

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD
DEL CUSCO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



**“COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Ambrosia arborescens* Miller (Marku)”.**

TESIS PRESENTADA POR:

Bachiller Jessica Zaida Marín Villa.

Para optar al título profesional de Químico.

ASESOR: Dr. Leoncio Solís Quispe.

Cusco – Perú

2019

DEDICATORIA

A dios por siempre sostener mi mano, guiándome para cumplir metas y sueños, y por permitirme culminar esta etapa.

A mi madre, Sinforosa por ser luz en mi vida, por su infinito amor, comprensión y esfuerzo, por enseñarme a luchar hasta el final.

A mis hermanas, Tania, Shanda, Lusbia y Luz clarita, por su cariño y constante amor.

A mi abuelita Amalia que fue el pilar fundamental en mi vida quien siempre creyó en mí y en lo que puedo hacer.

A mi amorcito Ángelo por haber estado en mi lado brindándome su compañía y apoyo incondicional.

A mi amiga Estefani, por su cariño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por darme la salud, fuerza y perseverancia; por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarme cada día más.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por permitirme cumplir con esta oportunidad, asimismo a mis profesores de la escuela profesional de Química a la Dr. Celina Luizar Obregon, Mgt. Yolanda Callo Choquevilca y al Dr. Dino Quispe Guzman.

Un agradecimiento especial al Dr. Leoncio Solís Quispe, por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente tesis, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitió en el desarrollo de mi formación profesional.

Al Mgt. Ciro Tomaylla Cruz , por su ayuda y colaboración y haberme guiado el desarrollo de este trabajo.

A los Dictaminantes del trabajo de tesis, Mgt. Carmen Sonia Alosilla Robles y Mgt. Aura Natalia Centeno Loaiza, por todas las correcciones y exigencias, que permitieron darle la forma final y el contenido adecuado al presente trabajo.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

INDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	iii

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.3. OBJETIVOS.....	1
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	1
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1
1.4. HIPÓTESIS	2
1.5. VARIABLES.....	2
1.6. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	2

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.2. BASES TEÓRICAS	7
2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA DE <i>Ambrosia arborescens</i> MILLER.....	7
2.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	8
2.3. ACEITES ESENCIALES.....	9
2.3.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES.....	13
ESENCIAES	
2.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	14
2.4. ESPECTROSCOPIA UV.....	17
2.5. CROMATOGRAFÍA.....	17
2.5.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	19
2.5.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).....	22
2.6. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	24
2.7. ANTIOXIDANTE	25

CAPITULO III

METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	30
3.2. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.....	30
3.3. MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	31
3.4. MUESTREO.....	33
3.4.1. COLECCIÓN DE MUESTRA.....	33
3.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	33
3.5. EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL.....	34
3.6. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS.....	36
3.7. DETERMINACIÓN ESPECTROSCOPIA UV.....	39
3.8. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	40
3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH°.....	41
(1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	44
4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL.....	45
4.3. SOLUBILIDAD.....	46
4.4. ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	47
4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL.....	48
4.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH° (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de los métodos cromatográficos	19
Tabla 2	Porcentaje de extracción del aceite esencial	44
Tabla 3	Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales	45
Tabla 4	Solubilidad del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	46
Tabla 5	Composición química del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	49
Tabla 6	Composición mayoritaria del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	53
Tabla 7	Absorbancias para el estándar de referencia de Trolox	54

Tabla 8	% de inhibición de cada concentración del estándar de referencia de Trolox	55
Tabla 9	Resultados de absorbancias del DPPH° (1,1-difenil-2-picrihidrazil) con el aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	56
Tabla 10	% de inhibición del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	9
Figura 2	Ejemplos de monoterpenos	10
Figura 3	Ejemplos de sesquiterpenos	12
Figura 4	Ejemplos de fenilpropanos	13
Figura 5	Esquemas de un cromatógrafo de gases	22
Figura 6	Esquema de un espectrómetro de masas	24
Figura 7	Reacción del antioxidante con el radical DPPH°	28
Figura 8	Reacción de transferencia de electrones del compuesto DPPH°	29
Figura 9	Procedimiento metodológico del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	30
Figura 10	Esquema de extracción del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	34
Figura 11	Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger	35
Figura 12	Espectrofotometría UV-Vis de aceite esencial <i>Ambrosia arborescens</i> Miller en etanol absoluto	47
Figura 13	Cromatograma GC-MS del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	48
Figura 14	Curva de calibrado de Trolox	55
Figura 15	Relación lineal entre disolución del aceite y el % de Inhibición	56
Figura 16	Muestreo de la especie de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	71
Figura 17	Preparando la muestra para extraer aceite esencial	71
Figura 18	Obtención del aceite esencial por Hidrodestilación con trampa de Clevenger	72

Figura 19	Prueba de solubilidad del aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	72
Figura 20	Resultados de pruebas de solubilidad del aceite esencial	73
Figura 21	Reactivos para determinar el índice de acidez (I.A)	73
Figura 22	Titulación para determinar el índice de acidez (I.A)	74
Figura 23	Reactivos para determinar el índice de saponificación (I.S)	74
Figura 24	Reflujo del aceite esencial con etanol por 40 minutos	75
Figura 25	Titulación del índice de saponificación (I.S)	75
Figura 26	Viraje de rojo sangre a amarillo precipitado del índice de saponificación (I.S)	76
Figura 27	Espectrofotómetro UV, Termo SCIENTIFIC, Evolution 220	76
Figura 28	Preparación del aceite esencial para la corrida en cromatografía de gases	77
Figura 29	Lectura de la composición química del aceite esencial <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	77
Figura 30	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, Termo scientific, Trace 1310, ISQ QD	78
Figura 31	Reactivos para la determinación de la actividad antioxidante	79
Figura 32	Preparación de los reactivos para determinar la actividad antioxidante	79
Figura 33	Disolución del patrón de referencia de Trolox	80
Figura 34	Preparación del radical DPPH° (1,1-difenil-2-picrihidrazil)	80
Figura 35	Radical DPPH° con el patrón de referencia Trolox	81
Figura 36	Radical DPPH° con aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i> Miller	81
Figura 37	Equipo para la determinación del método DPPH° (1,1-difenil-2-picrihidrazil)	82
Figura 38	Lectura del estándar de referencia y el aceite con el método DPPH°	82

Figura 39 Masa Iónica del compuesto β -himachaleno	87
Figura 40 Masa Iónica del compuesto 2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol	87
Figura 41 Masa Iónica del compuesto germacreno D	88
Figura 42 Masa Iónica del compuesto α -bisabolol	88
Figura 43 Masa Iónica del compuesto 6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno-2-ol	89

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la composición química, características fisicoquímicas y la actividad antioxidante del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller procedente de la comunidad de Ccorao del distrito de Santiago, Cusco – Perú.

La extracción del aceite esencial, se realizó de las hojas tiernas frescas de *Ambrosia arborescens* Miller por el método de hidrodestilación con trampa de cleveger. El aceite esencial fue caracterizado por sus propiedades fisicoquímicas, su composición fue determinada por cromatografía de gases - espectrometría de masas y para la determinación de la actividad antioxidante se aplicó el método del DPPH' (1,1- difenil-2- picrilhidrazil).

El porcentaje de extracción del aceite esencial obtenido de la especie *Ambrosia arborescens* Miller, fue de 0,17 %. En su composición de la especie *Ambrosia arborescens* Miller, se identificó 94 componentes, siendo los mas abundantes el β -himachaleno (14,2%), 2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol (10,6%), germacreno D (7,41 %), α -Bisabolol (6,25%) y 6-isopropenil-4-8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno-2-ol (6%) de *Ambrosia arborescens* Miller, presenta una IC₅₀ de 0.000211 mg/ml y 389,86 μ mol Trolox/g de aceite.

El aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller presenta actividad antioxidante por tener en su composición compuestos polifenolicos con propiedades antioxidantes.

Los resultados obtenidos sustentan la posibilidad de uso de este aceite esencial como actividad antioxidante.

Palabras clave: Aceites esenciales, *Ambrosia arborescens* Miller, cromatografía de gases, actividad antioxidante.

SUMMARY

In the present investigation the chemical composition, physicochemical characteristics and the antioxidant activity of the essential oil of *Ambrosia arborescens* Miller coming from the community of Ccorao of the district of Santiago, Cusco - Peru were determined.

The extract of the essential oil was made from the fresh tender leaves of *Ambrosia arborescens* Miller by the method of hydrodistillation with clewenger trap. The essential oil was characterized by its physicochemical properties, its composition was determined by gas chromatography - mass spectrometry and for the determination of the antioxidant activity the DPPH method was applied (1,1- diphenyl-2-picrilhydrazil).

The extraction percentage of the essential oil obtained from the *Ambrosia arborescens* Miller species was 0.17%. In its composition of the species *Ambrosia arborescens* Miller, 94 components were identified, the most abundant being β -himachalen (14.2%), 2,6-dimethyl-3,5-heptadien-2-ol (10.6%), germacrene D (7.41%), α -Bisabolol (6.25%) and 6-isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalene -2-ol (6%) of *Ambrosia arborescens* Miller, presents an IC50 of 0.000211 mg / ml and 389.86 μ mol Trolox / g of oil.

The essential oil of *Ambrosia arborescens* Miller presents antioxidant activity by having in its composition polyphenolic compounds with antioxidant properties.

The results obtained support the possibility of using this essential oil as an antioxidant activity.

Key words: Essential oils, *Ambrosia arborescens* Miller, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

La buena salud y el control de enfermedades ha sido siempre una de las principales preocupaciones para la humanidad desde los tiempos iniciales. Por ello se han venido utilizando diversos recursos que van desde los materiales que nos ofrece la naturaleza hasta los meramente psíquicos rodeados de misticismo. Entre los primeros destacan las plantas que no solo nos ofrece el alimento diario sino también como remedios contra enfermedades de todo tipo; y aun cuando la ciencia y tecnología ha evolucionado mucho en el procesamiento de los elementos curativos de las plantas, todavía existe una práctica extendida de uso de manera directa, especialmente en las sociedades del tercer mundo. (Córdova, 2009)

Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud humana. Las plantas y árboles empleados son la base para el desarrollo de la medicina moderna, y en algunas zonas rurales e indígenas, son el único recurso del que disponen a falta de instituciones médicas y recursos monetarios para la adquisición de medicina moderna. (Escamilla y Moreno, 2015)

Sin embargo, las especies vegetales empleadas en la medicina se han modificado a la par de los ecosistemas. En años anteriores las especies utilizadas eran solo nativas, actualmente también se emplean algunas introducidas. Asimismo las especies de amplia distribución en el país son empleadas en gran medida, por lo que los beneficios son diversos y de gran importancia. (Escamilla y Moreno, 2015)

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción en condiciones ambientales generalmente son líquidos y rara vez sólido o pastosos, generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 compuestos, la mayoría de los cuales se pueden clasificar en la serie Terpénica y Arénica. (Moya, 2017)

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente la importancia del estudio de los aceites esenciales radica fundamentalmente, en su potencial de utilización como antioxidante, como alternativa de reemplazo a los productos químicos que causan toxicidad, generando efectos negativos en los seres humanos por su alta capacidad de bioacumulación y su poder residual prolongado.

La especie nativa *Ambrosia arborescens* Miller, es utilizada en una serie de dolencias como: dolor de cabeza, migrañas, reumatismo, fiebre, cólicos menstruales, dolores de parto, fracturas y lesiones.

En la revisión bibliográfica para el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, procedente de la comunidad de Ccorao del distrito de San Sebastián - Cusco, no se reporta estudios de la composición química y la actividad antioxidante, razón por la cual se plantea el desarrollo de la presente investigación.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller (Marku)?

OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial de la especie *Ambrosia arborescens* Miller (Marku), procedente de la comunidad de Ccorao del distrito de San Sebastián - Cusco.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar el porcentaje de extracción del aceite esencial de la especie *Ambrosia arborescens* Miller (Marku) por hidrodestilación con trampa de Clevenger.

2. Determinar las características fisicoquímicas del aceite esencial por métodos y técnicas estandarizadas.
3. Determinar la composición química del aceite esencial de la especie *Ambrosia arborescens* Miller (Marku), por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG/EM).
4. Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de la especie *Ambrosia arborescens* Miller (Marku).

1.4. HIPÓTESIS

El aceite esencial de la especie *Ambrosia arborescens* Miller (Marku), procedente de la comunidad de Ccorao del distrito de San Sebastián - Cusco, en su composición química contiene monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos con posible actividad antioxidante.

1.5. VARIABLES

Variable Independiente:

Composición del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller (Marku).

Variable Dependiente:

Actividad antioxidante del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller (Marku).

1.6. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Esta investigación servirá de apoyo fundamental para que los pobladores de esta comunidad puedan dar un uso adecuado a las plantas medicinales como medicina complementaria, de igual forma será un aporte para la comunidad científica de la región de Cusco y del país.

El estudio de la composición química y la actividad antioxidante de esta especie, se realiza con el objetivo de conocer el potencial medicinal y relacionar con la composición del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller (Marku) procedente de la comunidad de Ccorao del distrito de San Sebastián - Cusco.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

- Alvarado (2017) estudió la flora de la Cordillera Negra, con el objetivo de determinar la actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra en laboratorios de la Facultad de Ciencias biológicas, Medicina Farmacia y Bioquímica. Experimentalmente (actividad antioxidante a 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y actividad citotóxica 166 y 333 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

La actividad antioxidante a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dio el 74.29% de captación de radicales libres (CRL) del total de las especies, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue el 14.28% de captación de radicales libres y a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo el 5.71% captación de radicales libres.

El IC50 se pudo realizar a *Lepchenia Meyeni* (Walp) Epling. (Tecuar), *Echeveria chichlensis* (Ball) A. Berger. (Lengua de perro), *Oenothera rosea* L Hér. Ex Aiton. (Santa lucia) y *Alnus acuminata* Kunth. (Aliso), por presentar mayor capacidad de radicales libres. La actividad citotóxica haciendo uso de los huevos fértiles de erizo de mar por efecto de los 35 extractos a las 24 horas a 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó 28.57% mortalidad y a 333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó 40% mortalidad. A las 48 horas en la concentración de 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se apreció 28.57% mortalidad y a 333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se encontró 42.85% mortalidad.

- Echavarría *et al.* (2016) evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de dieciséis plantas medicinales: escoba amarga (*Parthenium hysterophons*), guarumo (*Cecropia obtusifolia*), ajeno (*Artemisia absinthium*), chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linaza (*Linum usitatissimum*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*) guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia*

cumanensis), diente de león (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) y moringa (*Moringa oleifera*). Para ello se usó el método DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil); asimismo realizo ensayos de reconocimiento de metabolitos secundarios a fin de obtener los primeros indicios de compuestos de interés fitoquímico.

La actividad captadora de radicales libres de los extractos se expresó como valor de IC₅₀ (µg/mL) (cantidad necesaria para inhibir la formación de radicales DPPH en un 50%).

La mayoría de las muestras evaluadas mostraron buena capacidad antioxidante con este método (DPPH), los ensayos de los extractos hidro-alcohólicos demostraron que la alcachofa (IC₅₀ 9,89 µg/mL), moringa (IC₅₀ 11,4 µg/mL) y borraja (IC₅₀ 14,0 µg/mL) representaron mayor capacidad antioxidante.

- Gallego (2016) analizó plantas aromáticas (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lavandula officinalis*) y otros tipos de plantas (*Caesalpinia decapetala*, *spinosa*, *Morinda citrifolia* (Noni)), analizando los polifenoles totales por Folin-Ciocalteu, la actividad antiradicalaria mediante métodos de TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) y FRAP (capacidad antioxidante total del plasma), se han identificado los compuestos polifenólicos por HPLC (DAD y MS/MS) de cada uno de los extractos de las plantas, obtenidos a partir con una extracción sólido-líquida con etanol 50% como solvente, bajo condiciones de refrigeración a 4°C, durante 24 h.

De los extractos evaluados el de Tara ha presentado la mayor actividad antiradicalaria, con un valor frente al ensayo ORAC de 2 mmolesTE/g peso seco y el Noni la menor actividad con 0.02 mmoles TE/g peso seco.

- Gaitán (2009) evaluó la actividad antioxidante de cinco especies vegetales popularmente usadas para afecciones nerviosas: *Brugmansia candida* Pers. (florifundia), *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. (manita), *Erythrina berteroana*

Urb. (palo de pito), *Ternstroemia tepezapote* Schlect. (tila) y *Wigandia urens*. (Ruiz), Gibson. (chocón). La determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las cinco especies se evaluó por el método de referencia basado en la oxidación del reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

En una primera fase, todos los extractos presentaron actividad antioxidante por la prueba de DPPH, siendo las especies *Chiranthodendron pentadactylon* y *Brugmansia candida* las de mayor actividad.

En la segunda fase se montó el método y determinó de forma cualitativa la actividad antioxidante. Este método utiliza como reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolio). Con esta metodología se evidenció la actividad antioxidante en cuatro especies (*Brugmansia candida*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Erythrina berteroana* y *ternstroemia tepezapote*).

Por último se pretendió estandarizó la metodología de MTT como una técnica cuantitativa, se buscó evaluar sus ventajas y desventajas sobre el método de referencia que utiliza DPPH. El método se estandarizó utilizando ácido gálico como antioxidante de referencia y llevando a cabo curvas de calibración con diluciones a partir de una concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, se encontró que la curva de medición pierde linealidad a diluciones altas de ácido gálico, ya que la coloración desaparece, dando lugar a una interpretación errónea a altas concentraciones.

- Moya (2017) estudio los extractos acuosos, hidroalcohólicos (50:50) y etanólicos de las hojas de *Ambrosia arborescens* Miller (Marco) y *Buddleja incana* Ruiz (Quishuar), donde sometió a pruebas *in vitro* para la determinación de las actividades biológicas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica. La determinación de la actividad antioxidante se basó en el método de quimioluminiscencia en el cuál el mejor tratamiento que presentó gran capacidad antioxidante fue el extracto hidroalcohólico

(50:50) de Quishuar 180629,19 \pm 293,40 μ g ácido gálico/g extracto. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el método de estabilización de membrana de los eritrocitos humanos, el extracto etanólico de Marco tuvo 88,57 % de capacidad antiinflamatoria, en comparación con el antiinflamatorio testigo utilizado aspirina, 87,66 %. La capacidad citotóxica se determinó mediante el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio), utilizando células MCF-7. El extracto capaz de inducir a una apoptosis celular fue el extracto etanólico de Marco ya que en el ensayo se evidenció un índice de concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) de 0,0043 mg/mL lo que indica que con esa mínima cantidad la toxicidad del extracto fue letal en las células.

- Ruiz *et al.* (2015) determinaron la composición química de 10 aceites esenciales de plantas peruanas por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con el objetivo de encontrar aceites esenciales que puedan ser usados como atrayentes o repelentes de *Thrips tabaci*, plaga que afecta al espárrago.

En el presente trabajo se estudió la composición química de los aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas: *Jungia paniculata*. (DC.) A. Gray, *Piper hispidum* SW., *Ambrosia arborescens* Mill., *Ambrosia peruviana* Willd., *Luma chequen* (Feuillée ex Molina) A. Gray., *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epl., *Ruta chalepensis* L., *Ruta graveolens* L., *Aristolochia silvatica* Barb. Rod.

- Yáñez *et al.* (2011) determinó la composición química del aceite esencial obtenido de las hojas de *Ambrosia peruviana* Willd recolectada en Guasdualito, Estado Apure de Venezuela. Los compuestos volátiles se aislaron por hidrodestilación en una trampa de Clevenger y posteriormente se realizó el análisis cualitativo-cuantitativo a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), en un equipo HP GC-MS System, modelo 5973, encontrando como compuestos mayoritarios al gamma-

curcumeno (23,99%), seguido de α -curcumeno (14,08%), acetato de bornilo (10,35%), camfor (5,03%) y epóxido de oximene (4,79%). La actividad antibacteriana del aceite esencial realizada por el método de difusión en agar con discos frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostró actividad contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, y *S. Typhi*, con valores de CIM de 350–500 $\mu\text{g/ mL}$.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA DE *Ambrosia arborescens* MILLER

La especie fue identificado en el Herbario Vargas, de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por el Magister Alfredo Tupayachi Herrera, en el año 2018.

Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Magnoliidae
Superorden	: Asteranae
Orden	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Género	: <i>Ambrosia</i>
Especie	: <i>Ambrosia arborescens</i> Miller

Sinonimias: *Ambrosia artemisioides* Wild., *A. frutescens* Lam., *A. fruticosa* Medik
Franseria artemisioides Wild., *F. conwayi* Rusby, *Gaertneria artemisioides* (Wild.)
 Kuntze, *Xanthium artemisioides* (Willd.) Delpino, *Xanthium fruticosum* L.f.

Nombres comunes: “Marcju”, “Marku”, “Marju”, “Altamisa”, “Artemisa”.

2.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto verde de 0.5 a 3 metros de altura; toda la planta con glándulas aromáticas. (Ibarra, 2013) Muy abundante, a veces considerado como una mala hierba. (Mendoza, 2016)

Poseen hojas alternas, pinantidisectas lanceoladas de 10 a 24 cm de largo por 7 a 20 cm de ancho, flores masculinas y femeninas de color amarillo de 15 a 30 cm de longitud en cabezuelas separadas a menudo en la misma planta. (Cano de terrones, 2014)

Flores masculinas modificadas, cáliz o vilano ausente, corola hialina, campanulada, 5-lobulada; estambres 5 alternado con lóbulos de la corola; pistilodio reducido.

Flores femeninas reducidas, perianto ausente, androceo ausente; ovario maduro obovado, estilo corto, estigma lobulado, superficies estigmáticas papilosas, exertas a través de los ápices espinosos del involucre. (F. Mendoza, 2016)

Fruto: aquenio de forma ovoidea, rodeado por cuatro prominencias en punta, mide 3 mm de altura y 6 mm de diámetro. (F. Mendoza, 2016). Se encuentra bajo la forma de matorrales en los bordes de los caminos, carreteras, cerca de las riberas de los ríos y fuentes de agua, bordeando cultivos, huertos y canales de regadío. (Vera, 2008). Se adapta a diferentes tipos de suelos, soporta helada y sequías, crece desde los 2000 hasta 3500 m de altitud. (Cano de terrones, 2014)



Figura 1. Hojas de *Ambrosia arborescens* Miller

2.3. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. (Martínez, 2003)

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como derivados oxigenados; alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. (Domínguez, 1979)

Molecularmente los aceites esenciales son mezclas complejas de hasta más de 200 componentes, constituidas mayoritariamente por monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. (Lock de Ugaz, 1994)

I. Monoterpenos

Los monoterpenos ($C_{10}H_x$) junto al isopreno son los compuestos orgánicos volátiles que dominan las emisiones a escala global y son miembros importantes de la familia de los isoprenoides (o terpenoides). Estos compuestos normalmente se pueden almacenar

en órganos especializados de las hojas y tallos, lo que contribuye a que parte del carbono que se ha producido en los tejidos vegetales mediante diversos procesos fisiológicos retorne hacia la atmósfera. Esta emisión es producida principalmente por la difusión, debido a un gradiente de presión de vapor desde los compartimentos celulares con concentraciones relativamente altas hacia el aire circundante a las hojas. (Bolaño, 2015)

La mezcla de monoterpenos, poseen actividades antibacterianas y antifúngicas. (Palacios, 2013)

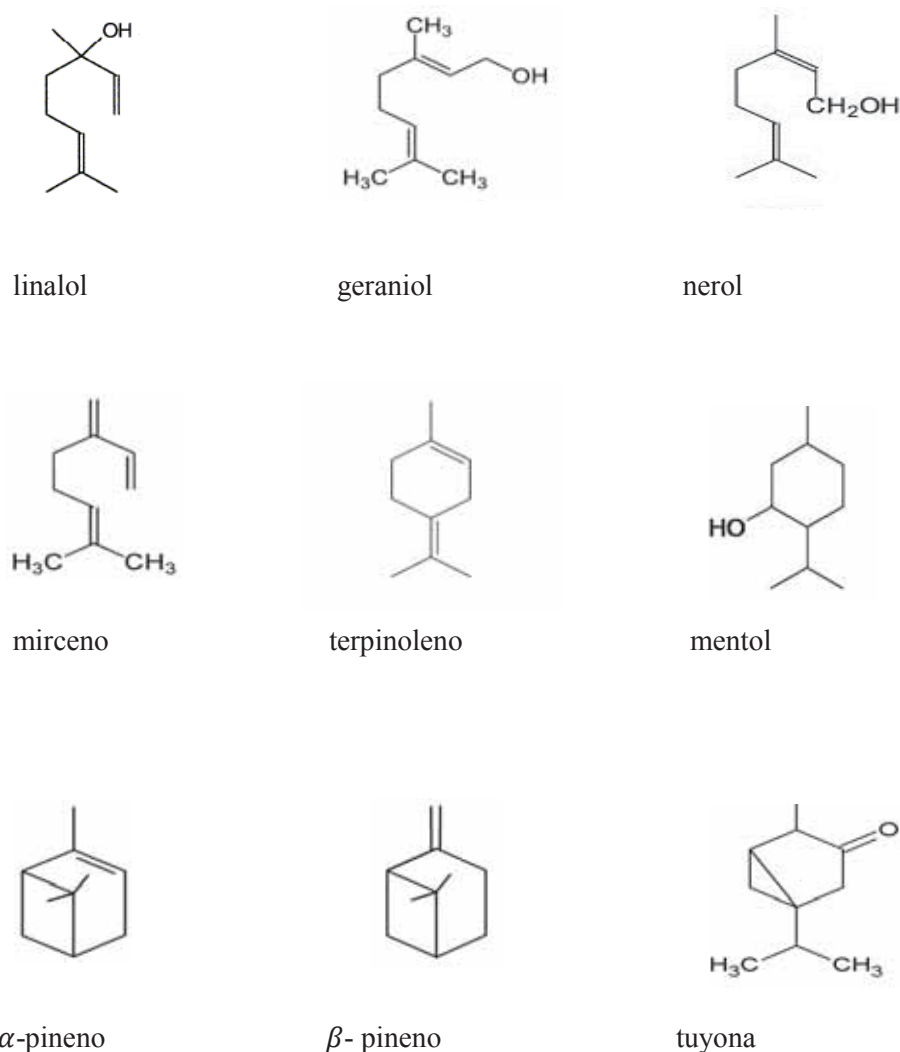


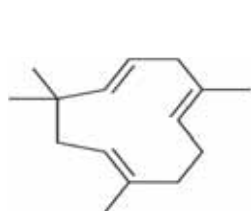
Figura 2. Ejemplos de monoterpenos (Solís, 2018)

II. Sesquiterpenos

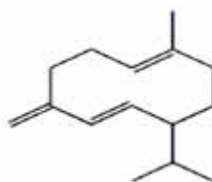
Los sesquiterpenos son compuestos que contienen al menos un grupo carbonilo conjugado, los cuales funcionan como agentes alquilantes. (Palacios, 2013)

Se cree que la actividad citotóxica de ellos radica en su capacidad de formar enlaces covalentes entre los grupos $O=C-C=CH_2$ de los sesquiterpenos y a los grupos sulhidrilos de algunas enzimas como la DNA polimerasa, timidilasa, fosfofructoquinasa y glicógeno sintetasa ocasionando la inhibición de la síntesis de DNA en las células cancerígenas. (Palacios, 2013)

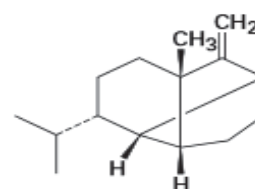
El estrés oxidativa, es uno de los tantos factores que pueden desencadenar el desarrollo del cáncer. Los lípidos constituyen un factor de riesgo para la formación de radicales libres en el organismo y estudios recientes han mostrado que las especies vegetales son buenos agentes antioxidantes. (Palacios, 2013)



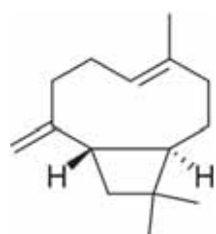
humuleno



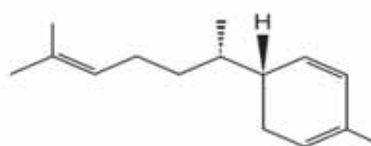
germacrano



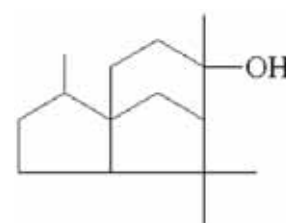
sativeno



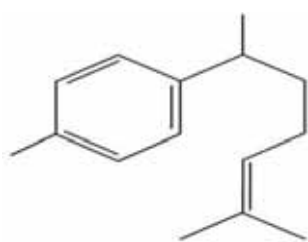
cariofileno



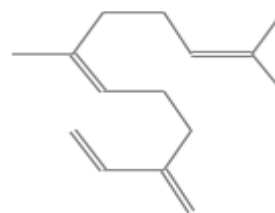
zingibireno



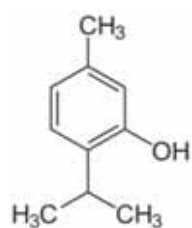
cedrol



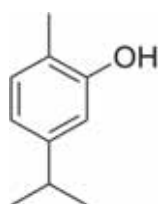
curcumeno

cis- β -farnesano**Figura 3. Ejemplos de sesquiterpenos (Solís, 2018)****III. Fenilpropanos.**

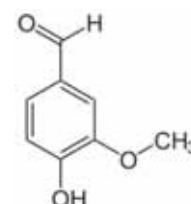
Son compuestos de naturaleza química aromática (o sea que contienen un anillo de benceno). Alguno de estos compuestos, como el *p*-cimeno, son terpenos cíclicos aromatizados, pero la mayoría de ellos no son terpénicos. Muchos compuestos aromáticos son fenilpropanoides, es decir que están formados por el esqueleto del fenilpropano. Los fenilpropanoides están relacionados estructuralmente con los aminoácidos fenilalanina y tirosina, para muchos de ellos se derivan de la ruta bioquímica del ácido shikímico. (Ocampo, 2008)



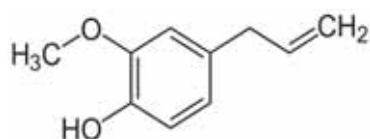
timol



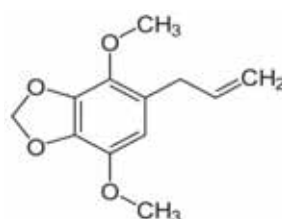
carvacrol



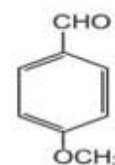
vainillina



eugenol



apiol



anisaldehido

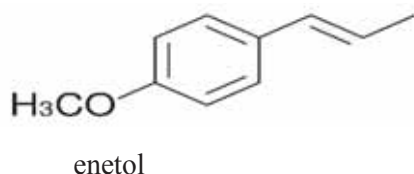


Figura 4. Ejemplos de fenilpropanos (Solís, 2018)

2.3.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales presentan una serie de propiedades comunes:

- Son líquidos a temperaturas ambiente; sin embargo algunos como el de anís solidifican a baja temperatura.
- Son muy volátiles y arrastrables en corriente de vapor de agua.
- Son inmiscibles en el agua como agliconas, y de acuerdo a la polaridad de sus componentes son solubles en la mayor parte de solventes orgánicos como etanol, éter, acetato de etilo, hexano, etc.; los de estructura química muy polar y los que se encuentran como glicósidos son solubles en agua
- Poseen índices de refracción elevados.
- Muchos presentan actividad óptica o poder rotatorio.
- La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua, sin embargo los obtenidos de la canela, clavo de olor y sasafrás poseen densidad mayor a la del agua.
- Por lo general son incoloros o ligeramente amarillentos, sin embargo existen excepciones como el de manzanilla de intenso color azul, debido a su contenido en camazuleno.
- Son aromáticos; su olor y sabor están determinados principalmente por sus constituyentes oxigenados.
- Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos. (Solís, 2018)

2.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como: destilación con agua o hidrodestilación con trampa de clevenger, destilación por arrastre de vapor, expresión, extracción con disolventes, extracción por el método enflorado o enfleurage, extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas. (Martínez, 2003)

I. DESTILACIÓN CON AGUA O HIDRODESTILACIÓN CON TRAMPA DE CLEVINGER

El método Clevenger, recibe el nombre gracias al equipo llamado Clevenger; usado en muchos laboratorios y considerados en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la determinación del contenido total de aceite esencial de una planta aromática.

El equipo está compuesto de un balón, donde se deposita la materia prima fragmentada y una cantidad conocida de agua destilada. Se le calienta constantemente, el aceite esencial con el agua presente se evaporan continuamente.

- Las ventajas de este equipo son: su simplicidad y flexibilidad para trabajar con aceites de diferentes densidades y naturaleza.
- Las desventajas son: degradación térmica, hidrolisis y solubilización; ya que está en contacto fijo con el agua. El tiempo de extracción es muy largo; debido a que se busca agotar todo el aceite contenido en la planta. (Oviedo,2011)

II. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo, pero su inconveniente requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparación con otros métodos.

La muestra vegetal no está en contacto con el agua, el vapor de agua se inyecta a la muestra vegetal colocada en el balón de destilación, de donde es arrastrado el aceite esencial. La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil como una impureza sean insolubles en agua, ya que el producto destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua fácilmente. (Peredo, 2009)

III. EXPRESIÓN

Es un método mecánico, aplicado fundamentalmente a los frutos cítricos, donde mecánicamente se punza o se ralla la corteza del fruto para perforar las glándulas secretoras de la parte externa del pericarpio. Luego mediante expresión, se provoca la extracción del aceite esencial, procediendo a continuación a su arrastre con agua finamente nebulizada; después de eliminar los desechos sólidos, el aceite esencial se separa de la fase acuosa por centrifugación. (Bruneton, 2001)

IV. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. (Bruneton, 2001)

Estos disolventes solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles. (Martínez, 2003)

Los extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, además de que requiere de periodos de tiempo

relativamente largos, los aceites esenciales obtenidos contienen trazas de los disolventes utilizados; limitando su uso en la industria cosmética o farmacéutica. (Peredo, 2009)

V. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE ENFLORADO O ENFLEURAGE

El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos.

Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa. (Rodríguez, 2012)

VI. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRTICOS

La extracción por fluidos supercríticos es una operación que explota el poder disolvente en fluidos supercríticos en condiciones por encima de su temperatura y presión crítica. Es posible obtener extractos libres de disolventes usando fluidos supercríticos y la extracción es más rápida que la utilización de disolventes orgánicos convencionales. (Peredo, 2009)

Este procedimiento presenta varias ventajas, además de que no se alteran las propiedades químicas. ((Rodríguez, 2012)

Ventajas de la extracción por fluidos supercríticos:

- Que los tiempos de extracción se reducen.
- Se obtienen rendimientos mayores.
- Es posible seleccionar sustancias y la composición de los extractos, cambiando los parámetros de extracción.
- Se requiere menor energía.

Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos (gases en condiciones ambientales normales) y a las propiedades de transporte mejoradas (alta difusividad y baja viscosidad). La principal desventaja es que ceras cuticulares y compuestos de alto peso molecular son extraídos junto con el aceite esencial. (Peredo, 2009)

VII. EXTRACCIÓN POR MICROONDAS

El uso de microondas es otra alternativa para la extracción de aceites esenciales. Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidrodestilación o adaptando un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente. No se necesita agregar ningún disolvente o agua si se emplea material fresco. En caso de que el material este seco, éste se rehidrata remojándolo en agua y drenando el exceso antes de la extracción. (Peredo, 2009)

2.4 ESPECTROSCOPIA UV

La espectroscopia UV fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras moleculares. La técnica de espectrometría UV es muy utilizada en el análisis cuantitativo, aunque en análisis cualitativo, en la determinación de estructuras, es superada por otras técnicas, como espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear. (Gonzales, 2008)

La región espectral correspondiente al ultravioleta y visible va desde el UV lejano con longitud de onda entre 10 y 200 nm (también denominada UV de vacío el O₂ absorbe en esta región justo por debajo de 200nm), UV cercano entre 200 y 400 nm, y visible entre 400 y 800 nm. (Gonzales, 2008)

2.5 CROMATOGRAFÍA

Método que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Es difícil describir rigurosamente al término

cromatografía, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo todos los métodos tienen en común el uso de la fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla son transportados a través de una fase estacionaria por el flujo de una fase móvil, y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de las mezclas. (Barajas, 2011)

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. (Barajas, 2011)

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en columna: En este tipo de cromatografía se utiliza un tubo cilíndrico, en el interior se coloca la fase estacionaria y a través de ella se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil (líquido o gas) a través de la fase estacionaria se puede conseguir por presión, capilaridad o por gravedad. (Barajas, 2011)

Cromatografía plana: La fase estacionaria se coloca en una superficie plana y se distinguen dos tipos de cromatografía plana:

- Cromatografía en papel, en la que el papel actúa como soporte de la fase estacionaria (cromatografía de partición). (Barajas, 2011)

- Cromatografía en capa fina, un sólido actúa como fase estacionaria, o como soporte de la fase estacionaria se extiende en una capa delgada sobre una placa, generalmente de vidrio, en la cromatografía plana está excluido el uso de un gas como fase móvil, por lo que ésta siempre es líquida. (Barajas, 2011)

Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos (Barajas, 2011)

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases	Gas-líquido (GLC)	Líquido adsorbido	Reparto entre gas y líquido
Cromatografía líquida	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
	Líquido-líquido	Líquido adsorbido	Adsorción
	Líquido-sólido	Sólido	
	Intercambio	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por Afinidad	Líquido en los intersticios Líquido con un grupo específico	Reparto/tamizado Reparto entre líquido

2.5.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte (generalmente helio o nitrógeno) que no interacciona con las moléculas

de analito, su única función es la de transportarlo a través de la columna. El analito se distribuye entre la fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte dentro de la columna cromatográfica, de manera que en función de interacción con ambas va a presentar distinto tiempo de retención, por lo que se puede analizar cada analito por separado. (Robles, 2014)

La cromatografía de gases se utiliza para el análisis de compuestos que presentan una volatilidad importante a temperaturas inferiores a 350-400 °C, además deben ser termoestables a las temperaturas de trabajo y no han de degradarse ni perderse parte de los mismos a través de reacciones secundarios. La naturaleza de los analitos y su peso molecular se puedan utilizar para predecir su volatilidad, así cuanto mayor sea la polaridad y/o el peso molecular menor será ésta. De manera que, mientras que los hidrocarburos más pesados de 500 uma puedan ser analizados por medio GC, los de peso molecular superior 1400 uma necesitarían condiciones especiales. (Robles, 2014)

Cada soluto presente en la muestra tiene diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados. (Gutiérrez, 2002)

VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

- Análisis rápido, (minutos)
- Eficiente, provee alta resolución

- Sensible, detecta fácilmente ppm y frecuentemente ppb
- No destructivo, acoplamiento en línea (espectrometría de masas)
- Análisis cuantitativo con alta exactitud
- Requiere un volumen de muestra pequeño (μL)
- Confiable y relativamente simple
- Bajo costo. (J. Mendoza, 2012)

DESVENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

- Está limitada a muestras volátiles
- No se puede utilizar en muestras térmicamente lábiles
- Es difícil para muestras grandes (preparativas)
- Requiere espectroscopia (MS) para confirmar la identidad de una señal. (J. Mendoza, 2012)

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

- Fuente de gas.
- Sistema de inyección.
- Horno y columna cromatográfica.
- Detectores. (Parrales, 2012)

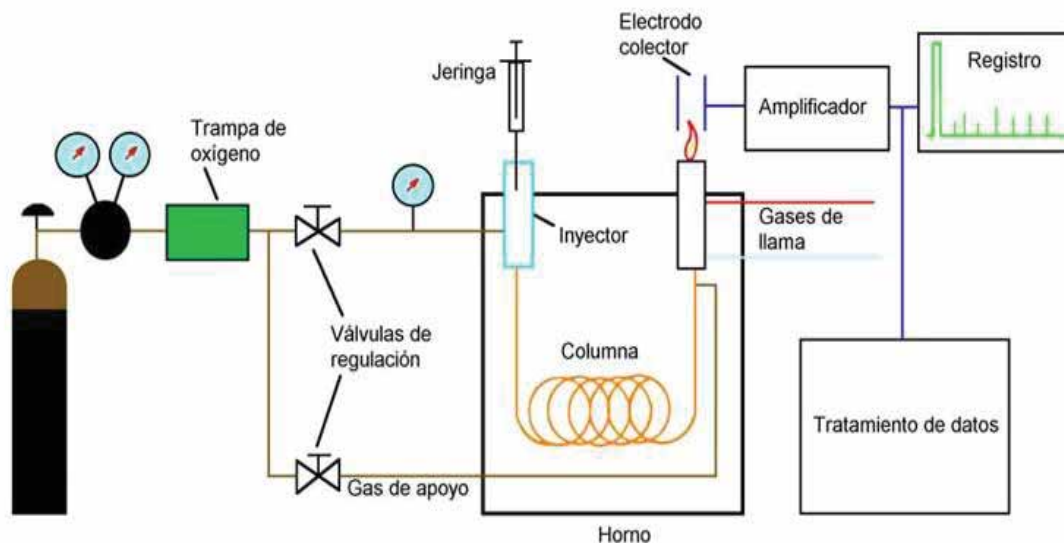


Figura 5. Esquemas de un cromatógrafo de gases (Parrales, 2012)

2.5.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

La espectrometría de masas es una técnica basada, previa ionización de la muestra, en la separación y registro de los iones producidos, según su relación masa-carga, en un sistema de vacío. (Robles, 2014)

Es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc.

Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa, permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad, habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm (partes por millón) y en casos específicos se puede llegar hasta ppt (partes por trillo) e incluso ppq (partes por cuatrillón).

- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida, se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases. (Gutiérrez, 2002)

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. (Gutiérrez, 2002)

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía.

El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. (Gutiérrez, 2002)

El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas. (Corral, 2018)

1. Introducción de la muestra.
2. Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones.
3. Separación y el análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación masa/carga.
4. Finalmente, se obtiene el espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

Los espectrómetros de masas se componen de unos elementos básicos como son: un sistema de introducción de la muestra - sistema de ionización - analizador de masas - detector - sistema de vacío - sistema de adquisición y tratamiento de los datos.

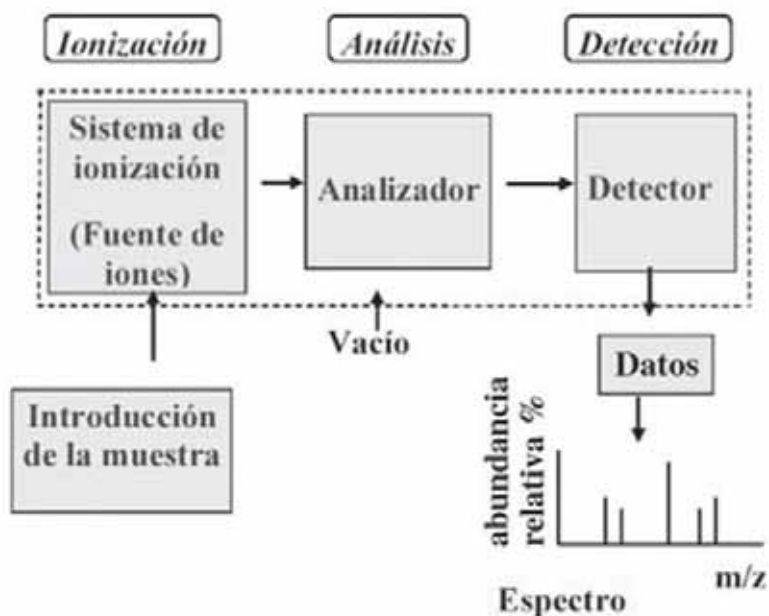


Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas (Martin, 2016)

2.6. CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

Es una técnica combinada (GC-MS) que permite la separación e identificación de mezclas complejas, es comúnmente usado para el análisis de aceites esenciales, manejando un sistema con alta sensibilidad, adquisición de datos y proceso confiable y bajo costo en relación con el gasto de reactivos. (Ricaldi, 2014)

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su

acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. (Gutiérrez, 2002)

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma. (Gutiérrez, 2002)

2.7. ANTIOXIDANTE

Son sustancias que inhiben o retardan el proceso oxidativo, cuya actividad podría deberse a sus componentes polifenólicos. (Oliveira, 2014)

Los polifenoles constituyen uno de los principales compuestos con actividad antioxidante, presentes en las plantas. (Echavarría, 2016) Los flavonoides, son un tipo de polifenoles que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y son sustancias que manifiestan una potente actividad antioxidante. (Oliveira, 2014)

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. (Gallego, 2016)

Un antioxidante es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos. Las propiedades antioxidantes no sólo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos. Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa. (Coronado, 2015)

CARACTERÍSTICAS DEL ANTIOXIDANTE

Las principales características de un compuesto antioxidante son, la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo. (Quiñonez, 2017)

Según el modo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios y secundarios. (Moscoso, 2014)

Primario; (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres)
Secundario o preventivo; los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singulete, etc. (Quiñonez, 2017)

RADICAL LIBRE

Un radical libre es una especie química definida que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Una vez generados, los radicales libres aparean rápidamente el electrón

desapareado uniéndose a otro radical libre o, cediendo un electrón a una estructura molecular adyacente no radicalaria, con el fin de estabilizarse. (Fito, 2003)

Estos radicales libres pueden alterar la actividad celular, tanto a nivel de funciones de membrana, del metabolismo o de expresión génica. Su misión es la de remover el electrón que le hace falta de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada, que perdió un electrón, se convierte entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañara muchas células y puede ser definida si los antioxidantes no intervienen. (Fito, 2003)

Sin embargo, la acción de los radicales libres puede ser bloqueada por sustancias antioxidantes, las cuales captan los radicales libres. Algunas investigaciones recientes sobre los radicales libres han confirmado que los alimentos ricos en antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cancerígenas, males como el de Parkinson y Alzheimer, así como también inflamaciones y problemas ocasionados por el envejecimiento celular. (Alvarez, 2008)

Las características de un radical libre son:

- Electrón no apareado.
- Alta inestabilidad.

Método DPPH* (1,1- difenil-2- picrilhidrazil)

Para evaluar actividad antioxidante se recurre a diferentes métodos, siendo uno de ellos 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. (Monreal, 2012)

Este método fue descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995) consiste en determinar la capacidad de captura del radical libre DPPH[•] por parte de los compuestos antioxidantes. Este radical presenta un pico máximo de absorción a 515 nm y tras la adición del antioxidante se produce una disminución de absorbancia proporcional a la concentración y actividad de dicho antioxidante, Samaniego (2006), este método es utilizado desde hace muchos años, por numerosos autores que han ido realizando adaptaciones del mismo a la matriz alimentaria de la que quieren obtener información, como modificar la concentración de DPPH (0,1 mM, 0,2 mM, 600 mM), tiempo de incubación o ataque (30 min, 60 min, 500 min o incluso sin tiempo definido, hasta llegar a saturación)

Este método es fácilmente comparable con otros métodos de medida basados en la captura de radicales libres. (Samaniego, 2006)

El radical DPPH[•] tiene un máximo de absorción a 515 nm, pero dicha absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AH) o un radical (R[•]):

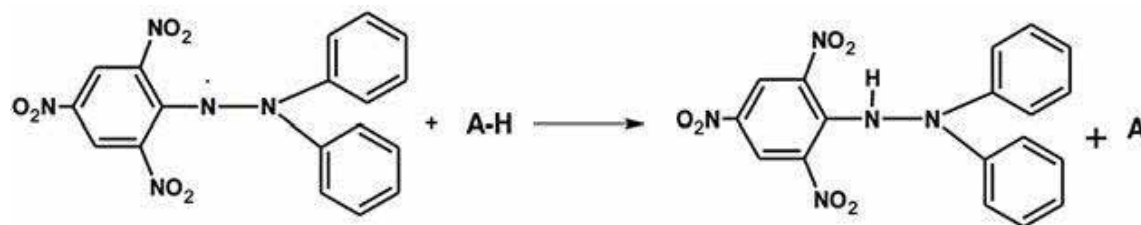


Figura 7. Reacción del antioxidante con el radical DPPH[•] (Samaniego, 2006)

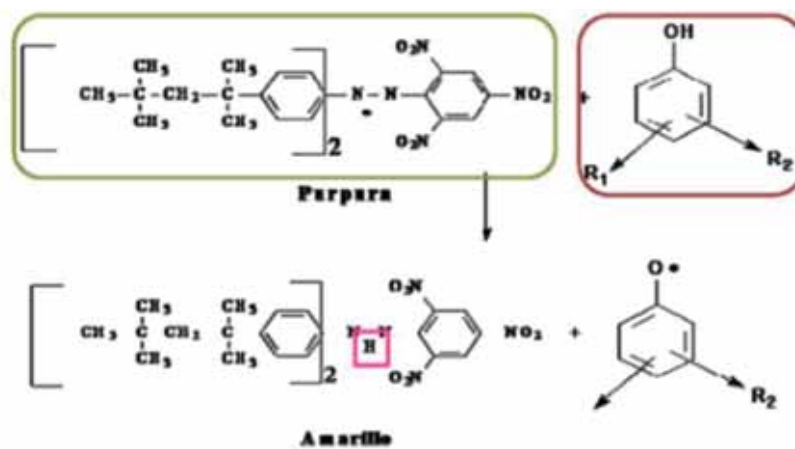


Figura 8. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico sobre el radical DPPH \cdot . (Torrenegra, 2014)

CAPITULO III

METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es del tipo descriptivo y experimental a través de métodos y técnicas de laboratorio, el porcentaje de extracción, las características fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante de aceite esencial.

3.2. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

El procedimiento metodológico seguido en el desarrollo de la presente investigación, fue:

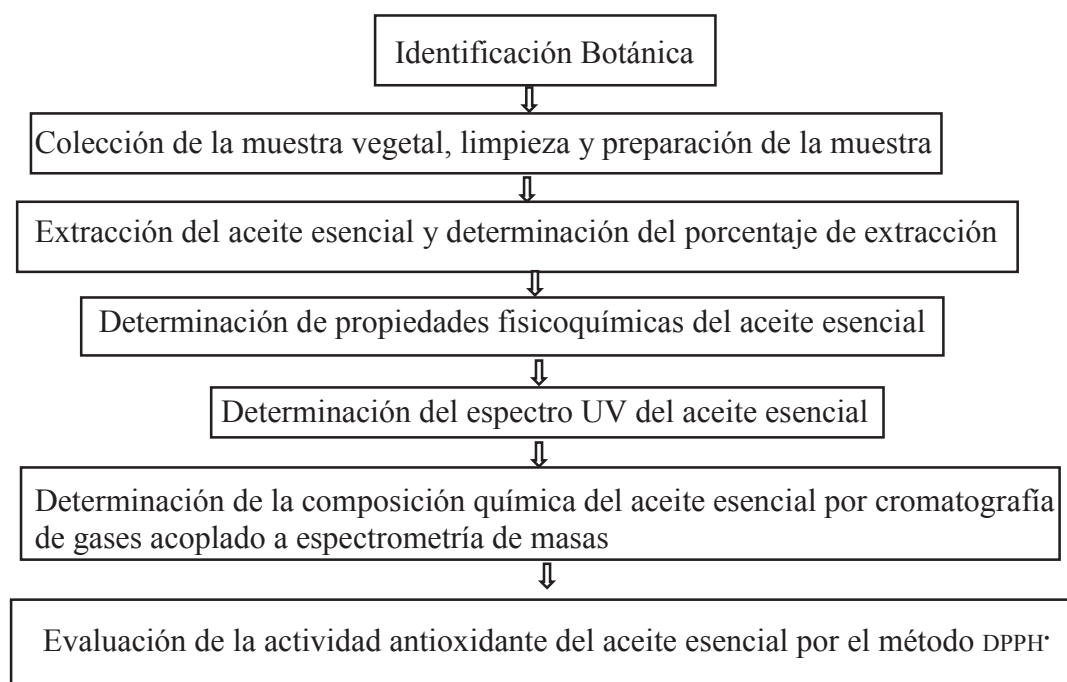


Figura 9. Procedimiento metodológico del aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller

3.3. MATERIALES, REÁCTIVOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

MATERIALES DE LABORATORIO

- Pipetas volumétricas 1, 2, 5,10 mL.
- Pipetas graduadas
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitados de 50, 100 mL.
- Fiolas de 25, 50, 100mL.
- Cubetas de cuarzo de 1cm.
- Bureta
- Matraz Erlenmeyer
- Embudo
- Bagueta
- Picnómetro (5 mL)
- Gotero
- Gradilla
- Soporte universal
- Cronómetro

EQUIPOS DE LABORATORIO

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas; Termo scientific, Trace 1310, ISQ QD
- Estufa; memmert Expert in Thermostatics

- Manta de calentamiento; ISOLAB, Laborgerate GmbH
- Balanza analítica; LX220A scs
- Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger
- Centrifuga; HERMLE,Z 206 A
- Espectrofotómetro UV-Visible; Termo SCIENTIFIC, Evolution 220
- Destilador de agua; GFL
- Refrigerador; MABE
- Refractómetro; ABBE

REÁCTIVOS

- Agua destilada
- Acetona (C₃H₆O) QP
- Benceno (C₆H₆) QP
- Éter (C₄H₅O) QP
- Etanol de 40°,70°,96°(C₂H₅-OH)
- Hexano (C₆H₁₄) QP
- Metanol (CH₃-OH) QP
- Solución de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) 0.2%
- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄)
- Reactivo 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH')
- Reactivo Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)

3.4. MUESTREO

3.4.1. COLECCIÓN DE MUESTRA

Las muestras de la especie vegetal de *Ambrosia arborescens* Miller, fueron colectadas en el mes de marzo del 2018, a una altitud de 3618 msnm, en la comunidad de Ccorao del distrito de San Sebastián, provincia y departamento del Cusco.

Se recolecto aproximadamente 5 kg conservados en papel kraft, posteriormente se trasladó al laboratorio del área de Fitoquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco para su extracción.

En la colección de la muestra se tomó en cuenta las siguientes consideraciones:

- Clima: despejado, no lluvioso.
- Horario: medio día.
- Estado vegetativo: antes de la floración.
- Tipo de muestra: intencional (hojas sanas).

3.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRA

En el laboratorio, las muestras se prepararon sometiendo a la operación de limpieza, que consiste en la selección de las hojas verdes libre de impurezas, posteriormente se trozo a fragmentos pequeños con el fin de obtener una mejor y rápida extracción del aceite esencial.

3.5. EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

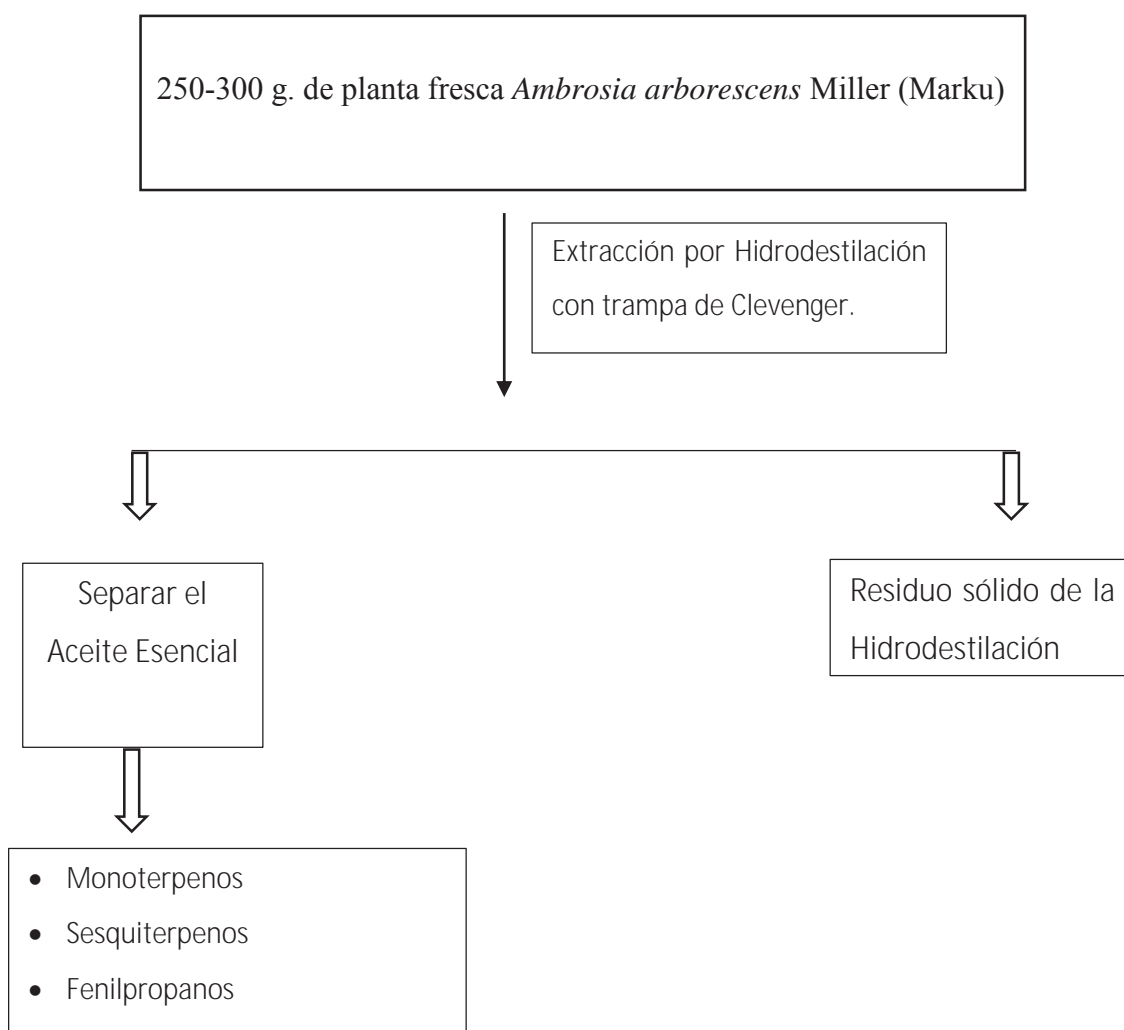


Figura 10. Esquema de extracción del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

MÉTODO: Extracción por Hidrodestilación con trampa de Clevenger.

PROCEDIMIENTO

- Se pesaron 250-300 gramos de muestra fresca de la especie *Ambrosia arborescens* Miller.
- Se colocó en un balón de vidrio de 2 Litros, inmersa de agua destilada, el cual fue sometido a la extracción por el método de Hidrodestilación por un periodo de 4 horas.

- De la destilación se obtuvo 0.4 - 0.5 mL de aceite esencial, secado con sulfato de sodio anhidro y conservado a 4 °C en frasco ámbar de tapa rosca.

Esta técnica resulta una de las más simples y económicas para obtener aceite esencial.

La ventaja de este método es su simplicidad y flexibilidad para trabajar con aceites de diferentes densidades.

La extracción del aceite esencial, en todos los casos se realizó de muestras de hojas verdes, por el método de hidrodestilación con trampa de clevenger.

El aceite esencial extraído desemboca en la trampa de clevenger donde mide la cantidad del aceite esencial obtenido.



Figura 11. Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger

3.6. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Para la caracterización física y química del aceite esencial se utilizó métodos estandarizados.

I. PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Las pruebas de solubilidad está relacionada con la estructura y polaridad de los compuestos y la facilidad de formar mezclas homogéneas entre los componentes del aceite esencial y los disolventes.

TÉCNICA: INDECOPI Norma 319.084 (Fontenla, 2006)

MÉTODO: Solubilidad en disolventes

FUNDAMENTO.- Los aceites esenciales de acuerdo a la estructura y polaridad de sus componentes, a la temperatura de ambiente, son susceptibles de formar mezclas homogéneas con diferentes disolventes químicamente puros y soluciones etanólicas de concentraciones conocidas. (Domínguez, 1979)

PROCEDIMIENTO Se mezcló 0.50 mL de aceite esencial con 2.0 mL de disolventes; agua, etanol (40%, 60%, 70% y 90 %), etanol absoluto, metanol, acetona, éter etílico, etanol absoluto y hexano a condiciones ambientales.

II. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

TÉCNICA: INDECOPI Norma 319.081 (Ochoa, 2012)

MÉTODO: Picnómetro

FUNDAMENTO.- La densidad es la relación que existe entre la masa de un volumen del aceite esencial y la masa de un volumen igual de agua destilada a la temperatura de 20 °C como referencia, esta determinación ayuda a definir calidad y permite también descubrir, en algunos casos, cantidades pequeñas de adulterantes. (Rodas, 2012)

FORMULA

$$d = \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

Donde:

d = Densidad.

P = Masa en g del picnómetro vacío.

P_1 = Masa en gramos del picnómetro lleno con agua destilada a 20°C.

P_2 = Masa en gramos del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C.

PROCEDIMIENTO Se pesó el picnómetro vacío, limpio y seco. Se determinó la masa del picnómetro, para lo cual se llenó con agua destilada, evitando la formación de burbujas de aire se colocó el termómetro y se deja destapada la rama del capilar. Se sumerge en un baño de agua a 20 °C durante 30 minutos controlando la temperatura del baño con el termómetro del picnómetro, cuando alcanzó la temperatura deseada, se enrazó la rama capilar del picnómetro con agua destilada a la misma temperatura y se tapó, se extrajo del baño, limpió y se secó para determinar su masa. El picnómetro vacío y lavado con etanol, se secó y posteriormente se llenó con el aceite esencial, y se procedió de igual forma que para el agua destilada y se determinó su masa.

III. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

TÉCNICA: INDECOPI Norma 319.075 (Fito, 2003)

MÉTODO: Refractómetro de Abbe

FUNDAMENTO.- El índice de refracción permite determinar la reducción de la velocidad de la luz al propagarse por un medio homogéneo y es una propiedad específica de cada interfase que varía con la temperatura y con la longitud de onda de la luz considerada. (Robles, 2014) y (Rodas, 2012)

PROCEDIMIENTO:

El refractómetro se calibró con agua destilada y antes de colocar la muestra, se mantuvo a la temperatura próxima a la que se va a tomar la lectura. Se hace circular una corriente de agua en el refractómetro, con el objeto de que el instrumento esté a la temperatura de 20 °C, a la cual se efectuará la lectura. En los prismas limpios y secos, se colocó una gota de aceite esencial, se esperó a que se estabilice la temperatura y se determinó la lectura en el refractómetro de Abbe.

IV. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ (I.A)

TÉCNICA: Norma INDECOPI 319.085 (Taco, 2018)

MÉTODO: Volumétrico.

FUNDAMENTO.- Se denomina al porcentaje de ácidos grasos libres que contiene un aceite o una grasa.

El índice de acidez se expresa como el número de mg de hidróxido de potasio necesario para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 gramo aceite. (Montoya, 2010) y (López, 1975)



FORMULA

$$\text{IA} = \frac{56.1 \times V \times Z}{M}$$

Donde:

V = mL de KOH gastados.

Z = Concentración normal de KOH.

56.1 = Meq de KOH en mg.

M = Muestra en gramos.

PROCEDIMIENTO En un matraz erlenmeyer de 250 mL se pesó 0.3558 gramos de aceite esencial, se agregó 5 mL de etanol neutralizado, 3 gotas de indicador fenoltaleína al 0,1 % luego se tituló con solución estándar de hidróxido de potasio 0.075 N hasta el cambio de viraje de color rosado.

V. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN (I.S)

MÉTODO: Volumétrico, titulación ácido – base.

FUNDAMENTO.- El índice de saponificación es la medida de ácidos grasos esterificados que existen en una muestra, luego de una saponificación, titulando los ácidos grasos libres. El índice de saponificación representa los mg de hidróxido de potasio necesarios para la saponificación de 1 g de grasa (Chávez, 2002)

FORMULA

$$IS = \frac{56.1 \times N(V1-V2)}{M}$$

Donde:

N = Normalidad de HCl 0.089 N

56.1 = Meq. de KOH en mg.

V1 = Volumen en mL de HCl en el blanco.

V2 = Volumen en mL de HCl en la muestra.

M = muestra en gramos.

PROCEDIMIENTO.- En un balón de vidrio de 250 mL, se pesó 0.3785 gramos del aceite esencial, se agregó 15mL de solución etanólica de hidróxido de potasio 0.1N, luego de reflujar por 40 minutos, se enfrió y añadió 2 gotas de indicador fenoltaleina al 0.1%, se tituló con la solución estándar de ácido clorhídrico 0.089N hasta el cambio de viraje de color amarillo. Se realizó la titulación en blanco, con una muestra de aceite esencial sin hidrolizar.

3.7. DETERMINACIÓN ESPECTRO DE ABSORBANCIA UV

MÉTODO: Espectroscópico

FUNDAMENTO.- La espectroscopia UV es una de las técnicas más ampliamente y más frecuentemente empleadas en el análisis químico.

El espectro UV de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos grupos o átomos de la molécula y no caracterizan a la molécula como entidad. (Leary, *et al.*, 1998)

PROCEDIMIENTO.-

- El instrumento, espectrofotómetro UV se calibro con etanol absoluto en un rango de longitud de onda entre 190-400 nm.
- Se preparó la solución de aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, disolviendo 2 μ L de muestra en 10 mL con etanol absoluto, de esta solución se hizo una dilución, 0,1 mL en 2,5 mL con etanol absoluto.
- La solución se colocó en las cubetas de cuarzo del instrumento y se determinó el perfil espectroscópico.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

MÉTODO: Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-MS)

La identificación del componente del aceite esencial se realizó por Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-MS), en el cromatógrafo Modelo Trace 1310 Termo scientific acoplado a un espectrómetro de masas Modelo ISQ QD Termo scientific, en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco con una columna capilar TG – 5SILMS de diámetro interno 0.25 mm y de 30 metros. Los análisis se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: programa de temperatura de horno, temperatura inicial 60°C, gradiente 5 °C/min., temperatura final 240 °C (5 min.); gas portador helio con un flujo de 1mL/min.; temperatura del inyector y detector de 250 °C, volumen de inyección fue de 1 μ L y una dilución Split de 1/100.

En el cromatógrafo se obtuvieron los cromatogramas y el contenido porcentual de cada componente, se calculó a partir del área bajo el pico y los componentes se compararon con el total del pico de áreas de todos los componentes; mientras que la identificación de los componentes de cada cromatograma se realizó mediante la obtención del espectro

de masas. En el espectrómetro de masas MS, los parámetros fueron: temperatura de fuente 230 °C, temperatura de cuádruplo 150 °C; energía de ionización 70 eV y un rango de masas 40 – 400 m/z.

Los diferentes componentes del aceite esencial, se identificó utilizando los tiempos de retención de la cromatografía de gases y los espectrómetros de masa de cada componente. Los espectros de masas se compararon con los datos estándar de referencia correspondiente a los espectros de masas de la base de datos librería Mainlib. Lo que permitió valorar la composición mayoritaria de cada aceite esencial y así determinar la identificación y cuantificación de los aceites esenciales.

3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH[•] (1,1 – Difenil-2-Picrilhidrazil)

FUNDAMENTO: El radical libre y estable 1,1-Difenil-2-Picrilhidrazil (DPPH[•]), Es un indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Su mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrogeno proveniente de un donador. La reacción de ensayo, desarrolla un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia a 515 nm. (Carhuapoma, 2007)

Los resultados se expresan como actividad antiradical o IC₅₀ (Concentración Inhibitoria al 50), la cual está definida como la concentración del antioxidante que disminuye la absorción del radical a un 50% de la cantidad inicial. (Torrenegra, 2014)

PROCEDIMIENTO

Medida de la actividad antioxidante en aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller se considera el tiempo final de medida cuando se alcanza el equilibrio, lo que asegura

que la reacción no continúa progresando y se testimonia que todos los compuestos antioxidantes hayan reaccionado con el radical DPPH°. (Samaniego, 2006)

Los compuestos polifenólicos frente al radical DPPH°, en general la absorbancia desciende rápidamente en los primeros minutos, debido a la transferencia al radical de los átomos de hidrógeno con más facilidad de donación.

Seguidamente una etapa de caída más lenta, hasta el equilibrio, debido a la actividad remanente de los productos de oxidación y degradación. (Oliveira, 2014)

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Radical DPPH° (0.06 mM), se pesan 2.3 mg de DPPH° y se disuelven en 100 mL de metanol (Brand-William *et al.*, 1995). El radical preparado es estable durante 12 h a temperatura ambiente y protegida de la luz.
- Preparación del estándar de referencia TROLOX: se emplea el Trolox en metanol, se prepara una disolución madre de 2 mM y posteriormente se preparan diluciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM en metanol, para preparar la curva estándar referida al % inhibición con respecto a las diferentes concentraciones de Trolox.
- Se mide la absorbancia con cubetas de cuarzo estándar de 1 cm, a 515 nm de 2.9 mL del DPPH° (0.06 mM), obteniendo así el valor de la absorbancia a tiempo cero, posteriormente se adiciona 100 µL de las diferentes concentraciones del Trolox, y se mide la absorbancia cada quince minutos, durante una hora (hasta alcanzar el equilibrio), se obtiene así el valor de la absorbancia final, pudiendo calcular el % de inhibición. (Samaniego, 2006)

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS

- Se extrae la fracción polar del aceite, se mezcla el aceite en metanol en proporción 1:1 v/v y se centrifuga a 2500-3000 rpm durante diez minutos a 15°C, a continuación se extrae la fase metanólica, donde se encuentran los componentes solubles en metanol del aceite (compuestos polifenólicos), responsables en su mayoría del efecto antioxidante de los mismos.
- Se mide la absorbancia en diferentes diluciones metanólicas del extracto (1:2, 1:5 y 1:10).
- Se toman 2.9 mL del radical DPPH[•], se le mide la absorbancia a 515nm, y se añaden 100µL del extracto metanólico del aceite a ensayar. Se agita y se mide su absorbancia cada 15 minutos durante una hora. (Samaniego, 2006)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Los resultados del porcentaje de extracción para cada peso de muestra se realizaron por triplicado.

El aceite esencial en base a hojas frescas de la especie *Ambrosia arborescens* Miller obtenido por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger, se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de extracción del aceite esencial

<i>Ambrosia arborescens</i> Miller		
W(g)	V(mL)	% Porcentaje
300	0,5	0,17
285	0,5	0,17
250	0,4	0,16
290	0,5	0,17
Promedio		0,17

Dónde: v = Volumen de aceite esencial, w = Peso de la muestra

Como se observa en la tabla 2, el promedio del porcentaje de extracción peso/volumen para la especie *Ambrosia arborescens* Miller, es de 0,17% por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger.

Haciendo la comparación con el rendimiento de la investigación realizada por Felipe Mendoza (2016) el porcentaje de extracción fue de 0,14%, lo cual muestra que la especie

Ambrosia arborescens Miller tiene menor cantidad de aceite esencial en comparación que se investigó.

4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL

Las características de las propiedades fisicoquímicas determinados para el aceite esencial, se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

<i>Ambrosia arborescens</i> Miller	
Estado Físico	Líquido aceitoso
Color	Amarillo intenso
Olor	Característico
Densidad relativa a 20 °C	0.9014 (g/mL)
Índice de refracción a 20 °C	1.4690
Índice acidez	3.727 (mg KOH/g aceite)
Índice de saponificación	43.53 (mg KOH/g aceite)

El aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller se caracterizó por sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas, las que se determinaron a través de las pruebas de color, olor, densidad relativa, índice de refracción, índice de acidez e índice de saponificación. Para el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller la densidad relativa es de 0.9014 g/mL y el índice de refracción es de 1.4690 nD. Según Domínguez (1979), densidad mayor de 0.9 g/mL e índice de refracción menor que 1,47, indica posible presencia de compuestos oxigenados alifáticos en su composición. Resultado que se confirma con la determinación de la composición química de este aceite esencial.

En la investigación realizada en el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller por Ibarra y Paredes (2013) la densidad relativa fue de 0,893 g/mL y el índice de refracción 1,3635. Lo que indica que en la densidad relativa no existe una mayor diferencia con el

aceite esencial que se investigó, sin embargo para el índice de refracción existe una gran diferencia.

El índice de acidez del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller es mayor y el índice de saponificación es menor, lo cual indica en su composición mayor porcentaje de componentes con grupos carboxilo libre y menor porcentaje de componentes con grupo esterificado.

4.3. SOLUBILIDAD

Los resultados de las pruebas de solubilidad determinados en diferentes disolventes y soluciones etanólicas, se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la solubilidad del aceite esencial

Disolvente	<i>Ambrosia arborescens</i> Miller
Agua	-
Metanol	+
Etanol 40%	+
Etanol 60%	+
Etanol 70%	+
Etanol 90%	+
Etanol absoluto	+++
Éter etílico	+++
Hexano	+++

LEYENDA: Muy soluble = +++ Soluble = ++ Poco soluble = + Insoluble = -

En la tabla 4, se puede observar que el aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller es muy soluble en disolventes apolares y ligeramente polares (hexano, éter etílico y etanol absoluto) y poco soluble en polares (metanol y en soluciones etanólicas 40%, 60%, 70% 90%) e insolubles en muy polar (agua). Resultados que nos permiten afirmar que el aceite esencial tiene una gran cantidad de componentes apolares y ligeramente polares.

4.4. ESPECTROSCOPIA UV

El espectro UV del aceite esencial puede ser utilizado para obtener información sobre su posible composición y asumir la ausencia o presencia de compuestos con grupos cromóforos según Olga Lock de Ugaz (1994).

Perfil del espectro UV del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller

El espectro ultravioleta obtenido está en el rango de 190 – 400 nm de longitud de onda, se muestra en la figura 12.

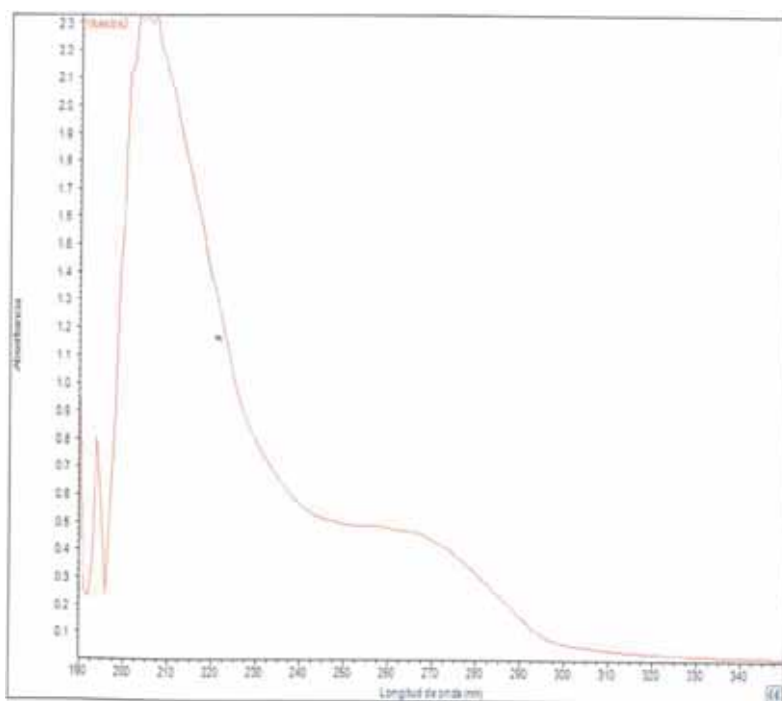


Figura 12. Espectro UV de aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller en etanol absoluto.

El espectro UV del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller muestra 2 picos, el primer pico se observa una absorción entre 208 - 212 nm esto es un indicador de la presencia de compuestos saturados y la segunda absorción entre 260 – 280 nm lo cual indica que se encuentra grupos aromáticos Olga Lock de Ugaz (1988).

4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

La composición química cualitativa y cuantitativa del aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller, se determinó por GC – MS. La composición del aceite esencial se muestra en forma esquemática en sus perfiles cromatográficos de la cromatografía de gases, el número de sus componentes se determinaron en los cromatogramas por el número de picos, cada uno de los picos son señales de la presencia de los componentes a diferente tiempo de retención, tal como se muestra en la Fig. 13 respectivamente.

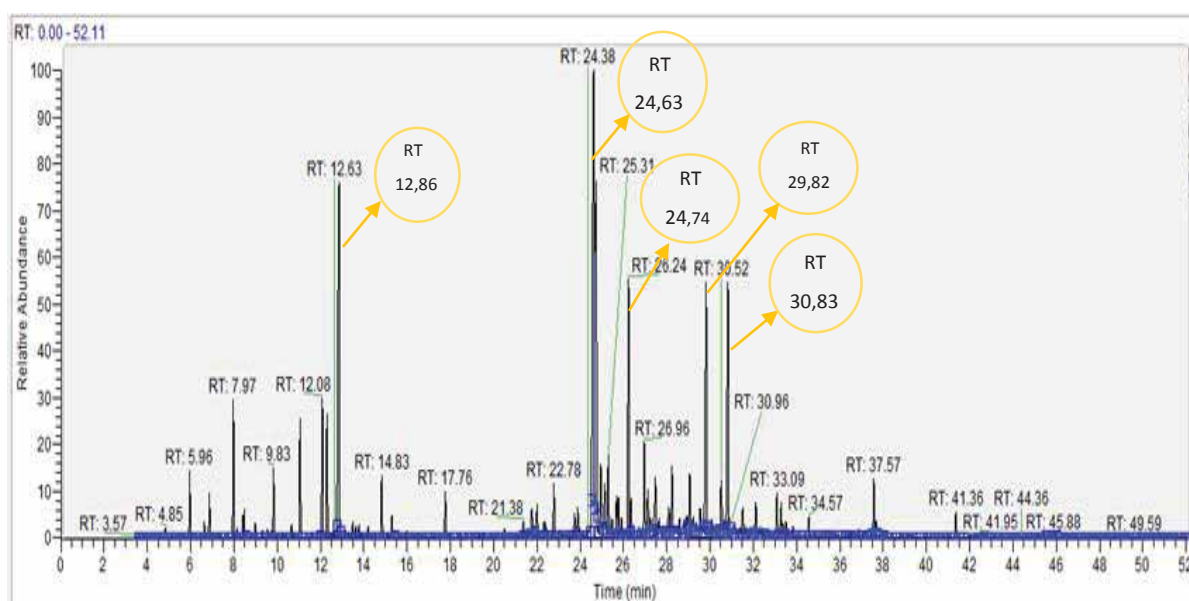


Figura 13. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

La cuantificación de sus componentes se realizó con el instrumento por integración del área debajo de cada pico. La identificación de los componentes de los aceites esenciales se determinó en comparación con los datos estándar de referencia correspondiente a los espectros de masas de la base de datos de la librería Mainlib del instrumento.

Según el cromatograma del aceite esencial se observa 5 picos mayoritarios para *Ambrosia arborescens* Miller según la figura 13, los picos analizados se encuentran de izquierda a derecha, el pico 1 corresponde a **2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol** con un

tiempo de retención 12,86 min, seguido del pico 2 con tiempo de retención de 24,63 min corresponde a **β -himachaleno**, el pico 3 con tiempo de retención 24,74 min corresponde a **germacreno D**, el pico 4 con un tiempo de retención 29,82 min a **6-isopropenil-4-8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno -2-ol** y el pico 5 con un tiempo de retención 30,83 min a **α -bisabolol**.

La composición química del aceite esencial, determinada por cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), en base a su tiempo de retención (RT) de los componentes del aceite esencial, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

Pico	Compuesto	RT min	%
1	cis-3-hexenol	4,85	0,18
2	santolina trieno	5,96	0,82
3	β -sabineno	6,63	0,21
4	2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] hept-2-eno	6,86	0,62
5	α -felandreno	7,97	2,1
6	α -pineno	8,14	0,15
7	β -pineno	8,42	0,3
8	2,5,5-trimetil-1-hexen-3-yne	8,48	0,41
9	ni	8,99	0,21
10	α -terpinoleno	9,33	0,1
11	<i>p</i> -cymeno	9,56	0,11
12	D-limoneno	9,73	0,1
13	eucaliptol	9,83	1,16
14	3-careno	10,24	0,07
15	γ -terpineno	10,67	0,2
16	cis- α -terpineol	11,06	2,02
17	artemisia alcohol	11,36	0,06
18	<i>p</i> -menta-1,4(8)-dieno	11,6	0,09

19	3,5-heptadien-2-ol, 2,6-dimetil-	12,08	2,9
20	1,3-ciclopentadieno, 5,5-dimetil-2-etil	12,3	2,22
21	2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol	12,86	10,6
22	cis-verbenol	13,15	0,07
23	cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	13,32	0,04
24	3-caren-10-ol	13,5	0,3
25	cis-verbenol	13,63	0,17
26	ni	13,79	0,23
27	ni	14,21	0,2
28	α -terpinenol	14,46	0,07
29	terpinen-4-ol	14,83	1,08
30	ni	15,31	0,44
31	propanal, 2-methyl-3-phenyl-	15,98	0,11
32	ácido triciclo [3.2.2.0 ^{1,5}] nonano-2-carboxílico	16,25	0,05
33	ácido 4,6-heptadienoico, 3,3,6-trimetil-, éster metílico	17,76	0,86
34	fenol, 2-metoxi-3- (2-propenil)	20,5	0,15
35	copaeno	21,38	0,32
36	ni	21,76	0,76
37	benzeno, 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)	22,01	0,56
38	β -himachaleno	22,34	0,25
39	ledeno	22,4	0,21
40	cariofileno	22,78	0,98
41	α -bergamoteno	23,16	0,07
42	β -farneseno	23,74	0,5
43	β -cariofileno	23,88	0,49
44	encecalol	23,98	0,19
45	β-himachaleno	24,63	14,2
46	α -curcumeno	24,68	4,05
47	germacreno d	24,74	7,41
48	naptaleno	24,95	1,23


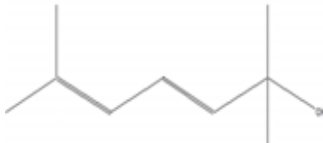
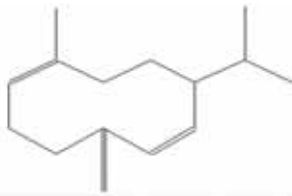
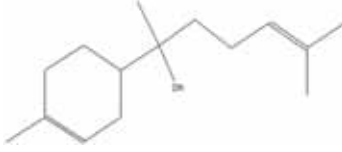
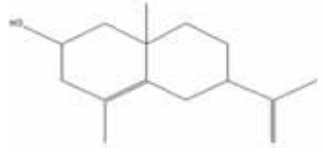
49	γ -elemeno	25,12	1,02
50	α -farneseno	25,31	1,35
51	α -longipineno	25,48	0,41
52	aromadendreno	25,7	0,88
53	δ -cadineno	25,77	0,67
54	β -gurjuneno	25,92	0,31
55	β -maalieno	26,24	5,78
56	γ -maalieno	26,35	0,64
57	nerolidol-Z	26,96	1,78
58	diepicedreno-1-oxido	27,13	1,02
59	benzoato de hex-3-enilo	27,24	0,26
60	germacrene D-4-ol	27,47	1,18
61	óxido de cariofileno	27,65	0,33
62	epóxido de calareno	28,09	0,52
63	carotol	28,24	1,28
64	cedren-13-ol	28,6	0,36
65	epoxido de aristoleno	28,81	0,29
67	epóxido de isoaromadendreno	28,93	0,18
68	muralan-3,9(11)-dieno-10-peroxi	29,06	1,12
69	óxido de ledeno	29,23	0,25
70	oxacyclotetradecino	29,31	0,13
71	T-cadinol	29,54	0,53
72	6-isopropenil-4-8a-dimetil- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno-2- ol	29,82	6,0
73	α -muurolol	30,08	0,37
74	aromadendreno oxido-(2)	30,52	1,13
75	α-bisabolol	30,83	6,25
76	ledol	31,27	0,11
77	13-heptadecina-1-ol	31,41	0,14
78	cis-nuciferol	31,52	0,57
79	trans-nuciferol	31,66	0,12

80	ni	32,11	0,65
81	α -ciperona	32,32	0,16
82	óxido de aloaromadendreno	32,43	0,15
83	9,12,15 ácido octadecatrienoico	32,62	0,14
84	4,6,6-trimetil-2- (3-metilbuta-1,3-dienil) - 3-oxatriciclo [5.1.0.0 (2,4)] octano	33,09	0,93
85	1-heptatriacontanol	33,29	0,55
86	13-heptadecina-1-ol	33,36	0,18
87	perhydrocyclopropa [e] azulene-4,5,6- triol, 1,1,4,6-tetrame thyl	33,51	0,26
88	oxacyclotetradecino	33,72	0,11
89	ni	33,83	0,17
90	perhidrofarnesil acetona	34,57	0,36
91	oxacyclotetradecino	37,57	1,03
92	ledenoxido	41,36	0,43

Nota: RT, Tiempo de retención, ni, Compuesto no Identificado.
Reporte de la CG/EM.

Conforme se observa en la tabla 5, el aceite esencial de *Ambrosia arborecens* Miller, muestra que los componentes mayoritarios son: β -himachaleno (14,2 %), 2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol (10,6 %), germacreno D (7,41 %), α -bisabolol (6,25 %) y 6-isopropenil-4-8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno-2-ol (6,0 %) y presenta 11 componentes con concentraciones mayores a 2% de abundancia; de los cuales, los que se encuentran en mayor porcentaje, son sesquiterpenos como β -himachaleno (14,2%), germacreno D (7,41%), α -bisabolol (6,25%) y posteriormente de monoterpenos α -felandreno (2,1%), cis- α -terpineol (2,02%); por consiguiente la composición química de este aceite esencial está conformada principalmente por sesquiterpenos, monoterpenos y un bajo porcentaje de fenilpropanos que aparece en el cromatograma y que además coincide con su espectro UV la presencia de los dobles enlaces y compuestos aromáticos.

Tabla 6. Composición mayoritaria del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

Pico	Compuesto	Estructura	RT min	%
1	β -himachaleno		24,63	14,2 %
2	2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol		12,86	10,6 %
3	germacreno D		24,74	7,41 %
4	α -bisabolol		30,83	6,25 %
5	6-isopropenil-4-8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno-2-ol		29,82	6,0 %

Los componentes β -himachaleno (30,62%), germacrene D (36,96%), son compuestos que se han detectado y reportado para la especie de *Ambrosia arborescens* Miller como componentes mayoritarios según Ruiz (2015) y los componentes carotol (1,6), α -curcumeno (14,1) y nerolidol-Z (2,7) son reportados por Yáñez *et al.* (2011), haciendo la comparación con la especie del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller que se investigó, estos 5 componentes también se encuentran presentes, sin embargo los porcentajes son diferentes.

El contenido y cantidad de compuestos es afectado por factores como el hábitat de la planta, la etapa fenológica, las diferentes partes de las que se extrae, la composición del suelo, por lo que es común encontrar diferencias en el contenido de sus componentes, aún entre plantas de la misma especie según Karousou *et al.*, (2005).

4.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil) DE *Ambrosia arborescens* Miller.

En la tabla 7 se muestran los datos de absorbancias ensayados cada 15 minutos a diferentes concentraciones de trolox con el radical DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil).

Tabla 7. Resultados de absorbancias para el estándar de referencia Trolox.

Absorbancia del DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil) = 1,0503

Concentración	0,05mM	0,2mM	0,5mM	1mM
Tiempo (min)	4,16x10 ⁻⁵ mg/mL	6,25x10 ⁻⁵ mg/mL	6,25x10 ⁻⁴ mg/mL	2,08x10 ⁻⁴ mg/mL
0	0,9003	0,8580	0,6859	0,3119
15	0,8971	0,8554	0,6636	0,2251
30	0,8969	0,8341	0,6599	0,2226
45	0,8968	0,8340	0,6586	0,2114
60	0,8965	0,8339	0,6585	0,2110

- La lectura de absorbancia se realizó a 515 nm

% de Inhibición para cada concentración con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = A_0 - A_f / A_0 \times 100$$

Donde:

A₀ = Absorbancia a tiempo cero

A_f = Absorbancia final

Tabla 8. % de Inhibición de cada concentración del estándar de referencia de Trolox.

% de Inhibición	
$4,16 \times 10^{-5} \text{mg/mL}$	14,6
$6,25 \times 10^{-5} \text{mg/mL}$	20,6
$6,25 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$	37,3
$2,08 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$	79,9

IC₅₀ (concentración a la cual el % Inhibición es igual a 50).

Para determinar IC₅₀ se halló con la siguiente ecuación:

$$y = 4 \times 10^{-4} x - 1.711$$

$$R^2 = 0.9693$$

Se utilizó el intercepto y la pendiente de la línea de regresión lineal.

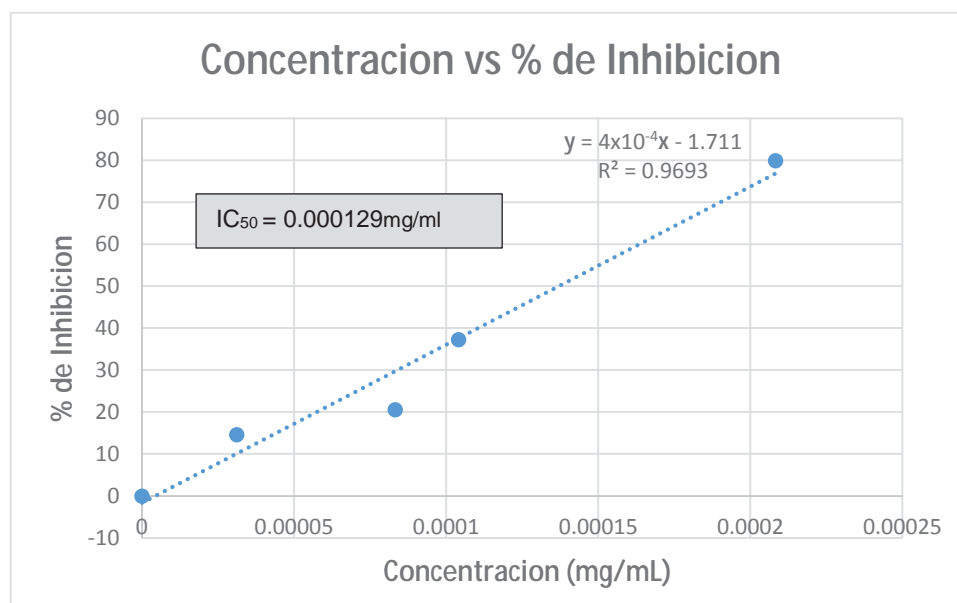


Figura 14. Curva de calibrado del Trolox.

En la tabla 9 se muestran los datos de absorbancias del radical estable DPPH• (1,1-difenil-2-picrihidrazil) con el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller ensayados cada 15 minutos a diferentes diluciones (1:2, 1:5 y 1:10).

Tabla 9. Resultados de absorbancias del DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil) con el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

Concentración \ Tiempo (min)	1:10 8,558x10 ⁻⁵ mg/mL	1:5 1,569x10 ⁻⁴ mg/mL	1:2 3,138x10 ⁻⁴ mg/mL
0	0,7715	0,7378	0,7198
15	0,7013	0,6446	0,5962
30	0,6359	0,5132	0,3671
45	0,6265	0,4363	0,3369
60	0,6111	0,4005	0,3011

Tabla 10. % de Inhibición del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller.

% de Inhibición	
8,558x10 ⁻⁵ mg/mL	42
1,569x10 ⁻⁴ mg/mL	61
3,138x10 ⁻⁴ mg/mL	71,3

En la figura 15 muestra la gráfica de la concentración vs % de inhibición del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller con el método del DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil).

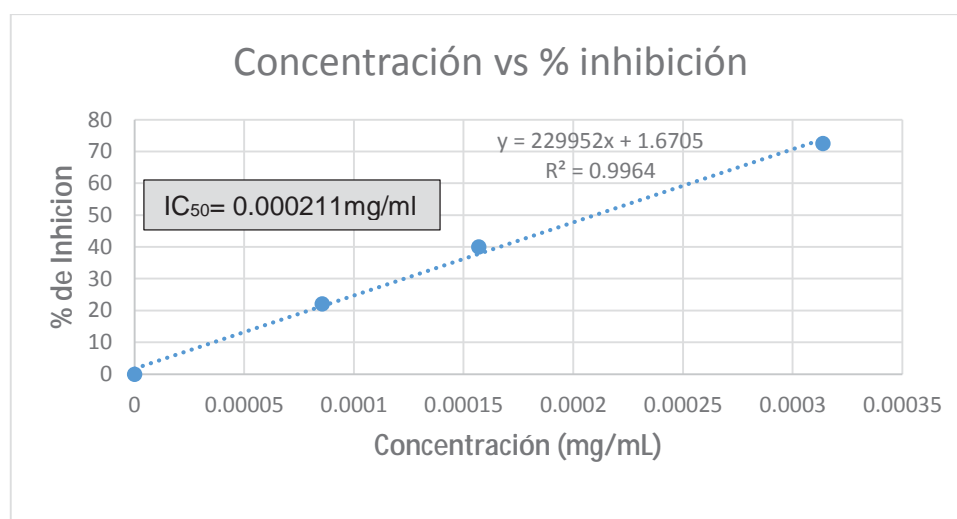


Figura 15. Concentración del aceite esencial vs el % de Inhibición.

El resultado de IC₅₀ (Concentración inhibitoria al 50%) para el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller muestra un valor de 0,000211 mg/mL. La bibliografía no reporta datos sobre la determinación del aceite esencial; sin embargo Moya (2017) reporta IC₅₀ = 0,0039 mg/mL para extracto etanólico de hojas de la especie de *Ambrosia arborescens* Miller. Lo cual muestra que la especie de *Ambrosia arborescens* Miller que se investigo tiene menor valor de IC₅₀ en comparación con el dato bibliográfico.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L muestra un valor de IC₅₀ = 2,42 mg/mL y para el aceite esencial de *Renealmia thyrsoides* de IC₅₀ 17, 10 mg/mL mediante el método del DPPH* según Noriega *et al.*, (2017).

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller es 389,86 μmol Trolox/g de aceite, el resultado se expresa como valor TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

De acuerdo con la siguiente formula:

$$\text{TEAC} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ del Trolox } (\mu\text{mol/mL})}{\text{IC}_{50} \text{ de la muestra } (\text{g/mL})}$$

En la investigación realizada en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (orégano) por Granados *et al.*, (2012), el valor de TEAC encontrado fue de 631.72 μmol de Trolox/g de aceite.

Haciendo la comparación con el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (orégano) presenta mayor valor de TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de extracción del aceite esencial de muestras frescas de hojas tiernas de *Ambrosia arborescens* Miller fue de 0,17 %, por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger.
2. El aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller es líquido aceitoso de color amarillo intenso, con una densidad relativa de 0,9014 g/ml, índice de refracción 1,4690, índice de acidez 3,727 mg KOH/g aceite e índice de saponificación de 43,53 mg KOH/g aceite.
3. El aceite esencial de las hojas frescas de *Ambrosia arborescens* Miller en su composición muestran el β -himachaleno (14,2%) es el más abundante seguido del 2,6-dimethyl-3,5-heptadien-2-ol (10,6%), germacreno D (7,41%), α -bisabolol (6,25%) y 6-Isopropenyl-4-8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol (6%) por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS).
4. La actividad antioxidante por el método de DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrihidrazil) para el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller, muestra una concentración Inhibitoria al 50 % de $IC_{50} = 0,000211$ mg/mL y 389,86 μ mol Trolox/g de aceite esencial expresada en TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

SUGERENCIAS

De este trabajo de investigación desarrollado se menciona las siguientes recomendaciones:

- Promover investigaciones mediante diferentes métodos para el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller para su uso como actividad antioxidante y reemplazar a muchos productos químicos que generalmente son tóxicos y dañinos para el hombre.
- Realizar investigaciones sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de las diferentes partes de la especie *Ambrosia arborescens* Miller.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado, B (2017). *Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra*. (Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos). Facultad de farmacia y bioquímica unidad de posgrado, Universidad Nacional mayor de san Marcos, Lima.

<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5653?show=full>
2. Álvarez, *et al.* (Abril). Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género vismia (Guttiferae). *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 15(1): 165-172.
3. Barajas, C (2011). *Propuesta de mejora utilizando diseño de experimentos en el desarrollo de técnicas analíticas en un laboratorio farmacéutico*. (Tesis para obtener el grado de maestro en ingeniería industrial). Instituto Politécnico Nacional, México

<http://www.virtual.sepi.upiicsa.ipn.mx/tesis/1309388514550tesismarzo.pdf>
4. Bolaño, *et al.* (2015). Emisiones biogénicas de monoterpenos en el parque nacional natural tayrona, santa marta (colombia). *Revista.luna.azúl*, 40:102-116.
5. Bruneton, J. (2ed). (2001). *Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales*. Zaragoza, España, Editorial Acriba.

6. Cano de terrones, T. (Junio). Caracterización de una espirolactona sesquiterpenica α -metilénica obtenida de *Ambrosia arborescens* Mill y evaluación de su actividad biológica en tripanosoma cruzi. *Rev.Soc.Quim,Perú*, 80(2):124 -134. [online].
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v80n2/a06v80n2.pdf>
7. Coronado, *et al.* (Febrero). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 42: 0717-7518.
8. Corral, A. (septiembre). *Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas*.
<http://mural.uv.es/calooan/>. Acceso el 18 de septiembre 2018.
9. Córdova, J. (2009). *Uso y utilización de plantas medicinales en Universidades de Lima*. (tesis para optar el título de Licenciado en Antropología). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.
<http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/1077>
10. Carhuapoma, P. (2007). *Composición química, actividad anti-Helicobacter pylori y antioxidante del aceite esencial de Satureja brevicalyx Epling "urqu muña"*. (tesis para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

11. Chávez, F. (2002). *Investigación de los parámetros para la obtención del aceite esencial de la Satureja boliviana y sus características físicas, químicas y biológicas*. UNSA. Perú.
12. Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México, Limusa.
13. Echavarría, *et al.* (Agosto). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*. 9(20): 29-35.
14. Escamilla, *et al.* (1ed). (2015). *Plantas Medicinales*. México.
15. Fitó, M. (2003). *Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos*. (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4431/mfc1de1.pdf>
16. Fontenla, G. (2006). *Caracterización del aceite esencial de "Lanche" (Myrcianthes rhopaloides (H.B.K) Mc Vaugh) provenientes del distrito de Chalaco, provincia de Morropón – Piura, obtenido por dos métodos de destilación*. (Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Forestal). Universidad Nacional agraria la Molina, Lima.

17. Gallego, M. (2016). *Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles*. (tesis doctoral). Universitat Politècnica de Catalunya Barcelonatech, Barcelona.
18. Gaitán, I. (2009). *Evaluación de la actividad antioxidante de cinco especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones de la memoria y los nervios*. (Trabajo de graduación para optar el grado de maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias químicas y farmacia, Guatemala.
19. Granados, *et al.* (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua*. 10(1):12-23.
20. Gonzales, R. (2008). *Fotodegradación de productos plásticos elaborados con polietileno lineal de baja densidad*. (tesis profesional). Posgrado interinstitucional en ciencia y tecnología, Centro de investigaciones en óptica, Aguascalientes.
21. Gutiérrez MC, Droguet M. *Identificación de compuestos volátiles por CG-MS*. La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas. Identificación de Compuestos Causantes de mal Olor. BOLETIN INTEXTER (U.P.C) N°122. 2002.
22. Ibarra, M. (2013). *Paredes EA. Eficacia antibacteriana in vitro de marco (Ambrosia arborescens Mill,) y paico (Chenopodium ambrosoides L.) en una Formulación Cosmética*. (Tesis previa a la obtención del título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Carrera:

Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Quito.
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6007>

23. Karousou D, Koureas D.N, Kokkini S. Essential oil composition is related to the natural's habitats: *Coridothymus Capitatus* and *Satureja thymbra* in natura 2000 sites of Crete Phytochemistry 66. 2005 Pág. 2668-2673. 2005.
24. Leary, *et al.* (5 ed.). (1998). *Espectrometría visible y ultravioleta*. México, McGraw-Hill
25. López, S. (1975). *Alteraciones de un aceite de girasol usado en fritura. Incidencia de su ingesta sobre parámetros nutricionales y del metabolismo lipoproteico en ratas*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense, Madrid.
26. Lock de Ugaz, O. (1ed.). (1988). *Investigación Fitoquímica*. Perú, Copyright.
27. Lock de Ugaz, O. (2ed.). (1994). *Investigación Fitoquímica*. Perú, Copyright.
28. Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*.
http://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
29. Martin, *et al.* (2016). *Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores*.
Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1066>, 56 pp.

30. Mendoza, F. (2016). *Formulación Bioinsecticida a partir del aceite esencial de ambrosia arborescens Mill (altamisa) de Aplicación Canina*. (Tesis previa a la obtención del título). Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Cuenca, Cuenca.
31. Mendoza, J. (2012). Cromatografía de gases. 7-8.

https://www.u-cursos.cl/usuario/2775c7595e300ed228a801eb8341e457/mi_blog/r/GC_Clase_1__QAII-2012.pdf
32. Moya, E. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales de Marco (Ambrosia arborescens) y Quishuar (Buddleja incana), obtenidos mediante secado por aspersión*. (Tesis). Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
33. Montoya, G. (1ed.). (2010). *Aceites Esenciales*, Colombia.
34. Moscoso, E. (2014). *Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de cinco clones de papa nativa (Solanum tuberosum y del puré deshidratado)*. (Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial). Universidad Nacional José María Arguedas, Facultad de Ingeniería. Andahuaylas.
<http://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/209/15-2014-EPIA-Moscoso%20Moscoso-capacidad%20antioxidante.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

35. Monreal, *et al.* (noviembre). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH°) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *An. Vet.* 28: 67-78.
- [https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/37659/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20captaci%C3%B3n%20del%20radical%202,2-difenil-1-picrilhidrazilo%20\(DPPH\)%20para%20evaluar....pdf](https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/37659/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20captaci%C3%B3n%20del%20radical%202,2-difenil-1-picrilhidrazilo%20(DPPH)%20para%20evaluar....pdf)
36. Noriega, *et al.* (2017). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los rizomas de *Renealmia thyrsoides* (Ruiz & Pav) Poepp. & Eddl (shiwanku muyu). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 22 (2).
37. Ochoa, *et al.* (diciembre). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria.* 3(2012) 291-302.
- <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/90>
38. Ocampo, *et al.* (1ed.). (2008). *Curso práctico de química orgánica.* Colombia, Editorial ciencias exactas y naturales.
39. Oviedo, *et al.* (2011). *Métodos de extracción de aceites esenciales, comparación y empleo en productos de perfumería.* (Monografía para optar al título de licenciado en química). Facultad de Ciencias y tecnología departamento de química, Universidad Nacional autónoma de Nicaragua Unan-León. Nicaragua.

40. Oliveira, G. (2014). “*Capacidad antioxidante de Averrhoa carambola L (Carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres*”. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Humana. Lima:
41. Parrales, *et al.* (2012). *Cromatografía del gas natural*. (tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
- <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/91597/D-68860.pdf>
42. Peredo, *et al.* (2009). *Aceites esenciales: métodos de extracción*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 24-32.
- [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
43. Palacios, M. (2013). *Texto digital de farmacognosia y fitoquímica*. Chimbote, Perú.
44. Quiñonez, S. (2017). *Caracterización y determinación del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del fruto de sanke*. (tesis). Escuela profesional de ingeniería agroindustrial, Facultad de ciencias agrarias. Acobamba.
45. Ricaldi, *et al.* (diciembre). Cromatografía de gases-Espectrometría de masas de compuestos fitobioactivos delo aceite esencial de *Satureja incana*. *Apunt. Cienc. Soc.* 04(02).

46. Rodríguez, *et al.* (1Ed.). (2012). *Procedimientos para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México.
47. Robles, J. (2014). *Desarrollo de metodologías analíticas mediante Cromatografía/Espectrometría de masas para el control de Contaminantes Orgánicas prioritarias y emergentes en Aguas residuales y superficiales*. (tesis doctoral). Facultad de Ciencias experimentales departamento de Química, Física y Analítica. Universidad de Jaén. Jaén
<http://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/647/1/9788484398813.pdf>
48. Rodas, M. (2012). *Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor*. (tesis). Facultad de ingeniería. Universidad Rafael Landívar. Guatemala.
49. Ruíz, *et al.* (marzo). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Rev Soc Quím Perú*. 81(2).
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n2/a02v81n2.pdf>
50. Samaniego, C. (2006). *Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante de aceites de oliva virgen extra. Implicación en la salud*. (Tesis para optar al grado de doctor en farmacia). Universidad de granada, facultad de farmacia. Granada:
<https://hera.ugr.es/tesisugr/16068282.pdf>

51. Solís, *et al.* (1Ed.). (2018). *Plantas y Aceites esenciales como insecticidas*. Cusco, Perú.
52. Taco, *et al.* (2018). *Evaluación del tiempo de extracción, factor de empaquetamiento, humedad de rizoma, en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de jengibre (zingiber officinale roscoe) por arrastre de vapor, caracterización fisicoquímica del aceite esencial y aplicación antioxidante en el aceite de oliva*. (tesis para optar el título profesional de ingenieros químicos). Facultad de ingeniería de procesos, Escuela profesional de ingeniería química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa.
53. Torrenegra, M. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de oregano (Origanum vulgare), oregano “borde blanco” (Origanum vulgare ssp) y areganito (Lippia alba) cultivado en la zona norte del departamento de bolívar (Colombia)*. (Tesis para optar el título de Magíster en Ciencias y Tecnología de Alimentos). Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
<http://bdigital.unal.edu.co/39674/1/45506760.2014.pdf>
54. Vera, M. (2008). *Estudio fitoquímico de una planta de la flora del ecuador: ambrosia arborescens*. (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en biotecnología). Departamento de ciencias de la vida ingeniería en biotecnología, Escuela politécnica del ejército. Sangolquí:
55. William, *et al.* (june). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.- Wiss. u.- Technol.* France.28, 25-30.

56. Yáñez, *et al.* (agosto). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Rev. peru biol.* Vol.18 (2).
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v18n2/a03v18n2.pdf>

ANEXOS



Figura 16. Muestreo de la especie de *Ambrosia arborescens* Miller



Figura 17. Preparando la muestra para extraer aceite esencial

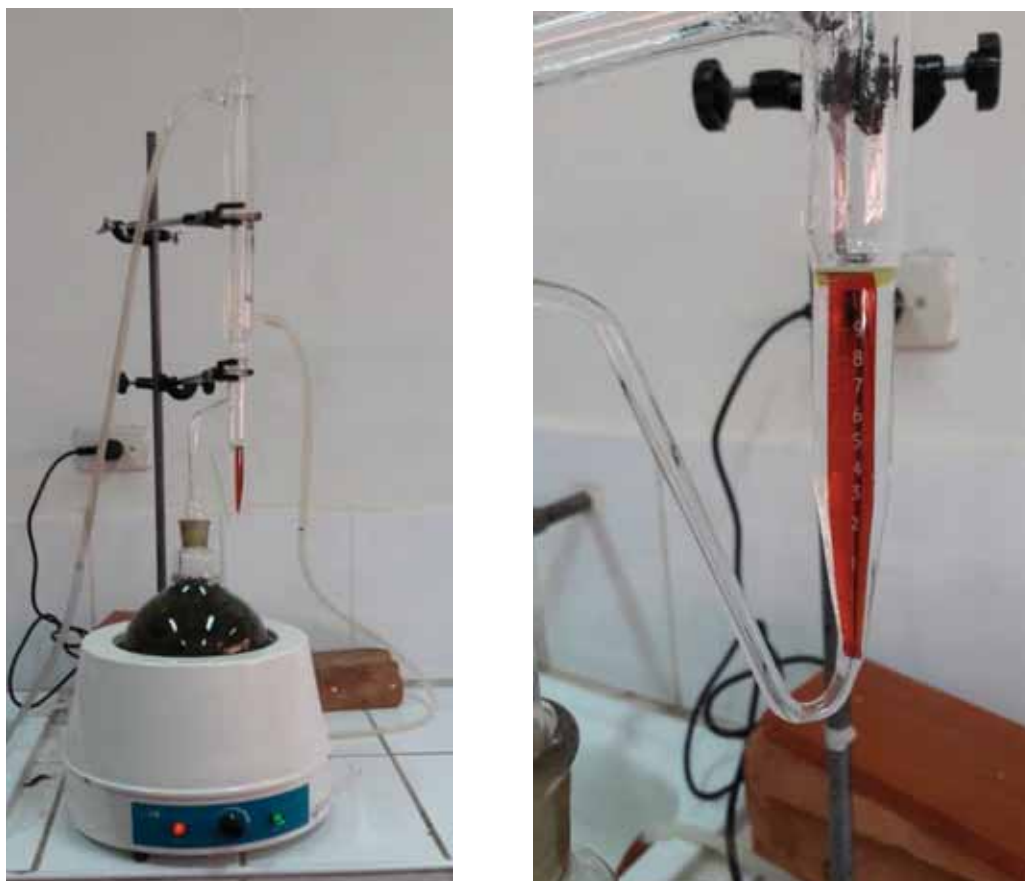


Figura 18. Obtencion del aceite esencial por hidrodestilacion con trampa de Clevenger



Figura19. Prueba de solubilidad del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller

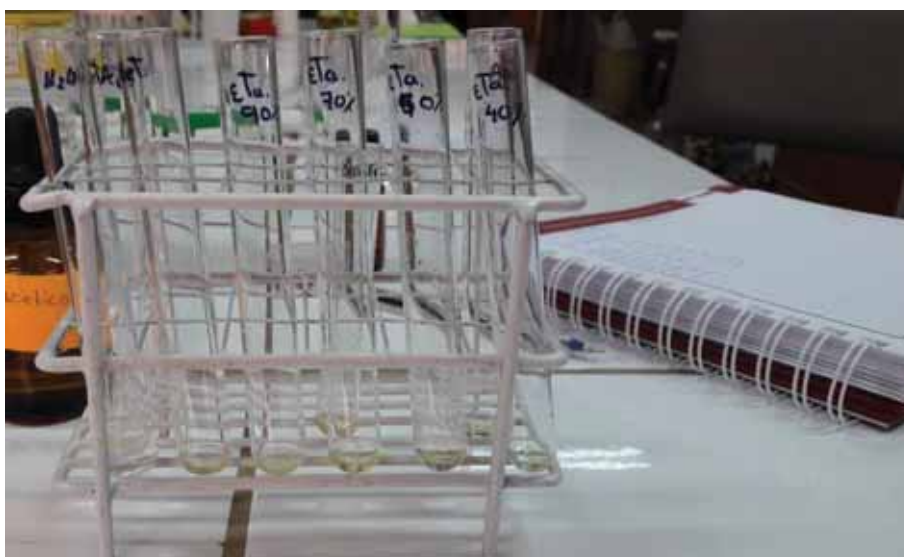


Figura 20. Pruebas de solubilidad del aceite esencial



Figura 21. Reactivos para determinar el índice de acidez (I.A)



Figura 22. Titulación para determinar del índice de acidez (I.A)



Figura 23. Reactivos para determinar el índice de saponificación (I.S)



Figura 24. Reflujo del aceite esencial con etanol por 40 minutos



Figura 25. Titulación del índice de saponificación



Figura 26. Viraje de rojo sangre a amarillo precipitado del índice de saponificación



Figura 27. Espectrofotómetro UV-Visible; Thermo SCIENTIFIC, Evolution 220



Figura 28. Preparación del aceite esencial para la corrida en cromatografía de gases



Figura 29. Lectura de la composición química del aceite esencial *Ambrosia arborescens* Miller



Figura 30. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas; Termo scientific, Trace 1310, ISQ QD



Figura 31. Reactivos para la determinación de la actividad antioxidante



Figura 32. Preparación de los reactivos para determinar la actividad antioxidante



Figura 33. Disoluciones de trolox



Figura 34. Preparación del radical DPPH° (1,1 – difenil-2-picrilhidrazil)



Figura 35. Radical DPPH° con el patrón de referencia Trolox

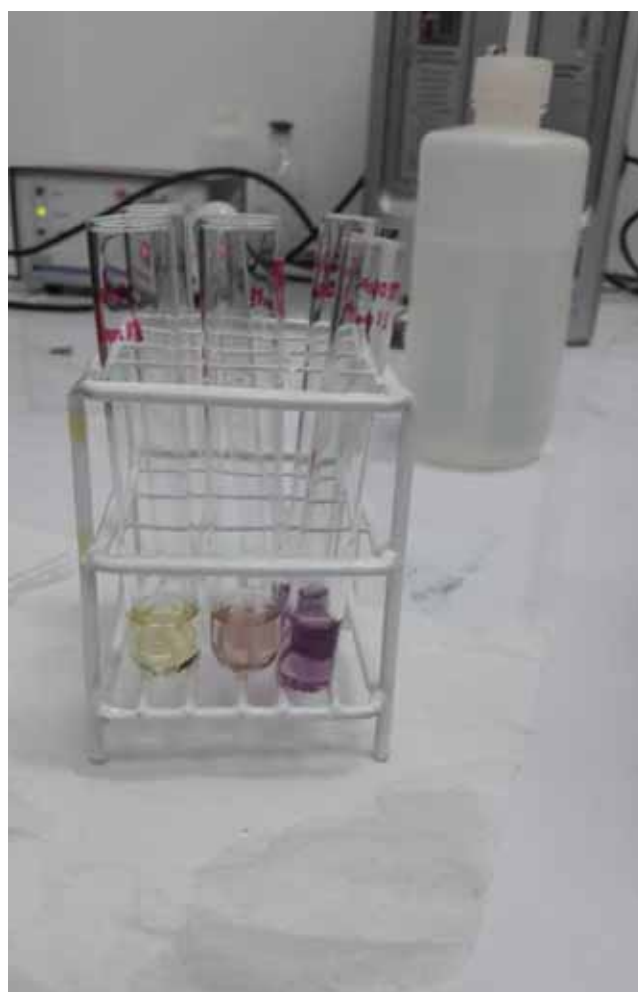


Figura 36. Radical estable DPPH° con el aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller



Figura 37. Equipo para la determinación del método DPPH° (1,1- difenil-2-picrilhidrazil)

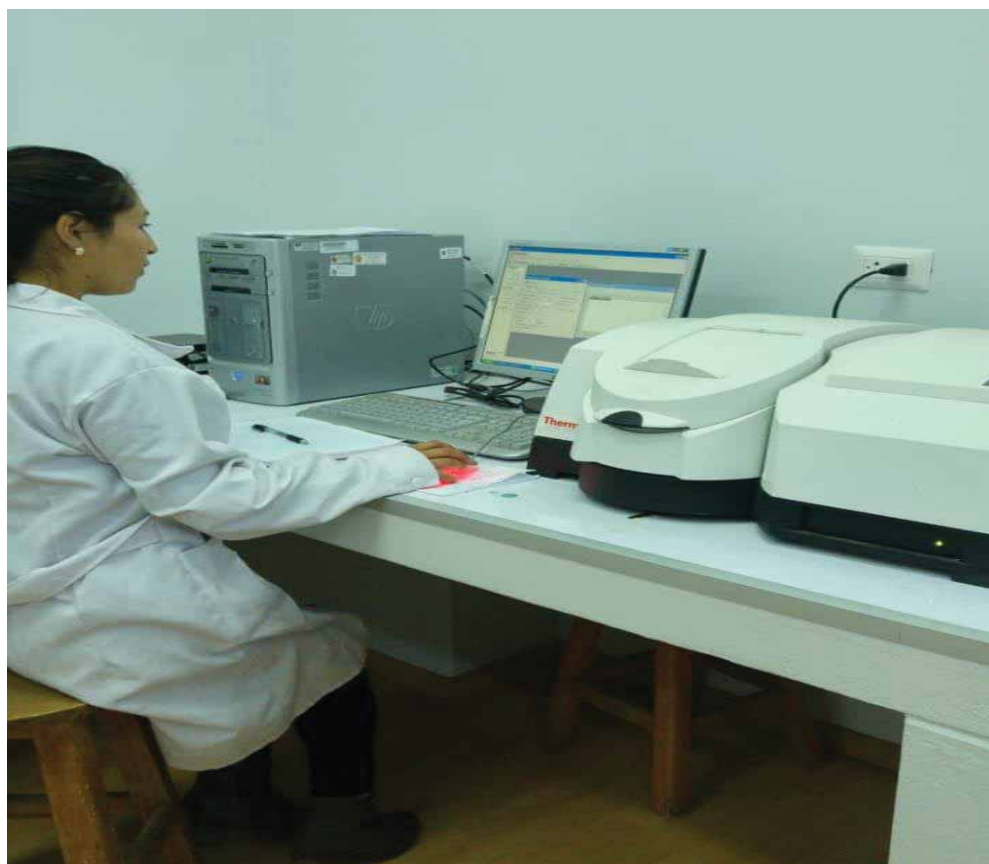


Figura 38. Lectura del estándar de referencia y el aceite con el método DPPH°

PEAK LIST							
data03_180530203357.raw							
RT: 0.00 - 52.11							
Number of detected peaks: 92							
Apex RT	Start RT	End RT	Area	%Area	Height	%Height	
4.85	4.8	4.89	435540243.6	0.18	141105094	0.21	3-Hexen-1-ol
5.96	5.83	6.02	2041649352	0.82	961360889	1.46	Santolina triene
6.63	6.54	6.7	515285771.1	0.21	224426256	0.34	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.
6.86	6.78	6.93	1536117277	0.62	647170810	0.98	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-, (ñ)-
7.97	7.9	8.05	5204981692	2.1	1979909071	3	á-Phellandrene
8.14	8.09	8.19	380232014.1	0.15	137298424	0.21	á-Pinene
8.42	8.37	8.45	748286912.9	0.3	318418670	0.48	β-Pinene
8.48	8.45	8.53	1017987794	0.41	404088209	0.61	1-Hexen-3-Yne,2,5,5-trimethyl-
8.99	8.89	9.04	530463544.6	0.21	196809205	0.3	ni
9.33	9.26	9.4	255118190.6	0.1	97576752.2	0.15	cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
9.56	9.5	9.61	266405748.5	0.11	105673061	0.16	benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-
9.73	9.68	9.76	238016296.2	0.1	89062104.7	0.14	D-Limonene
9.83	9.76	9.92	2883692331	1.16	1000149424	1.52	eucalyptol
10.24	10.18	10.3	165824849.8	0.07	64630176.3	0.1	3-Carene
10.67	10.58	10.7	503772910.4	0.2	184922195	0.28	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
11.06	10.98	11.2	4994178839	2.02	1696544383	2.57	terpineol, cis-á-
11.36	11.31	11.4	140267904.7	0.06	33279291.3	0.05	1,5-Heptadien-4-ol, 3,3,6-trimethyl-
11.6	11.47	11.7	215399104.6	0.09	56408915.4	0.09	cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12.08	11.99	12.2	7173721135	2.9	1977365542	3	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
12.3	12.23	12.4	5502237288	2.22	1763148197	2.67	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-
12.86	12.75	12.9	26245795717	10.6	4977452829	7.55	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
13.15	13.07	13.2	165879284.4	0.07	54039143	0.08	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, [1S-(1á,2á,5á)]-
13.32	13.23	13.4	106726214.1	0.04	36688765.5	0.06	cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol
13.5	13.38	13.6	734036090.6	0.3	226972390	0.34	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
13.63	13.57	13.7	429843067.8	0.17	145761781	0.22	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, [1S-(1á,2á,5á)]-

13.79	13.73	13.9	566822180.9	0.23	178154434	0.27	ni
14.21	14.11	14.3	496228162.9	0.2	148794304	0.23	ni
14.46	14.38	14.5	166963803.2	0.07	53180102.1	0.08	p-menth-1-en-8-ol
14.83	14.74	14.9	2666283362	1.08	885184229	1.34	3-Cyclohexene-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-
15.31	15.17	15.4	1092115193	0.44	302671549	0.46	ni
15.98	15.93	16.1	260484624.3	0.11	79233807.4	0.12	propanal, 2-methyl-3-phenyl-
16.25	16.2	16.3	125561990.9	0.05	44212181.4	0.07	tricyclo[3.2.2.0]nonane-2-carboxylic acid
17.76	17.69	17.9	2122959007	0.86	664882018	1.01	4,6-Heptadienoic acid, 3,3,6-trimethyl-, methyl ester
20.5	20.38	20.6	373746121.2	0.15	113166710	0.17	phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-
21.38	21.33	21.5	784333863.8	0.32	223045945	0.34	copaene
21.76	21.69	21.9	1888177860	0.76	366934008	0.56	ni
22.01	21.94	22.1	1392294611	0.56	472154010	0.72	benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-
22.34	22.28	22.4	624992587.6	0.25	209680145	0.32	1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl-, (R)-
22.4	22.37	22.5	513598084	0.21	180849456	0.27	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1aá,4á,4aá,7bá)]-
22.78	22.69	22.9	2423166569	0.98	765998381	1.16	caryophyllene
23.16	23.12	23.2	175385115.2	0.07	65090577.3	0.1	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-
23.74	23.66	23.8	1244693747	0.5	330087762	0.5	β -farnesene
23.88	23.83	23.9	1219591926	0.49	400694538	0.61	$\acute{\alpha}$ -caryophyllene
23.98	23.94	24.1	465698471.7	0.19	107913313	0.16	2H-1-Benzopyran, 7-methoxy-2,2-dimethyl-
24.63	24.51	24.7	35176182599	14.2	6254449113	9.49	1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl-, (R)-
24.68	24.66	24.7	10025951453	4.05	4451939371	6.75	benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
24.74	24.7	24.8	18360806637	7.41	4997008512	7.58	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
24.95	24.89	25	3049881896	1.23	936493542	1.42	naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4aá,7á,8aá)]-

25.12	25.06	25.2	2521020688	1.02	652968102	0.99	c-elemene
25.31	25.24	25.4	3343735077	1.35	1114843536	1.69	á-farnesene
25.48	25.38	25.6	1014738484	0.41	227251726	0.34	Tricyclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-ene, 2,6,6,9-tetramethyl-
25.7	25.59	25.7	2175948034	0.88	553295231	0.84	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4- methylene-, [1aR- (1aá,4aá,7á,7aá,7bá)]-
25.77	25.74	25.8	1659167078	0.67	528204641	0.8	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a- hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1- methylethyl)-, (1S-cis)-
25.92	25.86	26	763874447	0.31	234519889	0.36	cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-
26.24	26.14	26.3	14320609222	5.78	3621376893	5.49	1H-Cyclopropa[a]naphthlene, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahydro- 1,1,3a,7-tetramethyl-, [1aR- (1aá,3aá,7bá)]-
26.35	26.3	26.4	1575199820	0.64	503377163	0.76	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, decahydro-1,1,3a-trimethyl-7- methylene-, [1aS- (1aá,3aá,7aá,7bá)]-
26.96	26.89	27	4400913292	1.78	1325854430	2.01	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11- trimethyl-, (E) -Z
27.13	27.03	27.2	2517832153	1.02	624173949	0.95	Diepicedrene-1-oxide
27.24	27.2	27.3	654729193	0.26	225429458	0.34	3-Hexen-1-ol benzoate
27.47	27.36	27.6	3404493607	1.37	780297786	1.18	1-Hydroxy-1,7 -dimethyl-4- isopropyl-2,7 -cyclodecadiene
27.65	27.59	27.7	827648131	0.33	202691569	0.31	caryophyllene oxide
28.09	27.97	28.2	1295856049	0.52	350032310	0.53	calarene epoxide
28.24	28.15	28.3	3170225468	1.28	944503317	1.43	carotol
28.6	28.49	28.7	896014089.8	0.36	202076502	0.31	cedren-13-ol, 8-
28.81	28.75	28.9	722029855.4	0.29	145727783	0.22	aristolene epoxide
28.93	28.89	29	436756845.4	0.18	148131754	0.22	isoaromadendrene epoxide
29.06	28.98	29.2	2771280449	1.12	750062456	1.14	muralan-3,9(11)-diene-10-peroxy
29.23	29.18	29.3	631475038.3	0.25	212734421	0.32	ledene oxide-(II)
29.31	29.28	29.3	324585678.9	0.13	120837386	0.18	3- Oxatricyclo[20.8.0.0(7,16)triaconta- 1(22),7(16),9,13,23,29-hexaene
29.54	29.42	29.6	1324205301	0.53	328046179	0.5	tau-Cadinol
29.82	29.68	29.9	14864282712	6	3513601449	5.33	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro- naphthalen-2-ol
30.08	29.96	30.2	906793230.5	0.37	167363183	0.25	1-Naphthalenol, decahydro-1,4a- dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, [1R-(1á,4aá,8aá)]-
30.52	30.44	30.6	2799942904	1.13	706197390	1.07	aromadendrene oxide-(2)
30.83	30.72	30.9	15468473526	6.25	3517396706	5.34	á-Bisabolol
31.27	31.16	31.3	275511476.3	0.11	68490450	0.1	ledol

31.41	31.35	31.5	334663603.3	0.14	107475920	0.16	13-Heptadecyn-1-ol
31.52	31.45	31.6	1406142768	0.57	381421925	0.58	cis-Nuciferol
31.66	31.6	31.8	295946690	0.12	97843105.1	0.15	trans-Nuciferol
32.11	31.99	32.2	1604217900	0.65	455997255	0.69	ni
32.32	32.24	32.4	403380264.2	0.16	97725820.9	0.15	7-Isopropenyl-1,4a-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-onn
32.43	32.38	32.5	376123348.6	0.15	102365417	0.16	alloaromadendrene oxide-(2)
32.62	32.53	32.7	348425819.5	0.14	82533011.1	0.13	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester,(Z,Z,Z)-
33.09	32.94	33.2	2312547892	0.93	601439046	0.91	4,6,6-Trimethyl-2-(3-methylbuta-1,3-dienyl)-3-oxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octane
33.29	33.23	33.3	1364623166	0.55	449039413	0.68	1-Heptatriacotanol
33.36	33.33	33.4	450239311.8	0.18	149126884	0.23	13-Heptadecyn-1-ol
33.51	33.45	33.6	648659496.3	0.26	177894436	0.27	perhydrocyclopropa[e]azulene-4,5,6-triol, 1,1,4,6-tetramethyl
33.72	33.65	33.8	268790260.5	0.11	63849976.3	0.1	3-Oxatricyclo[20.8.0.0(7,16)triaconta-1(22),7(16),9,13,23,29-hexaene
33.83	33.78	33.9	413696115.4	0.17	123410053	0.19	ni
34.57	34.5	34.7	884763286.4	0.36	284497789	0.43	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-
37.57	37.46	37.6	2550822613	1.03	782012869	1.19	3-Oxatricyclo[20.8.0.0(7,16)triaconta-1(22),7(16),9,13,23,29-hexaene
41.36	41.29	41.5	1073520970	0.43	354865516	0.54	Ledene oxide-(II)

1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl-, (R)-
 Formula C₁₅H₂₄, MW 204, CAS# 1461-03-6, Entry# 71328
 1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl-, (+)-

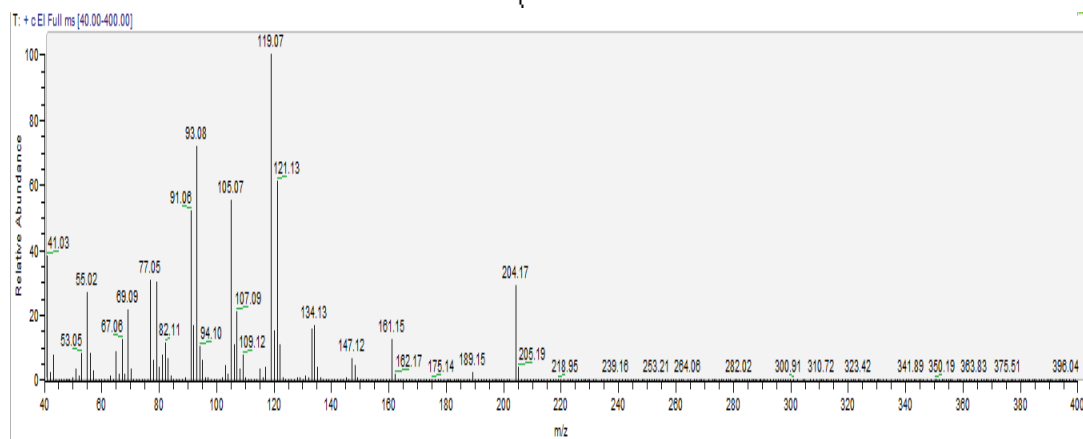
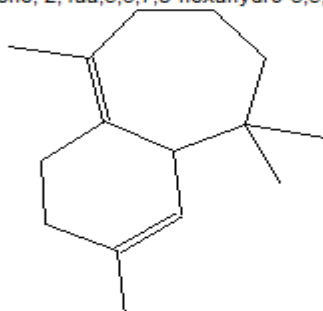


Figura 39. Masa Iónica del compuesto β -himachaleno

3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
 Formula C₉H₁₆O, MW 140, CAS# 77411-76-8, Entry# 63870
 (3E)-2,6-Dimethyl-3,5-heptadien-2-ol #

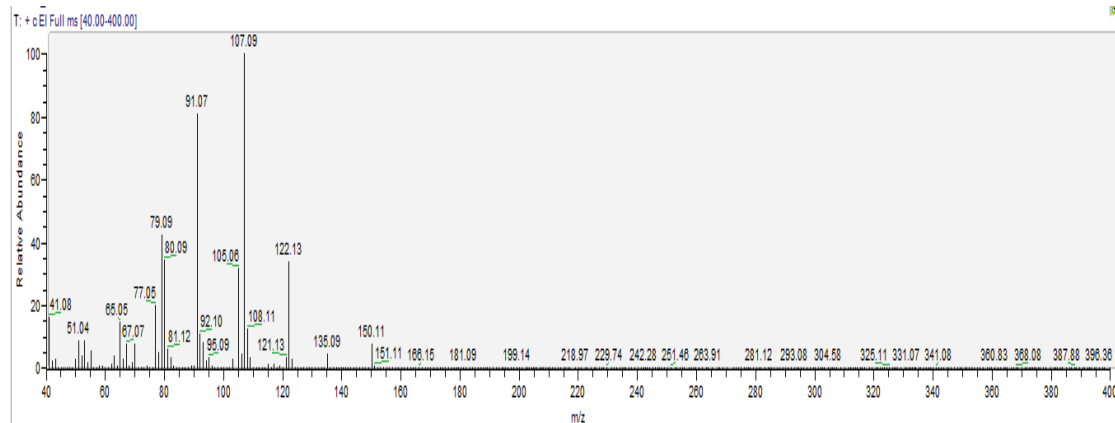
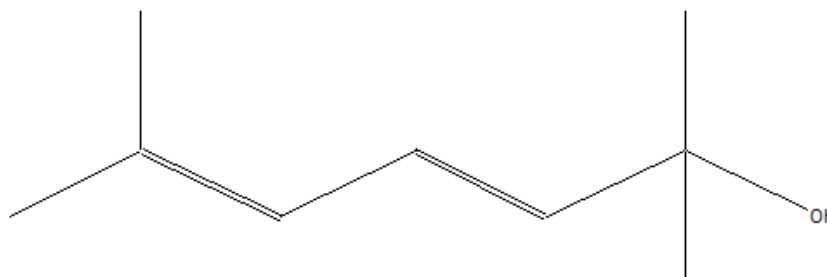


Figura 40. Masa Iónica del compuesto 2,6-dimetil-3,5-heptadien-2-ol

1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
 Formula C₁₅H₂₄, MW 204, CAS# 23986-74-5, Entry# 103253
 Germacrene D

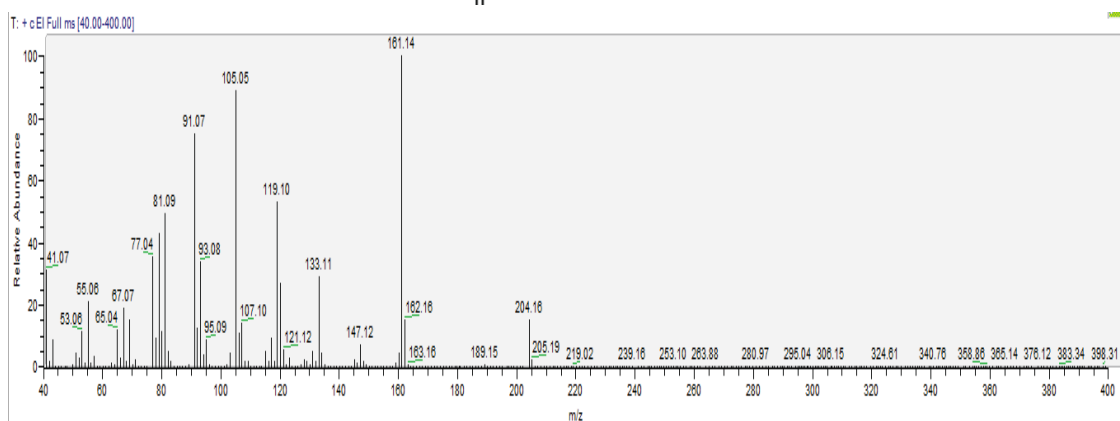
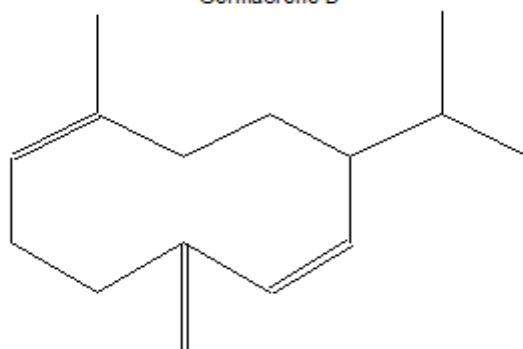


Figura 41. Masa Iónica del compuesto germacreno D

à-Bisabolol
 Formula C₁₅H₂₆O, MW 222, CAS# 515-69-5, Entry# 5569
 3-Cyclohexene-1-methanol, à,4-dimethyl-à-(4-methyl-3-pentenyl)-, (R*,R*)-

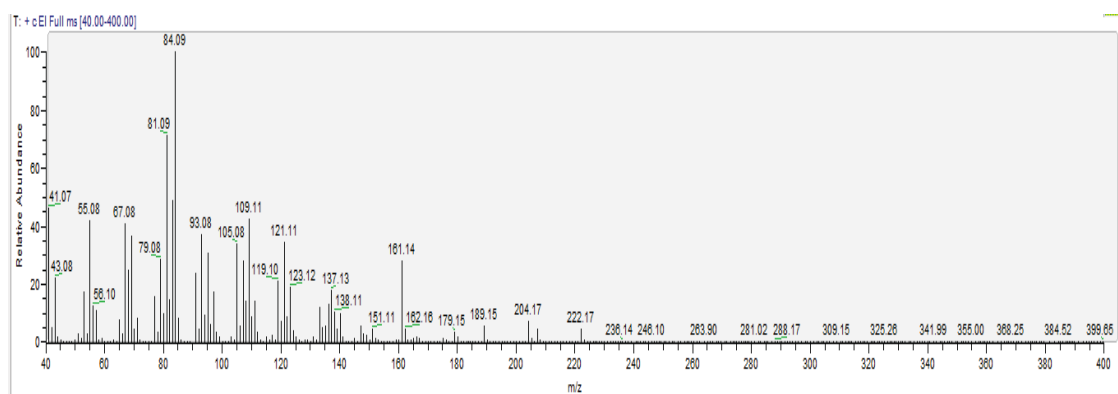
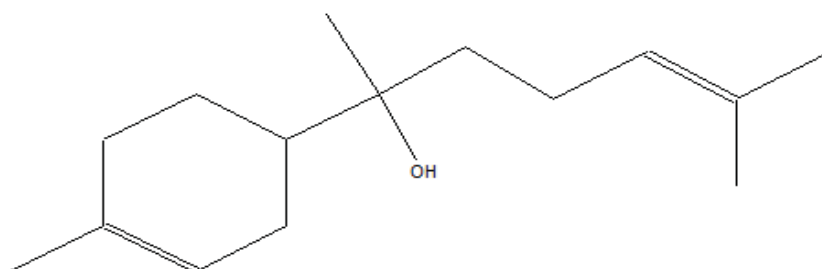


Figura 43. Masa Iónica del compuesto à-bisabolol

6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol
 Formula C₁₅H₂₄O, MW 220, CAS# NA, Entry# 101752

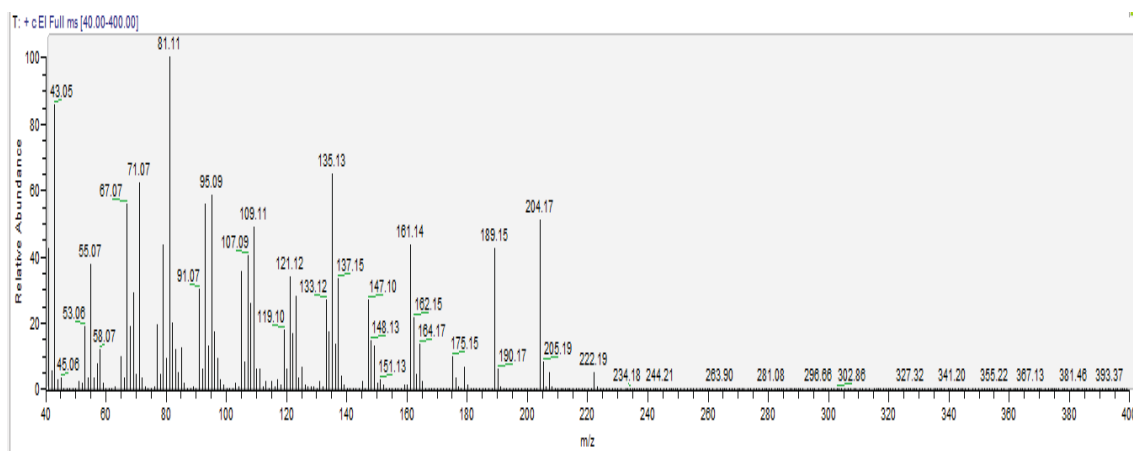
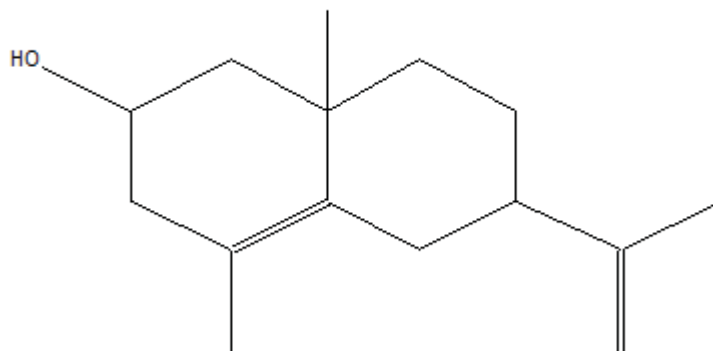


Figura 43. Masa Iónica del compuesto 6-isopropenil-4-8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno-2-ol

TECNICA	PRUEBA	FUNDAMENTO
INDECOPI Norma 319.084	SOLUBILIDAD	Se establece el método de determinación de la solubilidad de aceites esenciales en diluciones de etanol. El principio del método consiste en que, a una temperatura de 20 °C se adiciona progresivamente al aceite esencial, una solución acuosa de etanol de concentración adecuada y conocida y se observa el grado de solubilidad.
INDECOPI Norma 319.081	DENSIDAD RELATIVA	Define a la densidad como la relación entre el peso de un volumen, determinados a 20 °C, y a la densidad relativa como la relación entre la densidad del aceite a 20 °C y a la densidad del agua destilada a 20 °C.
INDECOPI Norma 319.075	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	El índice de refracción de los aceites esenciales oscila generalmente entre 1.43 y 1.62 a temperaturas alrededor de 20 °C siendo éste un parámetro que permite determinar si la muestra es pura.
INDECOPI Norma 319.085	ÍNDICE DE ACIDEZ	Los aceites esenciales trabajados en condiciones adecuadas no deben presentar valores superiores a 0.4-0.5% en ácido oleico. En general se toma como limite la acidez de 1% para calificar comercialmente aceites finos o calidad extra.