocillo y dejar reposar.
- Repetir el procedimiento para la concentración 2, 3 y 4.
- Llevar las 28 placas a la incubadora por 24 horas.

#### 3.4.4.18 Resultados esperados

Observar 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, por debajo de estos rangos la bacteria es resistente al antibiótico o sustancia antimicrobiana.

#### 3.4.5 Cuantificación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas: *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*.

El procedimiento se realizó de la misma forma que esta detallado en el apartado 3.4.3; a diez concentraciones diferentes.

Todo el proceso experimental del laboratorio se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C), en oscuridad, debido a que el entorno fisicoquímico como la luz y la temperatura afecta los resultados de la actividad antioxidante. Materiales, reactivos y equipos utilizados se encuentran en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

#### 3.4.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especies aromáticas seleccionadas: *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*.

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.

Se realizó en un área estéril, con materiales, reactivos y equipos dentro del Laboratorio de Microbiología de CENSALUD de la Universidad de El Salvador. Todo el procedimiento se realizó de la misma manera que en el apartado 3.4.4, exceptuando las concentraciones y el número de ensayos realizados.

Se realizó la determinación en tres ensayos a 15 concentraciones diferentes, detalladas a continuación.

#### 3.4.6.1 Preparación de las concentraciones para el primer ensayo

- Pesar 40 mg del aceite esencial y diluir en 5 mL de DMSO al 10%, esta es nuestra solución inicial para preparar 1 mL de las diferentes concentraciones:

C1: 125 µg/mL

- Transferir de la solución inicial 16 µL a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 984 µL de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C1”.

C2: 100 µg/mL

- Transferir 800 µL de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 200 µL de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C2”.

C3: 75 µg/mL

- Transferir 750  $\mu\text{L}$  de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 250  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C3”.

C4: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 666  $\mu\text{L}$  de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 334  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C4”.

C5: 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de la solución “C4” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C5”.

#### 3.4.6.2 Preparación de las concentraciones para el segundo ensayo

- Pesar 40 mg del aceite esencial y diluir en 5 mL de DMSO al 10%, esta es nuestra solución inicial para preparar 1 mL de las diferentes concentraciones:

C1: 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir de la solución inicial 625  $\mu\text{L}$  a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 375  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C1”.

C2: 4,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 800  $\mu\text{L}$  de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C2”.

C3: 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 750  $\mu\text{L}$  de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 250  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C3”.

C4: 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 667  $\mu\text{L}$  de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 333  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C4”.

C5: 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de la solución “C4” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C5”.

#### 3.4.6.3 Preparación de las concentraciones para el tercer ensayo

- Pesar 50 mg del aceite esencial y se diluyó en 5 mL de DMSO al 10%, ésta era nuestra concentración 1 (C1) de 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , luego realizar los cálculos para preparar 1 mL de las diferentes concentraciones:

C2: 9,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir de la solución inicial 900  $\mu\text{L}$  a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C1”.

C2: 8,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 889  $\mu\text{L}$  de la solución “C1” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 111  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C2”.

C3: 7,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 875  $\mu\text{L}$  de la solución “C2” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 125  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C3”.

C4: 6,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transferir 857  $\mu\text{L}$  de la solución “C3” a un vial previamente limpio, seco y esterilizado.
- Agregar 143  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10%.
- Homogenizar y rotular como “C4”.

### 3.4.7 Procesamiento de datos

#### 3.4.7.1 Procesamiento de muestras

Los resultados de cuantificación de actividad antioxidante se realizaron por triplicado respecto a cada solución de trabajo, se procedió a tabular los datos utilizando el programa Microsoft Excel 2019, con el cual se diseñó una hoja de

cálculo para obtener los valores de CV, tomando en cuenta los valores que presentaron un CV menor al 10%.

#### 3.4.7.2 Procesamiento de estándares

El espectrofotómetro UV-Vis brinda una concentración en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox, se realizó un promedio de las curvas de calibración que presentaron un CV menor al 10%, a partir de la ecuación de línea recta obtenida se calcula la concentración en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox utilizando los valores de absorbancia exhibidas para cada celda.

Haciendo uso de la nueva concentración encontrada para cada celda, se realizaron los cálculos que determinan la capacidad antioxidante expresada en el  $\text{IC}_{50}$  mg/mL de Trolox.

#### 3.4.7.3 Comparación de resultados

Una vez obtenidos los resultados sobre la capacidad antioxidante presentes en las especies de *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*, haciendo uso del programa estadístico StatGraphics versión 18, se realizó el análisis para verificar si existe diferencia estadísticamente significativa en la actividad antioxidante exhibida por las especies.

Se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una sola vía, que hace posible determinar si la diferencia que existe entre los datos es suficiente para poder diferenciarlos o relacionarlos entre sí, evaluando la dispersión que existe entre los resultados.

En ANOVA de un factor existen ciertas condiciones a cumplir:

- Sólo se relacionan dos variables: Una variable dependiente y una independiente (factor).

- La variable dependiente es cuantitativa, mientras que la variable independiente es categórica (nominal u ordinal).

#### 3.4.7.4 Prueba F para la diferencia de más de dos medias

Al aplicar ANOVA de un factor, se calculó un estadístico o test denominado F. En el cálculo del estadístico F se divide la variación entre los grupos por la variación dentro de los grupos.

Si las medias entre los grupos varían mucho y la media dentro de un grupo varía poco, es decir, los grupos son heterogéneos entre ellos y similares internamente, el valor F será más alto y, por tanto, las variables estarán relacionadas, lo que significa que las medias de la variable dependiente difieren o varían mucho entre los grupos de la variable independiente.

#### 3.4.7.5 Análisis de datos de actividad antimicrobiano

Con respecto a los datos del análisis antimicrobiano, se realizaron 3 ensayos utilizando los aceites esenciales, cada ensayo con un rango de concentración determinado, en el ensayo 1 se encuentra el rango de concentración más bajo y en el tercero el rango de concentración más alto.

Al llevarse a cabo estos se utilizaron antibióticos de alta pureza como referencias, sus halos de inhibición se compararon con los halos formados por las diluciones de los aceites esenciales, y de esta manera con base a los criterios ya establecidos en fuentes bibliográficas determinar la actividad antimicrobiana de cada aceite esencial.

**CAPITULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADO

### 4.1 VIAJES DE BIOPROSPECCIÓN

Los viajes de bioprospección, tenían por objetivo, la búsqueda de especies vegetales fuente de aceites esenciales en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán. Así, se llevaron a cabo 2 viajes de bioprospección detallados en la Tabla 1, 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.

Tabla N° 1 Viajes de bioprospección realizados en el Departamento de Ahuachapán en 2022. Autoría propia.

Lugar de bioprospección	Fecha del viaje	No. de especies	No. de familias
Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán	10 de febrero 19 de julio	35	27

### 4.2 LISTADO DE ESPECIES VEGETALES IDENTIFICADAS

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. Se registraron el número de especies vegetales y familias botánicas identificadas según Tabla 2:

Tabla N° 2 Listado de especies vegetales observadas en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (10 febrero y 19 julio). Autoría propia.

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>Arachnothyx laniflora</i>

Tabla N° 2 Listado de especies vegetales observadas en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán (10 febrero y 19 julio). Autoría propia. Continuación.

7		Rubiaceae	<i>Rondeletia sp.</i>
8	“Sietío”	Onagraceae	<i>Fuchsia microphylla subsp. Tetractyla</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>
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”	Rutáceas	<i>Zanthoxylum culantrilo</i>
27		Musaceae	<i>Ensete cf ventricosum</i>
28	“Ciprés”	Cupressaceae	<i>Cupressus lusitánica</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>Nentandra martinicensis</i>
34	“Duraznillo”	Rhamnaceae	<i>Frangula capreifolia var. Grandifolia</i>
35	“Campañilla morada”	Convolvulaceae	<i>Ipomoea sp.</i>

#### 4.3 LISTADO DE ESPECIES AROMÁTICAS

De las 35 especies vegetales identificadas, se enlistan 9 especies aromáticas que pueden ser potencialmente estudiadas, presentadas en la Tabla 3.

Tabla N° 3 Listado de especies aromáticas observadas en La Laguna Verde, Municipio de Apaneca, Departamento de Ahuachapán. Autoría propia.

“Cordoncillo”	Verbenaceae	<i>Citharexylum donnell-smithii</i>
“Lima de montaña”	Piperaceae	<i>Piper standleyi</i>
	Lamiaceae	<i>Scutellaria longifolia</i>
	Passifloraceae	<i>Passiflora adenopoda</i>
“Cedro-espino”	Rutaceae	<i>Zanthoxylum culantrilo</i>
“Ciprés”	Cupressaceae	<i>Cupressus lusitánica</i>
“Canelito” “Pimiento”	Lauraceae	<i>Ocotea effusa</i>
“Aguacate de olor”	Lauraceae	<i>Persea americana</i>
“Canelón”	Lauraceae	<i>Nentandra martinicensis</i>

#### 4.4 SELECCIÓN DE LAS ESPECIES AROMÁTICAS PARA ANÁLISIS DE INVESTIGACIÓN

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 y factibilidad para coleccionar las muestras, se seleccionaron 2 especies vegetales *Piper standleyi* “Lima de Montaña” Piperaceae y *Zanthoxylum culantrilo* “Cedro-espino” Rutaceae, para calcular el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales, y determinar de la actividad antioxidante y antimicrobiana, respectivamente.



Figura N° 1 Especies aromáticas seleccionadas para extracción de aceites esenciales. Autoría propia.

#### 4.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*.

Cabe mencionar, que para estandarizar este método Clevenger, se utilizaron 1.04 Kg de hojas frescas de hojas *Citrus x aurantifolia* para obtener de 2.5 mL de aceite esencial.

La extracción y cuantificación de los aceites esenciales por medio del método Clevenger para las especies vegetales *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*, se presentan en la Tabla 4.

Tabla N° 4 Cantidad de aceite esencial extraído en 1Kg de hojas de muestra de las especies vegetales aromáticas seleccionadas. Autoría propia.

Especie vegetal	Aceite esencial extraído (mL)	Porcentaje de rendimiento	Método de extracción
<i>Piper standleyi</i>	0.3	0.03 +/- 0.0023	Aparato Clevenger
<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	0.4	0.07 +/- 0.0069	Aparato Clevenger

Las características de los aceites esenciales obtenidos fueron:

##### *Piper standleyi*

- Insoluble en agua.
- Translucido.
- Olor a cítricos.
- Incoloro al momento de la extracción y durante el tiempo de análisis.

##### *Zanthoxylum culantrilo*

- Insoluble en agua
- Translucido
- Olor a cítricos.
- Incoloro al momento de la extracción y durante el tiempo de análisis.

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. Esta fue colectada en Laguna Verde, Apaneca, generó un rendimiento mayor que otras especies de *Piper* recolectas en la selva del Amazonas en Brasil, su promedio oscilaba entre 0.01 a 0.02 (%v/m) <sup>(14)</sup>.

Con respecto a la especie *Zanthoxylum culantrilo*, al igual que la anterior, esta es la primera vez que se estudia desde el punto de vista fitoquímico. En cuanto al rendimiento de aceite esencial obtenido (0.07%; ver tabla 4), este fue mayor que los reportados para la mayoría de especies de *Zanthoxylum* colectados en Monteverde, Costa Rica (0.0165-0.0475%) a excepción de *Zanthoxylum monophyllum*, presentó un rendimiento mayor (0.0836%) <sup>(13)</sup>.

#### 4.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Piper standleyi* Y *Zanthoxylum culantrilo*

Se presenta el resultado del valor de IC<sub>50</sub> del estándar de referencia el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico conocido como Trolox (Ver tabla 5) y se omitieron las lecturas que no mantuvieron la tendencia de un CV menor al 10%. El resultado fue una curva de calibración promedio de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta (Ver Figura 2).

Tabla N° 5 Concentración, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH. Autoría propia.

Concentraciones (µmol/L)	Promedio	SD	CV
500	0.0549	0.00500377	9.11605688
100	0.4302	0.04137677	9.61753418
50	0.4896	0.04830497	9.86710741
25	0.512	0.04849742	9.47215285
12.5	0.5253	0.04734272	9.01193948
6.25	0.5303	0.04445597	8.3826469
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	68.83	0.3008111	0.43703652

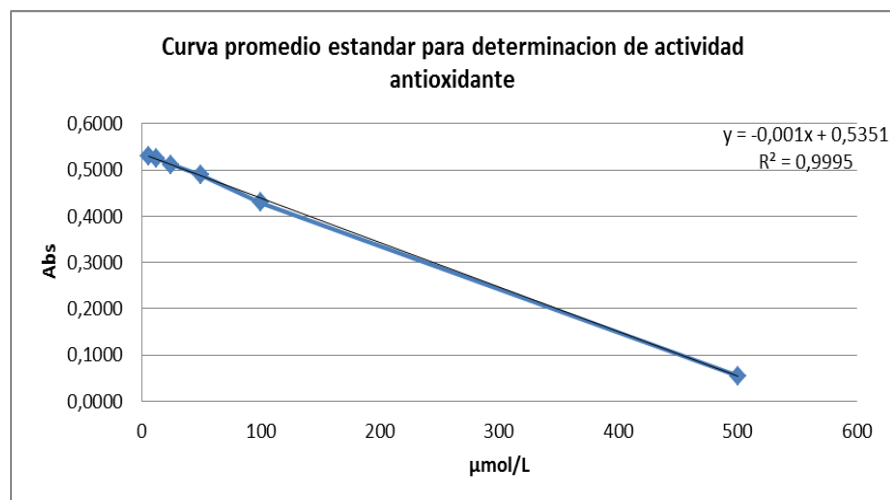


Figura N° 2 Curva de calibración de estándares utilizando Trolox para la determinación de actividad antioxidante. Autoría propia.

Ahora bien, para cada aceite esencial se pesaron 2 muestras de trabajo, y se prepararon 3 soluciones (con concentraciones similares a las utilizadas en la puesta punto del método con el aceite esencial de “Limón”). Y por cada muestra se midió por triplicado la absorbancia de las soluciones preparadas. Luego estos resultados se tabularon y graficaron para obtener el IC<sub>50</sub> en mg/mL, para cada aceite esencial de las especies aromáticas seleccionadas. Para realizar los cálculos de promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación, se utilizó el programa Microsoft Excel 2019. El resultado final se expresó como el promedio de los IC<sub>50</sub> obtenidos para cada uno de los aceites esenciales (Ver Tabla 6)

Tabla N° 6 Resultados de determinación de la actividad antioxidante en aceite esencial de *Piper standleyi*, *Zanthoxylum culantrilo* frente a Trolox. Autoría propia.

Especie	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Trolox	68.83 ± 0.30
<i>Piper standleyi</i>	182.5 ± 1.95
<i>Zanthoxylum culantrilo</i>	45.37 ± 1.01

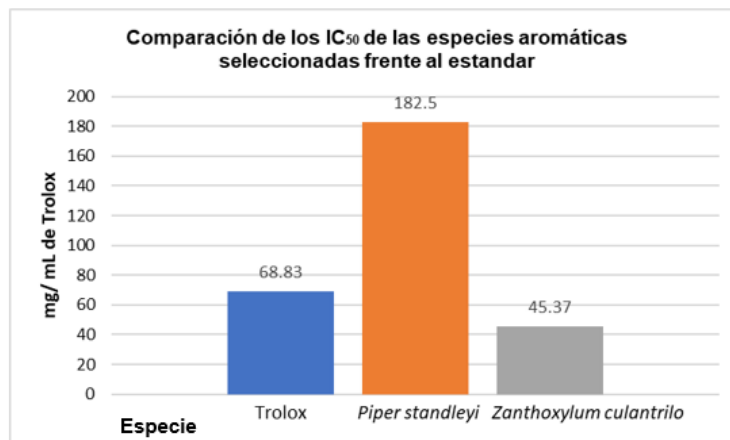


Figura N° 3 Comparación de los IC<sub>50</sub> de las especies vegetales analizadas. Autoría propia.

De los aceites esenciales analizados (Ver Tabla 6), se observa que el aceite de *Zanthoxylum culantrilo* mostró la mayor actividad antioxidante IC<sub>50</sub>=45.37±1.01 mg/mL, el cual representa casi 4 veces más actividad para captar los radicales libres que *Piper standlleyi* (182.5±1.95 mg/mL), incluso presentó mayor actividad antioxidante que el estándar de referencia Trolox (68.830±0.30 mg/mL).

La evaluación de *Piper standleyi* muestra que es la especie menos activa en este estudio, pero si se compara con la capacidad antioxidante de *Piper lineatum* (IC<sub>50</sub> de 0.05 mg/mL) es más activa <sup>(14)</sup> <sup>(23)</sup>.

Será interesante llevar a cabo el análisis de estos aceites esenciales por medio de cromatografía de gases-masas, para determinar la composición química y relacionarla con la actividad antioxidante.

#### 4.6.1 Análisis estadístico

Al comparar los resultados obtenidos durante el ensayo antioxidante con los aceites esenciales de *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo* se observó que no fue necesario realizar un análisis estadístico ANOVA, ya que los resultados no son cercanos entre sí, tanto para ambas especies vegetales, como al comparar las especies vegetales con el estándar de referencia.

#### 4.7 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo*

##### 4.7.1 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 4).

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*)

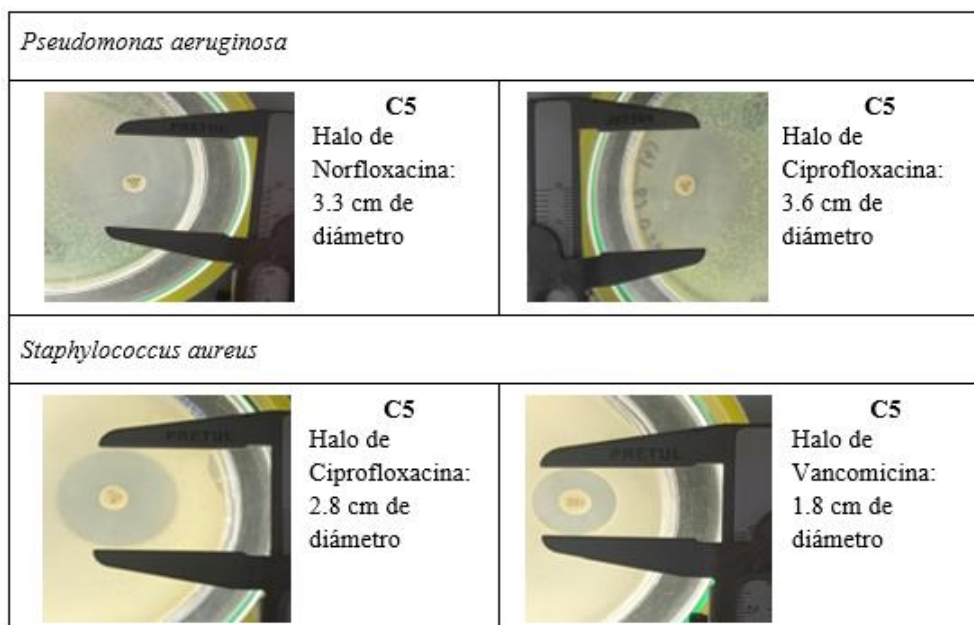


Figura N° 4 Antibióticos utilizados para cada microorganismo y diámetros de los halos de inhibición. Autoría propia.

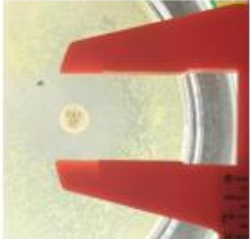
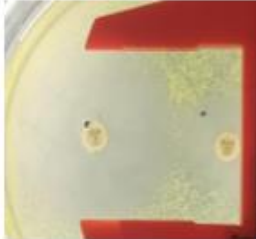
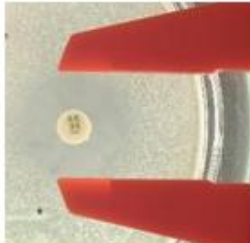
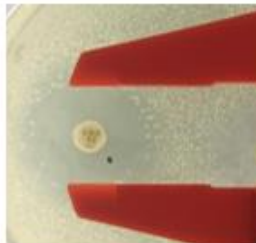
<i>Salmonella enterica</i>	
 <p><b>C5</b> Halo de Trimetoprim sulfametoxazol: 1.8 cm de diámetro</p>	 <p><b>C5</b> Halo de Ciprofloxacin: 3.7 cm de diámetro</p>
<i>Escherichia coli</i>	
 <p><b>C5</b> Halo de Amikacin: 1.9 cm de diámetro</p>	 <p><b>C5</b> Halo de Ceftriaxona: 1.8 cm de diámetro</p>

Figura N° 4 Antibióticos utilizados para cada microorganismo y diámetros de los halos de inhibición. Autoría propia. Continuación.

Como se puede observar en la Figura 4, los halos formados por estos discos, detallan el tamaño del diámetro que se formó, así, frente a *Pseudomonas aeruginosa*, el antibiótico más eficaz fue Ciprofloxacin, con un halo de inhibición de 3.6 cm de diámetro y para Norfloxacin el halo de inhibición fue de 3.3 cm de diámetro. Frente a *Staphylococcus aureus*, el antibiótico más eficaz fue Ciprofloxacin 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 observa (Figura 4) que el antibiótico más eficaz contra *Salmonella enterica* fue Ciprofloxacin, 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 Amikacin, el cual formó el mayor halo de inhibición con 1.9 cm de diámetro y Ceftriaxona con un halo de inhibición de 1.8 cm de diámetro, respectivamente.

4.7.2 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 *Piper 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.

4.7.3 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 *Piper 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 (Ver Figura 5). Las concentraciones de aceite esencial ensayadas fueron:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 5,000  $\mu\text{g/mL}$
- 4,000  $\mu\text{g/mL}$
- 3,000  $\mu\text{g/mL}$
- 2,000  $\mu\text{g/mL}$
- 1,000  $\mu\text{g/mL}$

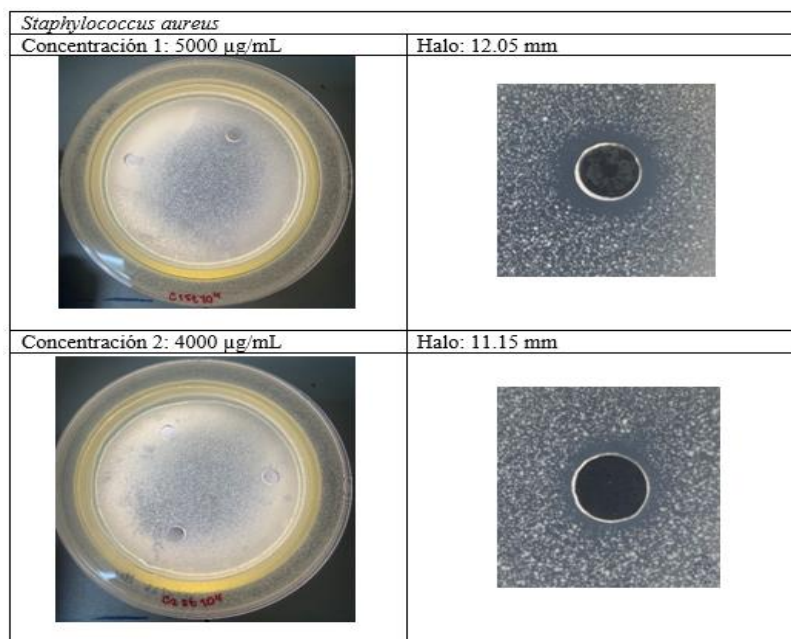


Figura N° 5 Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.  
Autoría propia.

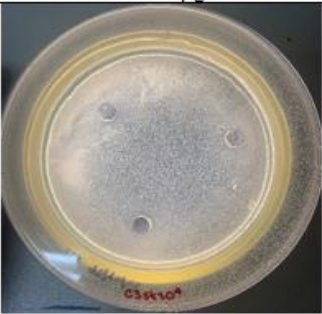

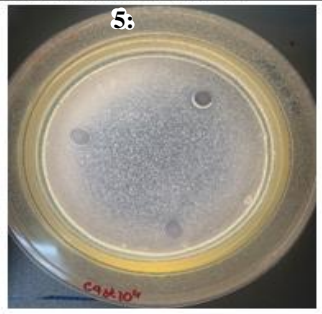
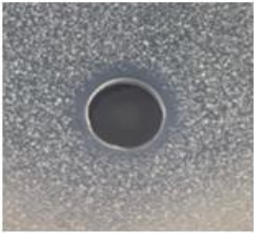
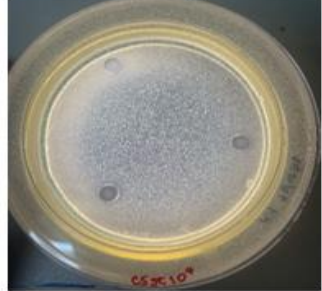

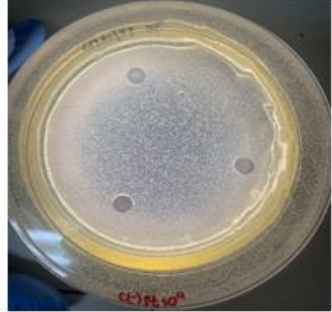
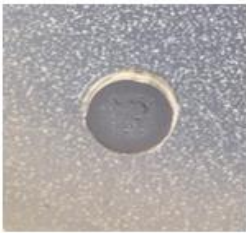
Concentración 3: 3000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 11.2 mm
	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Concentración 4: 2000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 11.1 mm
5: 	
Concentración 2: 1000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 10.1 mm
	
Control Negativo C(-): DMSO 10%	Halo: No hay formación
	

Figura N° 5 Segundo ensayo del aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.  
Autoría propia. Continuación.

En este segundo ensayo solo *Piper standleyi* presentó formación de halos de inhibición sobre *Staphylococcus aureus*, a concentraciones mayores a 1000 µg/mL mientras que *Zanthoxylum culantrilo* fue inactiva en las concentraciones ensayadas.

#### 4.7.4 Tercer 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 *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó con concentraciones más altas:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 10000 µg/mL
- 9000 µg/mL
- 8000 µg/mL
- 7000 µg/mL
- 6000 µg/mL

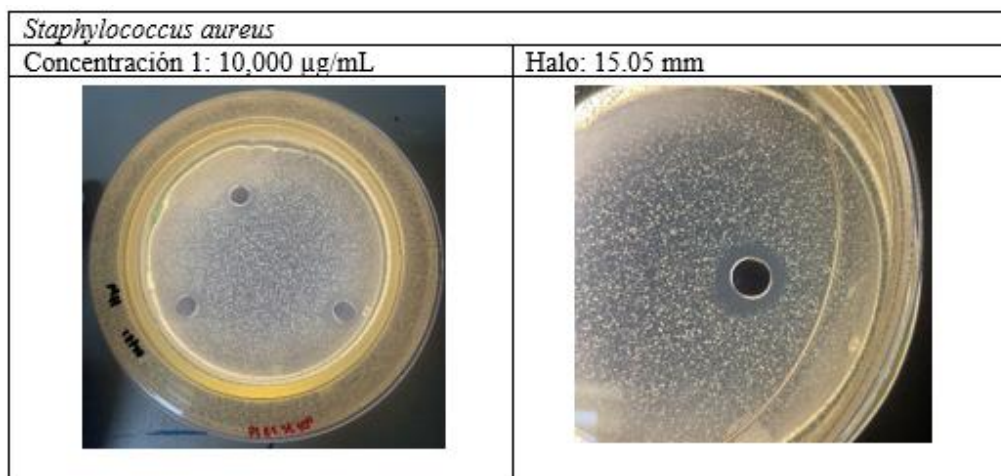


Figura N° 6 Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.  
Autoría propia.

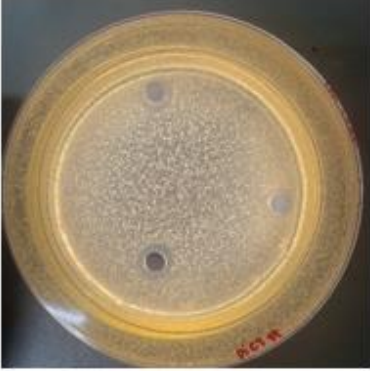

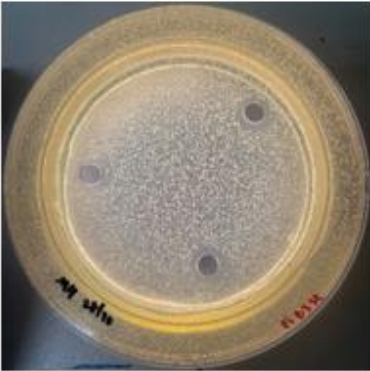
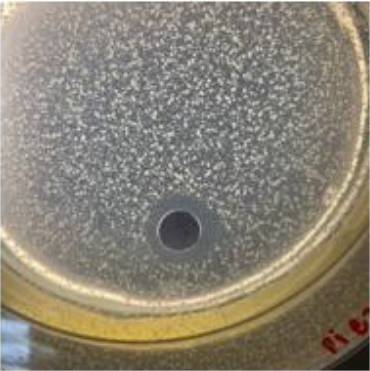
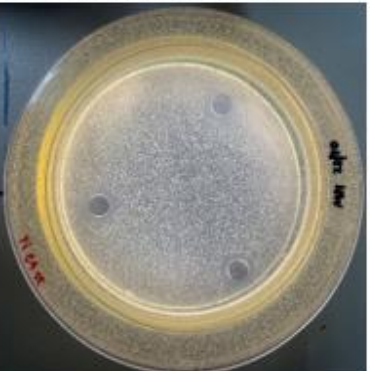
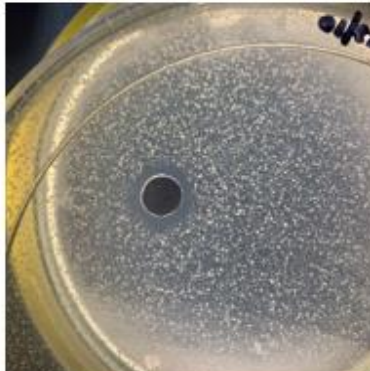
Concentración 2: 9,000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 13.9 mm
	
Concentración 3: 8,000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 12.7 mm
	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Concentración 4: 7,000 $\mu\text{g/mL}$	Halo: 11.9 mm
	

Figura N° 6 Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.  
Autoría Propia. Continuación.

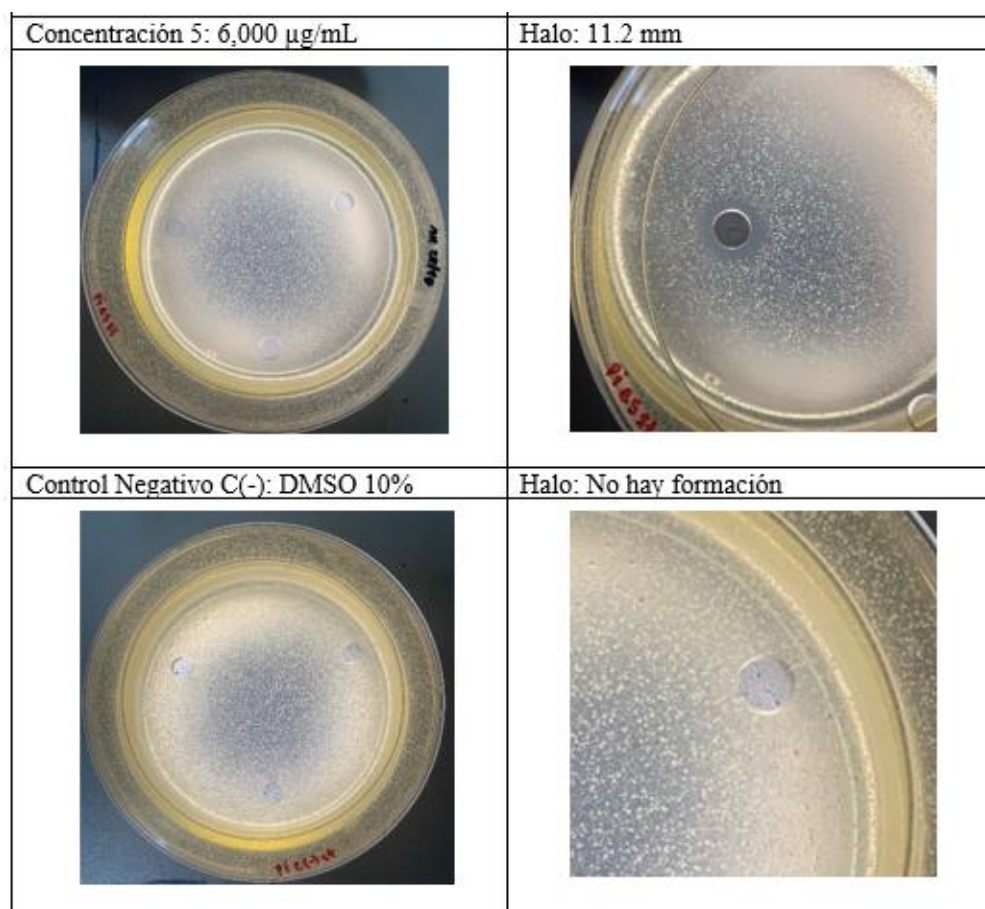


Figura N° 6 Tercer ensayo del aceite esencial de la hoja de *Piper standleyi* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.  
Autoría Propia. Continuación.

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, las cuales son bacterias Gram (-). Por otro lado, *Piper standleyi* presentó formación de halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones altas (primer y segundo ensayo), es decir desde 1,000  $\mu\text{g/mL}$  hasta 10,000  $\mu\text{g/mL}$  en concentraciones ensayadas, sin embargo, el tamaño del diámetro del

halo no es suficiente para afirmar que la bacteria es sensible a este aceite esencial.

4.7.5 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.

4.7.6 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 *Zanthoxylum culantrilo* 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

4.7.7 Tercer 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 *Zanthoxylum culantrilo* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó con concentraciones más altas:

- Control negativo solución de DMSO 10%
- 10000 µg/mL
- 9000 µg/mL
- 8000 µg/mL
- 7000 µg/mL
- 6000 µg/mL

Según los resultados obtenidos, el aceite esencial de la hoja de *Zanthoxylum culantrilo*, no presenta 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. Cabe mencionar que este aceite no se había ensayado previamente en otras

investigaciones, ni en estas concentraciones y con las bacterias mencionadas.

#### 4.7.8 Análisis estadístico

Con respecto al ensayo antimicrobiano los datos obtenidos no sugieren realizar un análisis estadístico ya que con respecto a *Piper standleyi* esta especie sólo fue activa contra un tipo de microorganismo (Ver figura 5 y 6 ) observando esta actividad en solo dos de los tres ensayos realizados.

Por otro lado, *Zanthoxylum culantrilo* no fue activa contra ningún microorganismo de los 3 ensayos realizados.

**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. En los dos viajes de bioprospección que se llevaron a cabo, se identificaron 35 especies vegetales pertenecientes a 27 familias botánicas.
2. De las especies vegetales identificadas en la Laguna Verde, 10 pueden poseer propiedades aromáticas interesantes, según investigación bibliográfica.
3. 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 y factibilidad para coleccionar las muestras, se seleccionaron 2 especies vegetales *Piper standleyi* "Lima de Montaña" Piperaceae y *Zanthoxylum culantrilo* "Cedro-espino" para calcular el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales.
4. La especie vegetal aromática que presentó menor rendimiento aceite esencial fue *Piper standleyi*.
5. La especie vegetal aromática *Zanthoxylum culantrilo*, exhibió mayor capacidad antioxidante en comparación con *Piper standleyi*.
6. *Piper standleyi*, presentó halos de inhibición a concentraciones altas frente a *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram (+), sin embargo, no son significativos para afirmar su efecto antimicrobiano.

**CAPITULO VI**  
**RECOMENDACIONES**

## 6. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a los futuros investigadores mantener las condiciones ambientales controladas en la realización de la prueba antioxidante, debido a la inestabilidad de los reactivos y aceites esenciales, ya que en solución se vuelven más vulnerables al ataque de oxígeno, temperatura y luz en la prueba de antioxidantes.
2. Los docentes e investigadores deben realizar más viajes de bioprospección a La Laguna Verde en búsqueda de nuevas especies vegetales aromáticas fuente de aceites esenciales y así continuar con esta línea de trabajos de investigación.
3. Recomendar a docentes en el área de investigación utilizar el método de extracción de "Hidrodestilación por Clevenger" a nivel de docencia universitaria para la extracción de aceites esenciales.
4. Realizar por otros investigadores el análisis de cromatografía de gases-masas a ambos aceites obtenidos, para determinar su composición química y relacionarlos con los resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation: Bioactivities and applications of essential oils. J Food Sci [Internet]. 2014;79(7):R1231-49. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
2. Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. J Agric Food Chem [Internet]. 2006;54(12):4364–70. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0603329>
3. Farmacopea Estadounidense USP 34 NF 39. Determinación de aceites volátiles Clevenger. 2009; 34(1):196-7.
4. Barrnce A, Beer J, Boshier DH, Chamberlain J, Cordero J, Detlefson G, et al. Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Oxford Forestry Institute. 2003;14.
5. Halliewll B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. J Exp Pathol. 1989; 70(6):737-57.

6. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005; 53(6):1841-56. <http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c>
7. Khan AL, Khan H, Hussain J, Adnan M, Hussain I, Khan T, et al. Sesquiterpenes: The potent antioxidants. *J Sci Ind Res* [Internet] 2008; 51(6):343-50
8. Coronado M, Salvador H, León R, Gutiérrez T, Marcela Vázquez F, Claudia RV, et al. Antioxidants: Present perspective for the human health [Internet]. Conicyt.cl. [citado 29 de mayo de 2022]. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/v42n2/art14.pdf>
9. Boire NA, Stefan R, Nicole P. Essential oils and future antibiotics: new weapons against emerging superbugs. *J Anc Dis Prev Rem.* 2013; 1-5
10. Rivera JRG, Crondall CA, Essential oils as antimicrobials in food systems. *J Food Control.* 54:1-34.
11. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils. *J Food Chem Toxicol.* 2008; 1-30.
12. Magoni C, Bruni I, Guzzetty L. Sangiovanni E. Dell`agil M, Massimo L. Coffee pulp waste as a source of antioxidant phytocomplexes. 2015.

13. Durango, H.G. Composición química y actividades biológicas del género *Zanthoxylum*, Una revisión (Tesis de grado), Universidad de Córdoba, Colombia. 2012. Recuperado de: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/3911>
14. Vázquez, J. 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. (2012).
15. Miller AB, Cates RG, Johnson LA, O'Neill KL. Antimicrobial and anticancer activity of essential oils from Guatemalan medicinal plants [Internet]. Byu.edu. 2010 [cited 2022 Nov 18]. <https://scholarsarchive.byu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3410&context=etd>
16. Samol V, Santizo C, Caceres A. Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. Rev cient [Internet]. 2011;21(2):34–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.54495/rev.cientifica.v21i2.130>

17. Zahra G, Khadijeh B, Hossein D, Ali S. Essential oil composition of two *Scutellaria* species from Iran. *J Tradit Chin Med Sci* [Internet]. 2019;6(3):244–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcms.2019.07.003>
18. Chóez-Guaranda I, Ortega A, Miranda M, Manzano P. CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF *PASSIFLORA EDULIS* F. *FLAVICARPA* AGROINDUSTRIAL WASTE. *Emir J Food Agric* [Internet]. 2017;458. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2016-10-1542>
19. Simionatto E, Porto C, Dalcol II, da Silva UF, Morel AF. Essential oil from *Zanthoxylum hyemale*. *Planta Med* [Internet]. 2005;71(8):759–63. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-864184>
20. Nteziyaremye P, Cherutoi J, Makatiani J, Muhizi T. Variation of yield and chemical composition of essential oil from *Cupressus lusitanica* growing in different Agro-ecological zones of Rwanda. *Asian Journal of Applied Chemistry Research* [Internet]. 2021; 42–56. <http://dx.doi.org/10.9734/ajacr/2021/v9i230212>
21. Takaku S, Haber WA, Setzer WN. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2007; 35(8):525–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.02.003>

22. Nasri C, Halabi Y, Aghzaf S, Nounah I, Brunel M, Oubihi A, et al. Seven *Persea americana* varieties essential oils comparison: Chemical composition, toxicity, antibacterial, and antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2022;44(102468):102468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102468>

23. De Morais SM, Facundo VA, Bertini LM, Cavalcanti ESB, Anjos Júnior JF dos, Ferreira SA, et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2007;35(10):670–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>

## **ANEXOS**

## **ANEXO**

Tablas con resultados de *Piper standleyi* y *Zanthoxylum culantrilo* de la determinación de la actividad antioxidante.

Tabla N° 1 Resultados de determinación de la actividad antioxidante en *Piper standleyi*. Autoría propia.

Muestra 1						
Cmx	1	2	3	Promedio	SD	CV
25	0.464	0.458	0.461	0.461	0.013	2.780
20	0.474	0.459	0.470	0.469	0.006	1.313
15	0.478	0.469	0.475	0.476	0.020	4.237
IC50 (mg/mL)	172.5	205.0	170.140	182.5	1.950	10.671
Muestra 2						
25	0.466	0.431	0.458	0.452	0.018	4.060
20	0.471	0.474	0.463	0.469	0.006	1.211
15	0.508	0.517	0.475	0.500	0.022	4.422
IC50 (mg/mL)	134.7	75.12	141.65	117.15	36.59	31.215

Tabla N°2. Resultados de determinación de la actividad antioxidante en *Zanthoxylum culantrilo*. Autoría propia.

Muestra 1						
Cmx	1	2	3	Promedio	SD	CV
25	0.474	0.483	0.473	0.477	0.005	0.964
20	0.515	0.518	0.526	0.520	0.005	0.969
15	0.558	0.566	0.592	0.572	0.014	2.447
IC50 (mg/mL)	42.06	44.13	37.34	41.51	3.65	8.797
Muestra 2						
25	0.480	0.477	0.484	0.480	0.0004	0.7311
20	0.526	0.525	0.517	0.522	0.0049	0.9434
15	0.555	0.555	0.566	0.558	0.0063	1.136
IC50 (mg/mL)	46.440	45.26	44.48	45.37	1.011	2.229