

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Evaluación de la composición fenólica y carácter antioxidante del aceite esencial proveniente de hojas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh "arrayán" en sus tres estadios fenológicos

Autor: Lisbeth Marisol Topón Quinga

Directora: Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.

Sangolquí, 6 de marzo de 2023



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1

Introducción

2

**Objetivos e
hipótesis**

3

**Materiales y
métodos**

4

**Resultados y
discusión**

5

Conclusiones

6

Recomendaciones

7

Agradecimientos

INTRODUCCIÓN

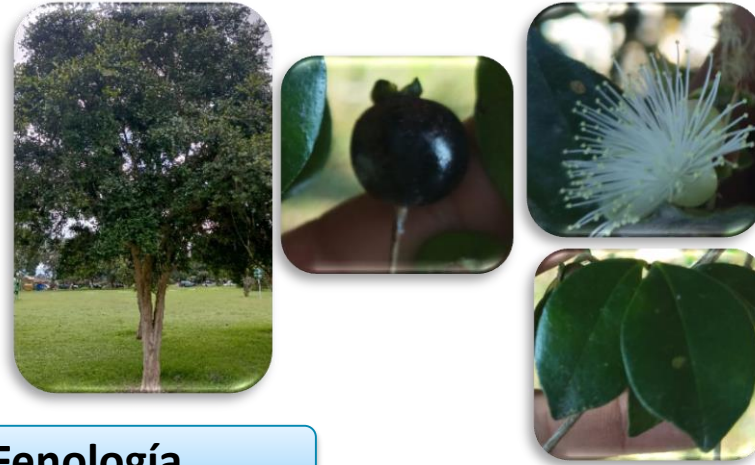
1



INTRODUCCIÓN

Myrcianthes hallii (O. Berg) McVaugh

Descripción botánica



Propiedades-Usos

Gastronomía

Medicina tradicional

Odontología

Propiedades biológicas

- Cicatrizante
- Antibacteriano
- Antimicrobiano
- Antioxidante

→ Arrayán-mirto

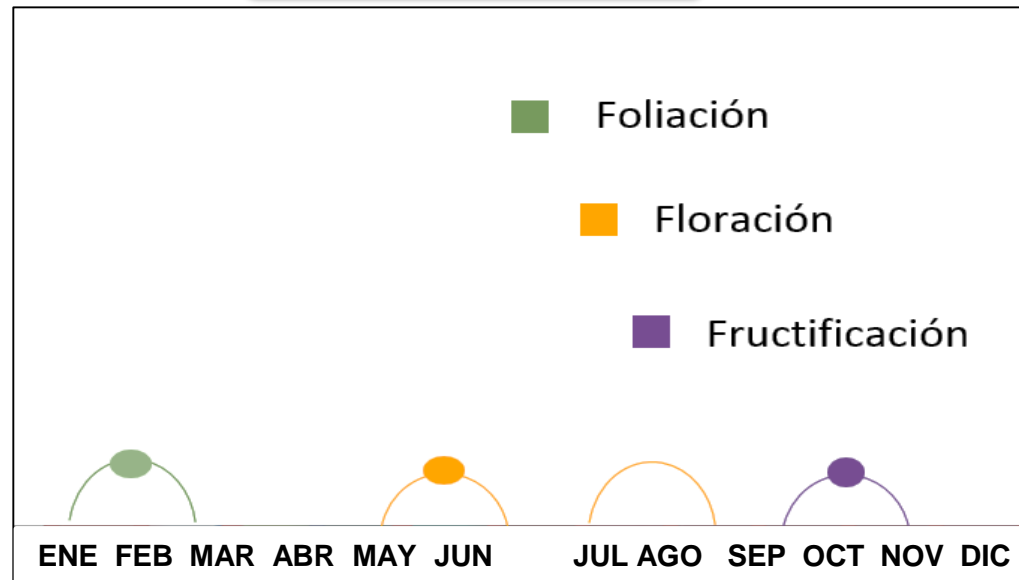
→ Familia Myrtaceae

→ En Ecuador esta de forma nativa y cultivada (2500-3000m)

→ Distribuido en Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Loja, Azuay, Chimborazo

- ✓ Aceite esencial
- ✓ Ácidos fenólicos
- ✓ Flavonoides
- ✓ Taninos
- ✓ Antocianinas

Fenología



(iNaturalist, 2024)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

INTRODUCCIÓN

ANTIOXIDANTE

Sustancia química que detiene o controla la oxidación, neutraliza radicales libres

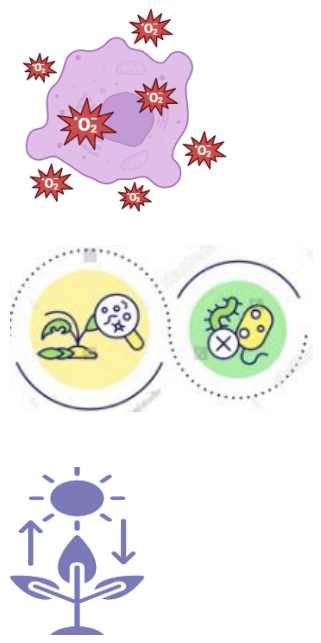


PLANTAS

- Los ROS se generan:
- Fotosíntesis
 - Respiración
 - Respuesta al estrés oxidativo

Función:

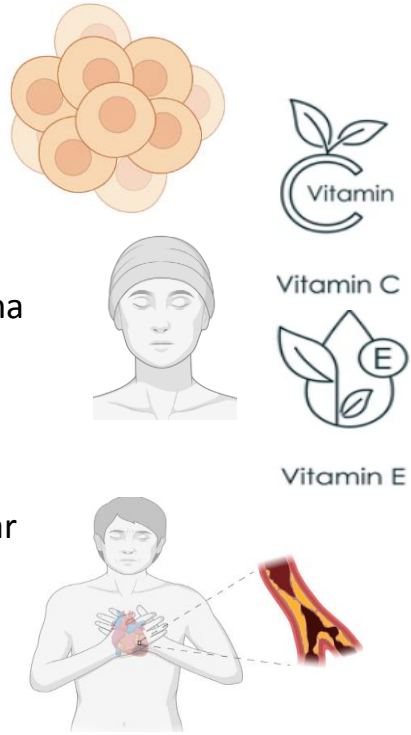
- Protección contra el estrés oxidativo
- Defensa contra patógenos
- Protección contra radiación UV



SERES VIVOS

- Los ROS se generan:
- Respiración celular
 - Metabolismo
 - Radiación ultravioleta

- Protección celular
- Refuerzo del sistema inmunológico
- Salud cardiovascular



ALIMENTOS

- Los ROS se generan:
- Oxidación de grasas
 - Procesos de conservación
 - Contaminación

- Prevención de la oxidación de grasas
- Extensión de la vida útil



INTRODUCCIÓN

Sustancia con alta volatilidad y aromático

ACEITE ESENCIAL

Se forman en: hojas, flores, frutos, semillas

Funciones:

- Antifúngico
- Insecticida
- Antioxidante
- Actibacterial



Composición:

- Compuestos fenólicos
- Ésteres
- Alcoholes
- Terpenoides

Métodos de extracción



Destilación por arrastre de vapor

Hidrodestilación

Solventes

Extracción con fluidos supercríticos

Prensado

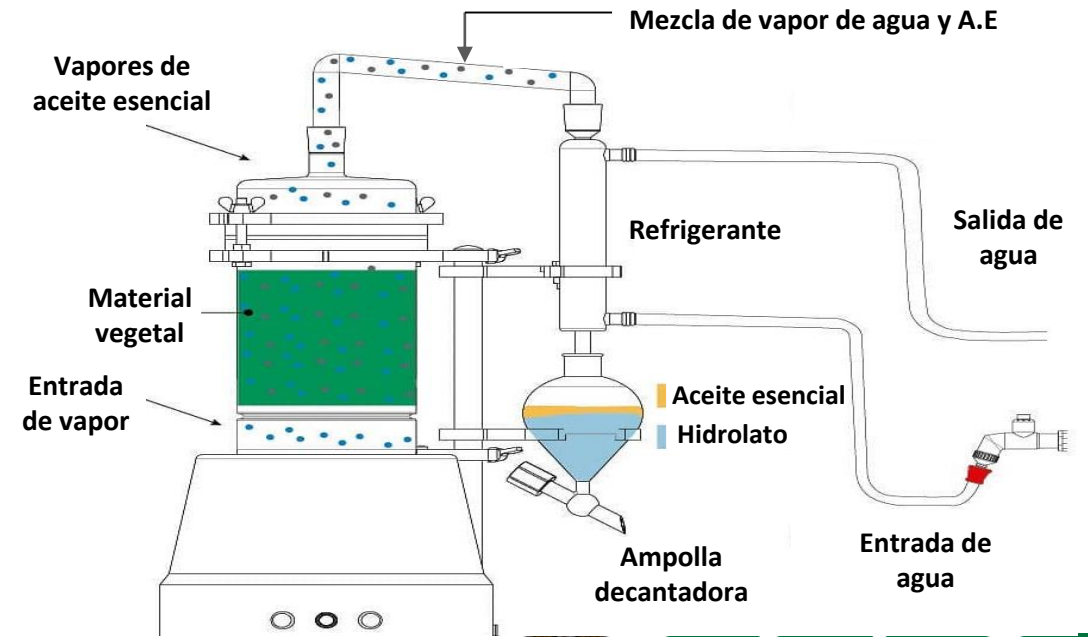
Destilación por arrastre de vapor

Generación del vapor de agua

Arrastre de sustancias volátiles

Enfriamiento y condensación

Separación de fases



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivos e hipótesis

2





Objetivo General:

Evaluar la composición fenólica y carácter antioxidante del aceite esencial proveniente de hojas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) McVaugh “arrayán” en sus tres estadios fenológicos.

Objetivos Específicos:

Obtener aceite esencial de las hojas *Myrcianthes hallii* (O. Berg) McVaugh “arrayán” recolectadas en tres estadios fenológicos en la parroquia de Guasaganda.

Determinar el contenido de fenoles presente en el aceite esencial extraído de hojas de arrayán en sus tres estadios fenológicos mediante el método de Folin-Ciocalteu.

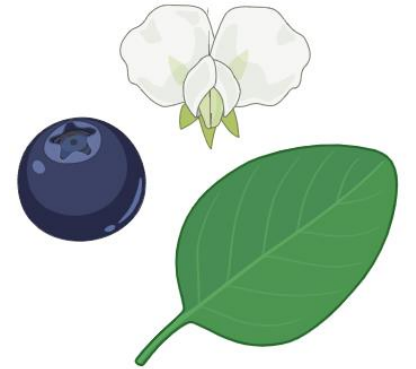
Establecer la presencia de flavonoides en el aceite esencial extraído de hojas de arrayán en sus tres estadios fenológicos.

Identificar el carácter antioxidante del aceite esencial extraído de hojas de arrayán en sus tres estadios fenológicos mediante los métodos DPPH, ABTS, FRAP.



HIPÓTESIS

La capacidad antioxidante del aceite esencial de la muestra *Myrcianthes hallii* (O. Berg) McVaugh, proviene de sus compuestos fenólicos y varía de forma estadísticamente significativa según el estadio fenológico en el que se recolectan sus muestras.



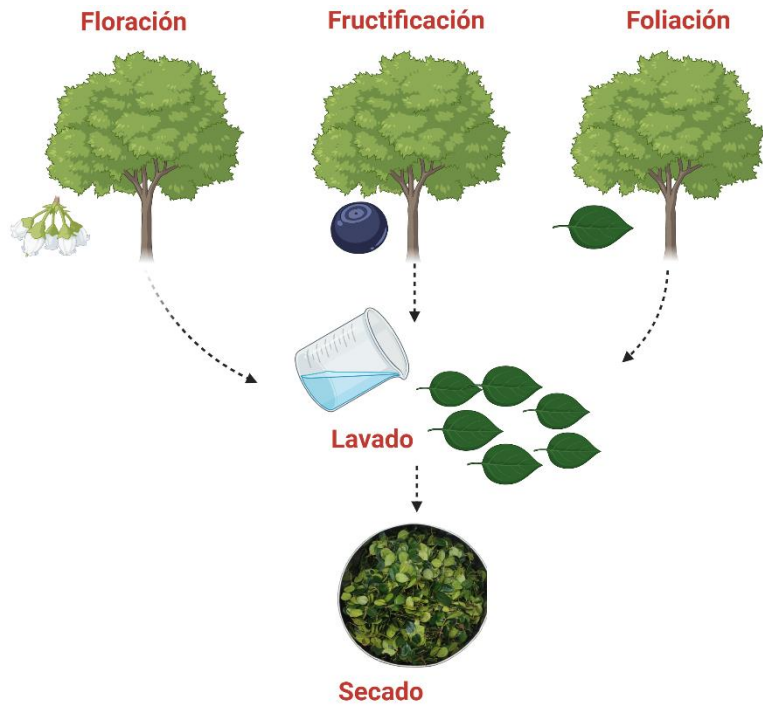
Materiales y Métodos

1



1

Obtención y preparación de la muestra



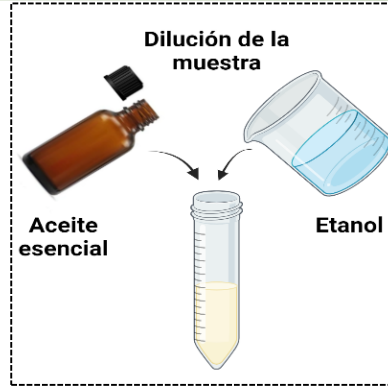
2

Obtención del aceite esencial



MATERIALES Y MÉTODOS

3 Ensayo DPPH



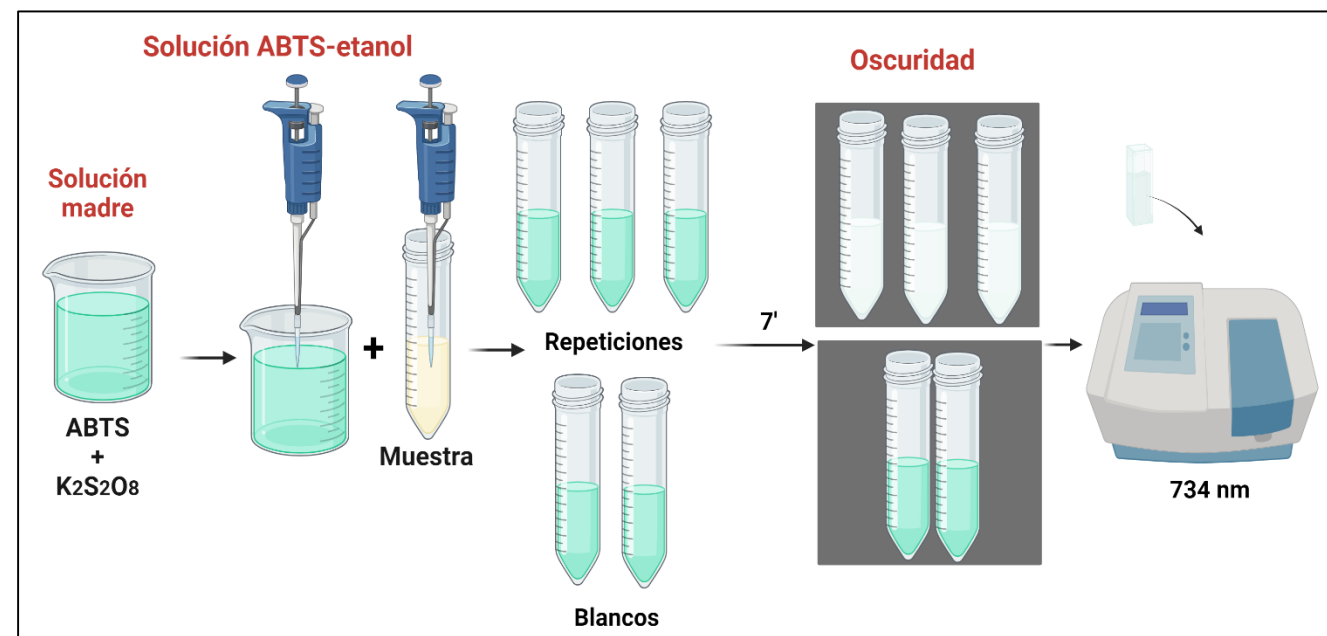
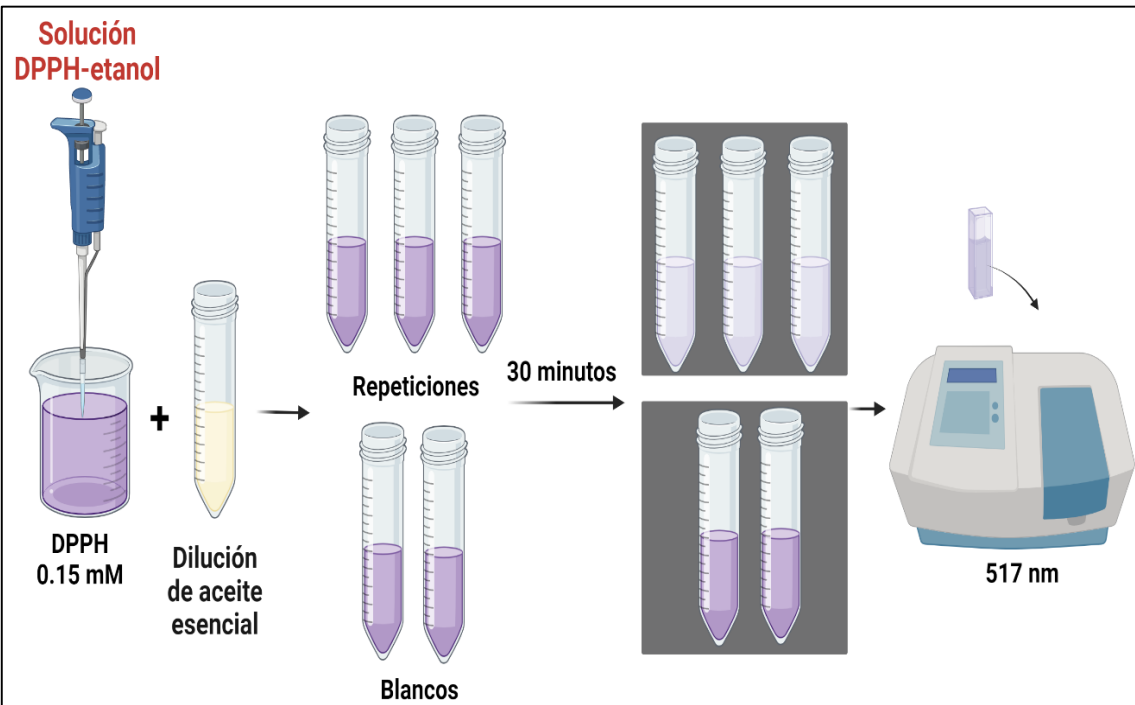
4 Ensayo ABTS

Capacidad antioxidante

Transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Transferencia de electrones (ET)

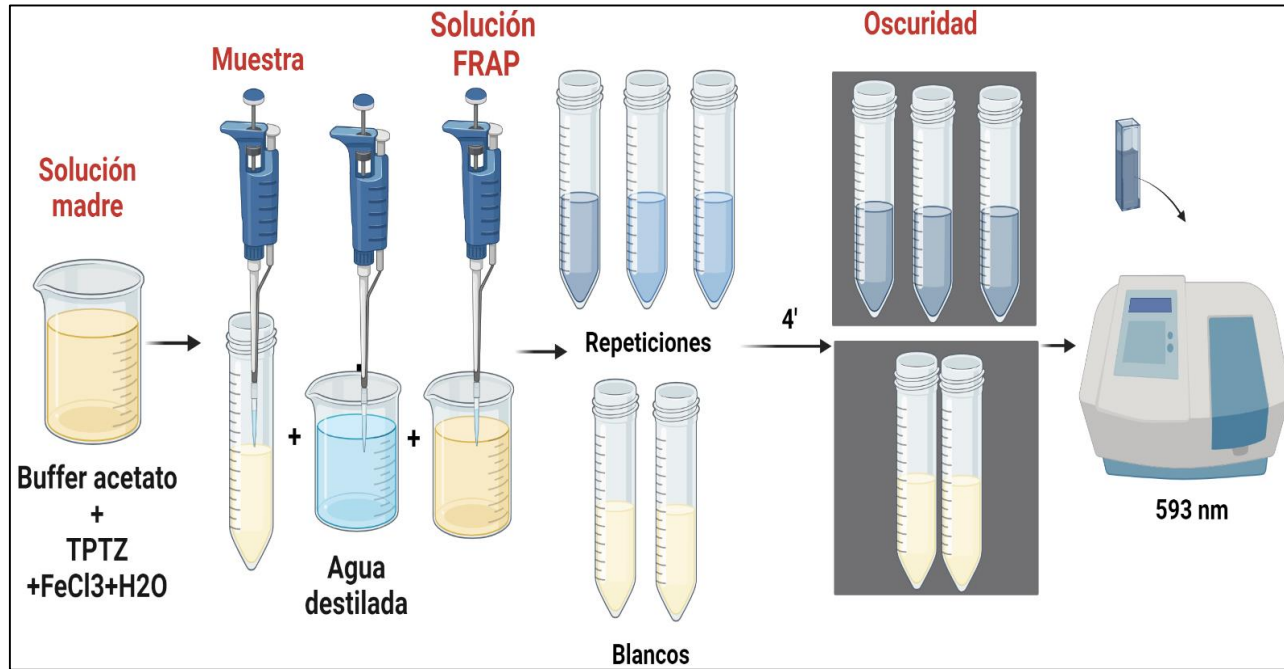
MIXTOS (HAT/ET):
DPPH, ABTS



MATERIALES Y MÉTODOS

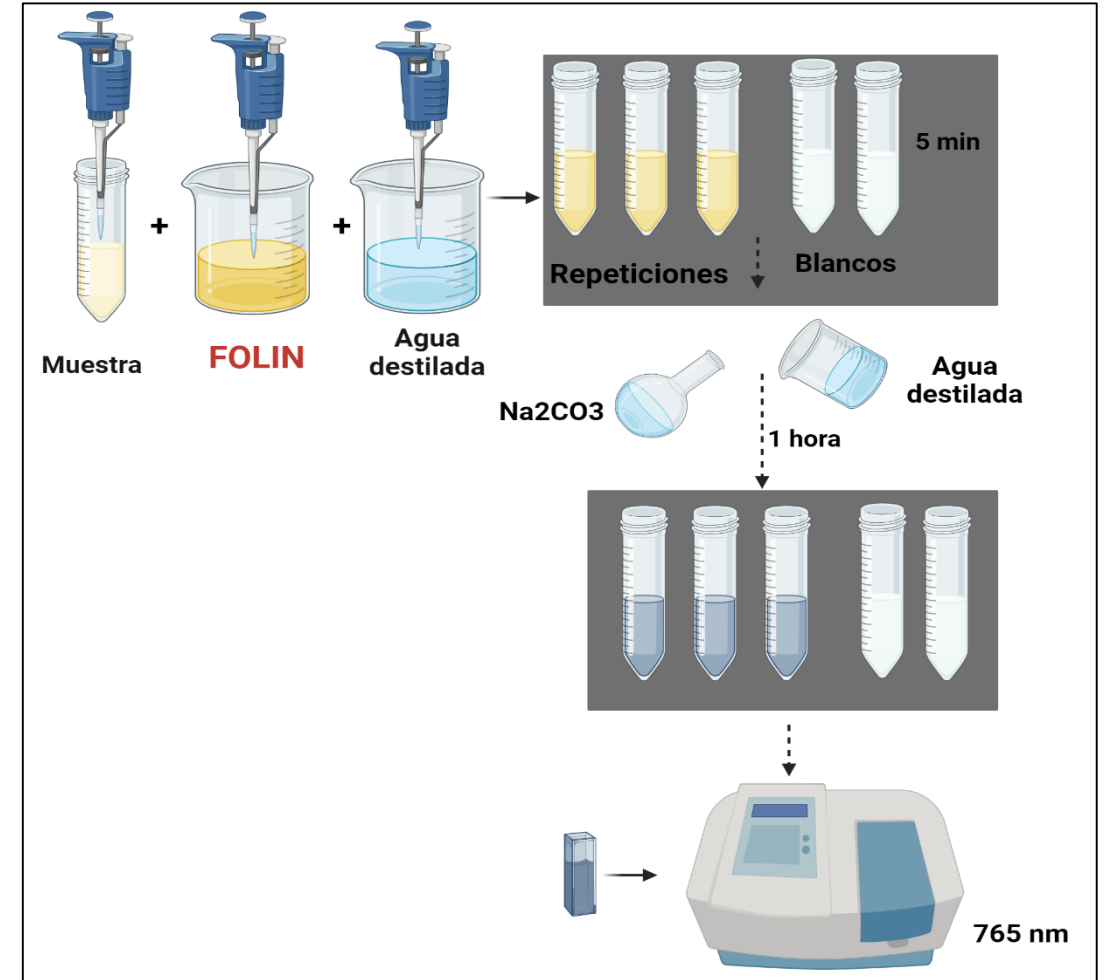
5

Ensayo FRAP



6

Ensayo de Fenoles Totales

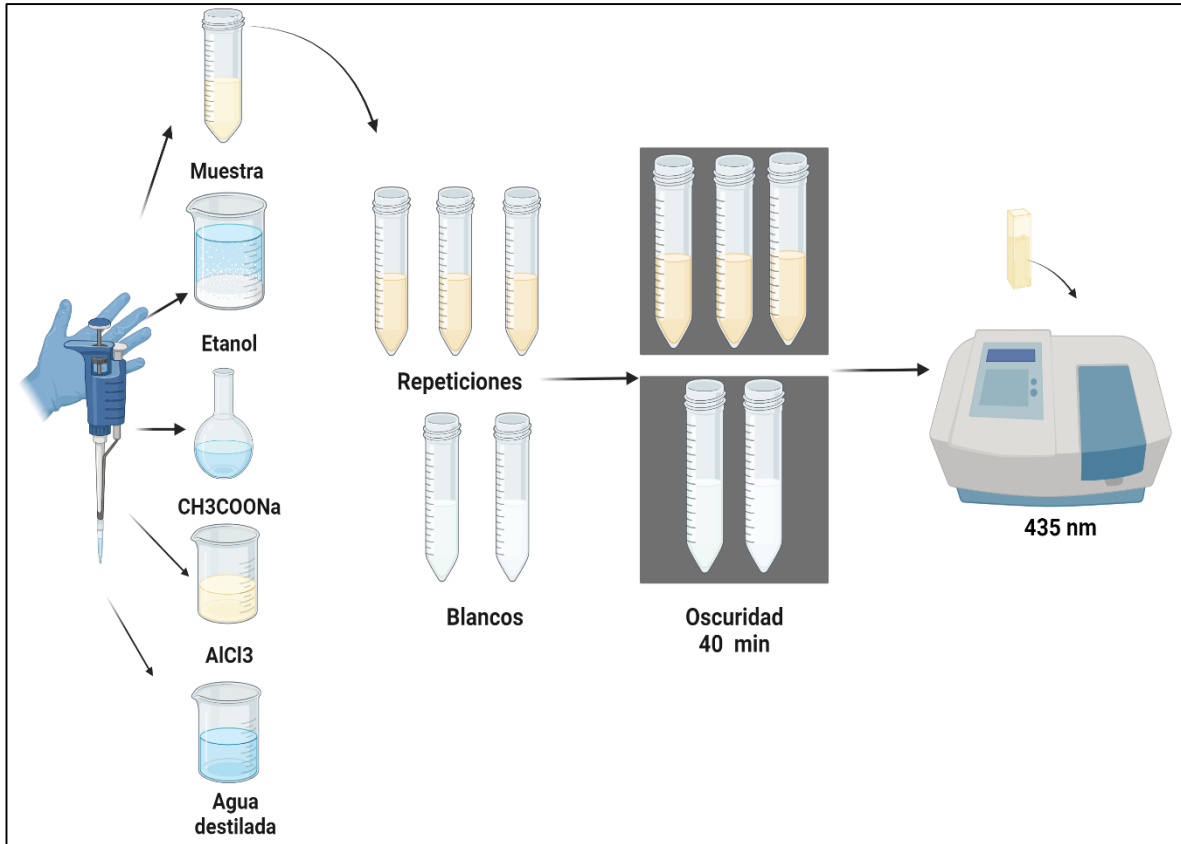


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

MATERIALES Y MÉTODOS

7

Ensayo Flavonoides



8

Análisis estadístico

Gráfico de caja y bigote

Intervalos de confianza

Análisis de varianza



Normalidad:

- ✓ Gráfico Q-Q plot
- ✓ Shapiro Wilk

Homocedasticidad:

- ✓ Gráfico de dispersión
- ✓ Prueba Levene

Prueba de Duncan

Resultados y Discusión

4



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del aceite esencial

Figura 2
Extracción del aceite esencial de arrayán



Especie	Rendimiento (%)
<i>Myrcianthes rhopaloides</i> (Kunt) McVaugh	0.28
<i>Myrcianthes fragans</i> McVaugh	0.36%
Familia <i>Myrtaceae</i>	0.18-0.30

Tabla 1
Porcentaje de rendimiento del aceite de arrayán en los tres estadios fenológicos

Estadio fenológico	Peso del material vegetal (gramos)	Volumen (mL)	Rendimiento (%)
Floración	400	2	0.5
Fructificación	400	1.3	0.3
Foliación	400	0.9	0.2

Ensayo DPPH

Figura 3
Método DPPH empleado en aceite esencial

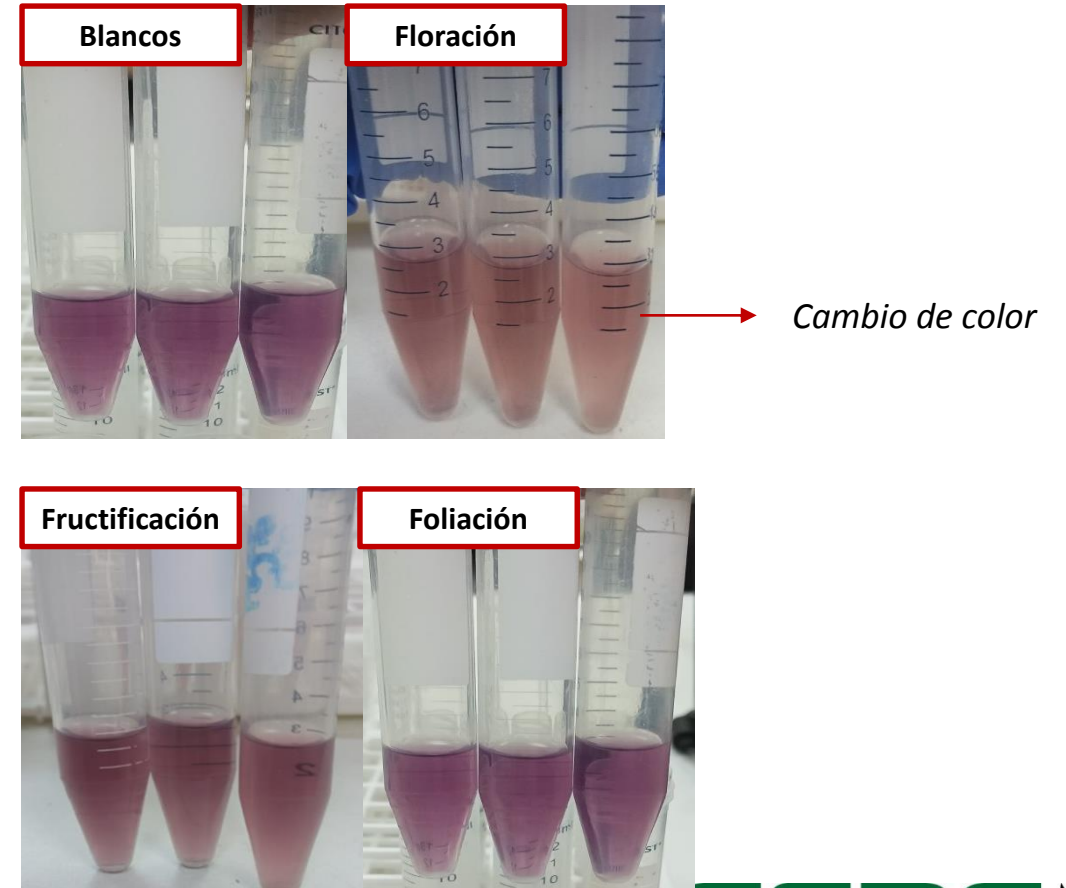


Figura 5

Resumen de medidas descriptivas de aceite esencial para DPPH

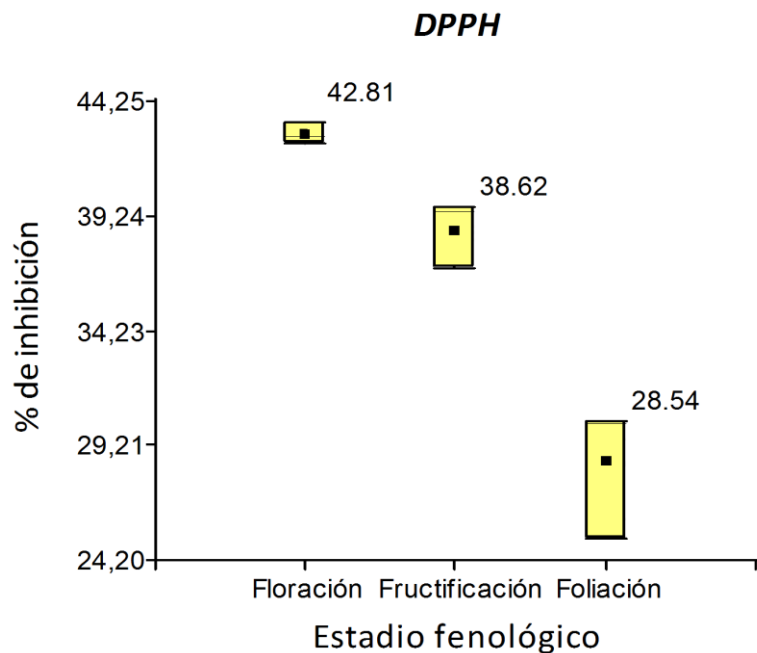
Medidas resumen

Estadio fenológico	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3
Floración	% de inhibición	3	42,81	0,47	1,11	42,42	43,34	42,68	42,42	43,34
Foliación	% de inhibición	3	28,54	2,97	10,41	25,11	30,30	30,21	25,11	30,30
Fructificación	% de inhibición	3	38,62	1,49	3,85	36,91	39,59	39,37	36,91	39,59

Estadística Descriptiva

Figura 4

Gráfico de cajas de las muestras de aceite esencial en DPPH



Estadística Inferencial

Supuestos del ANOVA-Normalidad

Figura A2

Gráfico Q-Q plot DPPH

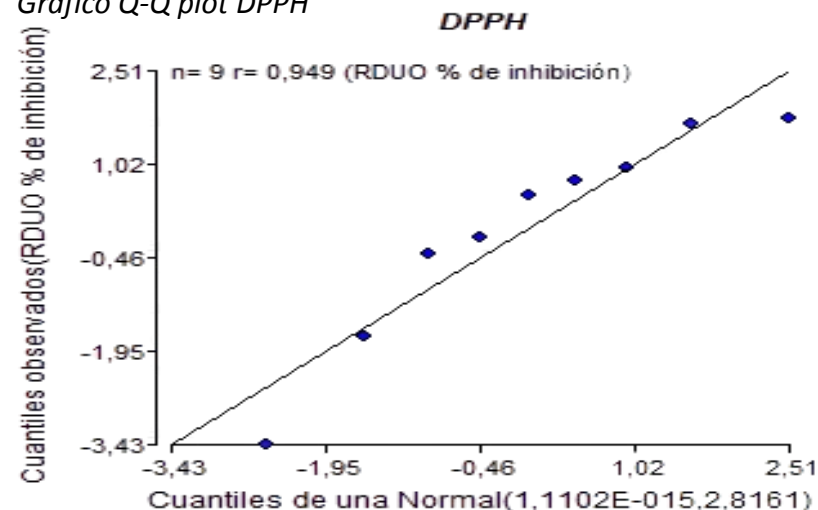


Figura 6

Prueba de Shapiro-Wilk para el método DPPH

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO % de inhibición	9	0,00	1,68	0,89	0,3170

p_valor > 0.05



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Supuestos del ANOVA-Homocedasticidad

Figura A3

Gráfico de dispersión para verificar supuesto de homocedasticidad en DPPH

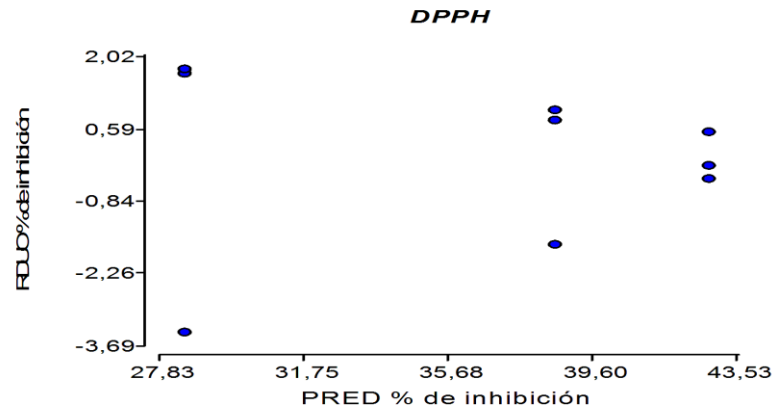


Figura 7

Prueba de Levene para verificar supuesto de homocedasticidad en DPPH

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % de inhibición	9	0,69	0,59	51,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,68	2	2,84	6,66	<u>0,0299</u>
Estadio fenológico	5,68	2	2,84	6,66	0,0299
Error	2,56	6	0,43		
Total	8,24	8			

p_valor > 0.01

ANOVA

Figura 8

ANOVA del aceite esencial en los estadios fenológicos para el método DPPH

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% de inhibición	9	0,93	0,91	5,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	322,96	2	161,48	43,01	<u>0,0003</u>
Estadio fenológico	322,96	2	161,48	43,01	0,0003
Error	22,53	6	3,75		
Total	345,49	8			

p_valor < 0.05 ~~Ho~~

Figura 9

Prueba de Duncan en DPPH

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 3,7548 gl: 6

Estadio fenológico Medias n E.E.

Foliación	28,54	3	1,12	A
Fructificación	38,62	3	1,12	B
Floración	42,81	3	1,12	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



Capacidad antioxidante

Factores que intervienen

Compuestos

Especie

Órgano de la planta

Edad

Método de extracción

Porcentaje de inhibición respecto al tiempo de recolección de las muestras

Floración	Fructificación	Foliación
Día 0	Día 120	Día 180

Figura 10

Gráfico de dispersión del tiempo de recolección de las muestras

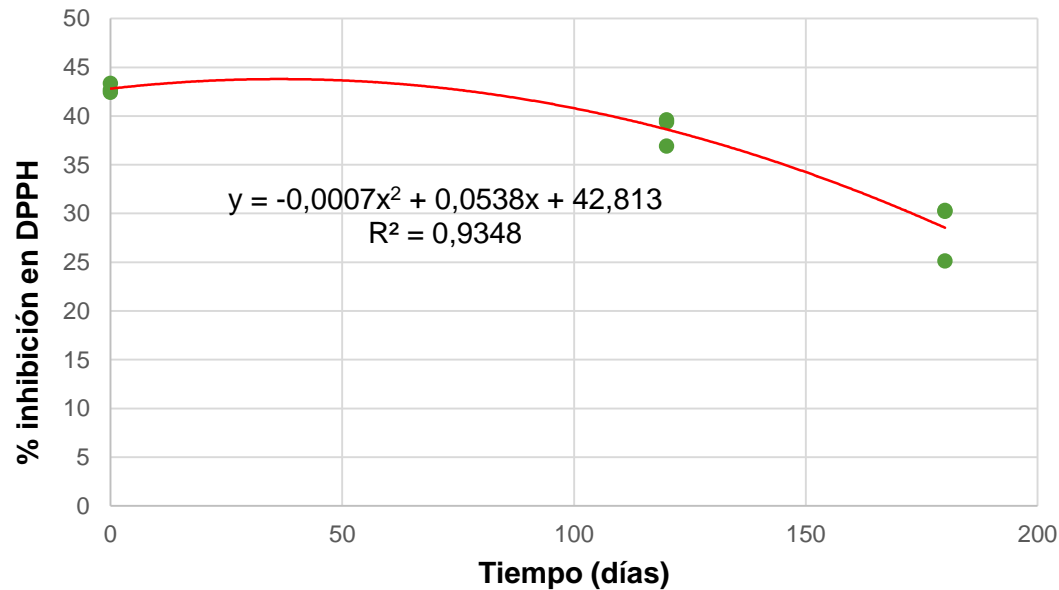
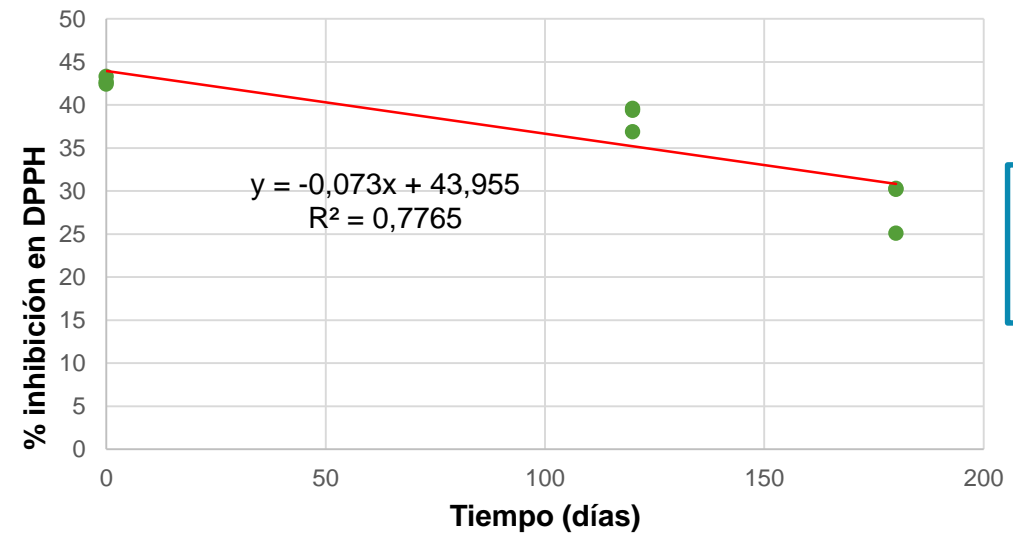


Figura 11

Gráfico de dispersión con estimación lineal del tiempo de recolección de las muestras



Disminuye **7.3%**
el porcentaje de
inhibición



Ensayo ABTS

Figura 12

Método ABTS empleado en aceite esencial

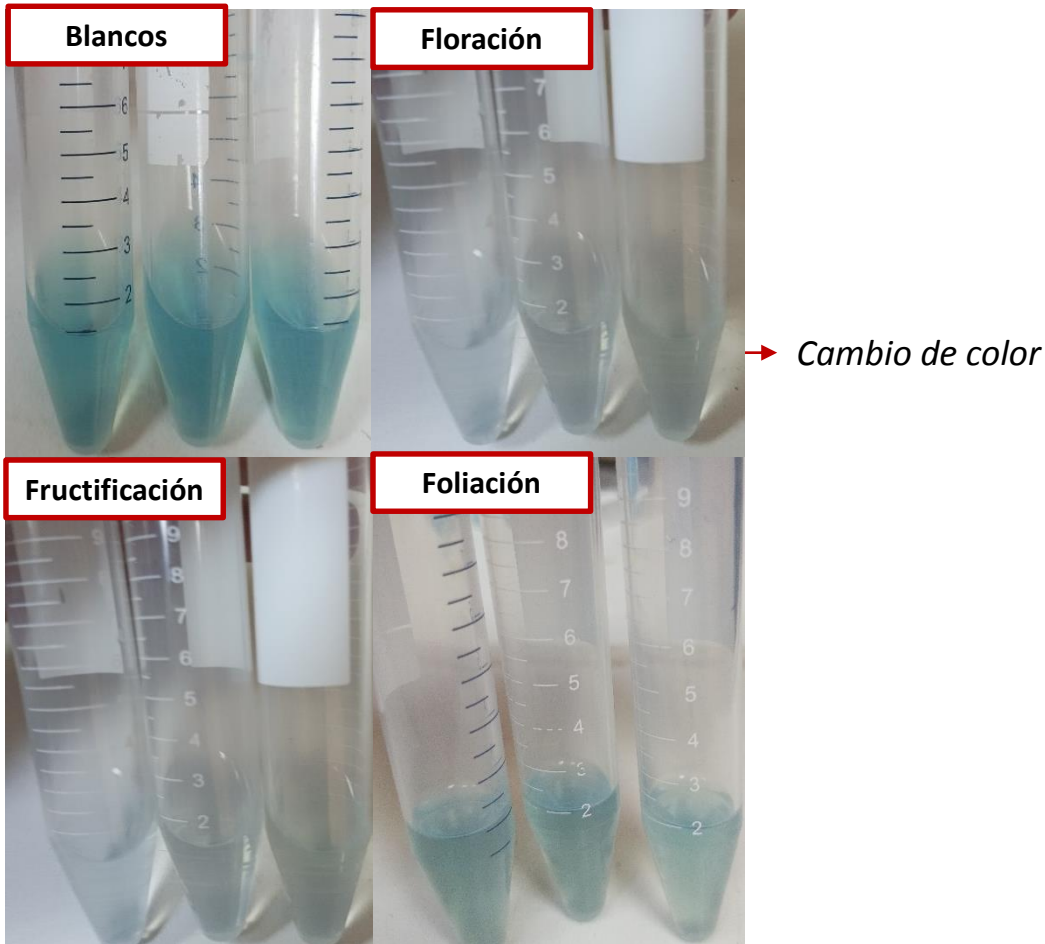


Figura 13

Gráfico del porcentaje de inhibición en muestras de aceite esencial respecto al estadio fenológico

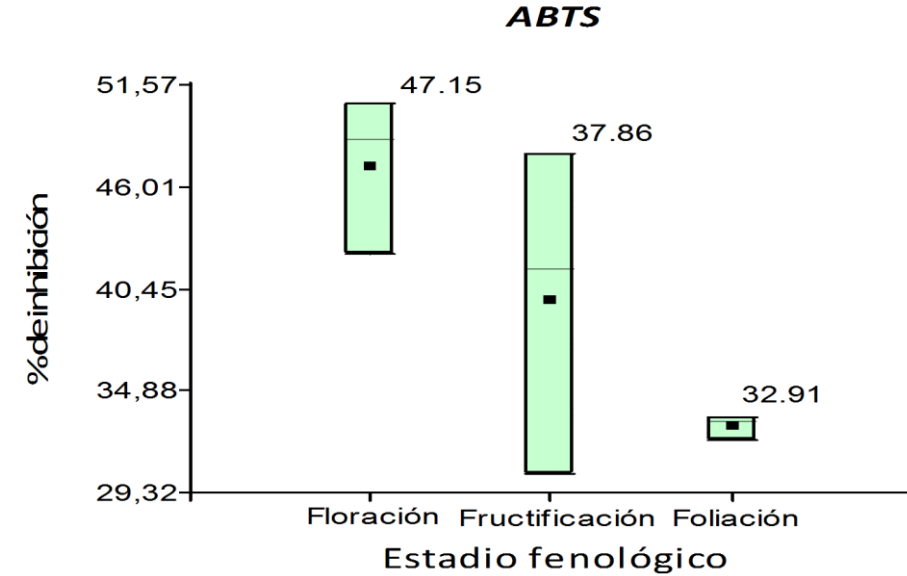


Figura 14

Resumen de medidas descriptivas para ABTS

Medidas resumen

Estadio fenológico	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3
Floración	% de inhibición	3	47,15	4,30	9,12	42,32	50,56	48,58	42,32	50,56
Foliación	% de inhibición	3	32,91	0,69	2,10	32,12	33,38	33,24	32,12	33,38
Fructificación	% de inhibición	3	39,86	8,83	22,14	30,33	47,75	41,51	30,33	47,75

Ensayo ABTS

ANOVA

Figura 17

ANOVA del aceite esencial de los estadios fenológicos para ABTS

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
‰ de inhibición	9	0,61	0,48	14,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	304,22	2	152,11	4,71	0,0589
Estadio fenológico	304,22	2	152,11	4,71	0,0589
Error	193,75	6	32,29		
Total	497,98	8			

p_valor < 0.05 Ho

✓ p_valor > 0.05 Ho

Figura 18

Prueba de Duncan para las medias del porcentaje de inhibición en ABTS

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 32,2919 gl: 6

Estadio fenológico Medias n E.E.

Foliación	32,91	3	3,28	A
Fructificación	39,86	3	3,28	A B
Floración	47,15	3	3,28	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Porcentaje de inhibición

Factores que intervienen

Medición de las absorbancias

Tiempo de reacción del reactivo con el persulfato de potasio

Tiempo de reacción del reactivo formado con el antioxidante

Especie

Comparación
% INHIBICIÓN

Myrcianthes leucoxylo
(Ortega) Mc Vaugh

41.04%

Myrcianthes hallii (O. Berg)
Mc Vaugh "arrayan"

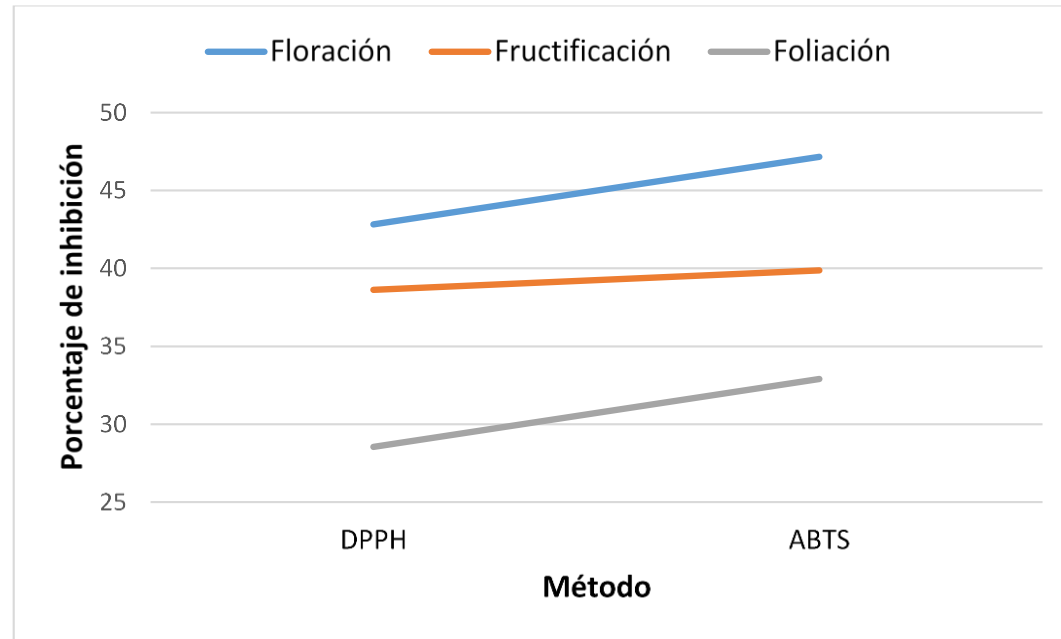
E.Flo: 47.15%
E.Frt: 39.86
E. Fol: 32.91%



COMPARACIÓN ENTRE DPPH Y ABTS

Figura 1

Interacción entre ensayo DPPH, ABTS respecto al estadio fenológico

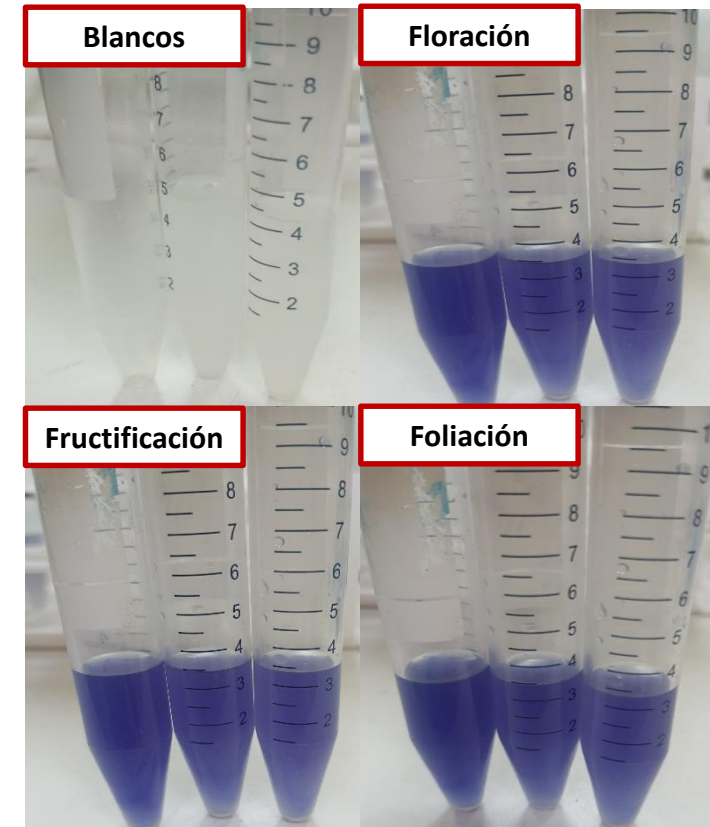


Ensayo FRAP



Figura 25

Método FRAP empleado al aceite esencial



Ensayo FRAP

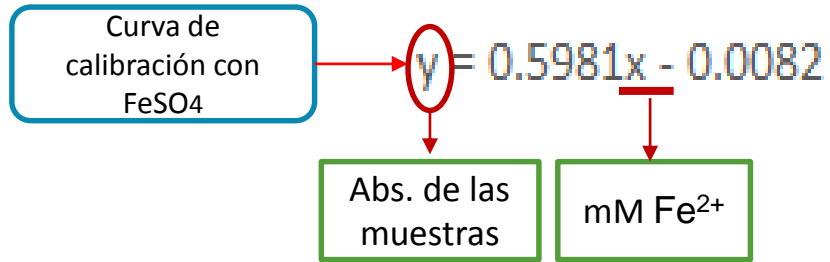


Figura 26

Gráfico de la capacidad de reducción de ion férrico en muestras de aceite esencial FRAP

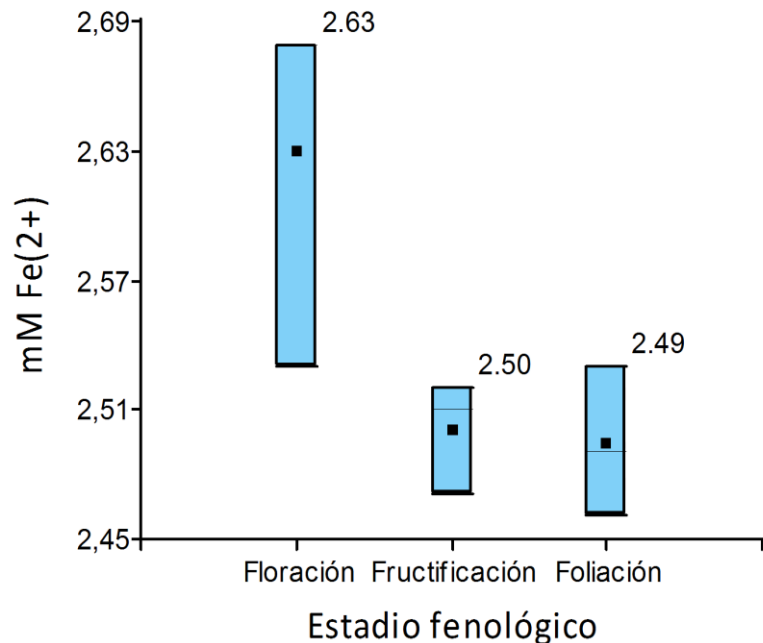


Figura 27

ANOVA de FRAP respecto al estadio fenológico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
umol Fe ²⁺ /mL	9	0,65	0,53	2,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31,77	2	15,88	5,49	0,0441
Estadio fenológico	31,77	2	15,88	5,49	0,0441
Error	17,36	6	2,89		
Total	49,13	8			

Figura 28

Prueba de Duncan respecto al estadio fenológico en FRAP

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 2,8937 gl: 6

Estadio fenológico Medias n E.E.

Foliación	74,78	3	0,98	A
Fructificación	74,98	3	0,98	A
Floración	78,86	3	0,98	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Especie	Comparación Poder de reducción de Fe ³⁺
<i>Myrtus communis</i> L.	70.2 µM Fe ²⁺ /mL
<i>Myrcianthes hallii</i> (O. Berg) Mc Vaugh "arrayán"	74.78 µM Fe ²⁺ /mL

Floración mayo-agosto

Floración julio



Contenido de fenoles totales

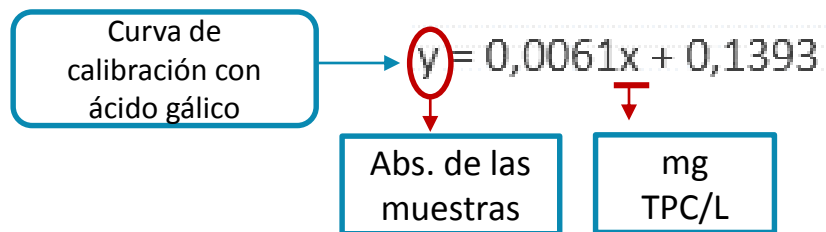
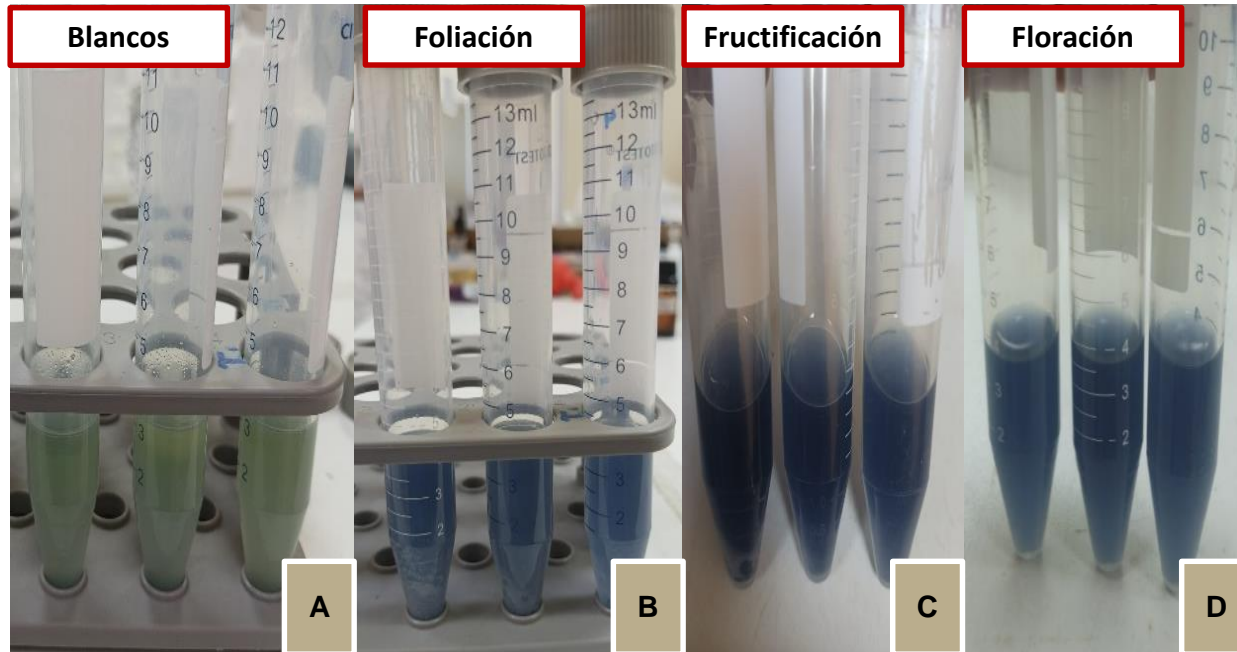
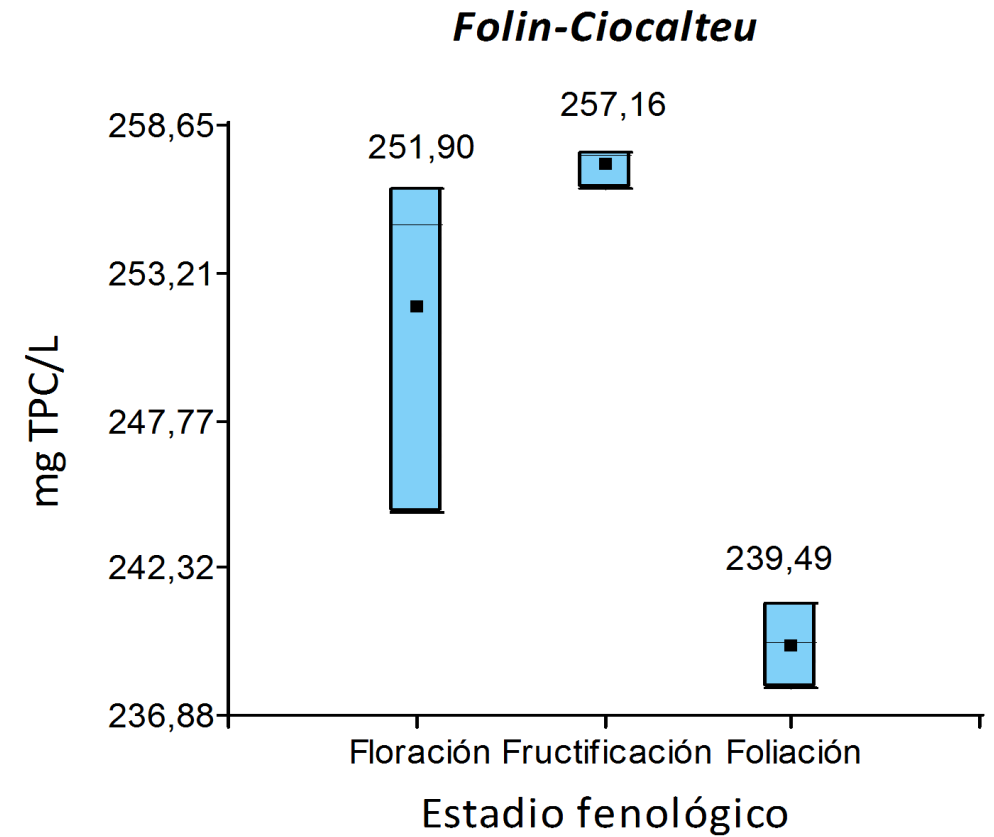


Figura 30

Contenido de fenoles totales del aceite esencial



ANOVA

Figura 34

Análisis de varianza del contenido fenólico total

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
mg GAE/mL	9	0,84	0,79	1,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,44	2	0,22	15,90	<u>0,0040</u>
Estadio fenológico	0,44	2	0,22	15,90	0,0040
Error	0,08	6	0,01		
Total	0,52	8			

Figura 35

Prueba de Duncan para contenido fenólico total

Test:Duncan Alfa=0,05

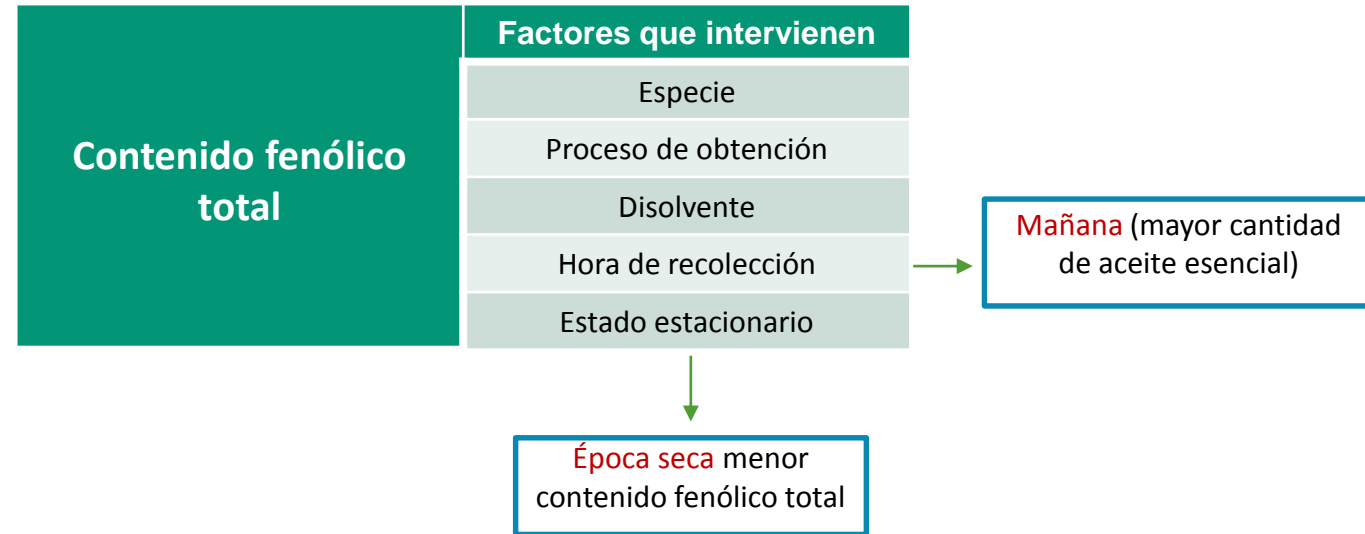
Error: 0,0138 gl: 6

Estadio fenológico Medias n E.E.

Foliación	7,19	3	0,07	A
Floración	7,56	3	0,07	B
Fructificación	7,71	3	0,07	B



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Contenido de flavonoides totales

Figura 36

Ensayo con tricloruro de aluminio para determinar cantidad total de flavonoides

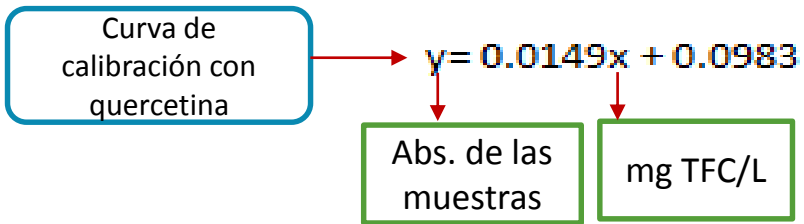
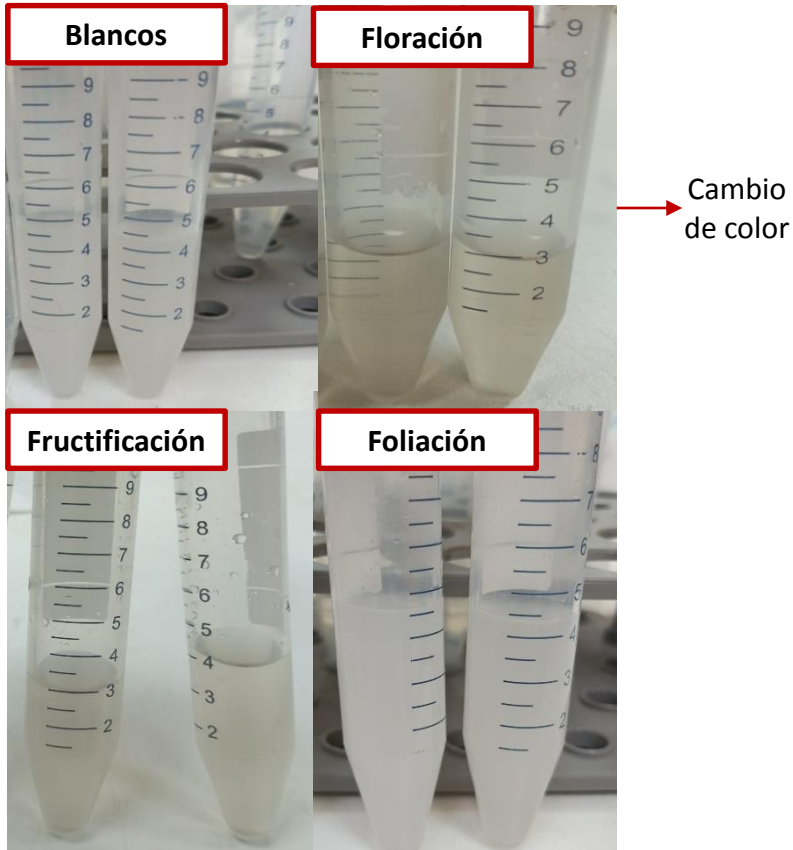
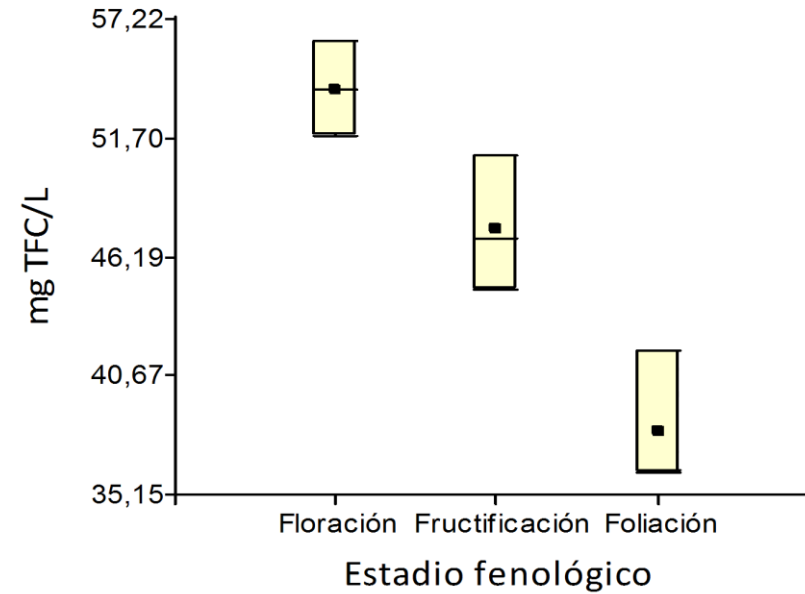


Figura 37

Gráfico de cajas para contenido de flavonoides totales

Contenido de flavonoides totales



ANOVA

Figura 41

ANOVA de la cantidad total de flavonoides en los estadios fenológicos

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
mg QE/mL	9	0,88	0,84	6,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,35	2	0,17	22,59	0,0016
Estadio fenológico	0,35	2	0,17	22,59	0,0016
Error	0,05	6	0,01		
Total	0,40	8			

Figura 42

Prueba de Duncan para contenido de flavonoides totales

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0077 gl: 6

Estadio fenológico Medias n E.E.

Foliación	1,14	3	0,05	A
Fructificación	1,43	3	0,05	B
Floración	1,62	3	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cantidad total de flavonoides	Factores que intervienen
	Proceso de extracción
	Solvente
	Tiempo de reacción
	Cantidad de reactivo

Aceite esencial	Valores
Arrayán	1.62 mg QE/mL y 1.14 mg QE/mL
Orégano	0.28 mg QE/mL



Conclusiones

5



CONCLUSIONES



Se obtuvo aceite esencial de las hojas de arrayán mediante el proceso de destilación con arrastre de vapor. La recolección se realizó en diferentes estadios fenológicos, con un porcentaje de rendimiento del 0.5% en floración, 0.3% en fructificación y 0.2% en foliación.



Mediante el ensayo de Folin, se determinó la cantidad total de fenoles con valores de 7.71 mg GAE/mL para fructificación, seguido de floración con 7.56 mg GAE/mL y menor contenido en foliación con 7.19 mg GAE/mL. Mediante métodos estadísticos se determinó que existe mayor cantidad total de fenoles en el estadio de fructificación y floración.



Se estableció la presencia de flavonoides en los tres estadios fenológicos del aceite esencial mediante colorimetría y cuantificación con la prueba de tricloruro de aluminio. Los valores obtenidos fueron mayoritarios en floración con una concentración de 1.62 mg QE/mL, un menor resultado presentó foliación con 1.14 mg QE/mL y un valor intermedio fructificación con 1.14 mg QE/mL.



Se identificó carácter antioxidante en el aceite esencial mediante las pruebas de ABTS y DPPH, mostrando un inhibición más significativa en floración con 42.81% y para ABTS 47.15%. Dada la selectividad de DPPH, los análisis estadísticos indicaron que existe cambio tanto en floración, fructificación y foliación. Estos resultados fueron respaldados por la prueba de FRAP, que confirmó con valor de 78.86 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ /mL, que existe mayor capacidad antioxidante en el estadio de floración.



En conclusión se obtuvo mayor capacidad antioxidante en el estadio de floración debido a los altos porcentajes de inhibición presentados en las pruebas. La variación en los resultados se debe a factores que afectan el carácter antioxidante, como factores ambientales, periodos de cosecha, tiempo de recolección de muestra, especie y método utilizado. Por lo cual es importante aplicar más de una prueba para confirmar los resultados.

Recomendaciones

6



RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar la extracción del aceite esencial con otros métodos alternativos, para poder aumentar el porcentaje de rendimiento y tener una comparación entre los diferentes procesos de obtención.

Se sugiere recolectar las muestras para destilación en un horario determinado para evitar variaciones en los valores. Además, se recomienda realizar la destilación utilizando otras partes de la planta, con el fin de obtener diferencias entre los resultados y poder hacer comparaciones.

Se aconseja cumplir rigurosamente el tiempo destinado para cada prueba, dado que un cambio en la variación del tiempo de medición de las absorbancias podría conducir a la obtención de valores erróneos o sobreestimados que afectan a los resultados.

Se recomienda complementar los estudios de capacidad antioxidante, mediante la incorporación de pruebas adicionales, como cromatografía de gases, que permite conocer específicamente los componentes individuales del aceite.



Agradecimientos

7



AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.
Directora del proyecto

Querida familia, novio y amigos

Laboratorio de Biotecnología del Centro de
Investigación de Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA