



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO QUÍMICO

“Determinación de tocoferoles, tocotrienoles mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y medición de la capacidad antioxidante usando el método de decoloración del catión radical ABTS⁺, empleando un espectrofotómetro UV-visible en cuatro especies de *Arecaceae* de la provincia de Loja y El Oro”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Cuenca Quezada, Karina del Cisne

DIRECTOR: Solano Cueva, Natalí Elizabeth, Ing

LOJA-ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Natalí Elizabeth Solano Cueva

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración

El presente trabajo de fin de titulación: “Determinación de tocoferoles, tocotrienoles mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y medición de la capacidad antioxidante usando el método de decoloración del catión radical ABTS⁺, empleando un espectrofotómetro UV-visible en cuatro especies de *Arecaceae* de la provincia de Loja y El Oro”, realizado por Karina del Cisne Cuenca Quezada, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, agosto de 2014

f.....

Solano Cueva Natalí Elizabeth, Ing.

C.I: 1104083884

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Karina del Cisne Cuenca Quezada, declaro se autora del presente trabajo de fin de titulación: "Determinación de tocoferoles, tocotrienoles mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y medición de la capacidad antioxidante usando el método de decoloración del catión radical ABTS⁺, empleando un espectrofotómetro UV-visible en cuatro especies de *Arecaceae* de la provincia de Loja y El Oro ", de la Titulación de Ingeniería Química, siendo Natalí Elizabeth Solano Cueva, Ing. directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja; en su parte pertinente, dice textualmente: "Forman parte del Patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

f.....

Cuenca Quezada Karina del Cisne

C.I: 1105188849

DEDICATORIA

A Dios por ser el hombro y la fuerza en los momentos más difíciles, a mis padres por ser mi apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida y que gracias a ellos se hizo posible mi crecimiento intelectual, personal y profesional, a mis hermanas Paúl, Paulina y Maite por su amor.

Karina

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida, sabiduría y paciencia para luchar y superar los retos que se me han presentado durante estos años de preparación.

A la Ing. Natalí Solana por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella en este proyecto, por brindarme el apoyo, confianza y sobre todo paciencia y ayuda incondicional para llevar a cabo mi trabajo.

Al Mgs, Jorge Ramírez y Bq. Santiago Ojeda por brindarme su apoyo, su experiencia y su conocimiento para hacer del presente trabajo un instrumento valioso para futuras investigaciones.

Al Ing. Vladimir Morocho por dedicarme su tiempo y ayuda en la parte Botánica de esta investigación.

Al Dr. César Compadre quien es el mentor de este tema de investigación y nos ha colaborado de todas las maneras posibles.

Al Ing. James Calva, por ser como mi cotutor, por brindarme su ayuda y motivación.

Y sobre todo a mis queridos padres José y Rosa, por su amor, por sus sacrificios, comprensión y apoyo incondicional, gracias por enseñarme que hay que amar todo lo que uno hace en todo momento y que hay que trabajar muy duro para lograr lo que se anhela, gracias por ser el mejor ejemplo de superación que he tenido en mi vida; de igual manera un agradecimiento profundo a mis hermanos Paúl, Paulina y Maite por su amor, apoyo y comprensión, así como a mis tíos por sus consejos y apoyo.

Por último, agradezco a mis queridas amigas, por compartir muchos momentos alegres juntas y como olvidar a las personas que fueron como mis madres adoptivas Elcie (+) y Eulalia, gracias por su cariño y sabios consejos.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Fin y propósito del proyecto.....	4
OBJETIVOS	5
CAPITULO I.....	6
1 Marco Teórico	7
1.1. <i>Arecaceae</i>	7
1.1.1. Aspectos botánicos de las especies de la familia <i>Arecaceae</i>	7
1.2. Usos de los Aceites Vegetales.....	11
1.3. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles.....	12
1.4. Método empleado para la obtención del aceite vegetal.....	15
1.4.1 Extracción en Soxhlet.....	15
1.5. Métodos empleados para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles.....	16
1.5.1 Saponificación.....	16
1.5.2 Derivatización.....	16
1.5.3 Cromatografía de Gases.....	17
1.5.4 Espectrometría de Masas.....	18
1.6. Método empleado para medir la capacidad antioxidante.....	19
1.6.1 Antioxidante.....	19
1.6.2 Decoloración del catión radical ABTS ⁺	20
1.6.3 Espectrofotometría UV-visible.....	21
CAPITULO II	22
2 Materiales y métodos.....	23
2.1 Recolección de materia vegetal y base de datos para almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.....	24
2.2 Obtención del aceite y determinación de rendimientos.....	24
2.3 Determinación de propiedades físicas.....	24
2.3.1 Densidad.....	24

2.3.2	Índice de refracción.	24
2.3.3	Color y apariencia.....	25
2.4	Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.	25
2.4.1	Saponificación de los aceites vegetales.	25
2.4.2	Derivatización de las muestras saponificadas	26
2.4.3	Inyección de las muestras.	27
2.5	Evaluación de la capacidad antioxidante.	27
2.6	Análisis Estadístico.....	28
CAPÍTULO III		29
3	Resultados y discusiones	30
3.1	Almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.....	30
3.1.1	Información Etnobotánica.	30
3.2	Rendimientos y propiedades físicas.	31
3.2.1	Extracción del aceite vegetal mediante equipo Soxhlet.	31
3.2.2	Rendimientos.....	31
3.2.3	Propiedades Físicas.	33
3.3	Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.....	36
3.4	Evaluación de la capacidad antioxidante.	43
4	CONCLUSIONES	46
5	RECOMENDACIONES	48
6	BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS		54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG 1.1. Estructura química de Tocoferoles (a) y Tocotrienoles (b)	12
FIG 1.2. Estructuras moleculares de los Tocoferoles	12
FIG 1.3. Estructuras moleculares de los Tocotrienoles	13
FIG 1.4. Mecanismo biosintético de α -tocoferol y α -tocotrienol.	14
FIG 1.5. Esquema de partes de un Cromatógrafo de Gases	17
FIG 1.6. Esquema de un Espectrómetro de Masas de cuadropolo	18
FIG 1.7. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de barrido de doble luz	20
FIG 1.8. Esquema general de procedimiento	21
FIG 3.1. Cromatograma de la especie <i>Aiphanes grandis</i>	36
FIG 3.2. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie <i>Aiphanes grandis</i>	37
FIG 3.3. Fragmentos de la molécula α -tocoferol	38
FIG 3.4. Cromatograma de la especie <i>Phoenix canariensis</i>	38
FIG 3.5. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie <i>Phoenix canariensis</i>	39
FIG 3.6. Fragmentos de la molécula α -tocoferol	40
FIG 3.7. Cromatograma de la especie <i>Syagrus romanzoffiana</i>	40
FIG 3.8. Espectro de masa de α -tocotrienol en la especie <i>Syagrus romanzoffiana</i>	41
FIG 3.9. Fragmentos de la molécula α -tocoferol	42
FIG 3.10. Curva de calibración ABTS	42

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

TABLA 3.1 Rendimientos de la extracción por cada especie	30
GRÁFICA 3.1. Comparación de rendimiento de las cuatro especies	31
TABLA 3.2 Color y Apariencia por cada especie	32
TABLA 3.3 Índice de refracción por cada especie	32
GRÁFICA 3.2. Comparación del índice de refracción de las tres especies	33
TABLA 3.4 Densidad por cada especie	34
GRÁFICA 3.3. Comparación de la densidad de las tres especies	34
TABLA 3.5 Pesos moleculares de los tocoles	35
TABLA 3.6 Iones de referencia de los tocoles	35
TABLA 3.7 Actividad antioxidante de las especies <i>Arecaceae</i>	43
GRÁFICA 3.11. Comparación de la capacidad antioxidante	43

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA 1.1. Especie <i>Aiphanes grandis</i>	6
FOTOGRAFÍA 1.2. Especie <i>Phoenix canariensis</i>	7
FOTOGRAFÍA 1.3. Especie <i>Syagrus romanzoffiana</i>	8
FOTOGRAFÍA 1.4. Especie <i>Attalea cf.</i>	9
FOTOGRAFÍA 2.1. Equipo de extracción Soxhlet	23
FOTOGRAFÍA 2.2. Envase y etiquetado de los aceites	23
FOTOGRAFÍA 2.3. Picnómetro	24
FOTOGRAFÍA 2.4. Refractómetro	24
FOTOGRAFÍA 2.5. Saponificación del aceite empleando una atmósfera inerte	26
FOTOGRAFÍA 2.6. Vial e inserto	26
FOTOGRAFÍA 2.7. Derivatizante	26
FOTOGRAFÍA 2.8. Baño seco	26
FOTOGRAFÍA 2.9. Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrofotómetro de Masas	27
FOTOGRAFÍA 2.10. Espectrofotómetro UV-visible	27
FOTOGRAFÍA 2.11. Estándar de trólox	28
FOTOGRAFÍA 3.1. Imagen de base de datos	29

ABREVIATURAS

ABTS 2,2-azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)

Cf por confirmar

CG Cromatografía de Gases.

CV Coeficiente de variación

DPPH 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

EM Espectrometría de Masas

α Alfa

β Beta

δ Delta

γ Gama

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IE Impacto de electrones

IR Espectroscopia Infrarroja

TRÓLOX 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

$\mu\text{mol ET/g MF}$ Micromoles equivalentes de trólox/ gramo de muestra fresca

RESUMEN

Actualmente se está incentivando el consumo de vitaminas, por sus propiedades antioxidantes. Se obtienen principalmente de fuentes de origen vegetal, entre ellas la vitamina E una de las más importantes que ayuda a prevenir el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Con estos antecedentes la importancia de realizar esta investigación en especies de *Arecaceae*. Se recolectaron frutos de 4 especies diferentes en las provincias de Loja y El Oro, de los que se extrajo aceite vegetal por el método Soxhlet.

En una base de datos ya elaborada se detalló la información Botánica y Etnobotánica de cada especie estudiada, se determinó propiedades físicas como índice de refracción, densidad, color y apariencia; se estableció el método para inyectar las muestras en el CG/EM, para inyectar las muestras es necesario purificarlas para evitar daños en el equipo por lo que se las saponificó y derivatizó. Se identificó α -tocoferol en las especies *Aiphanes grandis* y *Phoenix canariensis* y α -tocotrienol en *Syagrus romanzoffiana*. La actividad antioxidante se determinó por el método ABTS, observando que *Syagrus romanzoffiana* posee mayor actividad antioxidante y *Phoenix canariensis* la menor.

PALABRAS CLAVES: *Arecaceae*, *Aiphanes grandis*, *Phoenix canariensis*, *Syagrus romanzoffiana*, tocoferol, tocotrienol, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Actually the consumption of vitamins is has increased because their antioxidant properties. These are mainly obtained from plant sources; including vitamin E as one of the most important to help prevent cancer and cardiovascular disease. Thus the importance of this research and the fact of there aren't studies of these species in the *Arecaceae*. The fruits of 4 different species were collected in the provinces of Loja and El Oro, of which vegetable oil was extracted with the Soxhlet method.

In a database Botany and Ethnobotany information of each of the species studied was detailed, certain physical properties such as refractive index, density, color and appearance was determined and proceeded to establish the method to inject the samples in the GCMS, for inject the samples in GCMS is necessary to purify to avoid equipment damage these were saponified and derivatized. It was possible to identify the presence of α -tocopherol in species *Aiphanes grandis* and *Phoenix canariensis* and α -tocotrienol in *Syagrus romanzoffiana*. The antioxidant activity was determined using the ABTS method, where it is noted that the species *Syagrus romanoffiana* possesses the greatest antioxidant activity and *Phoenix canariensis* lower.

KEY WORDS: *Arecaceae*, *Aiphanes grandis*, *Phoenix canariensis*, *Syagrus romanzoffiana*, tocopherol, tocotrienol, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Ecuador se caracteriza por ser un país de gran riqueza natural, considerado como megadiverso ya que concentra en un pequeño territorio una gran diversidad de plantas y animales¹.

A nivel mundial las palmas están representadas por 2360 especies y 189 géneros, y suelen encontrarse principalmente en ecosistemas tropicales y subtropicales². Las palmas son uno de los grupos de plantas económicamente más importantes en el mundo. Éstas constituyen además un elemento conspicuo e importante en la estructura y ecología de los bosques tropicales, donde debido a su elevada disponibilidad de recursos juegan un rol importante proveyendo fuentes de ingresos estables a los pobladores en algunas de las áreas más pobres de estas regiones. Algunas de las características que hacen a las palmas importantes son:

- 1) incluyen a numerosas especies,
- 2) son elementos comunes, importantes y diversos de los ecosistemas de bosques húmedos,
- 3) dominan extensas áreas, particularmente en suelos pobres o mal drenados,
- 4) incluyen muchas especies que son extremadamente importantes en la dieta de varias especies de vertebrados,
- 5) son muy importantes para la subsistencia de la población humana y
- 6) su presencia en el mercado se ha incrementado y es potencial.

Por eso, conocer las palmas y sus usos es importante para poder comprender cómo los bosques tropicales húmedos y sus varios nichos ecológicos pueden ser utilizados y manejados de manera sostenible³.

Las *Arecaceae* (palmeras), son plantas con flores monocotiledóneas, que se pueden desarrollar en una gran variedad de climas. Existen aproximadamente 33 géneros conocidos, actualmente con alrededor de 127 especies y 15 especies endémicas de *Arecaceae* en el Ecuador⁴.

La región sur del Ecuador es considerada como uno de los mayores centros de riqueza y diversidad en especies vegetales, cuenta con grandes potenciales extractivos vegetales, por lo cual el interés de estudiar la capacidad antioxidante que presentan los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) en los aceites vegetales de la especie de *Arecaceae* específicamente de las provincias de Loja y El Oro.

En la actualidad se está incentivando el consumo de vitaminas hidrosolubles (vitamina C) y liposolubles (vitamina A y E), ya que se les atribuyen propiedades antioxidantes, éstas se obtienen principalmente de fuentes de origen vegetal, entre ellas la vitamina E ha sido

reconocida como una de las más importantes. Las fuentes vegetales más relevantes que aportan vitamina E, son aceites vegetales, germen de trigo y las nueces en general⁵.

Algunos estudios sugieren que la vitamina E es un importante antioxidante que ayuda a prevenir el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Esta vitamina mejora la circulación, repara los tejidos y contribuye en el tratamiento del síndrome premenstrual y la enfermedad fibroquística de los senos⁶.

Numerosos estudios en nutrición humana, demuestran una estrecha correlación entre el consumo de frutas y verduras y la menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas, debido a su bajo contenido en colesterol y a la presencia de vitaminas, fibras, antioxidantes naturales y minerales. Así mismo, el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, como: arterioesclerosis, artritis, demencia y cáncer, es por ello que el uso de antioxidantes, es estudiado de forma intensiva, en el tratamiento de accidentes cerebro vascular y enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro propio metabolismo, surgen algunas moléculas que no pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies oxígeno reactivas (ROS), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o al natural envejecimiento humano. Entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético⁷.

Son muchos los motivos por los cuales los antioxidantes son importantes en nuestro organismo, es por ello que son considerados como aquellas sustancias que hallándose en bajas concentraciones, con respecto a la de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato⁸.

Con estos antecedentes la importancia de realizar este trabajo de investigación ya que no se han encontrado estudios previos de estas especies recolectadas, las mismas que podrían contribuir a estudios posteriores, abriendo puertas para los diferentes usos industriales que se le puede dar al aceite vegetal de las *Arecaceae*.

Fin y propósito del proyecto

La presente investigación aportará al estudio del aceite vegetal de cuatro especies de *Arecaceae*, de esta manera se contribuye al estudio de la flora de la zona sur del Ecuador; determinando las propiedades físicas, la composición química y la capacidad antioxidante del aceite vegetal de dichas especies.

OBJETIVOS

General.

- Determinar la presencia de tocoferoles y tocotrienoles mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y medición de la capacidad antioxidante usando el método de decoloración del catión radical ABTS⁺, empleando un espectrofotómetro UV-visible en cuatro especies de *Arecaceae* del sur de Ecuador.

Específicos:

- Recolectar cuatro especies de *Arecaceae*, en las provincias de Loja y El Oro.
- Identificar cada una de las especies, obtener información etnobotánica de las especies recolectadas.
- Extraer el aceite de las cuatro especies *Arecaceae*.
- Determinar el rendimiento y algunas propiedades físicas como densidad, índice de refracción, color y apariencia de los aceites obtenidos.
- Determinar la composición química de los respectivos aceites vegetales mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.
- Medir la capacidad antioxidante usando el método de decoloración del catión radical ABTS⁺ empleando un espectrofotómetro UV-visible.

CAPITULO I

1 Marco Teórico

1.1. *Arecaceae*.

Las *Arecaceae* también conocidas como palmeras se encuentran ampliamente distribuidas en la región tropical a nivel mundial, con algunas especies que se extienden en zonas subtropicales en ambos hemisferios, desarrollándose en casi todo tipo de hábitat, desde selvas tropicales hasta desiertos. La mayoría de las palmeras se distinguen por sus grandes hojas compuestas, pinnadas en la parte superior y sus elevados tallos ramificados⁹.

La familia de palmeras incluye a 200 géneros y 2.450 especies distribuidas en la región tropical a nivel mundial, con algunas especies que se extienden en áreas subtropicales en ambos hemisferios. Además de ser un grupo diverso y ecológicamente importante, los componentes de la familia *Arecaceae* tienen renombre por su extraordinaria utilidad para las comunidades humanas y las palmeras están siendo explotadas en amplios rangos de escalas económicas a nivel mundial⁹.

A continuación una breve descripción de las cuatro especies consideradas en el presente trabajo de investigación.

1.1.1. Aspectos botánicos de las especies de la familia *Arecaceae*.

1.1.1.1 *Aiphanes grandis*.



Fotografía 1.1. Especie *Aiphanes grandis*
Fuente: La Autora

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Sub clase: *Commelinidae*

Orden: *Arecales*

Familia: *Areaceae*

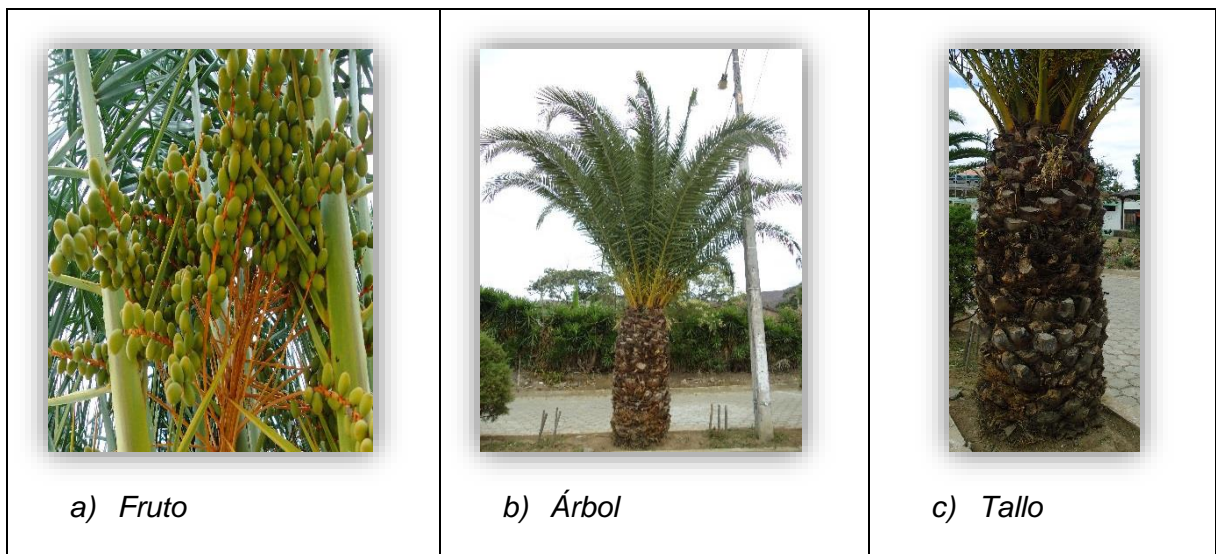
Género: *Aiphanes*

Especie: *Aiphanes grandis*

Descripción:

Palma solitaria hasta 20m de alto; espinas negras, largas (hasta 20cm) en el tronco, más cortas en el raquis, el margen de las pinnas y la inflorescencia, hojas pinnadas, pinnas lineares, premorsas (parecen mordidas), agrupadas y arregladas en planos diferentes; inflorescencias con pedúnculos cortos que aparecen bajo las hojas; frutos ovoides verdes-marrones de 2-3cm. Crece en zonas húmedas premontañas entre los 1100 y 1700 msnm. Es endémica para el Ecuador. Se come el palmito (meristemo apical) crudo o cocinado. De las semillas del fruto se puede preparar encocado; se cocinan los frutos enteros en agua, se los abre, se licuan las semillas y se cocina el licuado con azúcar o panela¹⁰.

1.1.1.2 Phoenix canariensis.



Fotografía 1.2. Especie *Phoenix canariensis*
Fuente: La Autora

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Arecales*

Familia: *Areaceae*

Género: *Phoenix*

Especie: *Phoenix canariensis*

Descripción:

Palmera de gran tamaño, con tronco (estípite) grueso y muy coriáceo, sus hojas (palmas) en densos penachos palmeados, pueden medir entre 2 y 3 m de largo. Las flores se disponen en densos racimos anaranjados. Frutos más pequeños que los dátiles.

Son palmas solitarias, alcanza un tamaño de 10–13 m de alto y 50–70 cm de diámetro, armadas; tallos gruesos con las vainas de las hojas persistentes; plantas dioicas. Hojas pinnadas, numerosas, 5–7 m de largo, las superiores erectas, las inferiores péndulas o arqueadas; pinnas en número de 150 pares, arregladas en distintos ángulos, las inferiores modificadas a manera de acantofilos; vaina de 150 cm de largo, formando una red fibrosa. Inflorescencias interfoliares, ramificadas, de 100 cm de largo, axilares, mucho más cortas que las hojas, brácteas inconspicuas; raquillas no ramificadas, numerosas, arregladas en espiral, amarillo-anaranjadas, sépalos connados en un cúpula baja; flores estaminadas blanquecinas, pétalos valvados, estambres 6, pistilodio ausente; flores pistiladas globosas, pétalos imbricados, estaminodios generalmente 6, carpelos libres, foliculares. Frutos generalmente desarrollándose de un solo carpelo, ovoides, 2–3 cm de largo, anaranjado-amarillentos, residuo estigmático apical, epicarpo liso, mesocarpio carnoso, endocarpo membranoso; semilla conspicuamente acanalada, endospermo homogéneo, eofilo simple¹¹.

1.1.1.3 Syagrus romanzoffiana.



Fotografía 1.3. Especie *Syagrus romanzoffiana*
Fuente: La Autora

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Arecales*

Familia: *Areaceae*

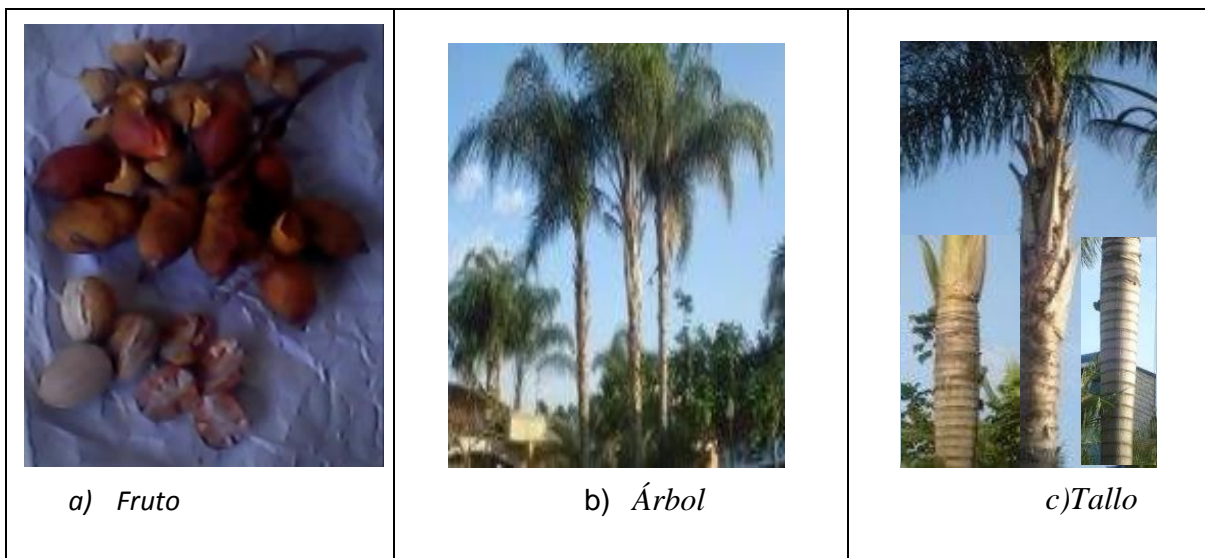
Género: *Syagrus*

Especie: *Syagrus romanzoffiana*

Descripción:

Palmera de 10 a 12 m de altura, aunque no es inusual que puedan llegar hasta los 25 m, con estípite (tronco sin ramas acabado en un ramo de hojas) liso, a veces con ensanchamientos a distintas alturas, con un diámetro de 30 a 60 cm en la base, de color gris. Las hojas son palmas alternas pinnadas, de 2 a 4 m de longitud. Están formadas por numerosos foliolos lanceolados de hasta 1 m de largo que se insertan en el raquis en distintas filas y agrupaciones, lo que da a la hoja un aspecto plumoso. Las flores, blancas o amarillas y monoicas (diferenciadas por sexo), se presentan en inflorescencias muy ramificadas y largas (de 1,5 a 2 m de longitud), con flores únicamente masculinas o femeninas, que aparecen entre dos hojas y que están protegidas por una espata leñosa y estriada. El fruto es una drupa de forma globosa, parecida a una aceituna, de 1 a 2 cm de diámetro, de color verde mientras está inmaduro y de color amarillo anaranjado cuando está maduro, que aparece en racimos densos. Tiene la pulpa densa y muy fibrosa y una única semilla de color castaño ¹².

1.1.1.4 Attalea cf.



Fotografía 1.4. Especie *Attalea cf.*
Fuente: La Autora

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Arecales*

Familia: *Areaceae*

Género: *Attalea*

Descripción:

Attalea es un género de la familia de las palmeras (*Areaceae*). Contiene 67 especies distribuidas en áreas de tierras bajas húmedas a semiáridas del neotrópico⁹. Son palmas solitarias con corona formada por varias hojas grandes, pinnadas; la inflorescencia es interfoliar, con flores blancuzcas a amarillentas, masculinas con pétalos no carnosos, femeninas más grandes y de ambos sexos. Frutos ovoides con exocarpio color marrón en la madurez, mesocarpio seco y fibroso, endocarpio leñoso y semillas elípticas oleaginosas.

1.2. Usos de los Aceites Vegetales.

Los aceites vegetales son compuestos orgánicos obtenidos a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. El aceite vegetal se puede obtener mecánica (prensado) o químicamente (disolvente hexano), y generalmente se usa alguna combinación de ambas técnicas¹³.

Aproximadamente dos tercios de la producción mundial de aceites y grasas se utilizan para el consumo humano. Las grasas son fuentes concentradas de energía, vitaminas y ácidos grasos que son esenciales para casi todos los organismos¹⁴.

La relativa sencillez y versatilidad de los procesos físicos (fraccionamiento) o químicos (hidrogenación o interesterificación), usados por separado o en combinación, permiten modificar las propiedades de los aceites vegetales para hacerlos particularmente indicados para usos finales específicos. Tales procesos hacen a los aceites vegetales intercambiables, un hecho que conduce a que esos aceites predominen en el mercado de los aceites comestibles¹⁴.

En los usos comestibles, los aceites vegetales se emplean principalmente en la fabricación de margarinas, productos lácteos, rellenos para galletas y alimentos preparados. Las mantecas vegetales se utilizan principalmente para obtener grasas de repostería. En ésta también se utilizan mucho los aceites láuricos (aceites de coco y palmiste) así como aceites fraccionarios de soya y algodón¹⁴.

Los aceites vegetales también tienen aplicaciones industriales, para estos fines pueden usarse en forma de triglicéridos brutos o refinados (tales como los ácidos grasos) o como derivados de los ácidos grasos. La industria de revestimiento de superficies hace un uso sustancial de diversos aceites insaturados en la producción de resinas alquídicas pinturas y barnices. Los aceites de lino y de soya son los aceites principales empleados en la fabricación de estos dos últimos productos. Tales aceites pueden modificarse mediante tratamiento térmico u oxidativo. Los ácidos grasos que se producen por hidrólisis de aceites o de pasta oleosa son preferidos muchas veces a los triglicéridos por gozar de propiedades específicas funcionales que son importantes para la industria de revestimiento de superficies. La industria del jabón comparte con el sector de revestimiento de superficies la utilización de ácidos grasos o de los aceites de los cuales se derivan. Los aceites láuricos son los de mayor interés en esta industria¹⁴.

Los aceites grasos no sólo tienen un mercado importante por sí mismo, sino que también proporcionan la materia prima para casi todos los derivados de ácidos grasos usados en diversas industrias. Igualmente tienen aplicación en lubricación y fabricación de lubricantes por sus propiedades de reducir fricción ¹⁴.

1.3. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles.

El término general vitamina E se utiliza para designar a un grupo de ocho especies naturales de tocoferoles y tocotrienoles (α -, β -, γ - y δ -). Su estructura consta de 2 partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos 8 vitámeros se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11 ¹⁵, como se muestra en la Fig. 1.1, 1.2, 1.3.

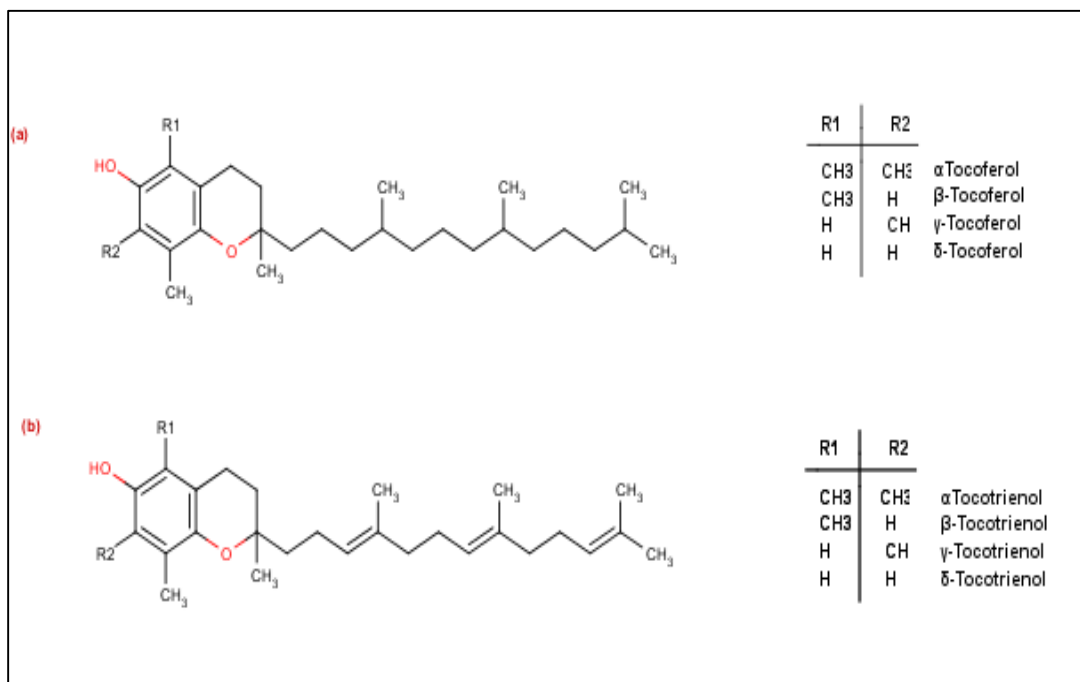


Fig. 1.1. Estructura química de Tocoferoles (a) y Tocotrienoles (b)
Fuente: Cyberlipid Center, 2004

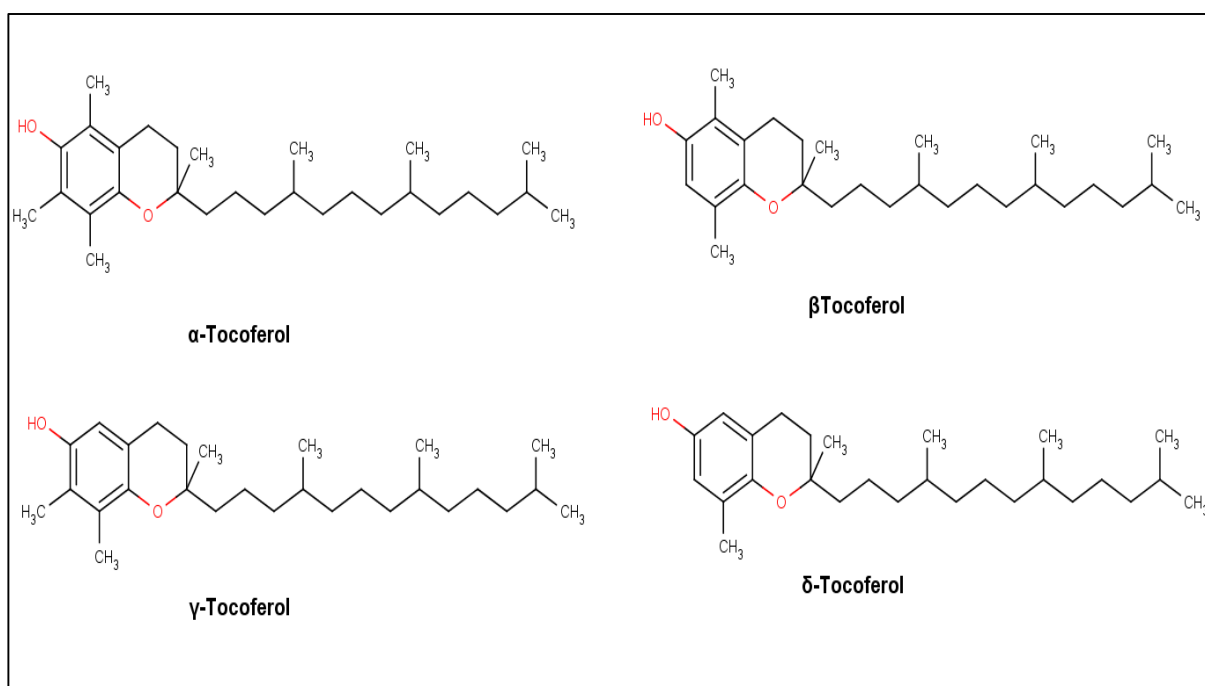


Fig. 1.2. Estructuras moleculares de los Tocoferoles
Fuente: Watson, Preedy, 2007

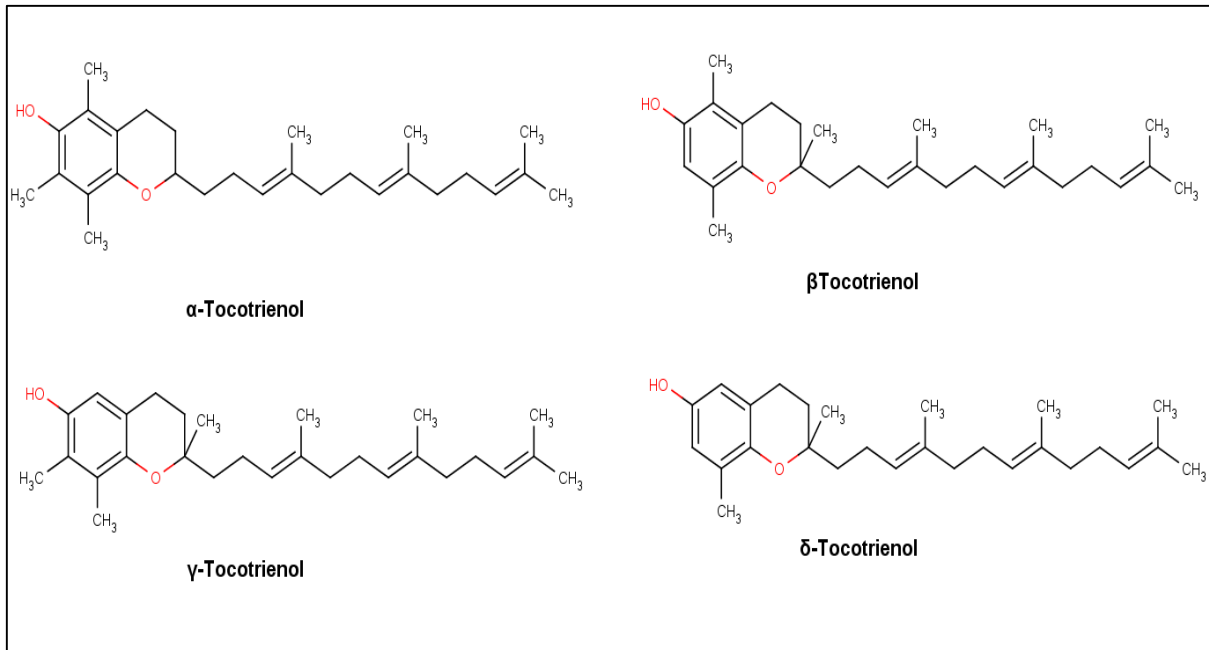


Fig. 1.3. Estructuras moleculares de los Tocotrienoles
Fuente: Watson, Preedy ,2007

Se ha señalado que cada uno de los tocoles que conforman esta vitamina poseen diferente actividad antioxidante, la cual decrece en el orden $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, al igual que su potencial biológico¹⁶.

Los tocoferoles son los componentes más abundantes de los aceites vegetales y naturales, el α -tocoferol es el tocoferol principal, y los δ , γ , β son compuestos que se encuentran presentes en cantidades menores, mientras que los tocotrienoles son los componentes más activos, el isómero más abundante es el γ -tocotrienol¹⁷.

Los tocoferoles y tocotrienoles en su forma pura han sido descritos como sustancias viscosas de color amarillo pálido, que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales como hierro (Fe^{3+}) y cobre (Cu^{2+})¹⁶.

La vitamina E actúa coordinada con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerándose actualmente un importante antioxidante que aporta sustanciales beneficios al organismo¹⁵.

Esta actividad antioxidante radica en su capacidad de protección de las membranas celulares, acción que realiza impidiendo la oxidación de las mismas por los radicales libres. Dicha oxidación llevaría a una degradación del organismo, especialmente a la aparición de enfermedades cardiacas o posibles cánceres¹⁵.

En la Fig. 1.4 se muestran los mecanismos biosintéticos de formación de los α -tocoferol y α -tocotrienol, respectivamente.

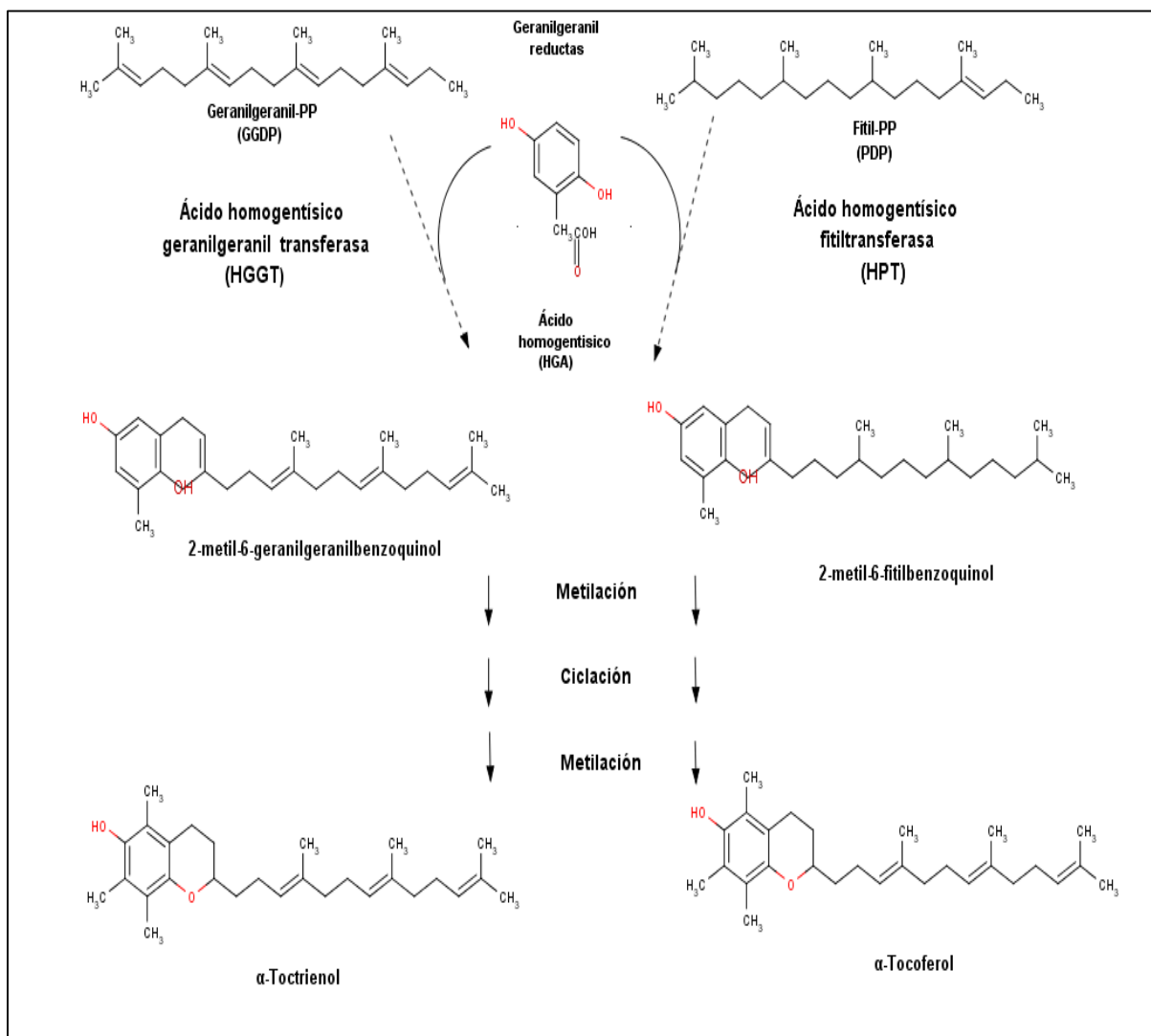


Fig. 1.4. Mecanismo biosintético de α -tocoferol y α -tocotrienol.
Fuente: Sayago, 2007

1.4. Método empleado para la obtención del aceite vegetal.

1.4.1 Extracción en Soxhlet.

Es una técnica general y bien establecida que supera los resultados de otras técnicas convencionales, aunque tiene un campo limitado en la extracción de compuestos termolábiles¹⁸. El hexano es el disolvente más utilizado para extraer aceites comestibles de plantas¹⁹.

La extracción con Soxhlet presenta las siguientes ventajas:

- La muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente,
- La extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los compuestos,
- No es necesaria la filtración después de la extracción,
- Se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet y
- Además, la metodología empleada es muy simple y barata²⁰.

1.5. Métodos empleados para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles.

1.5.1 Saponificación.

Los aceites son componentes de origen vegetal, que están constituidos de ésteres de propanotriol, glicerol o glicerina y ácidos grasos, a los que se les conoce como triglicéridos. Cada aceite natural contiene diversos triglicéridos y eventualmente algún otro lípido, aunque corrientemente en baja proporción²⁰. Cuando son líquidos se les denomina aceites y cuando son sólidos, grasas.

Todas las sustancias grasas sean de origen vegetal o animal, están constituidas en un elevado porcentaje, por ácidos grasos, combinados con glicerina (glicéridos). Los ácidos grasos constituyen el 94% a 96% del peso total de las moléculas que conforman el aceite. Los aceites obtenidos de las frutas frescas o de las cáscaras de frutas, tales como el aceite de palma, aceite de oliva, contienen como principales componentes ácidos, el palmítico, oleico y el linoleico. Las células grasas, contienen también otros lípidos en pequeñas cantidades, llamados insaponificables, es decir que no pueden ser hidrolizados en ácidos grasos²¹.

Una de las reacciones químicas más importantes de los ésteres es la saponificación, que consiste en la combinación de un éster con una base inorgánica para dar una sal orgánica y un alcohol²².

1.5.2 Derivatización.

La derivatización es un proceso de alteración química de un compuesto, mediante la modificación de la funcionalidad de una molécula para aumentar o disminuir la volatilidad, los reactivos derivatizantes permiten a los cromatógrafos analizar compuestos que de otro modo

no son fácilmente detectables. La derivatización también reduce la adsorción en el analito en el sistema de CG, mejora la respuesta del detector en la separación y simetría del pico²³.

Los derivatizantes se utilizan por las siguientes razones:

- Para mejorar la resolución y reducir la simetría de compuestos polares (-OH,-COOH, = NH,-NH₂,-SH, y otros grupos funcionales).
- Para analizar compuestos relativamente no volátiles.
- Para mejorar la eficiencia analítica y aumentar la detección.
- Para mejorar la estabilidad de los compuestos ²³.

La elección de un reactivo de derivatización se basa en el grupo funcional que requiere derivatización, la presencia de otro grupo funcional en la molécula, y la razón para realizar la derivatización. La estructura química y las propiedades de la molécula influyen en la elección del reactivo ²³.

En la elección de un reactivo de derivatización adecuada, ciertos criterios deben ser usados puesto que un buen reactivo:

- Produce una reacción de derivatización que es 95-100% completa.
- No causará ningún reordenamientos o alteraciones estructurales durante la formación del derivado.
- No contribuye a la pérdida de la muestra durante la reacción.
- Produce un derivado que no va a interactuar con la columna (GC o HPLC).
- Produce un derivado que es estable con respecto al tiempo²³.

Se pueden usar derivatizantes como: Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide, que es el reactivo usado en esta investigación, ya que es un reactivo utilizado en investigaciones anteriores. El derivatizante sustituye el H del grupo OH de la molécula ubicado en el grupo fenilo.

1.5.3 Cromatografía de Gases.

En Cromatografía de Gases se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador. La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta, a través de un septo (diagrama de silicona), en un inyector caliente, en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el

gas portador, que puede ser He, N₂ o H₂, y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador. La columna debe estar suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más elevada que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa²⁴.

La Cromatografía de Gases separa compuestos de una mezcla, pero para su identificación es necesario implementar otras técnicas espectroscópicas como son la Espectrometría de Masas (EM), Espectroscopía Infrarroja (IR)²⁵.

En la Fig. 1.5 se muestra un esquema representativo de las partes de un Cromatógrafo de Gases.

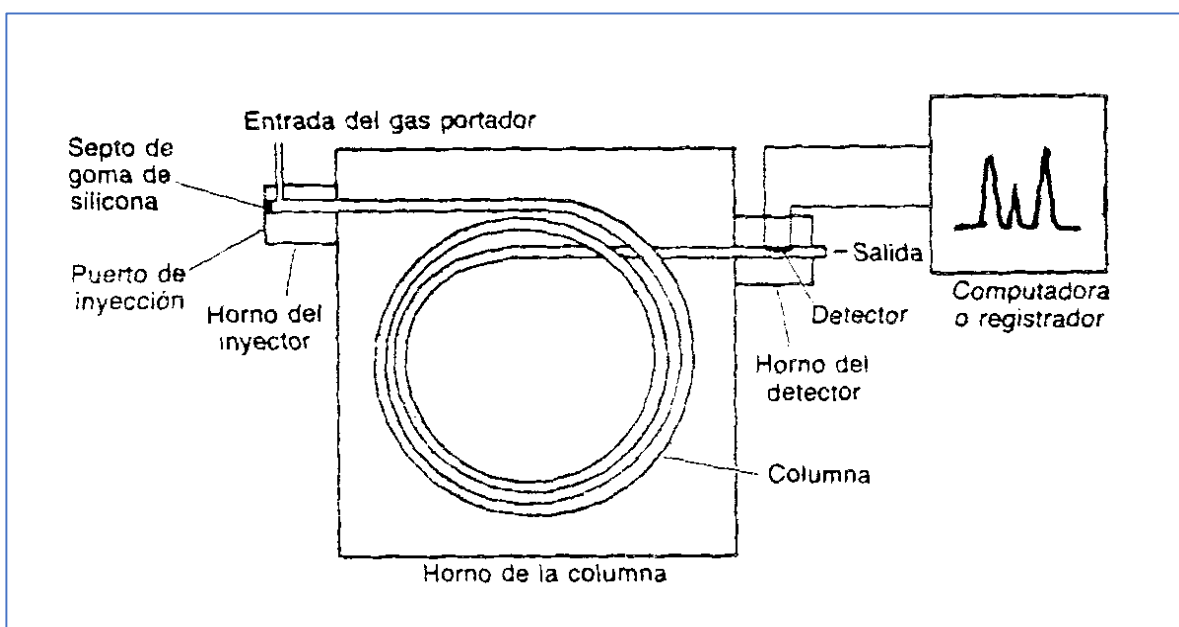


Fig 1.5. Esquema de partes de un Cromatógrafo de Gases
Fuente: Harris (2007)

1.5.4 Espectrometría de Masas.

Espectrometría de Masas es una técnica que estudia las masas de átomos, moléculas o fragmentos de moléculas. Para obtener un espectro de masas, las moléculas gaseosas o las especies desorbidas de fases condensadas se ionizan, los iones se aceleran en un campo eléctrico y a continuación se separan según su relación masa/carga (m/z)²⁴.

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 o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq.
- 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 ²⁶.

En la Fig. 1.6 se muestra un Espectrómetro de Masas con todos sus partes debidamente identificadas.

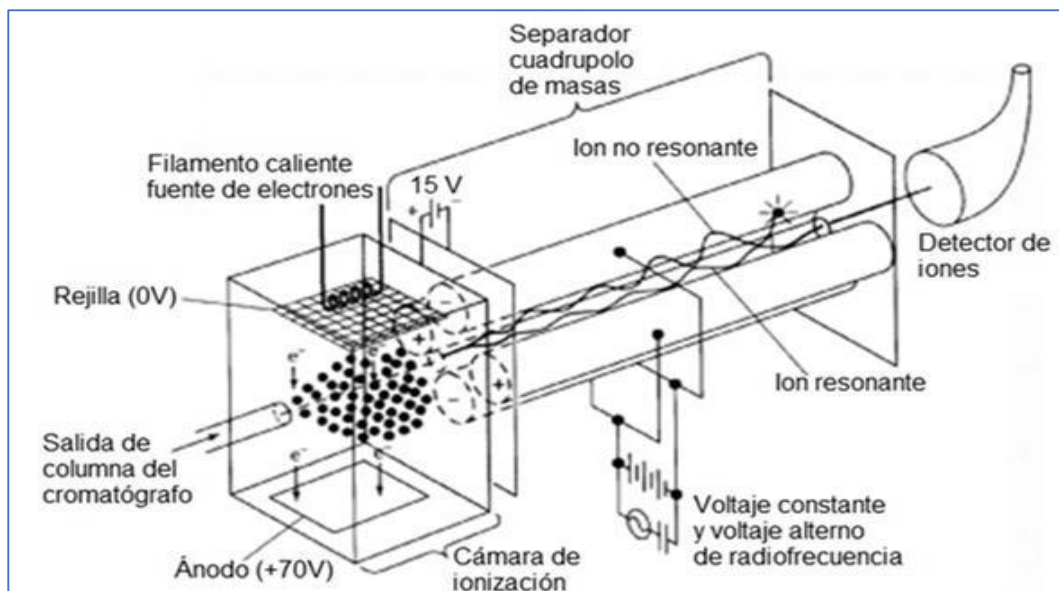


Fig. 1.6. Espectrómetro de masas de cuadrupolo
Fuente: Harris, 2007

1.6. Método empleado para medir la capacidad antioxidante.

1.6.1 Antioxidante.

Un antioxidante biológico se ha definido como cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, previene significativamente o retrasa la oxidación de dicho sustrato²⁷. Es un ingrediente que protege la calidad de los alimentos²⁸ y neutraliza la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre²⁹.

Hay evidencias que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos, mostrando la relación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre³⁰, los que pueden ser modificados al aumentar su ingesta³¹.

Entre los principales factores que afectan la actividad antioxidante de los extractos, se encuentra: calidad de la planta, origen geográfico, condiciones climáticas, época de recolección, almacenamiento y factores tecnológicos¹⁸. El contenido total en polifenoles y la actividad antioxidante son distintas para las diferentes partes de la fruta, además es posible que se den las diferencias dependiendo de la etapa de maduración de los frutos o entre hojas jóvenes y viejas de los materiales vegetales³².

Entre las actividades fisiológicas de los antioxidantes naturales se encuentra: actividad antibacteriana, antiviral, antimutagénica, antialérgica, anticarcinogénica, inhibidora del incremento de la presión arterial, antiúlceras, anticariogénica, antimicrobiana y antifúngica¹⁹, todas derivadas del estrés oxidativo celular, además de su poder como: vasodilatadores, antiinflamatorios, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como cicloxigenasa, lipoxigenasa³³.

1.6.2 Decoloración del catión radical ABTS⁺.

La capacidad antioxidante de una muestra está dada por interacciones sinérgicas entre compuestos y por la acción en cada uno de ellos, por lo cual es necesario combinar más de un método para evaluar correctamente la capacidad antioxidante de una muestra³². Por lo que se ha desarrollado una serie de métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante. Uno de ellos; se basa en la medida de la reacción con radicales, tales como ABTS⁺³⁴.

ABTS, llamado así por el reactivo 2,2-azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6- ácido sulfónico), mide la capacidad de los antioxidantes naturales de eliminar radicales libres^{35 36}. Este ensayo se basa en la activación de metmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el radical catiónico, cuando hayan o no antioxidantes³⁷. El ABTS en sistemas lipofílicos, puede ser utilizado para estudiar los efectos de protección de antioxidantes liposolubles en lípidos, simplificando así el ensayo^{38 39}. Pérez-Jiménez (2007) y Saura Calixto (2006) encontraron que algunos compuestos que tienen actividad captadora con ABTS, no muestran la misma actividad con el radical DPPH⁴².

El radical catiónico ABTS⁺ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Las mediciones se realizan a una longitud de onda de 734 nm ³⁷.

1.6.3 Espectrofotometría UV-visible.

En las técnicas espectrofotométricas se determina la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, ocurriendo una pérdida de color proporcional con la concentración ⁴³.

Un espectrofotómetro UV-visible se muestra en la Fig. 1.7. La luz visible procede de una lámpara de halógeno-cuarzo y la fuente de UV es una lámpara de arco de deuterio que emite en el intervalo de 200 a 400 nm. Se usa una única lámpara cada vez. La red de difracción selecciona una banda estrecha de longitudes de onda, que entran en el monocromador, el cual selecciona una banda aún más estrecha que es la que atraviesa la muestra. Después del corte de haces y la transmisión a través de la muestra y referencia la señal se detecta en un tubo fotomultiplicador, que genera una corriente eléctrica proporcional a la irradiancia ²⁴.

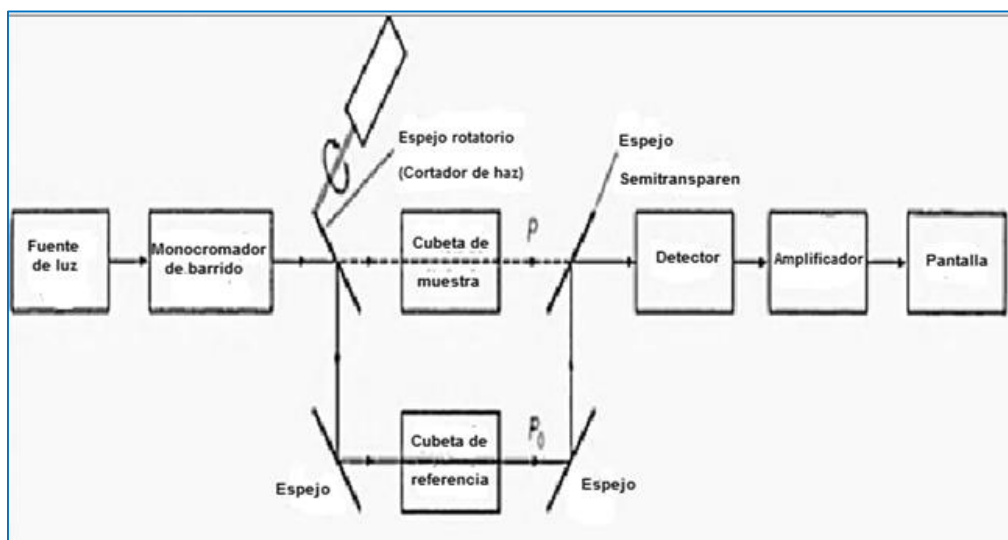


Fig. 1.7. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de barrido de doble luz.
Fuente: Harris, 2007

CAPITULO II

2 Materiales y métodos

La presente investigación se desarrolló bajo el siguiente esquema:

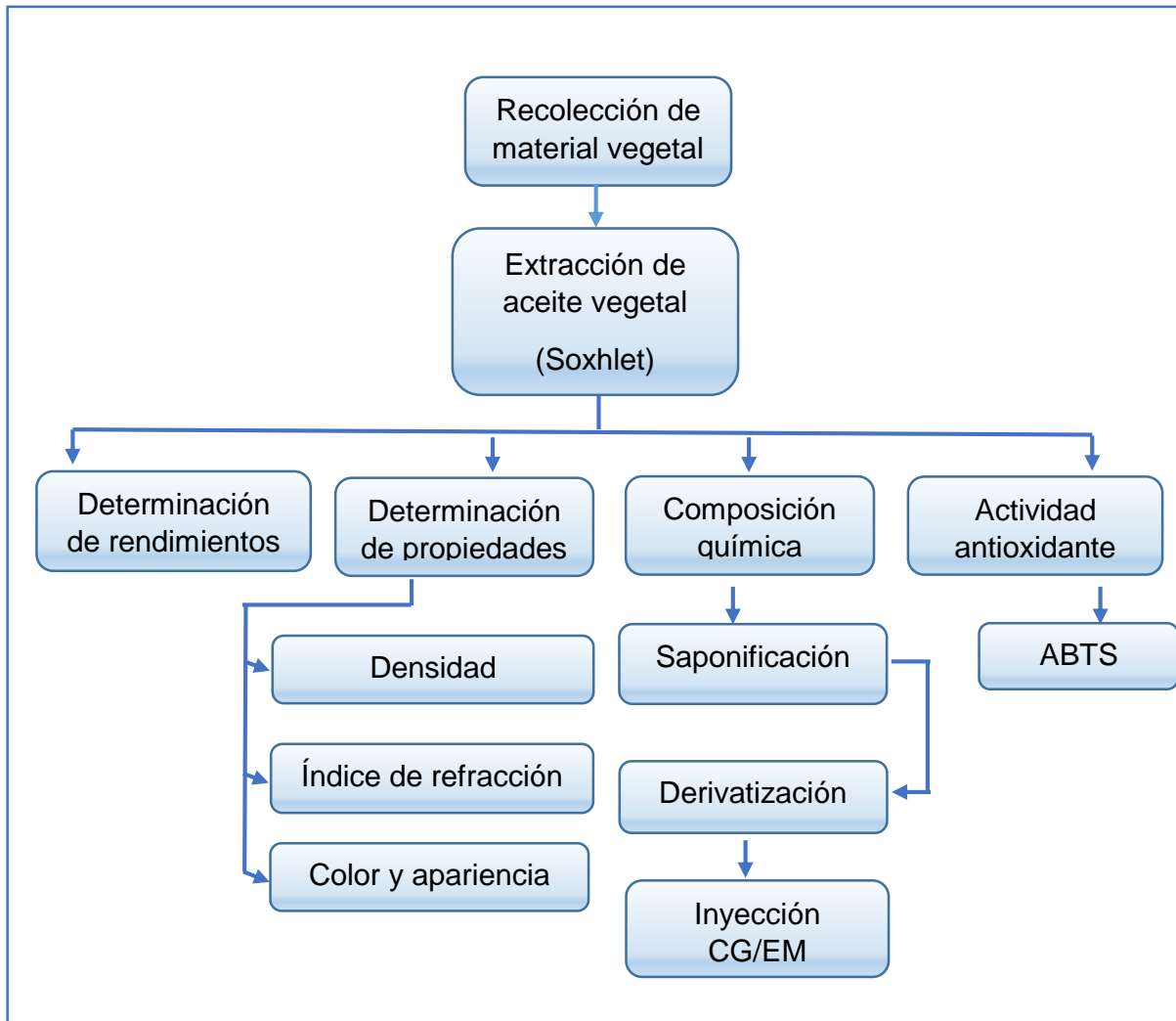


Fig. 1.8. Esquema general de procedimiento

Fuente: La Autora

2.1 Recolección de materia vegetal y base de datos para almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.

Se recolectan 4 especies de *Arecaceae*, las muestras se toman de un sólo árbol y se realiza una salida de campo por cada especie.

- *Aiphanes Grandis*, especie recolectada en el sector de “Sambotambo” provincia de El Oro, en las coordenadas: 79° 43´ 56” W; 03° 39´ 13” S, altura 1450 msnm, el día 08 de abril del 2013. La muestra botánica depositada en el Herbario del Departamento de Química con el código PPN-aa-0013.
- *Phoenix Canariensis*, especie recolectada en el cantón Quilanga, provincia de Loja, en las coordenadas: 95° 24´ 77” W; 06° 77´ 43” S, altura 1892 msnm, el día 17 de agosto del 2013. La muestra botánica depositada en el Herbario del Departamento de Química con el código PPN-aa-0010.
- *Syagrus romanzoffiana*, especie recolectada en el cantón Catamayo, provincia de Loja, en las coordenadas: 79° 21´ 08.3” W; 03° 59´ 15.3” S, altura 1222 msnm, el día 23 de noviembre del 2013. La muestra botánica depositada en el Herbario del Departamento de Química con el código PPN-aa-0011.
- *Attalea cf.*, especie recolectada en el cantón Guabo, provincia de El Oro, en las coordenadas: 79° 49´ 43” W; 03° 14´ 36” S, altura 47 msnm, el día 9 de septiembre del 2013. La muestra botánica depositada en el Herbario del Departamento de Química con el código PPN-aa-0012.

2.2 Obtención del aceite y determinación de rendimientos.

La extracción del aceite vegetal de las especies recolectadas, se realiza mediante equipo Soxhlet, los tiempos de extracción y cantidad de solvente se determinaron previamente.

La parte útil del fruto de la palmera que se utilizó en la presente investigación para la extracción de aceite fueron: endosperma y testa, una vez separadas del endocarpio y mesocarpio se cortaron en pedazos muy pequeños de tal manera que mejore el contacto entre la superficie de la muestra y el solvente. Para realizar los cortes respectivos se puede utilizar podadoras manuales²⁰.

Para obtener los aceites vegetales se partió de 40 g de muestra, al cual se añaden 200 ml de solvente (hexano). La extracción se lleva a cabo empleando un equipo Soxhlet²⁰, fotografía 2.1.

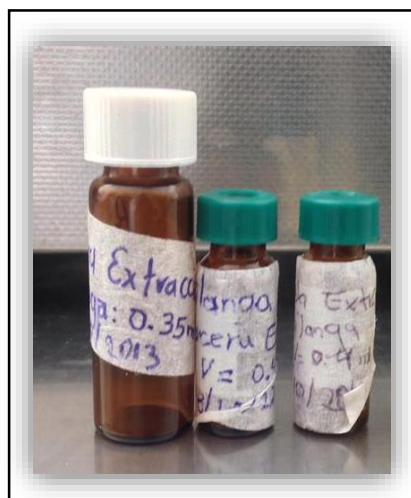
Se dejó destilar por 2 horas a una temperatura de 70 °C (se controló el tiempo desde que empieza a ebulir el hexano). Pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se concentra en un rotaevaporador a 25 °C²⁰.

Cuando se haya verificado que no existe la presencia de hexano en la muestra, se procedió a colocar el aceite en una probeta y se midió el volumen exacto o en los casos en que se obtiene aceite sólido se pesó en una balanza analítica, el aceite vegetal obtenido²⁰.

Luego se almacenó el aceite en frascos ámbar cerrados y debidamente etiquetados conjuntamente con el volumen y fecha de destilación, fotografía 2.2. Posteriormente los aceites se almacenaron en refrigeración a -4°C para evitar la degradación del aceite por parte de la luz²⁰.



Fotografía 2.1. Equipo de extracción Soxhlet
Fuente: La Autora



Fotografía 2.2. Envase y etiquetado de los aceites
Fuente: La Autora

Se realizan 3 extracciones por cada especie con el fin de obtener la cantidad suficiente de aceite para los análisis posteriores y el resultado se expresó como promedio \pm desviación estándar.

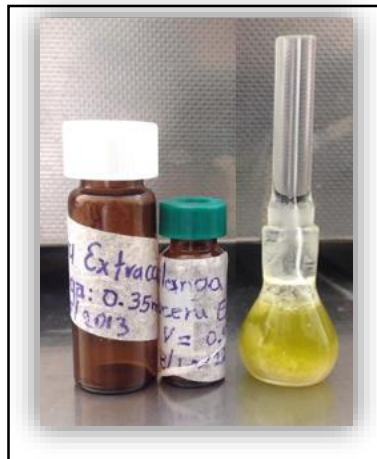
Los rendimientos se obtienen de todos los datos obtenidos de las diferentes destilaciones utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad obtenida de aceite}}{\text{Cantidad de muestra inicial}} \times 100$$

2.3 Determinación de propiedades físicas.

2.3.1 Densidad.

La densidad se determina mediante la norma ANFOR NF T75-111 (ver anexo), para lo cual se usa un termómetro, baño maría, picnómetro y balanza analítica (Fotografía 2.3).



Fotografía 2.3. Picnómetro
Fuente: La Autora

2.3.2 Índice de refracción.

Esta propiedad se mide usando un refractómetro marca ABBE (Fotografía 2.4.), que se encuentra en el Laboratorio de Alimentos-UTPL. Se determina mediante la norma ANFOR NF 75-112, (ver anexo II).



Fotografía 2.4. Refractómetro
Fuente: La Autora

2.3.3 Color y apariencia.

La valoración se llevó a cabo empleando el sentido de la vista, siendo posible observar su consistencia, color, apariencia y características que permiten apreciar la calidad del aceite utilizado.

2.4 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.

La identificación de los tocoferoles y tocotrienoles se realiza mediante Cromatografía de Gases (CG), el equipo usado es de marca Agilent Technologies 6890N-Network CG System, serial US10347010, acoplado a Espectrometría de Masas (EM) MICROMASS, Quattro Ultima, serial VB226 de 50/60 Hz, operado bajo condiciones de impacto de electrones (IE) a 70eV. El método utilizado se detalla en el anexo III.

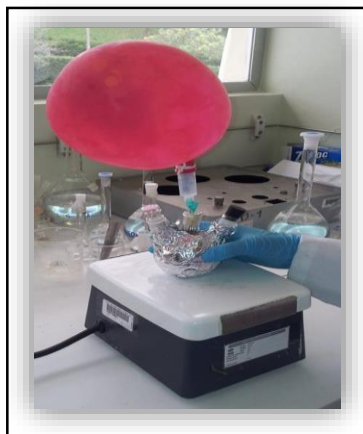
Se especifican cada uno de los pasos que se ejecuta durante la saponificación, derivatización e inyección de las muestras, hasta lograr finalmente la identificación de los compuestos de interés.

2.4.1 Saponificación de los aceites vegetales.

Para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales es necesario realizar la saponificación de las muestras ^{44 45 46} (ver anexo IV).

Para llevar a cabo la saponificación de las muestras es necesario crear una atmósfera inerte, por el hecho de que los tocoles son muy sensibles al oxígeno.

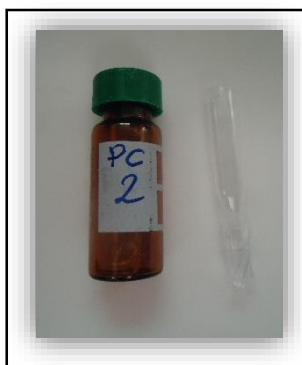
Se crea la atmósfera inerte utilizando un globo de látex que es llenado con nitrógeno y se coloca en la parte superior del balón de tres bocas que es considerado como reactor, el mismo que debe estar sellado con una única salida para el aire que era desplazado por el nitrógeno dentro del reactor (Fotografía 2.5.).



Fotografía 2.5. Saponificación del aceite empleando una atmósfera inerte
Fuente: La Autora

2.4.2 Derivatización de las muestras saponificadas.

Se pesa 0,001 g de aceite de palma saponificado se coloca en un vial con inserto y se agrega 100 μ l de derivatizante (N-methyl-N-TMStrifluoroacetamide).



Fotografía 2.6. Vial e inserto
Fuente: La Autora



Fotografía 2.7. Derivatizante
Fuente: La Autora

Se coloca en un baño seco marca Labnet, previamente calentado a 60 °C por un lapso de tiempo de 15 min. Se deja enfriar en un desecador durante 15 min antes de ser inyectada en el CG/EM⁴⁷.



Fotografía 2.8. Baño seco
Fuente: La Autora

2.4.3 Inyección de las muestras.

Finalmente se inyecta diferentes muestras en el CG/EM, usando el método que se detalla en el anexo III.



Fotografía 2.9. Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrofotómetro de Masas
Fuente: La Autora

Se inyectan estándares de tocoferoles y tocotrienoles en CG/EM, que son derivatizados previamente y posteriormente sirven para comparar los iones de referencia aquí obtenidos con los de las muestras.

2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los aceites vegetales se realiza utilizando un espectrofotómetro UV-visible. El trólox es el estándar de referencia que se utiliza para hacer reaccionar a la muestra con un determinado reactivo⁴⁸.



Fotografía 2.10. Espectrofotómetro UV-visible
Fuente: La Autora

Se emplea la técnica de Arnao et al. (2001) con algunos ajustes descritos por Thaiponget al. (2006). Se prepararon dos soluciones: ABTS (0,0074 Molar) y persulfato de potasio (0,0026 Molar), la mezcla de estas se dejó reposar por 12 horas de tal forma que se obtuvo la solución patrón de ABTS, la solución de trabajo se preparó mezclando 1 mL de solución patrón con 60 ml de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 734 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox en concentraciones entre: 25 y 800 μM . De cada concentración así como de cada muestra se tomó 150 μL en un vial, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados fueron expresados en μmoles equivalentes de trólox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol ET/g MF}$). En el Anexo V, se muestra el esquema de la experimentación descrita.



Fotografía 2.11. Estándar de trólox
Fuente: La Autora

2.6 Análisis Estadístico.

La variación en rendimiento, índice de refracción, densidad y actividad antioxidante (ABTS), se evaluó por medio de un ANOVA (de una sola varianza) con un nivel de significancia de 95% ($P < 0,05$).

La curva de calibración de la actividad antioxidante se obtuvo utilizando el programa Microsoft Excel 2010, la curva tuvo un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0,99$ (Anexo 7.1). El análisis estadístico y la generación de gráficas se llevó a cabo empleando Microsoft Excel 2010.

CAPÍTULO III

3 Resultados y discusiones

3.1 Almacenamiento de información Botánica y Etnobotánica.

La información Etnobotánica fue obtenida por las personas que habitan en los lugares donde se procedió a recolectar las especies, y fue almacenada en una base de datos en Microsoft Access, al igual que la información Botánica de cada especie. Esta base de datos reposa en un CD en el Laboratorio de Análisis Químico Instrumental del Departamento de Química. En la Fotografía 3.1 se muestra una imagen del formato usado.

ARECACEAE	
Id:	9
Nombre común:	Chonta
Familia:	Arecaceae
Género:	<i>Aiphanes</i>
Especie:	<i>grandis</i>
Sinonimo:	No tiene
Lugar de recolección:	El Oro- Sambotambo
Coordenadas:	79° 43' 56" W; 03° 39' 13" S; Alt: 1450 msnm
Descripción:	Palma solitaria hasta 20m de alto; espigas negras, largas (hasta 20cm) en el tronco, más cortas en el raquis, el margen de las pinnas y la inflorescencia hoias
Usos:	Preparar encocado, alimento de animales
código de herbario:	PPN-aa-0013
Imagen:	
Rendimiento mesocarpio %:	3,72
Rendimiento coco %:	no se obtuvo

Fotografía 3.1. Imagen de base de datos.
Fuente: La Autora

3.1.1 Información Etnobotánica.

La información etnobotánica se obtuvo de los habitantes de los sectores en que se recolectaron las especies.

La especie *Aiphanes grandis*, se conoce con el nombre común de Chonta. Es utilizado como alimento. Se come el palmito (meristemo apical) crudo o cocinado.

De las semillas del fruto se puede preparar encocado; se cocinan los frutos enteros en agua, se los abre, se licuan las semillas y se cocina el licuado con azúcar o panela¹⁰.

La especie *Phoenix canariensis*, se conoce con el nombre común de Palma canaria. Los frutos sirven para el ganado. Tiene uso ornamental.

La especie *Syagrus romanzoffiana*, es conocida con el nombre común de Palma chirivá. El fruto se usa para alimentar al ganado. Tiene uso ornamental.

La especie *Attalea cf.*, se conoce con el nombre común de Mata de coco. Es usada para alimentar animales y para la construcción.

3.2 Rendimientos y propiedades físicas.

Según revisión bibliográfica no existen reportes y/o estudios acerca de la caracterización del aceite de las cuatro especies de *Arecaceae* en estudio; por lo cual no hay normas que permitan establecer los requisitos mínimos que debe cumplir el aceite; por este motivo los valores obtenidos se comparan con la normatividad vigente para grasas de aceites vegetales de uso cosmético y alimenticio (Norma NTE INEN34:2012- COVENIN 30:1997)

3.2.1 Extracción del aceite vegetal mediante equipo Soxhlet.

Para la extracción del aceite se emplearon la endosperma y la testa de los frutos previamente triturados de las especies en estudio. La extracción se realizó por el método Soxhlet empleando como solvente hexano.

3.2.2 Rendimientos.

En la tabla 3.1 se muestran los rendimientos, el promedio y desviación estándar obtenidos de las tres extracciones, para cada una de las especies en estudio.

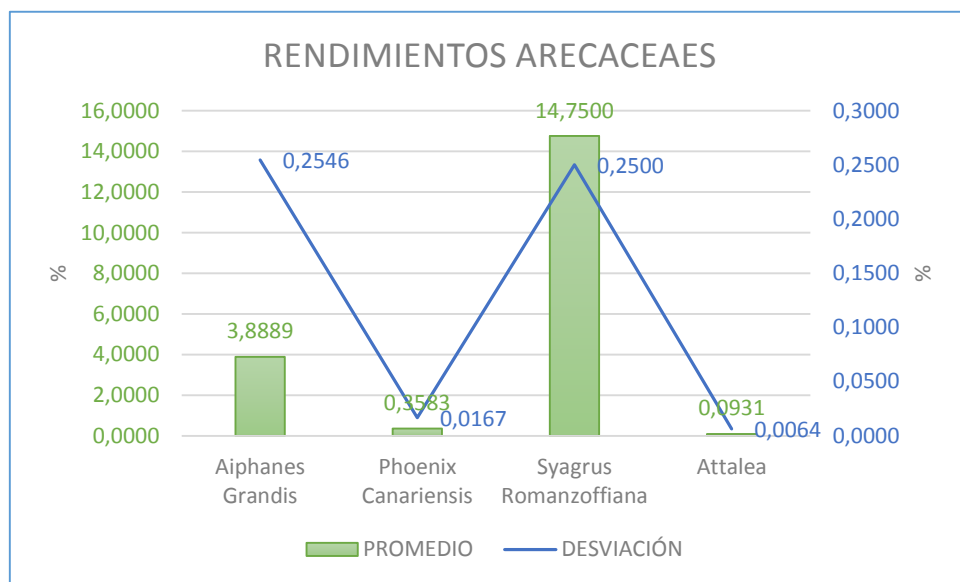
Tabla 3.1 Rendimientos de la extracción por cada especie

% RENDIMIENTO (expresados en base fresca)						
ESPECIES	PRIMERA EXT.	SEGUNDA EXT.	TERCERA EXT.	PROMEDIO		DESVIACIÓN
<i>Aiphanes grandis</i>	3,67	3,83	4,17	3,89	±	0,25
<i>Phoenix canariensis</i>	0,36	0,38	0,34	0,36	±	0,02
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	14,50	15,00	14,75	14,75	±	0,25
<i>Attalea</i>	0,09	0,09	0,10	0,09	±	0,01

Fuente: La Autora

El aceite vegetal extraído de la especie *Attalea*, fue descartado debido a su bajo rendimiento, ya que no se contaba con la cantidad suficiente para los ensayos posteriores.

En la gráfica 3.1 se muestra una comparación de los rendimientos obtenidos de los aceites en porcentaje, en la cual se puede visualizar que la especie *Syagrus romanzoffiana* tiene un mayor rendimiento y la especie *Attalea* es la que contiene el más bajo rendimiento.



Gráfica 3.1. Comparación de rendimiento de las cuatro especies
Fuente: La Autora

El ANOVA (Anexo 6.1) muestra que el valor $P < 0,05$, demostrando así que hay diferencias significativas en el rendimiento de las cuatro especies. En la tabla 3.1 se observa que la desviación obtenida es $< 0,05$ en dos de las especies: *Aiphanes grandis* y *Syagrus romanzoffiana* indicando que el análisis es confiable y los datos son reproducibles en estas especies.

Los resultados obtenidos se compararon con investigaciones realizadas, tal es el caso del estudio "*Posibilidades de cultivo del pindó (Syagrus romanzoffiana) en Argentina como productora de biodiesel bajo condiciones de clima semiárido*" en el cual se muestra que la semilla de la especie *Syagrus romanzoffiana* presenta de 25% a 52% de aceite, siendo éste superior al obtenido en el presente estudio, el cual fue de 14.75%⁵⁰.

En la investigación "*Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae)*", se muestra que las semillas del género *Aiphanes* tienen el 37% de aceite, siendo superior al del presente estudio, el cual fue 3,89%¹⁰.

En la investigación "*Características fisicoquímicas del aceite del endospermo de la Palma Yagua (Attalea cryptanther)*", se muestra que el rendimiento obtenido de la pulpa para la

especie *Attalea cryptanther* es de 5,48%, siendo superior al del presente estudio, el cual fue 0,09% ⁵¹.

El rendimiento de la extracción varía por la influencia de algunos factores, entre ellos, el contenido de aceite en las semillas y el método de extracción empleado. El contenido de aceite en la semilla depende de la variedad y las condiciones agroclimatológicas del lugar donde se cultiva ⁵².

3.2.3 Propiedades Físicas.

3.2.3.1 Color y apariencia.

El aceite presentó un color amarillo intenso; amarillo verdoso y amarillo naranja, con una apariencia líquido viscosa en las especies *Aiphanes grandis*, *Phoenix canariensis* y *Syagrus romanzoffiana*, respectivamente y sólido con una textura como cera en la especie *Attalea*, en la tabla 3.2 se detalla para cada especie.

Tabla 3.2 Color y Apariencia por cada especie

ESPECIES	PARTE UTILIZADA	COLOR	APARIENCIA
<i>Aiphanes Grandis</i>	Endosperma y testa	amarillo-intenso	líquido-viscoso
<i>Phoenix Canariensis</i>	Endosperma y testa	amarillo-verdoso	líquido-viscoso
<i>Syagrus Romanzoffiana</i>	Endosperma y testa	amarillo-intenso	líquido-viscoso
<i>Attalea</i>	Endosperma y testa	amarillo-naranja	sólido

Fuente: La Autora

3.2.3.2 Índice de refracción.

En la tabla 3.3 se detallan los valores del índice de refracción, el promedio y desviación estándar obtenidos de las tres extracciones para cada una de las especies en estudio.

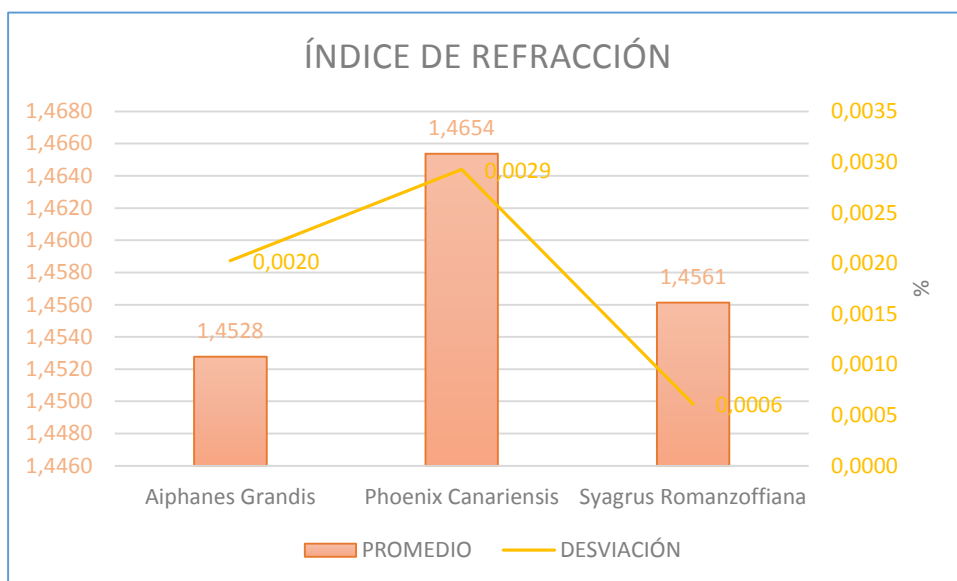
Tabla 3.3 Índice de refracción por cada especie

ESPECIES	PRIMERA EXT.	SEGUNDA EXT.	TERCERA EXT.	PROMEDIO		DESVIACIÓN
<i>Aiphanes Grandis</i>	1,4535	1,4543	1,4505	1,4528	±	0,0020
<i>Phoenix Canariensis</i>	1,4620	1,4667	1,4674	1,4654	±	0,0029
<i>Syagrus Romanzoffiana</i>	1,4555	1,4561	1,4567	1,4561	±	0,0006

Fuente: La Autora

En la gráfica 3.2 se compara una de las propiedades físicas, el índice de refracción de los aceites vegetales. Se observa que la especie *Phoenix canariensis* posee mayor índice de

refracción mientras que la especie *Aiphanes grandis* posee menor índice de refracción de los aceites.



Gráfica 3.2. Comparación del índice de refracción de las tres especies
Fuente: La Autora

El ANOVA (Anexo 6.2) muestra que el valor $P < 0,05$ demostrando que las tres especies no tienen el mismo índice de refracción, y como se observa en la tabla 3.2 la desviación obtenida es $< 0,05$ en las tres especies indicando que el análisis es confiable y los datos son reproducibles.

En la investigación “*Extracción y caracterización del aceite de Poraquieba serícea Tulasne*” se muestra un índice de refracción de 1,460²¹, encontrándose dentro de los valores de índice de refracción obtenidos en las tres especies del presente estudio.

En la investigación “*Características fisicoquímicas del aceite del endospermo de la Palma Yagua (Attalea cryptanther)*”, se muestra un índice de refracción de 1,4441⁵¹, siendo éste inferior a los obtenidos en el presente estudio; el valor encontrado en la Norma NTE INEN 30:2012, para grasa de palma africana (1,453 -1,4595)⁵³, se asemeja con los valores obtenidos.

3.2.3.3 Densidad.

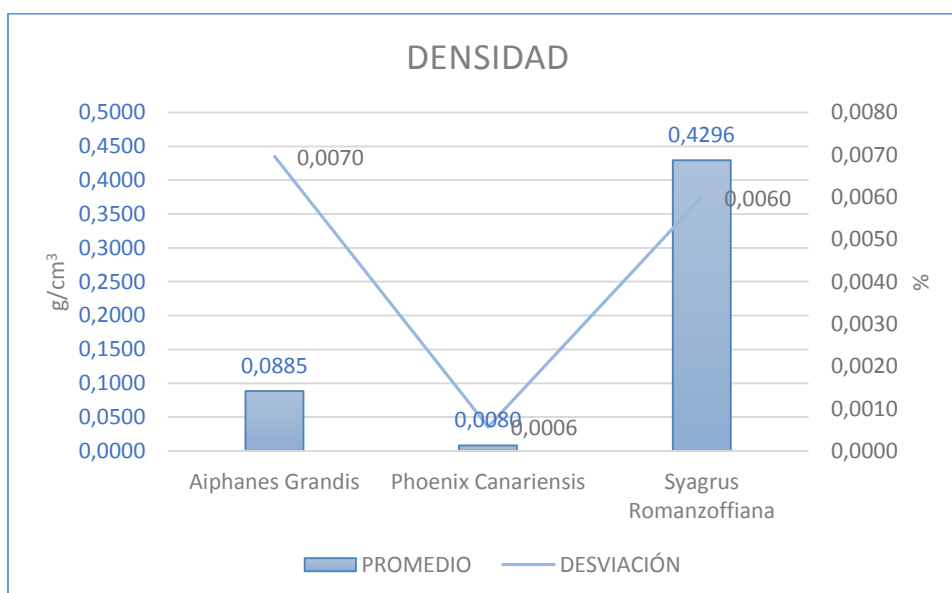
En la tabla 3.4 se detallan los valores de la densidad, el promedio y desviación estándar obtenidos de las tres extracciones para cada una de las especies en estudio.

Tabla 3.4 Densidad por cada especie

ESPECIES	PRIMERA EXT.	SEGUNDA EXT.	TERCERA EXT.	PROMEDIO		DESVIACIÓN
<i>Aiphanes grandis</i>	0,9016	0,9230	0,8932	0,9059	±	0,0154
<i>Phoenix canariensis</i>	0,9293	0,9293	0,9293	0,9293	±	0,0000
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	0,9008	0,9252	0,9279	0,9180	±	0,0149

Fuente: La Autora

En la gráfica 3.3 se muestra la densidad de los aceites vegetales obtenidos, en porcentaje. Se observa que la especie *Phoenix canariensis* posee mayor densidad y *Aiphanes grandis* posee menor densidad.



Gráfica 3.3. Comparación de la densidad de las tres especies

Fuente: La Autora

El ANOVA (Anexo 6.3) muestra que el valor de $P < 0,05$ demostrando que las tres especies no tienen la misma densidad, y como se observa en la tabla 3.4 la desviación obtenida es $< 0,05$ en las tres especies indicando que el método es confiable y los datos reproducibles.

Los valores de densidad obtenidos son similares a los reportados en la Norma NTE INEN 30:2012, para grasa de palma africana (0,910 - 0,918)⁵³, y se asemeja con los valores reportada por la norma venezolana (0,8969-0,926 g/cm³)⁵⁴, para aceites vegetales.

En la investigación “*Extracción y caracterización del aceite de Poraquieba serícea Tulasne*” se muestra que la densidad es de 0.8912 g/cm³ siendo éste inferior al obtenido en el presente estudio ²¹.

Las propiedades físicas del aceite vegetal de las especies en estudio, puede varían por el método empleado para determinarlas, independientemente de esto los valores de índice de refracción y densidad se encuentran dentro del rango reportado por investigaciones de aceites vegetales.

3.3 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles.

El peso molecular de los compuestos cambia al realizar la derivatización, en la tabla 3.5 se especifican los pesos moleculares de los tocoles antes y después de la derivatización.

Tabla 3.5 Pesos moleculares de los tocoles

Compuesto	Peso Molecular	Peso molecular + derivatizante ((CH ₃) ₃ SiO)
α-tocotrienol	424,66	496
β-tocotrienol	410,63	482,4
γ-tocotrienol	410,63	482,4
δ-tocotrienol	396,61	468,3
α-tocoferol	430,71	502,4
β-tocoferol	416,68	488,4
γ-tocoferol	416,68	488,4
δ-tocofero	402,65	474,4

Fuente: Jara 2012

Para la identificación de los tocoles presentes en cada especie, se utilizó los iones de referencia y su fragmentación que son características para cada especie, en la tabla 3.6 se detallan los iones de referencia.

Tabla 3.6 Iones de referencia de los tocoles

Compuesto	Iones de Referencia (m/z)
α-tocoferol	503,2; 504,0; 237,7; 236,8
β-tocoferol	489,3; 490,1; 222,7; 223,7
γ-tocoferol	489,3; 490,1; 222,7; 223,7
δ-tocoferol	475,1; 475,9; 208,6; 209,5
α-tocotrienol	497,2; 498,0; 237,8; 237,0
β-tocotrienol	481; 484,0; 223,5; 222,6
γ-tocotrienol	481; 484,0; 223,5; 222,6
δ-tocotrienol	489,3; 490,1; 223,7; 49,0

Fuente: Núñez, 2007.

La información existente de determinaciones de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) en especies de *Arecaceae* es muy escasa, por lo que se comparará con estudios similares.

Empleando el método descrito en el anexo III, mediante CG/EM, en el cromatograma fig 3.1 de la especie *Aiphanes grandis* se identificó el α -tocoferol, en un tiempo de retención de 8,743 min.

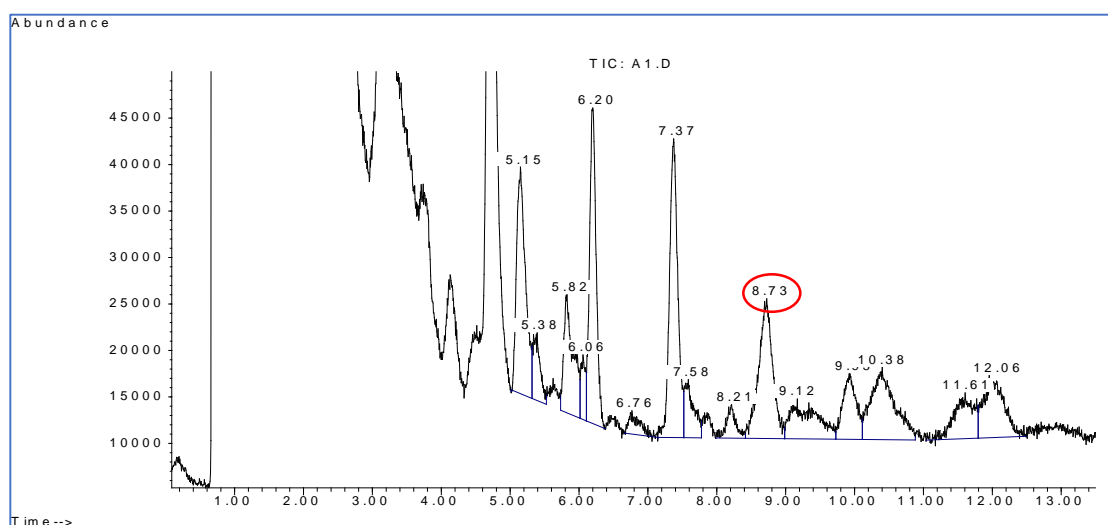


Fig 3.1. Cromatograma de la especie *Aiphanes Grandis*
Fuente: La Autora

En el espectro de masa se observó el ion molecular m/z 502.7 con fragmentos m/z 237.2 (Fig 3.2), en dicha figura se detalla: **(a)** Espectro de masa del estándar. **(b)** Espectro de masa obtenido de (Mirmira, Edward, 1972). **(c)** Espectro de masa de la muestra; que permiten realizar una comparación y determinar el tocol presente.

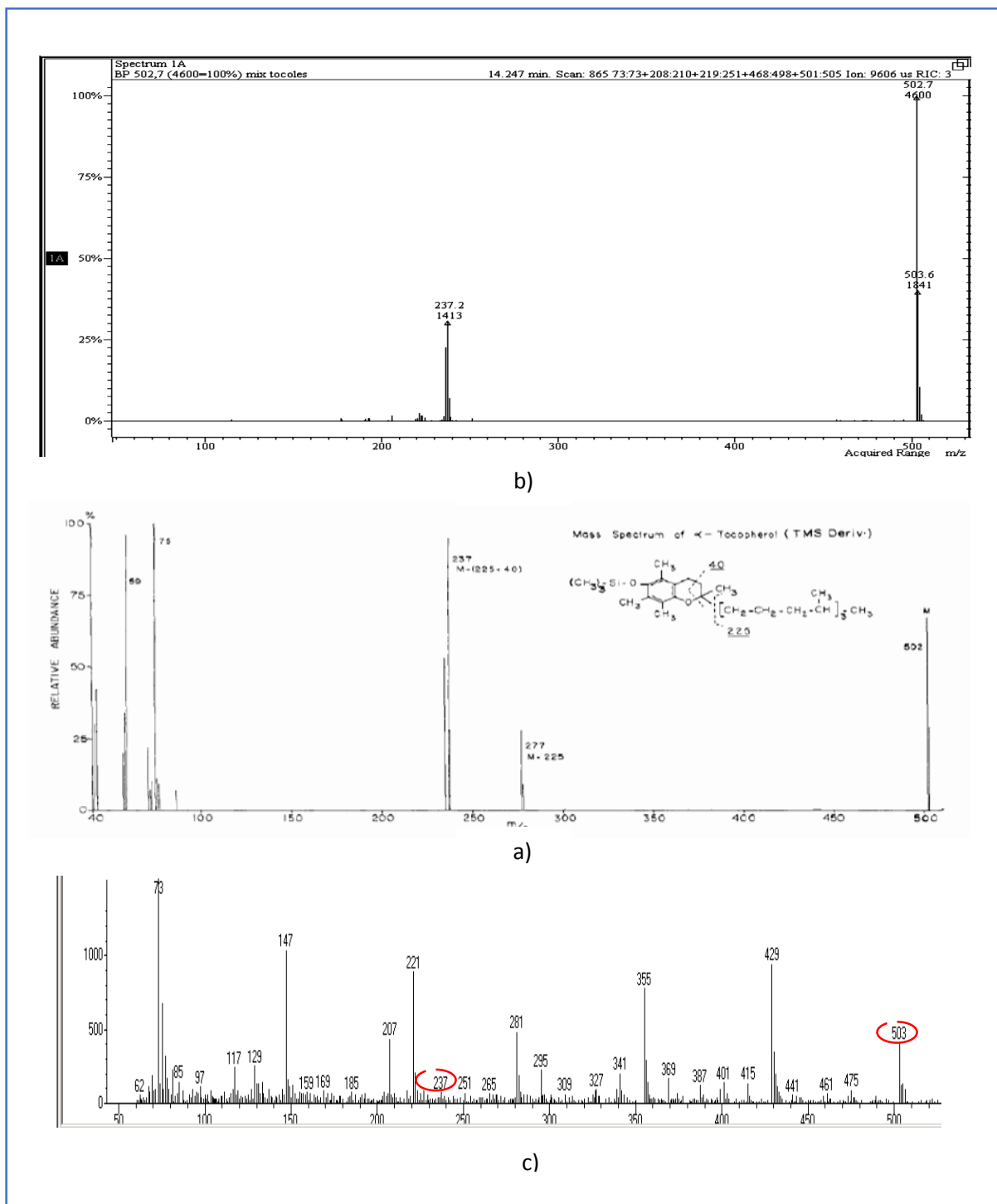


Fig 3.2. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie *Aiphanes Grandis*
Fuente: La Autora

Se puede constatar que los tres espectros presentan la misma fragmentación molecular (503, 237 m/z), logrando determinar la presencia de α -tocoferol en este aceite, cada compuesto tiene su propia fragmentación molecular como se puede comparar en (Mirmira, Edward, 1972)⁵⁵ y (Núñez, 2007)¹⁶.

Se aprecia que el espectro de la especie *Aiphanes grandis* (Fig 3.2 c) además de poseer los iones moleculares del α -tocoferol (503, 237 m/z), también contiene otros iones moleculares

esto se debe al que el compuesto no se encuentra totalmente puro como es el caso en la investigación realizada por (Jara D, 2012)²⁰ por especies de la familia *Arecaceae*, en la que se obtuvo el espectro de masas del aceite idéntico al del estándar sin la presencia de otros iones moleculares.

En la Fig 3.3 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante los cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $[502 - (225)] = 277$; $[502 - (225 + 40)] = 237$.

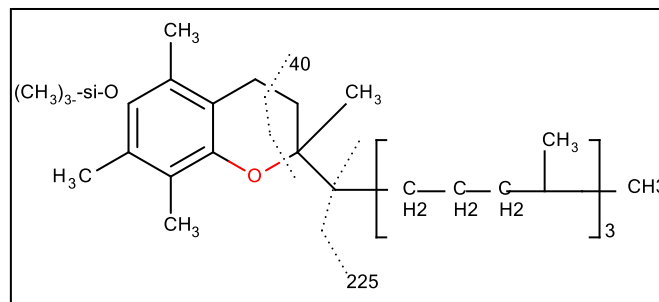


Fig 3.3. Fragmentos de la molécula α - tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972.

En el cromatograma fig 3.4 de la especie *Phoenix canariensis* se identificó el α -tocoferol, en un tiempo de retención de 7,39 min.

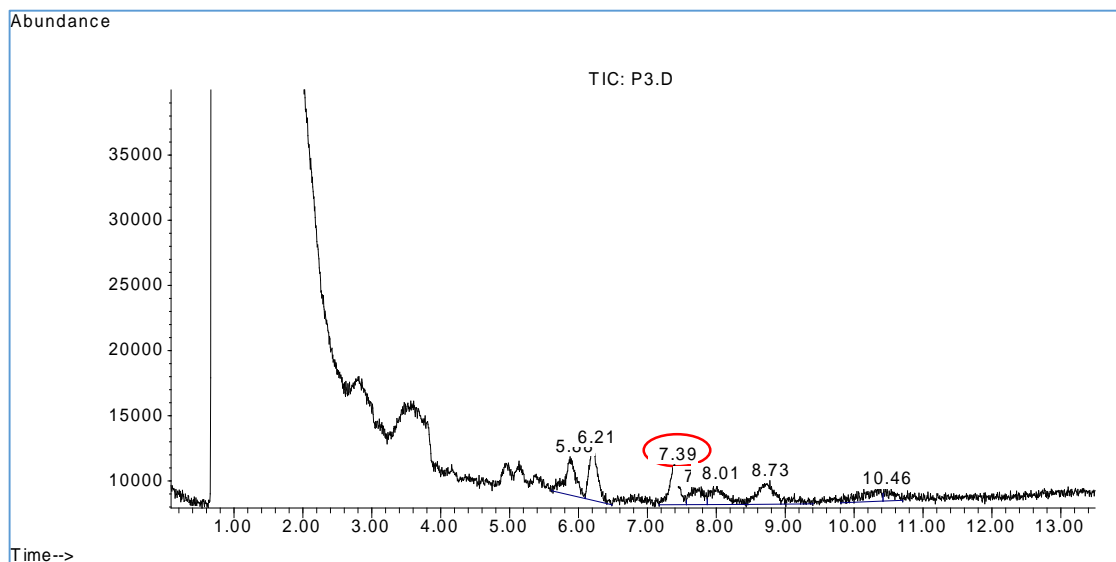


Fig 3.4. Cromatograma de la especie *Phoenix canariensis*
Fuente: La Autora

En el espectro de masa se observó el ion molecular m/z 502.7 con fragmentos m/z 237.2 (Fig 3.2), en dicha figura se detalla: **(a)** Espectro de masa del estándar. **(b)** Espectro de masa obtenido de (Mirmira, Edward, 1972). **(c)** Espectro de masa de la muestra; que permiten realizar una comparación y determinar el tocol presente.

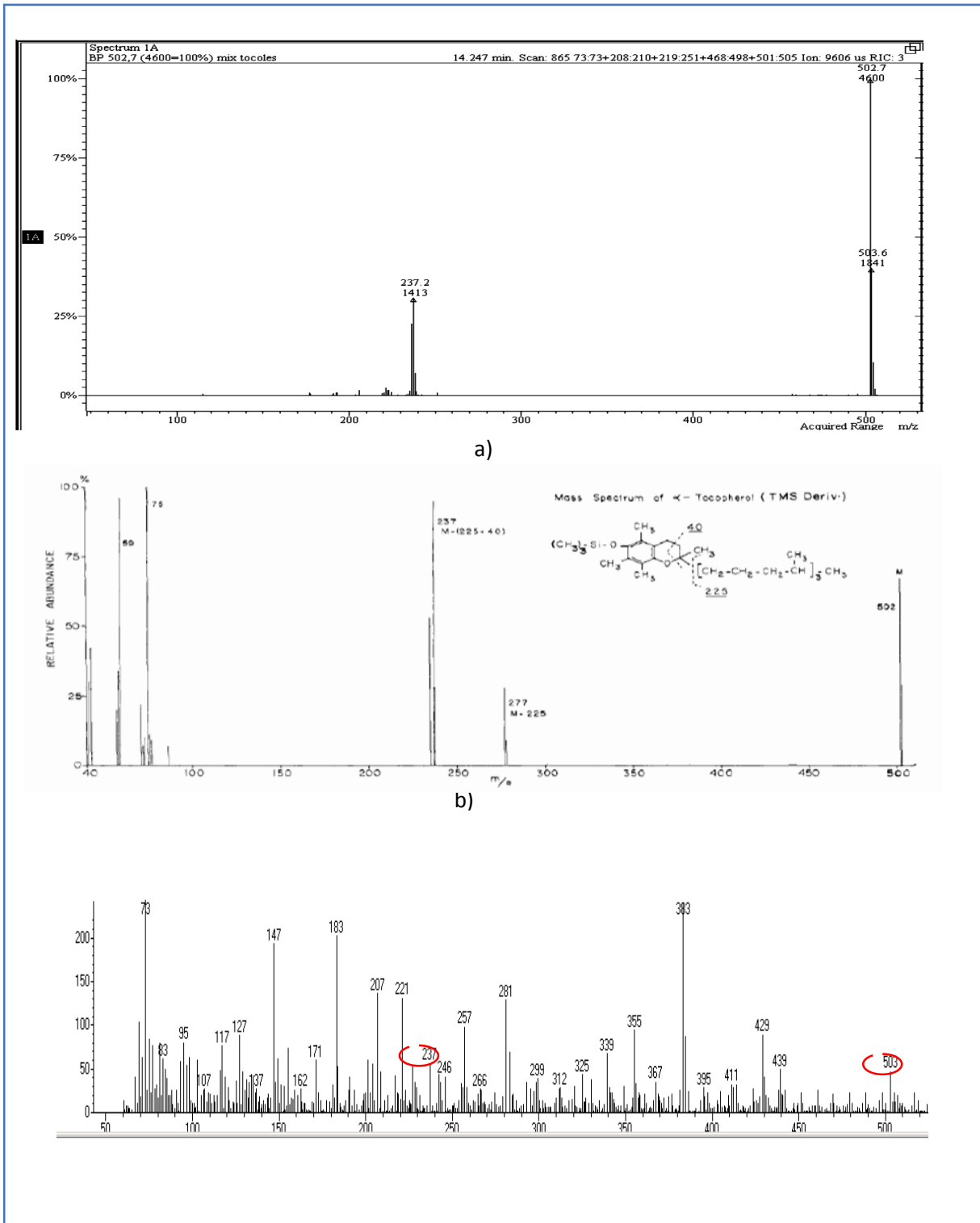


Fig 3.5. Espectro de masa de α -tocoferol en la especie *Phoenix canariensis*
Fuente: La Autora

Se puede constatar que los tres espectros presentan la misma fragmentación molecular, logrando determinar la presencia de α -tocoferol, acompañado de otros compuestos como se observa en la fig 3.5 c, debido a que el tocol no se encuentra totalmente puro; cada compuesto tiene su propia fragmentación molecular como se puede comparar en (Mirmira, Edward, 1972)⁵⁵ y (Núñez, 2007)¹⁶.

En la Fig 3.6 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante los cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $[502 - (225)] = 277$; $[502 - (225 + 40)] = 237$.

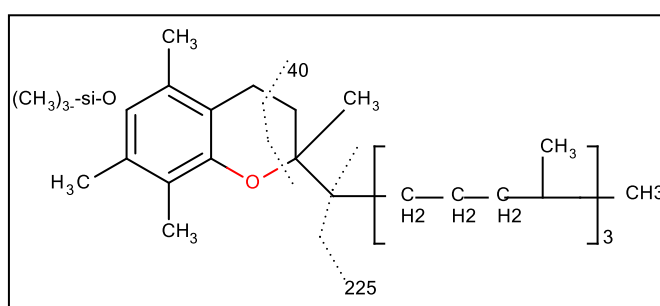


Fig 3.6. Fragmentos de la molécula α -tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972.

En el cromatograma Fig. 3.7 de la especie *Syagrus romanzoffiana* se logró identificar α -tocotrienol, con un tiempo de retención correspondiente a 12,537min.

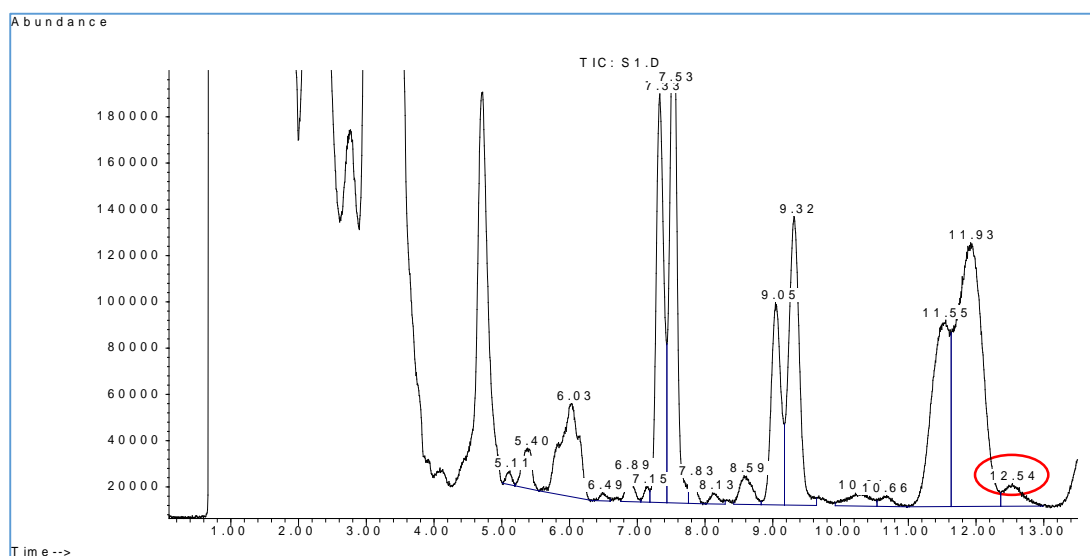
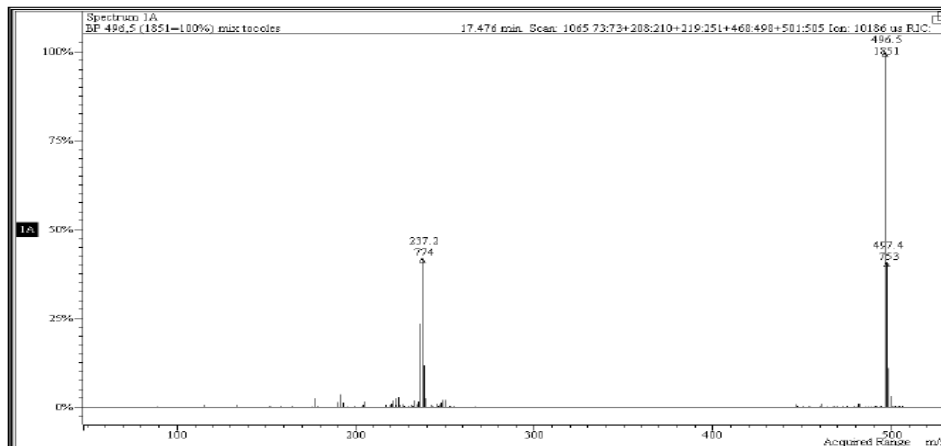
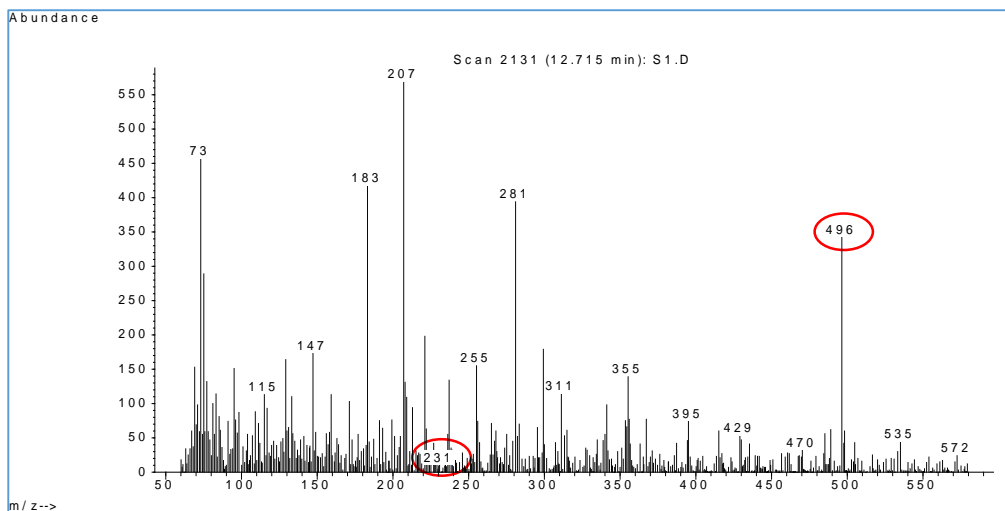


Fig 3.7. Cromatograma de la especie *Syagrus Romanzoffiana*
Fuente: La Autora

En el espectro de masa se observó el ion molecular m/z 496 con fragmentos m/z 237 (Fig. 3.8), en ésta figura se detalla: **a)** Espectro de masa del estándar. **b)** Espectro de masa de la muestra; que permiten realizar una comparación y determinar el tocol presente.



a)



b)

Fig 3.8. Espectro de masa de α -tocotrienol en la especie *Syagrus Romanzoffiana*
Fuente: La Autora

Se puede constatar que los dos espectros presentan la misma fragmentación molecular (496, 237 m/z), logrando determinar la presencia de α -tocotrienol en este aceite, cada compuesto tiene su propia fragmentación molecular como se puede comparar en (Mirmira, Edward, 1972)⁵⁵ y (Núñez, 2007)¹⁶.

Se aprecia que el espectro de la especie *Syagrus Romanzoffiana* (Fig 3.8 b) además de poseer los iones moleculares del α -tocotrienol (496, 237 m/z), también contiene otros iones moleculares esto se debe a que el compuesto no se encuentra totalmente puro.

En la Fig 3.9 se muestran las fragmentaciones que ocurren en la molécula y mediante las cuales se obtienen los iones de referencia característicos para este compuesto, $[497 - (225)] = 272$; $[497 - (225 + 40)] = 237$.

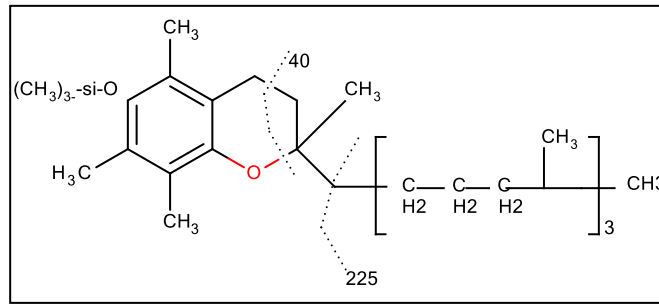


Fig 3.9. Fragmentos de la molécula α -tocoferol
Fuente: Mirmira, Edward, 1972.

3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los aceite se utilizó una curva de calibración (Fig 3.10) la que se obtuvo utilizando el programa Microsoft Excel 2010, la curva tuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9983$ (Anexo 7.1), cercano a 1 indicando que las dos variables están perfectamente relacionadas.

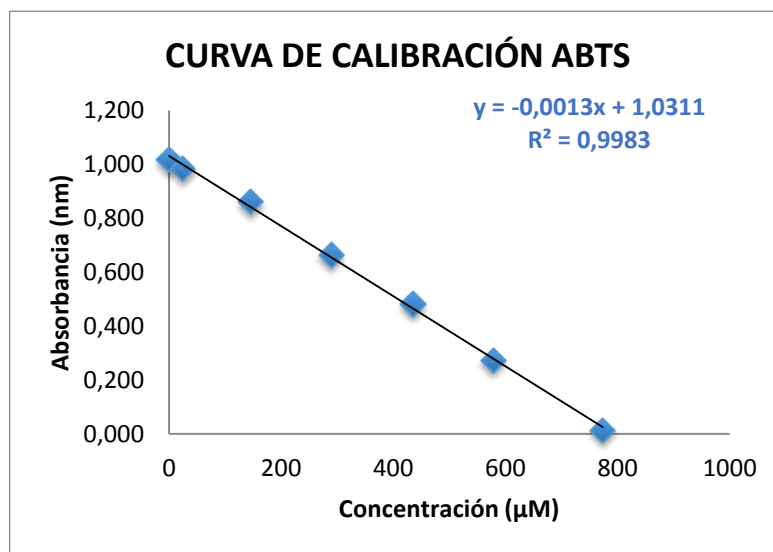


Fig 3.10. Curva de calibración ABTS
Fuente: La Autora

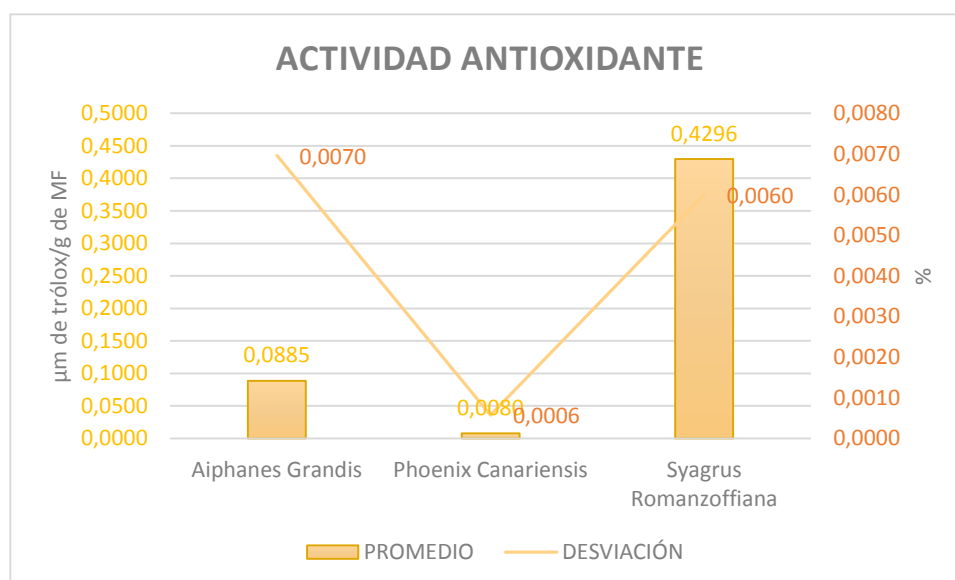
La tabla 3.7 muestra un resumen de los resultados de la actividad antioxidante de las especies en estudio, obtenidos por el método ABTS.

Tabla 3.7 Actividad antioxidante de las especies *Arecaceae*

Muestra	Absorbancia(nm)	Concentración Trólox $\mu\text{m/L}$	Volumen de solución (ml)	Volumen de extracto (ml)	V Extracto-Aceite obtenido (ml)	Wi muestra (g)	Concentración μM de Trólox/g de MF	μM de Trólox/g de MF		
Aiphanes grandis	0,843	145	2,850	0,150	3,670	120,000	0,084	0,089	±	0,007
	0,849	140	2,850	0,150	3,830	120,000	0,085			
	0,841	146	2,850	0,150	4,170	120,000	0,097			
Phoenix canariensis	0,845	143	2,850	0,150	0,360	120,000	0,008	0,008	±	0,001
	0,849	140	2,850	0,150	0,380	120,000	0,008			
	0,854	136	2,850	0,150	0,340	120,000	0,007			
Syagrus romanzoffiana	0,871	123	2,850	0,150	14,500	80,000	0,424	0,430	±	0,006
	0,872	122	2,850	0,150	15,000	80,000	0,436			
	0,872	122	2,850	0,150	14,750	80,000	0,429			

Fuente: La Autora

En la gráfica 3.11 se muestra la capacidad antioxidante de los aceites vegetales obtenidos, en μM de Trólox/g de MF. Se observa que la especie *Syagrus romanzoffiana* posee mayor actividad antioxidante y *Phoenix canariensis* la menor.



Gráfica 3.11. Comparación de la capacidad antioxidante

Fuente: La Autora

El ANOVA (Anexo 6.4) muestra que el valor de P es $<0,05$ demostrando que hay diferencia significativa en la capacidad antioxidante de las tres especies y como se observa en la tabla 3.7 la desviación obtenida es $<0,05$ en las tres especies indicando que el método es confiable y los datos reproducibles.

Es necesario considerar que son escasos los estudios que reporten la actividad antioxidante de especies de la familia *Arecaceae* obtenidos a partir de los frutos, en la investigación "Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil" muestra para tres especies de *Arecaceae* Açai, $15.1 \pm 4.1 \mu\text{mol}$ Trólox/g; Carnaúba $10.7 \pm 0.2 \mu\text{mol}$ trólox/g; Juçara, $78.3 \pm 13.3 \mu\text{mol}$ trólox/g por el método ABTS para materia

fresca (pulpa) ⁵⁶, pero al comparar los datos obtenidos con dicha referencia se notó que los valores son distintos aunque pertenecen a la misma familia *Arecaceae*, siendo éstos superiores a los obtenidos en el presente estudio, esta diferencia puede ser debido a que el contenido de compuestos antioxidantes se ve influenciado por las condiciones de extracción, estado de madurez de la fruta, variedad de la materia prima, ubicación geográfica de la misma^{57 58 59}, tipo de solvente utilizado, concentración de dicho solvente, tiempo de extracción, tamaño de partícula, temperatura de extracción, relación sólido: solvente y debido a que hay muchos ensayos con diferentes sustratos, cinética de reacción y métodos analíticos para evaluar la actividad antioxidante⁶⁰, por lo cual las comparaciones entre resultados de actividad antioxidante sólo pueden hacerse para un mismo método y para muestras obtenidas con los mismos disolventes⁴⁰.

4 CONCLUSIONES

- Se recolectaron 4 especies de *Arecaceae* en las provincias de Loja y El Oro, éstas especies son: *Aiphanes grandis*, *Phoenix Canariensis*, *Syagrus romanzoffiana* y *Attalea cf.*; de estas especies se seleccionaron 3 (*Aiphanes grandis*, *Phoenix Canariensis*, *Syagrus romanzoffiana*) debido a su rendimiento en la extracción para determinar propiedades físicas, tocoles y capacidad antioxidante.
- La identificación de las especies se realizó en el Herbario Reinaldo Espinosa de la Universidad Nacional de Loja, en donde nos facilitaron las muestras de herbario ahí existentes para comparar nuestras especies, basándonos en bibliografía para las especies no existentes en el herbario, y de ésta manera caracterizar las especies recolectadas.
- La extracción del aceite vegetal se realizó mediante el método Soxhlet porque utilizó menor cantidad de solvente y empleó un tiempo de destilación de 2 horas, la muestra se pone en contacto repetidamente con las fracciones del disolvente lo que ayuda a desplazar el equilibrio de la transferencia, además es un método sencillo que permite extraer mayor cantidad de muestra que la mayoría de métodos modernos.
- Los rendimientos obtenidos para las 4 especies en estudio son bajos en comparación con otras especies de la familia *Arecaceae*, varían por la influencia de algunos factores, entre ellos, el contenido de aceite en las semillas y el método de extracción empleado, así como de las condiciones agroclimatológicas del lugar donde se cultivan.
- Se determinó las propiedades físicas cuyos resultados son positivos en las tres especies, tanto la densidad (0,9059; 0,9296; 0,9180 g/cm³) como el índice de refracción (1,4528; 1,4654; 1,4567) se encuentran dentro de los rangos establecidos por normas para aceites vegetales.
- Mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, en la especie *Aiphanes grandis* se determinó la presencia de α -tocoferol; en la especie *Phoenix canariensis* se identificó la presencia de α -tocoferol y en la especie *Syagrus romanzoffiana* se encontró el α -tocotrienol.
- La evaluación de la capacidad antioxidante en las tres especies es baja (0,089 ; 0,008 0,430 μ M de trólox/g de MF), comparada con especies de la misma familia *Arecaceae*,

esta diferencia puede ser debido a que el contenido de compuestos antioxidantes se ve influenciado por algunos factores como las condiciones de extracción, estado de madurez de la fruta, ubicación geográfica, tipo de solvente utilizado, tiempo de extracción, tamaño de partícula, temperatura de extracción.

5 RECOMENDACIONES

- Trabajar con muestra seca y un determinado tamaño de partícula, para permitir una mayor área de contacto entre el sólido y el solvente, facilitando la extracción.
- Los tocoles son muy sensibles a la luz y al calor, por lo que es importante trabajar con cuidado para evitar pérdidas.
- No usar derivatizantes guardados, ya que no posee las mismas propiedades que al utilizar al instante de que se lo abre, debido a que este se oxida rápidamente.
- Es necesario trabajar con más de un método para obtener una imagen completa de la capacidad antioxidante de dichos compuestos.

6 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Saltos G. Napoleón & Vázquez S. Lola. Ecuador: su realidad, Recursos Naturales. Quito. 2009, pp100.
- 2) Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE. Genera Palmarum: The evolution and classification of Palms. Royal Botanic Gardens, Kew. UK., 2008; pp 732
- 3) Balslev, H.; Grandez C.; Paniagua N.Y.; Møller A. L.; Hansen, S. L. Palmas (*Arecaceae*) útiles en los alrededores de Iquitos, Amazonía Peruana. *Peru. biol.* 15(supl. 1): **2008**, 15. 121- 132
- 4) Jørgensen P. M. & León Y. S., Catalogue of the vascular plants of Ecuador; Missouri Botanical Garden, USA, 1999.
- 5) Oliveras, M.J. Calidad Del Aceite De Oliva Virgen Extra . Memoria Doc. Farm, Universidad De Granada, 2005
- 6) James F. B.; Phyllis A. B. Recetas Nutritivas que curan. 2000, pp 21
- 7) Castañeda, B; Ramos, E; Ibáñez, L. Volumen8, N°1. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas.2008.
- 8) Criado, C; Moya, M. Actualizaciones el Médico: Vitaminas y Antioxidantes. Madrid. 2009, pp10
- 9) Borchsenius Finn & Moraes r. Mónica., Diversidad y usos de palmeras andinas (*Arecaceae*). 2006, 412-433.
- 10) Veerlr van den Eynden, Eduardo Cueva, Omar Cabrera. Plantas silvestres, comestibles del sur del Ecuador. 1999, pp 24.
- 11) Flora of North America Editorial Committee, e. Magnoliophyta: Alismatidae, Arecidae, Commelinidae (in part), and Zingiberidae. Fl. N. Amer. 2000.
- 12) Barcelona pel Medi Ambient. Especies Verdes. Itinerario botánico por los jardines temáticos de Montjuïc: *Syagrus romanzoffiana* [Online] <http://mediambient.itineraris.bcn.cat/es/node/85/360> (accessed 13/01/13).
- 13) Murray R. K.; Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J, Rodwell V. W., Weil P. A. HARPER Bioquímica ilustrada, Veintiochoava Edición; México. 2010
- 14) Jurado, J., Muñoz, L. Caracterización del aceite de las semillas de *Solanum Quitoense* variedad la selva y evaluación de su actividad antioxidante. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009
- 15) Sayago A.; Marín M.I.; Aparicio R. y Morales M.T. Vitamina E y aceites vegetales. **2007**, 58, 74-86.

- 16) Núñez P. Roxana P. Evaluación del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en aceite de nuez de selecciones clonales de *Gevuina avellana* Mol. Tesis. Universidad Austral De Chile. Valdivia, Chile 2007.
- 17) Preedy Victor & Watson Ronald. The Encyclopedia of Vitamin E. 2007
- 18) Luque de Castro, M. D. y Garcia-Ayuso, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1-10. Ziller, S., "Grasas y Aceites Alimentarios", S.A., Editorial Acribia, Séptima ed, España, 1996.
- 19) Conde, E. Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Universidad de Vigo. Ourense. 2009.
- 20) Jara, D. Determinación de tocoferoles y tocotrienoles en cuatro especies de *Arecaceae* del sur del Ecuador mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas. Universidad Técnica Particular de Loja. 2012.
- 21) Trejo Ch. E.; Maury L. Extracción y caracterización del aceite de *Poraqueiba sericea* Tulasne (UMARí); Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la UNAP- Iquitos-Perú. 2002
- 22) Chang R. & College. Química, séptima ed. 2005
- 23) Sigma A. Guide to derivatization reagents for GC. Bulletin 909A. [Online] 1997
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t196909.Par.0001.File.tmp/t196909.pdf> (accessed 02/07/12)
- 24) Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo, Tercera ed, S.A. Reverte. España. 2007, pp. 462-518-579.
- 25) Jennigs, W. Shibamoto, T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volátiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press, 1980, pp 472.
- 26) Gutiérrez, M, Droguet, M. [Online] **2002**, (U.P.C.) N°122. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor.
<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf>
(accessed 26/06/13).
- 27) Benzie, IF; Strain, JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ___ antioxidant power “: *The FRAP assay. Analytical Biochemistry*. **1996**, 239(292), 70-76
- 28) Abdalla, AE; Darwish, SM; Ayad, EH; El-Hamahmy, R. Egyptian mango byproduct2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*. **2007**, 103(4), 1141-1152.
- 29) Finkel, T; Holbrook, JN. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **2000**, 108, 239.

- 30) Sohal, RS; Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *National Institutes of Health*. **1996**, 273, 59-63.
- 31) Avello, M; Suwalsky, M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, **2006**, 2, 161-172
- 32) Sawa, T; Nakao, M; Akaike, T; Ono, K; Maeda, H. 1999. Alkylperoxyl radicalscavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds, implications for the anti-tumor- promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**1999**, 47, 397-402
- 33) García, FJ. Elaboración in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 2006.
- 34) Henriquez, G.; Aliaga, C.. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures. *Inter. J. Chem. Kinet*. **2002**, 559-665.
- 35) Nantitanon, W; Yotsawimonwat, S; Okonogi, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *Food Science and Technology*. **2010**, 43,1095-1103
- 36) Prior, R; Wu, X; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **2005**, 53, 4290- 4302
- 37) Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**, 26, 1231-1237.
- 38) Antolovich, M; Prenzler, PD; Patsalides, E; McDonald, S; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst critical review*. **2001**, 127,183-198.
- 39) Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. **2001**, 73, 239-244.
- 40) Pérez-Jiménez, J; Saura-Calixto, F. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. Departamento de metabolismo y nutrición. Instituto del Frío. Madrid. 2007, 1150-1160.
- 41) Saura-Calixto, F; Goñi, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. **2006**, 94, 442-447.
- 42) Maisuthisakul, P; Gordon, M. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*. **2009**, 117, 332-334.
- 43) Rojas, D; Narváez, C ; Restrepo, L. Evaluación del contenido de vitamina C , fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium Guajaval* .) de las variedades pera , regional roja y regional blanca. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2008, pp 49- 60

- 44) Instituto de la Grasa (C.S.I.C). Chromatography analysis of minor constituents in vegetable oils; *Journal of Chromatography*. España. **2000**
- 45) Pocklington W.D. & Dieffenbacher A. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance Liquid Chromatography; Laboratory of the Government Chemist, Waterloo Road, London UK. 1988.
- 46) Peterson M., Hoffman David, Mannrstedt-Fogelfors Birgitta. Oat Tocols: Saponification vs. Direct Extraction and Analysis in High-Oil Genotypes. 2006
- 47) Toyo'aka Toshimasa. Modern derivatization methods for separation sciences; John Wiley & Sons Ltd. 1999.
- 48) Prakash, A. Antioxidant activity. *Analytical Progress Press*, **2001**, 19, 1-6
- 49) Thaipong, K; Boonprakob, U; Crosby, K; Cisneros-zevallos, L; Hawkins, D. Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. **2006**, 19, 669-675
- 50) Falasca, S.L.; Miranda del Fresno, C.; Ulberich, A. Posibilidades de cultivo del Pindó (Syagrus romanzoffiana) en Argentina como productora de Biodiesel bajo condiciones de clima semiárido: Cuarto Congreso Nacional – Tercer Congreso Iberoamericano Hidrógeno y Fuentes Sustentables de Energía – HYFUSEN 2011.
- 51) García D., González J., Moreno M J., Belén D., Medina C., Linares O. Características fisicoquímicas del aceite del endospermo de la Palma Yagua (*Attalea cryptanther*): Grasas y aceites, ISSN 0017-3495, Vol. 57, Nº 3, 2006 , pp. 308-312
- 52) Göktürk N., Özkan G., Sema E. Çetin. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y aceites*, 58 (1), enero-marzo, 29-33, 2007.
- 53) Norma ecuatoriana NTE INEN 26:2012 (1ra Revisión). Aceite de girasol.
- 54) Norma venezolana COVENIN 30:1997 (3era Revisión). Aceites vegetales comestibles. Norma General.
- 55) Mirmira, K & Edward, P. Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas Chromatography – Mass Spetrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (USA) **1972**, 20 (2), 240 – 245.
- 56) Rufino M., Alves R., Brito E., Pérez J., Saura F., Mancini J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. **2010**, 121 , 996–1002
- 57) Hamid, K., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V. Antioxidant activity of pinkflesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods*. **2010**, 4, 100-107
- 58) Lim, Y., Lim, T., Tee, J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. **2007**, 103, 1003-1008

- 59) Maisuthisakul, P., Gordon, M. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*. **2009**, 117, 332-341
- 60) Mahattanatawee, K., Manthey, J., Luzio, G., Talcott, ST., Goodner, K., Baldwin, EA. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-Grown tropical fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **2006**, 54, 7355-7363

ANEXOS

ANEXO I

Norma ANFOR para la determinación de la densidad relativa a 20 °C

Principio: La densidad relativa a 20 °C de un aceite vegetal se define como la masa de un determinado volumen de aceite vegetal a 20 °C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20 °C.

Nota:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite esencial para indicar la norma referente al aceite vegetal. La corrección para 20 °C es de 0,0007 a 0,0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20 °C de un aceite vegetal se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite vegetal a 20 °C.

Aparatos:

- Picnómetro de vidrio
- Baño termostático, mantenido a 20 °C ± 0.2 °C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30 °C, con una variación de 0,2 a 0,1 °C.
- Balanza analítica.

Procedimiento:

- **Preparación del picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasar por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza pesar el picnómetro, con un tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada a 20° C. Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 min ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con 1 mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

- **Peso del aceite vegetal:** Vaciar el picnómetro, enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones pero en lugar de agua hacerlo con aceite vegetal.

Expresión de resultados:

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

d_{20}^{20} = densidad relativa a 20 °C, referido al agua a 20 °C

m_0 = es la masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 = es la masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 = es la masa en gramos del picnómetro con el aceite vegetal.

Se expresará los resultados con cuatro decimales.

ANEXO II

Norma ANFOR para la determinación del índice de refracción

Principio: El índice de refracción de un aceite vegetal es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del aceite vegetal, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es $589,3 \pm 0,3$ nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20 °C, salvo para los aceites vegetales q no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 a 30°C según el punto de fusión del aceite vegetal considerado.

Aparatos:

- **Refractómetro:** Se utilizó un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de $\pm 0,0002$:

Ajuste el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

Resultados:

Determinación: Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20 °C salvo para los aceites vegetales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20 y 30 °C, según el

punto de fusión del aceite vegetal considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0,2$ °C y debe mantenerse a $\pm 0,2$ °C.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Expresión de resultados

- **Cálculos:** En índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula: $n_D = n_D + 0.0004(t' - t)$

Donde:

n_D = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t , o aquella a la que se haya efectuado la determinación.

0.0004 = factor de corrección.

t' = temperatura a la que se efectuó la medición.

t = temperatura a 20°C

ANEXO III

CONDICIONES DE OPERACIÓN DE CG/EM

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: 5973N

C:\MSDCHEM\1\METHODS\METHYL_STEARATE_SCAN_NEW.M

Control Information

Sample Inlet: GC

Injection Source: GC ALS

Mass Spectrometer Enabled

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 220 'C (On)

Maximum temp: 300 'C

Initial time: 2.00 min

Equilibration time: 0.50 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	10.00	285	5.00
2		0.0	(Off)

Post temp: 0 'C

Post time: 0.00 min

Run time: 13.50 min

FRONT INLET (UNKNOWN)

BACK INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Splitless

Initial temp: 275 'C (On)

Pressure: 28.05 psi (On)

Purge flow: 50.0mL/min

Purge time: 1.00 min

Total flow: 54.4mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 50.0mL/min

Saver time: 2.00 min

Gas type: Helium

COLUMN 1

(not installed) Capillary Column
Model Number: Agilent 122-5532
DB-5ms, 0.25mm * 30m * 0.25um
Max temperature: 350 °C
Nominal length: 30.0 m
Nominal diameter: 250.00um
Nominal film thickness: 0.25um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.8mL/min
Nominal init pressure: 28.05 psi
Average velocity: 52 cm/sec
Inlet: Back Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

COLUMN 2

FRONT DETECTOR

SIGNAL 1
Data rate: 20 Hz
Type: front detector
Save Data: On Save Data: On
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0 Range: 0
Fast Peaks: Off Fast Peaks: Off
Attenuation: 0 Attenuation: 0

BACK DETECTOR

SIGNAL 2
Data rate: 20 Hz
Type: front detector

Zero: 0.0 (Off)

COLUMN COMP 1

(No Detectors Installed)

COLUMN COMP 2

(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 1

Use: MSD Transfer Line Heater
Description: Interface mass
Initial temp: 250 °C (On)

Initial time: 0.00 min

Rate Final temp Final time
1 0.0(Off)

POST RUN

Post Time: 0.00 min

TIME TABLE

Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Back Injector:

SampleWashes3

Sample Pumps 6

Injection Volume 1.0 microliters

Syringe Size 10.0 microliters

Post Inj Solvent A Washes 3

Post Inj Solvent B Washes 0

ViscosityDelay0 seconds

Plunger Speed Fast

PreInjectionDwell0.00 minutes

PostInjectionDwell0.00 minutes

Column 1 Inventory Number: HP-FFAP

Column 2 Inventory Number: A015

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File: atune. u

Acquisition Mode: Scan

MS Information

Solvent Delay: 3.00 min

EM Absolute: False

EM Off set: 0

Resulting EM Voltage: 1764.7

[Scan Parameters]

Low Mass: 60.0

High Mass: 580.0

Threshold: 0

Sample#: 2 A/D Samples 4

[MSZones]

MS Quad: 150 C maximum 200 C

MS Source: 230 C maximum 250 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS

EMISSION: 34.610

ENERGY: 69.922

REPELLER: 29.620

IONFOCUS: 90.157

ENTRANCE_LE:14.000

EMVOLTS: 1764.706

AMUGAIN: 1965.000

AMUOFFSET: 124.000

FILAMENT: 1.000

DCPOLARITY: 1.000

ENTLENSOFFS: 19.075

MASSGAIN: -1.022

MASSOFFSET: -10.131

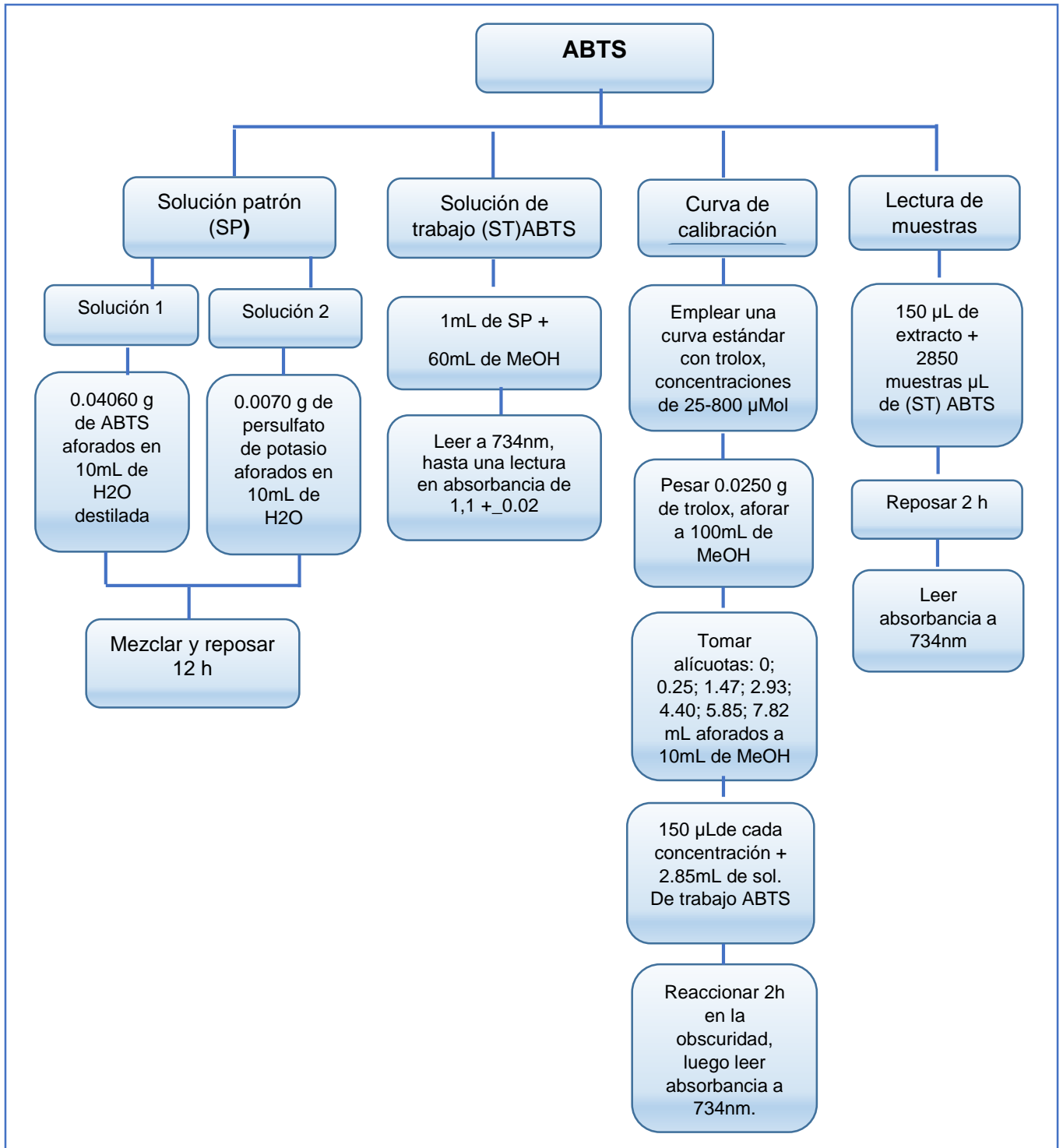
ANEXO IV

TÉCNICA DE SAPONIFICACIÓN (Pocklington, Dieffenbacher, 1988)

1. Pesar exactamente 2 g de aceite extraído en un matraz de 100 ml, disolver la muestra en 8 ml de etanol al 96%, agitando constantemente.
2. Añadir 100 mg de pirogalol agitando constantemente.
3. Purgar el matraz con N₂, añadir 4 ml de solución de hidróxido de potasio al 60% (m/m) y tapar con un tapón de vidrio (toda la reacción debe hacerse en ausencia de luz por lo que todo el material usado fue cubierto con papel aluminio).
4. Colocar el matraz en baño maría a 26 °C y agitar vigorosamente por 10 min.
5. Añadir 50 ml de agua desionizada y transferir el contenido del matraz a un embudo de decantación de 250 ml. Lavar el matraz con 50 ml de dietiléter que contiene 0,1 % (m/m) de pirogalol y transferir el lavado al embudo.
6. En el embudo, dejar que las dos fases se separen y extraer la capa acuosa inferior.
7. Extraer nuevamente la capa acuosa inferior 4 veces con alícuotas de 30 ml de dietil éter y combinar los extractos de éter.
8. Lavar los extractos combinados de dietiléter con 50 ml de agua y luego con 30 ml de HCl 0,01 moles por litro y añadir 2 g de sulfato de sodio anhidro, mezclando suavemente para absorber el H₂O.
9. Filtrar con papel filtro los extractos de éter y recoger el filtro en un balón ámbar.
10. Llevar al rotavapor a una presión reducida y a una temperatura no mayor a 40 °C.
11. Lavar las paredes del matraz con hexano.
12. Si permanece un residuo líquido en el matraz añade etanol y evapore a sequedad y transfiera en el contenido a un matraz de 50 ml.

ANEXO V

Esquema de determinación de actividad antioxidante (ABTS)



Fuente: La Autora

ANEXO VI ANOVA

6.1 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LAS CUATRO ESPECIES DE ARECACEAE

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	11,67	3,89	0,06
Columna 2	3	1,08	0,36	0,00
Columna 3	3	44,25	14,75	0,06
Columna 4	3	0,31	0,10	0,00

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	424,83	3	141,6094	4417,19	3,26E-13	4,07
Dentro de los grupos	0,26	8	0,0321			
Total	425,08	11				

6.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE LAS TRES ESPECIES DE ARECACEAE

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	4,3562	1,4521	7,55E-06
Columna 2	3	4,3868	1,4623	2,52E-05
Columna 3	3	4,3582	1,4527	8,57E-08

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0002	2	9,757E-05	8,9210	0,0159	5,1433
Dentro de los grupos	6,56E-05	6	1,094E-05			
Total	0,0003	8				

6.3 DENSIDAD DE LAS TRES ESPECIES DE ARECACEAE

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	2,7177	0,9059	0,0002
Columna 2	3	3,2261	1,0754	0,0000
Columna 3	3	2,7540	0,9180	0,0002

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0536	2	0,0268	175,3734	4,757E-06	5,1433
Dentro de los grupos	0,0009	6	0,0002			
Total	0,0545	8				

6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS TRES ESPECIES DE ARECACEAE

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	0,266	0,089	4,849E-05
Columna 2	3	0,024	0,008	3,253E-07
Columna 3	3	1,289	0,430	3,589E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,301	2	0,1503	5323,357	1,787E-10	5,143
Dentro de los grupos	0,000	6	0,0000			
Total	0,301	8				

ANEXO VII CURVA DE CALIBRACIÓN

7.1 CURVA DE CALIBRACIÓN ABTS.

Datos de curva de calibración ABTS

concent. (μM)	Absorbancia (nm)	Promedio
0	1,018	1,017
	1,016	
	1,016	
24,75	0,984	0,984
	0,984	
	0,985	
145,84	0,861	0,861
	0,862	
	0,861	
289,74	0,665	0,665
	0,664	
	0,665	
435,1	0,483	0,483
	0,483	
	0,483	
578,48	0,273	0,272
	0,272	
	0,272	
773,82	0,012	0,013
	0,013	
	0,013	
extracto	0,849	2,531
	0,847	
	0,835	

Fuente: La experimentación
Elaboración: La Autora

