

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



**Extracción y caracterización del aceite esencial de la semilla de cardamomo y de la resina de *Bursera copallifera* (copal) para su potencial uso como conservante alimentario**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Jessica Scarlet Peña Echeverría

para optar por el grado académico de

Licenciada en Ingeniería en Ciencia de los Alimentos

Guatemala

2022







UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



**Extracción y caracterización del aceite esencial de la semilla de cardamomo y de la resina de *Bursera copallifera* (copal) para su potencial uso como conservante alimentario**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Jessica Scarlet Peña Echeverría

para optar por el grado académico de

Licenciada en Ingeniería en Ciencia de los Alimentos

Guatemala

2022



Vo. Bo. :

(f)   
Dr. Igor Alfonso Trujillo Mayol

Tribunal Examinador:

(f)   
MSc. Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruíz

(f)   
MSc. María Patricia Palacios Recinos de Palomo

(f)   
MSc. Ana Alicia Paz Pierri

Fecha de aprobación: Guatemala, 9 de diciembre de 2022



## PREFACIO

El interés de este trabajo de graduación surgió a raíz de la creciente tendencia de uso de sustancias naturales como preservantes con el objetivo de ofrecerle al consumidor alimentos con etiquetas limpias y libres de aditivos de origen sintético. Por lo mismo, agradezco haber tenido la oportunidad de realizar una investigación en este ámbito, utilizando productos nacionales que contribuyen al desarrollo económico y tecnológico del país. Espero que este estudio pueda resultar útil en un futuro para otras personas interesadas en las propiedades funcionales de los aceites esenciales y su posibilidad de uso como conservantes en matrices alimentarias.

Quisiera aprovechar este espacio para agradecer a quienes me acompañaron y apoyaron durante este proceso. De no ser por estas personas, este trabajo no habría sido posible.

- A mis papás, Evelyn y Javier, quienes me han apoyado toda mi vida y siempre creyeron en mi capacidad y aptitud para esta carrera. Por brindarme la oportunidad y todos los recursos para estudiar, por mostrarse interesados en mi trabajo, por darme apoyo moral y por hacer lo posible para que pudiera efectuar mi investigación, sacrificando su tiempo y ayudándome con los constantes traslados, a pesar de las circunstancias.
- A mi hermana, Andrea Maybell, por desvelarse conmigo en varias etapas de la carrera, acompañarme a hacer tareas, demostrarme que era capaz y explicarme pacientemente las clases que se me dificultaron al iniciar este recorrido. Por ser mi ejemplo a seguir, resolverme dudas constantemente, estar pendiente de mí y de todo lo que implicó este trabajo, por hacerme reír y por siempre apoyarme, a pesar de la distancia.
- A mi hermano Pablo Javier, por apoyarme, estar para mí y en ocasiones resolverme dudas y explicarme temas de su conocimiento. Por hacerme reír y por mostrarse anuente a sacrificar sus mañanas para que yo pudiera realizar esta investigación.

- A mi amiga y compañera en todo este proceso, Lesly Lemus. Por estar a mi lado durante toda la carrera y especialmente en la realización de este trabajo, apoyándome en la investigación, acompañándome y ayudándome en todo momento de la etapa de experimentación sin necesidad de pedírselo, por darme sugerencias, asistirme en el cálculo de resultados y por siempre ser un apoyo moral en los buenos y malos momentos de este recorrido.
- A mi asesor, el Dr. Igor Trujillo, por guiarme en el proceso de investigación. Por brindarme sugerencias, a partir de su experiencia, durante la experimentación, por enseñarme habilidades en la elaboración de trabajos científicos y por gestionar la obtención de las muestras para este estudio.
- Al Ing. Harvey Pacay y el Lic. Edwint Rodríguez, por todo su apoyo durante la etapa de experimentación, enseñándome a desarrollar habilidades de trabajo de laboratorio, explicándome como llevar a cabo mi metodología, ayudándome a corregir errores o buscar soluciones y por siempre mostrarse abiertos a la resolución de dudas y comprenderme en los momentos difíciles.
- A la Lic. Ana Silvia Colmenares, por estar pendiente de mi trabajo, brindar retroalimentación durante la experimentación y redacción y siempre estar disponible para la resolución de dudas o solicitud de apoyo en diversas actividades.
- Al Lic. Víctor Hugo Jiménez, por ayudarme a desarrollar una metodología para la medición de actividad antimicrobiana, mostrarse dispuesto a la resolución de dudas y estar disponible para acompañarme durante la experimentación.
- A la Lic. Ana Luisa Mendizábal, por apoyarme en el análisis de compuestos volátiles, brindarme su tiempo e instruirme en la medición de parámetros fisicoquímicos.
- A la Lic. María José Bran, por interesarse en mi investigación y apoyarme prestándome el equipo de Soxhlet para efectuar la extracción de los aceites esenciales.
- Al Dr. Cifuentes, por creer en este tipo de proyectos y brindarme un espacio para realizar mi investigación.

# ÍNDICE

PREFACIO .....	v
LISTADO DE CUADROS .....	ix
LISTADO DE FIGURAS .....	x
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE CARDAMOMO Y DE RESINA DE COPAL .....	2
2.2 EXTRACCIONES DE ACEITE ESENCIAL DE CARDAMOMO Y RESINA DE COPAL .....	3
2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE CARDAMOMO Y RESINA DE COPAL.....	3
2.4 CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE CARDAMOMO Y RESINA DE COPAL.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 GENERALIDADES DEL CARDAMOMO.....	6
3.2 RESINA DE COPAL.....	6
3.3 ACEITES ESENCIALES.....	7
3.4 ACEITE ESENCIAL DE CARDAMOMO.....	7
3.5 ACEITE ESENCIAL DE RESINA DE COPAL.....	7
3.6 AGUAS FLORALES.....	8
3.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN .....	8
3.8 VALOR FUNCIONAL DE LOS ACEITES ESENCIALES Y DE LAS AGUAS FLORALES EN SISTEMAS ALIMENTARIOS.....	9
4. JUSTIFICACIÓN .....	11
5. HIPÓTESIS .....	13
6. OBJETIVOS .....	14

6.1	OBJETIVO GENERAL.....	14
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
7.	Metodología y diseño del experimento .....	15
7.1	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	15
	<i>Arrastre de vapor</i> .....	15
	<i>Por solventes</i> .....	16
7.2	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.....	16
	<i>Medición de pH</i> .....	16
	<i>Medición de densidad</i> .....	17
	<i>Medición de índice de refracción</i> .....	17
	<i>Medición de rotación óptica</i> .....	17
7.3	CARACTERIZACIÓN VOLÁTIL .....	18
7.4	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	18
	<i>Análisis DPPH</i> .....	18
	<i>Análisis FRAP</i> .....	20
	<i>Análisis de polifenoles</i> .....	21
	<i>Análisis de flavonoides</i> .....	22
7.5	CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	22
	<i>Microdilución</i> .....	22
7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
8.	RESULTADOS.....	25
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	30
10.	CONCLUSIONES .....	38
11.	RECOMENDACIONES .....	40
12.	BIBLIOGRAFÍA .....	41
13.	APÉNDICE .....	45

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1: Parámetros fisicoquímicos evaluados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	25
Cuadro 2: Compuestos volátiles mayoritarios determinados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	26
Cuadro 3: Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	28
Cuadro 4: Compuestos volátiles determinados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales* .....	45
Cuadro 5: Análisis de capacidad antioxidante en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	47

## LISTADO DE FIGURAS

Figura I: Resumen gráfico.....	xv
Figura 1: Curva de calibración ácido gálico .....	19
Figura 2: Diseño experimental y variables respuesta .....	24
Figura 3: Determinación de capacidad antioxidante, en términos de indicador DPPH, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	26
Figura 4: Determinación de capacidad antioxidante, en términos de indicador FRAP, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	27
Figura 5: Determinación de capacidad antioxidante, en términos del contenido total de polifenoles, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	27
Figura 6: Determinación de capacidad antioxidante, en términos del contenido total de flavonoides, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	28
Figura 7: Análisis de componentes principales para cada una de las muestras de aceite esencial y agua floral evaluadas.....	29
Figura 8: Valores de los componentes principales para cada uno de los parámetros evaluados ....	48
Figura 9: Valores de los componentes principales para cada una de las muestras evaluadas .....	48
Figura 10: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de cardamomo .....	49
Figura 11: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de resina de copal .....	50
Figura 12: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de agua floral de cardamomo .....	51
Figura 13: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de agua floral de resina de copal.....	52
Figura 14: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes DPPH .....	53
Figura 15: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes FRAP .....	53
Figura 16: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes de contenido total de polifenoles .....	53
Figura 17: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes de contenido total de flavonoides .....	54
Figura 18: Tabla ANOVA para el parámetro de rendimiento de extracción de los aceites esenciales .....	54

Figura 19: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de rendimiento de extracción de los aceites esenciales .....	54
Figura 20: Tabla ANOVA para el parámetro de pH evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	54
Figura 21: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de pH evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	55
Figura 22: Tabla ANOVA para el parámetro de índice de refracción evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	55
Figura 23: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de índice de refracción evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	55
Figura 24: Tabla ANOVA para el parámetro de rotación óptica evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	56
Figura 25: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de rotación óptica evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	56
Figura 26: Tabla ANOVA para el parámetro de densidad evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	56
Figura 27: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de densidad evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	57
Figura 28: Tabla ANOVA para el análisis de DPPH efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	57
Figura 29: Prueba de múltiples rangos para el análisis de DPPH efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	57
Figura 30: Tabla ANOVA para el análisis FRAP efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	58
Figura 31: Prueba de múltiples rangos para el análisis FRAP efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	58
Figura 32: Tabla ANOVA para el análisis de polifenoles efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	58
Figura 33: Prueba de múltiples rangos para el análisis de polifenoles efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	59
Figura 34: Tabla ANOVA para el análisis de flavonoides efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	59
Figura 35: Prueba de múltiples rangos para el análisis de flavonoides efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	59
Figura 36: Tabla ANOVA para el análisis de concentración mínima inhibitoria de <i>E.coli</i> efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	60
Figura 37: Prueba de múltiples rangos para el análisis de concentración mínima inhibitoria de <i>E.coli</i> efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	60
Figura 38: Tabla ANOVA para el análisis de concentración mínima inhibitoria de <i>S.aureus</i> efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	60
Figura 39: Prueba de múltiples rangos para el análisis de concentración mínima inhibitoria de <i>S.aureus</i> efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales .....	61
Figura 40: Porcentaje acumulado para cada uno de los parámetros evaluados en el análisis de componentes principales .....	61
Figura 41: Semillas de cardamomo utilizadas para la extracción de aceite esencial y agua floral .....	61

Figura 42: Semillas de cardamomo molidas utilizadas para la extracción de aceite esencial y agua floral.....	62
Figura 43: Resina de copal utilizada para la extracción de aceite esencial y agua floral .....	62
Figura 44: Bolsa de manta armada para introducir la muestra en el alambique de acero inoxidable para la extracción por arrastre de vapor.....	62
Figura 45: Alambique de acero inoxidable y sistema utilizado para la extracción por arrastre de vapor de aceite esencial y agua floral de semilla de cardamomo y resina de copal .....	63
Figura 46: Agua floral de cardamomo extraída por el método de arrastre de vapor .....	63
Figura 47: Proceso de decantación para la separación del aceite esencial y agua floral de cardamomo obtenidas por el método de arrastre de vapor.....	63
Figura 48: Aceite esencial de cardamomo extraído por el método de arrastre de vapor .....	64
Figura 49: Proceso de decantación para la separación del aceite esencial y agua floral de resina de copal obtenidas por el método de arrastre de vapor.....	64
Figura 50: Sistema utilizado para la extracción por solventes de aceite esencial y agua floral de semilla de cardamomo y resina de copal .....	64
Figura 51: Aceite esencial de cardamomo obtenido por el método de extracción por solventes ...	65
Figura 52: Rotavapor utilizado para la separación de aceite esencial de cardamomo y hexano tras la extracción por el método de solventes.....	65
Figura 53: Picnómetro utilizado para la medición de densidad de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor .....	65
Figura 54: Polarímetro utilizado para la medición de rotación óptica de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor.....	66
Figura 55: Tubo óptico utilizado para la medición de rotación óptica de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor.....	66
Figura 56: Muestras de aceite esencial de cardamomo, aceite esencial de resina de copal y agua floral de cardamomo tras el análisis de antioxidantes FRAP.....	66
Figura 57: Preparación de medio de cultivo Mueller Hilton para el análisis de capacidad antimicrobiana en muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal .....	67
Figura 58: Gradilla utilizada para la preparación de soluciones seriadas para el análisis de capacidad antimicrobiana en muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal .....	67
Figura 59: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	67
Figura 60: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra <i>B. cereus</i> y <i>E. coli</i> .....	68
Figura 61: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i> .....	68
Figura 62: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	69

Figura 63: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *B. cereus* .....69

## RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la extracción de aceite esencial y agua floral de la capsula de *Elettaria cardamomum* (cardamomo) y de la resina de *Bursera copallifera* (copal) por arrastre de vapor y solventes, en términos de rendimiento, propiedades fisicoquímicas, volátiles, antioxidantes y antimicrobianas para su uso como preservante alimentario. Para esto se evaluaron parámetros como el pH, densidad, índice de refracción, rotación óptica, composición química, análisis DPPH, FRAP, contenido total de polifenoles y de flavonoides junto con la concentración mínima inhibitoria para las bacterias gram negativas y positivas *E.coli* y *S. aureus*. Adicionalmente se efectuó un análisis estadístico para comprobar la existencia de diferencias significativas, con un valor P de  $< 0.05$ , y correlaciones a través de la metodología de componentes principales. Como resultado se obtuvo que la extracción fue efectiva únicamente por arrastre de vapor a raíz de que con la metodología de solventes no se logró la obtención de las sustancias con los parámetros organolépticos deseados. Por otro lado, se determinó que el aceite extraído de resina de copal posee la mayor actividad antioxidante con un total de  $0.0038 \pm 0.0001$  mg de ácido gálico/mL de muestra. A su vez el de cardamomo cuenta con la mayor actividad antimicrobiana con una concentración mínima inhibitoria de  $62.5 \mu\text{L}/\mu\text{L}$  para *E.coli* y  $15.6 \mu\text{L}/\mu\text{L}$  para *S.aureus*. Mientras que las aguas florales únicamente poseen la primera característica con un total de  $0.0035 \pm 0.0001$  mg de ácido gálico/mL de muestra para el agua de copal y de  $0.0033 \pm 0.0001$  mg de ácido gálico/mL de muestra para la de cardamomo. Con base en esto es posible concluir que todas las muestras evaluadas podrían utilizarse como preservantes naturales, ya sea para prevenir la oxidación, para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos o para ambos. De igual forma, se recomienda que en futuras experimentaciones se evalúen dichas sustancias en matrices alimentarias para poder comprobar lo determinando en un periodo establecido de tiempo y almacenamiento a condiciones controladas.

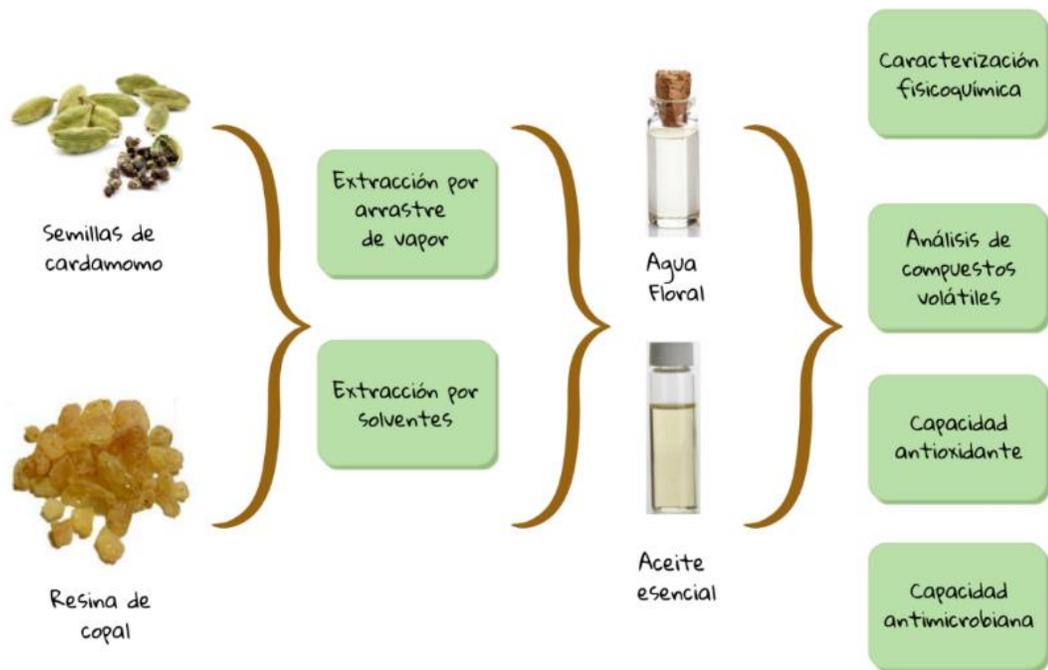


Figura I: Resumen gráfico

## ABSTRACT

The main objective of this work was to study the extraction of the essential oil and floral water from the *Elettaria cardamomum* (cardamom) capsule and *Bursera copallifera* (copal) resin by steam and solvent extraction, in terms of yield, physicochemical, volatile, antioxidant and antimicrobial properties for its use as a food preservative. For this, parameters such as pH, density, refractive index, optical rotation, chemical composition, DPPH and FRAP analysis, total content of polyphenols and flavonoids and the minimum inhibitory concentration for gram negative and positive bacteria such as *E. coli* and *S. aureus*. were evaluated. Additionally, a statistical analysis was carried out to verify the existence of significant differences, with a P value of  $< 0.05$ , and correlations through the principal component's methodology. As a result, it was obtained that the extraction was effectively only by steam entrainment since with the solvent methodology it was not possible to obtain the substances with the desired organoleptic parameters. On the other hand, it was determined that the oil extracted from copal resin has the highest antioxidant activity with a total of  $0.0038 \pm 0.0001$  mg of gallic acid/mL of sample. In addition, cardamom has the highest antimicrobial activity with a minimum inhibitory concentration of  $62.5 \mu\text{L}/\mu\text{L}$  for *E. coli* and  $15.6 \mu\text{L}/\mu\text{L}$  for *S. aureus*. While floral waters only have the first characteristic with a total of  $0.0035 \pm 0.0001$  mg of gallic acid/mL of sample for copal water and  $0.0033 \pm 0.0001$  mg of gallic acid/mL of sample for cardamom. Based on this, it is possible to conclude that all the samples evaluated could be used as natural preservatives, either to prevent oxidation, the growth of pathogenic microorganisms, or both. Similarly, it is recommended for future experiments with these substances to evaluate them in food matrices to verify it setting on a specific period of time and storage under controlled conditions.

# 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial Guatemala es uno de los principales países productores de cardamomo, (*Elettaria cardamomum*), representando alrededor del 61.5% de exportaciones del producto sin triturar. Sin embargo, no figura como uno de los principales exportadores de aceite esencial de cardamomo, a pesar de que este derivado resulta de utilidad en la industria de alimentos, pues puede ser empleada como potenciadora de características organolépticas, para retardar o inhibir la oxidación en diversos productos y como sustancia antimicrobiana. Esto puede atribuirse al hecho de que no existen variedad de estudios que demuestren las propiedades de la semilla de cardamomo o de otras partes de las plantas del territorio nacional como las resinas, que podrían utilizarse con el mismo propósito, en este caso de copal (*Bursera copallifera*), y que a su vez analicen los métodos adecuados para extraer la sustancia de interés.

A raíz de dichas ventajas y el hecho de que el país cuenta con la maquinaria para generar este subproducto, surge la necesidad de estudiar los métodos de extracción de aceite esencial de cardamomo y resina de copal. De forma que puedan aplicarse a escala industrial asegurando la obtención de los rendimientos más eficientes posibles. Para lo cual es importante evaluar no solo la metodología para extraer la sustancia, sino también la parte de los productos que origina los resultados más beneficiosos.

Es por esto que la caracterización y extracción del aceite esencial de cardamomo y resina de copal es un estudio de interés en la industria de alimentos, y en Guatemala como tal, debido a que puede representar una ventaja competitiva económica y dar paso al desarrollo de productos funcionales, que permitan brindarle un beneficio nutricional al consumidor o conservar las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de un alimento.

Es en ese sentido, se decide hacer un estudio que se enfoca en evaluar la extracción del aceite esencial a partir de la semilla de cardamomo y resina de copal. Esto mediante la metodología de arrastre de vapor en contraste con la de uso de solventes. De igual forma, se analizarán las características fisicoquímicas a través de la medición de pH, densidad, índice de refracción y rotación óptica. Además, se observará la composición química por cromatografía gaseosa, se determinará la capacidad antioxidante mediante el análisis DPPH, FRAP, contenido total de polifenoles y flavonoides, así como la capacidad antimicrobiana por microdilución. Esto con el objetivo de establecer que los aceites esenciales pueden extraerse de diversos subproductos y aprovecharse sosteniblemente para ser utilizadas en matrices alimentarias como un conservante de fuente natural.

## 2. ANTECEDENTES

Anteriormente se han realizado estudios que involucran la extracción y caracterización de aceites esenciales a través de diversas metodologías. El mayor interés de estas investigaciones radica en conservar las propiedades y elementos de estas sustancias, al mismo tiempo que se genera un alto rendimiento en su producción. Sin mencionar que también se busca implementar el uso de aguas florales, obtenidas también durante el proceso de extracción, de las cuales actualmente hay carencia de estudios. De esta forma, ambas podrán ser utilizadas de forma industrial como aditivos y preservantes, que permitan darles un valor agregado a los productos alimenticios al potenciar y conservar sus propiedades organolépticas, aumentar la vida útil, entre otros.

### 2.1 Caracterización del aceite de cardamomo y de resina de copal

En términos de la caracterización del aceite esencial, se han llevado a cabo estudios para establecer su composición química a través de los métodos de cromatografía de gases en combinación con la espectrofotometría de masas. En una investigación realizada en la Universidad del Valle de Guatemala se logró la identificación de 29 compuestos volátiles en el líquido de interés, los cuales variaban en términos de concentración según la región de cultivo de la muestra. De esta forma, fue posible establecer que los compuestos principales, siendo estos el 1,8 cineol y el acetato de terpenilo, se encontraban en la mayoría de las muestras según las regiones de procedencia. Mientras que, en el caso del copal, se ha observado que los compuestos mayoritarios son  $\alpha$ -pineno y limoneno. Adicionalmente, en la investigación mencionada, se estableció que el método de molienda de la muestra y extracción del aceite son variables significativas que influyen en la determinación de un perfil de compuestos volátiles (Mendizábal y Rolz, 2021; Tafoya, 2013).

Estos resultados son coherentes y están alineados a un estudio reportado por Villada, et al. 2017, donde se identificaron las propiedades bromatológicas, fisicoquímicas y microbiológicas del aceite esencial de cardamomo. En dicho estudio, se estableció un total de 5.20% de cenizas, 8.99% de humedad, 5.95% de extracto etéreo, 7.80% de proteína y 4.42% de proteína. Así como una actividad de agua de 0.643 y una capacidad calorífica de 362.64 kcal. Además, se determinó un recuento de mesófilos aerobios de 2600 UFC/g, un recuento de coliformes de < 3 NMP, un recuento de hongos y levaduras de 3100 UFC/g y una ausencia de *Clostridium* sulfo-reductores, *Escherichia coli* y *Salmonella*. De igual forma, a escala semi industrial se identificó un índice de refracción a 25° C de 1.48, una densidad a 20 °C de 0.93 g/mL, entre otros parámetros. Esto en contraste de un índice de refracción de 1.47 y una densidad de 0.85 g/mL para el aceite esencial de copal. Por otro lado, es preciso mencionar que al igual que en la investigación descrita anteriormente, se comprobó que

el método y las condiciones de extracción son una de las principales fuentes de variación de la concentración de los compuestos volátiles mayoritarios. Los cuales son de utilidad para establecer el grado de calidad del producto de interés (Valarezo, et al. 2020).

## 2.2 Extracciones de aceite esencial de cardamomo y resina de copal

Actualmente existen algunas de investigaciones que se enfocan en el método de extracción ideal del aceite esencial de cardamomo, lo cual en su mayoría es evaluado según el porcentaje de rendimiento final obtenido. Sin embargo, es importante que en conjunto se realice una cuantificación de los compuestos volátiles obtenidos. De esta forma es posible determinar que el extracto, además de ser abundante, es rico en los elementos que le otorgan su aroma y sabor característico, siendo de los más relevantes, como se ha mencionado anteriormente, el 1,8 cineol y el acetato de terpenilo.

En otros estudios previos se ha establecido que mediante la extracción por arrastre de vapor es posible obtener un valor en un rango de 32.58% a 41.68% de 1,8 cineol y un total comprendido entre 24.97% y 42.08% de acetato de terpenilo. Por otro lado, en la metodología con el uso de solventes orgánicos se han observado porcentajes de 16.60 y 57.35 para cada compuesto respectivo. En contraste de los determinados a través del método por fluido súper crítico, en donde se presentan datos de 21.40% y 42.30%. Los cuales a su vez pueden variar según la temperatura y presión utilizada en el proceso. Pues a 55°C y 300 bar se registraron los porcentajes más elevados, mientras que a 60°C y 200 bar se encontraban los más reducidos. De igual forma, en la hidrodestilación se identificó un valor de 32.57% de 1,8 cineol junto con uno de 34.12% de acetato de terpenilo. A su vez, para la extracción por ultrasonido se establecieron cifras de 27.70% y 46.00%. (Villada, 2016; Mendizábal y Rolz, 2021; Villada, et al. 2017).

Recientemente investigadores del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios de Universidad del Valle de Guatemala estudiaron aceites esenciales de cardamomo obtenido por arrastre de vapor, de la zona de Quiché y Alta Verapaz e identificaron  $\beta$ -pineno, D-Limoneno,  $\gamma$ -Terpinoleno, acetato de terpenilo, eugenol, acetato de lionalilo y nerodinol entre otros responsables de la composición química del aroma del aceite esencial. De igual forma, en un estudio efectuado en la universidad de Antioquia, al realizar la extracción con solventes utilizando pentano, hexano y ciclohexano se logró identificar cineol, lineol, terpenil acetato, linalil antralinato y demás compuestos volátiles. Por lo tanto, es factible realizar el estudio de la obtención del aceite esencial, de la semilla de cardamomo y posteriormente replicarlo para la resina de copal (Colmenares de Ruíz et al., 2021; Ríos, et al. 2007).

## 2.3 Capacidad antioxidante del aceite esencial de cardamomo y resina de copal

De forma general, el uso de aceites esenciales para prevenir la oxidación en matrices alimentarias ha tomado auge en los últimos años, esto a raíz de que funcionan como un aditivo natural. Es así como se han llevado a cabo estudios para comprobar el poder antioxidante del aceite esencial de romero en salchicha y carne de cerdo. Así como el del extracto de orégano en carne cocida y cruda

de pavo (Albarracín, et al. 2012). También, se realizó la evaluación del efecto del aceite esencial en la estabilidad oxidativa del aceite de soya en condiciones de almacenamiento. A partir de dicha experimentación se determinó que la concentración del líquido aceitoso, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, son los parámetros que pueden considerarse como fuentes de variabilidad. De igual forma, se estableció que el extracto de cardamomo era efectivo para prevenir la oxidación si era añadido en una concentración de 0.4 a 0.6 (% v/v) y el almacenamiento se daba de 20 a 30°C por un intervalo de 2 a 6 meses. Además, se debe mencionar que la adición de esta sustancia no generó cambios perceptibles en el flavor del alimento (Dolati, et al. 2016).

Por otro lado, cabe mencionar que el método comúnmente utilizado para la determinación de actividad antioxidante en aceites esenciales es el DPPH. En una investigación llevada a cabo en la Universidad de San Carlos de Guatemala se reportó un porcentaje de inhibición de 56.34% al emplear 500 microlitros del extracto. Mientras que, para la resina de copal, con una concentración inhibitoria de 50% se observó un resultado de 460 µg/mL con trolox como control positivo. En contraste, en un estudio realizado en hierbas zingiberáceas, se empleó el método FRAP, en donde se estableció que el cardamomo presentaba unos valores de entre 4.10 y 4.53 mg de trolox equivalente por gramos de peso seco. En donde se estableció que los datos obtenidos estaban relacionados con la presencia de los compuestos volátiles, monoterpenos, en el aceite esencial. Pues entre más altos sean los porcentajes, mayor será la actividad antioxidante (Ayala y Murillo, 2015; Valarezo, et al. 2020; Ivanović, et al. 2021).

## 2.4 Capacidad antimicrobiana del aceite esencial de cardamomo y resina de copal

En cuanto a la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de cardamomo se debe mencionar que es una característica que ha sido ampliamente aprovechada y estudiada tanto en la industria de alimentos como en la farmacéutica. En el segundo caso, en una investigación publicada en el Journal Frontiers in Microbiology se realizó la encapsulación de la sustancia de interés en nanocompuestos de quitosano, de modo que se comprobara su eficiencia como antibióticos. Como resultado se obtuvo que los compuestos demuestran un excelente poder antimicrobiano contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Luiz, et al. 2016).

De igual forma, en un estudio efectuado en carne de pescado, se observó que tanto el aceite esencial de cardamomo como el de eucalipto, salvia, hierbabuena y albahaca presentaban actividad antimicrobiana. En donde al realizar pruebas *in vitro*, en su mayoría mostraban 16 mg/mL de inhibición para *Salmonella typhi*, 8 mg/mL para *E. coli* y de 1 a 8 mg/mL para *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. Así mismo, también se ha comprobado la efectividad del extracto y la semilla de cardamomo en microorganismos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Prevotella intermedia*. Sin mencionar que en otras investigaciones incluso se ha estudiado la actividad antifúngica de este extracto en el ámbito agrícola. En donde se estableció que la combinación de 3000 ppm del aceite junto con metanol, etanol, cloroformo y oleoresinas de éter dietílico eran ideales para combatir *Aspergillus terreus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium madriti*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* y *S. typhi* (Argote, et al. 2016; Sarac, 2021).

Por otro lado, en el caso de la resina de copal, se han realizado estudios para evaluar su capacidad antimicrobiana en bacterias gram positivas, gram negativas y hongos. En donde se ha observado que la concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* es de 625 µg/mL y para *E. coli* es de 2500 µg/mL. Este mismo valor se identificó para *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Mientras que para *S. typhi* se requieren más de 5000 µg/mL (Valarezo, et al. 2020).

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Generalidades del cardamomo

El cardamomo, científicamente conocido como *Elettaria cardamomum*, perteneciente a la familia de zingiberáceas, es el fruto proveniente de una planta herbácea perenne. Es originario de la India, lugar a partir del cual posteriormente fue introducido en los continentes de América y Europa. Su cultivo requiere de una altura de entre 600 y 2000 metros sobre el nivel del mar. Mientras que su propagación puede tardar de 3 a 4 años. Entre sus características organolépticas se puede mencionar su forma ovalada con coloración verdosa, así como la presencia de semillas café en su interior y su aroma intenso que viene acompañado de un sabor dulce con un notorio picor (Ayala y Murillo, 2015; Barragan, *et. al*, 2016; Villada, 2016).

Comúnmente el cardamomo es reconocido por la variedad de propiedades funcionales y medicinales que posee, siendo una de las más relevantes su poder antiinflamatorio. Para hacer uso de dichas funcionalidades, comúnmente se extrae el aceite esencial del material biológico, pues el líquido volátil es más concentrado y a su vez facilita su aplicación en diversas industrias. Ya sea la alimentaria, farmacéutica o cosmética. La extracción puede efectuarse a partir de dos constituyentes del fruto, la semilla y la resina (Ramírez, 2019).

En términos de composición, las semillas poseen aceites volátiles, aceites grasos, pigmentos como la clorofila y feofitina, almidón, compuestos fenólicos, flavonoides, sílice, minerales y demás elementos. Así mismo, se debe tomar en consideración que su composición química puede llegar a variar según la variedad, región de cultivo y edad del cardamomo. Lo mismo aplica para los parámetros físicos, en donde de forma general el grano suele tener una forma elipsoidal con un largo promedio de  $14 \pm 2.0$  mm, un ancho de  $6.6 \pm 0.7$  mm y un grosor de  $5.5 \pm 0.8$  mm (Ramírez, 2019; Colmenares de Ruíz et al., 2021).

### 3.2 Resina de copal

La resina de *Bursera copallifera* (copal) se conoce como una secreción orgánica de la planta. Esta tiene compuestos bastante similares a los del aceite esencial, entre ellos los aceites grasos, aceites volátiles y como elemento diferenciador, los aromáticos no volátiles. Se debe mencionar que la combinación homogénea de ambos elementos en diversas proporciones forma las oleorresinas. Las cuales también son utilizadas en las industrias mencionadas con anterioridad, esto

a raíz de ventajas como la estabilidad, inocuidad microbiológica y facilidad para la incorporación (Ramírez, 2019).

### 3.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales se definen como líquidos aromáticos de carácter aceitoso, los cuales tienen un origen vegetal a partir de elementos diversos como las frutas, flores, semillas, hierbas, raíces, etc. Químicamente son conocidas como mezclas complejas de compuestos orgánicos liposolubles. Así mismo, usualmente son referidas como metabolitos secundarios a raíz de que sus componentes son sustancias restringidas de la naturaleza que se limitan a un número determinado de especies. Entre sus principales características fisicoquímicas se debe mencionar que son altamente volátiles, de bajo peso molecular, mayormente incoloras, relativamente fluidas, solubles en solventes orgánicos con menor densidad que el agua y estables en presencia de luz (Palazzolo et al., 2013; Peters, 2016).

### 3.4 Aceite esencial de cardamomo

El aceite esencial de cardamomo se caracteriza organolépticamente por tener la apariencia de un líquido aceitoso translúcido con coloración amarilla pálida. Además de un aroma afrutado, balsámico y picante. Los cuales pueden atribuirse a su composición química y perfil volátil. Esto a raíz de la presencia de elementos como el limoneno, sabineno, pineno,  $\alpha$  - terpenilo,  $\alpha$  - tepinilo y 1,8 - cineol. Estos compuestos pueden variar según la variedad de cardamomo, condiciones agroclimáticas y manejo del cultivo (Peguero, 2020; Villada, et al. 2017).

Entre las propiedades de este extracto de cardamomo resalta su poder antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antiinflamatorio, antiespasmódico, antiséptico, entre otros. Esto acompañado de su aroma y sabor característico es lo que provoca su alta demanda y uso en las industrias alimenticias, farmacéuticas, cosméticas y de perfumería. Específicamente en el sector alimentario es comúnmente empleada para la fabricación de licores, productos de repostería y panificación e incluso para la sazón de carnes y embutidos (Peguero, 2020; Villada, et al. 2017; Ayala y Murillo, 2015).

### 3.5 Aceite esencial de resina de copal

El aceite esencial de copal se caracteriza organolépticamente por tener la apariencia de un líquido aceitoso translúcido con coloración amarilla pálida. Además de un aroma balsámico característico. El cual puede atribuirse a su composición química y perfil volátil. Esto a raíz de la presencia de elementos como el  $\alpha$ -pineno y limoneno. Estos compuestos pueden variar de acuerdo con el método de extracción de la resina, condiciones agroclimáticas y manejo de la materia vegetal (Tafoya, 2013).

Entre las propiedades de este extracto copal resalta su poder antiinflamatorio, antimicrobiano, insecticida, antifúngico, antioxidante, entre otros. Esto acompañado de su aroma y sabor es lo que provoca su alta demanda y uso en las industrias farmacéuticas, cosméticas y de perfumería. Sin embargo, aún no se observa una variedad de aplicaciones en matrices alimentarias (Valarezo, et al. 2020).

### 3.6 Aguas florales

Las aguas florales se conocen como uno de los subproductos obtenidos tras la extracción de aceite esenciales a través de la metodología de arrastre de vapor. En donde el vapor de agua penetra la planta, semilla o materia orgánica de la que se desea adquirir la sustancia de interés y al condensarse se obtiene tanto el aceite, como un agua enriquecida por algunos de los compuestos volátiles de dicho fluido. Estas se caracterizan por ser incoloras, pero con una apariencia ligeramente turbia y un aroma de una menor intensidad al de los aceites esenciales. De igual forma, se debe mencionar que en la operación de extracción estas son obtenidas en grandes volúmenes a raíz del constante flujo de agua que se requiere. Además, se debe resaltar que son altamente utilizadas en el ámbito de la cosmetología y perfumería a raíz de sus propiedades y olores agradables (Mbacké, et al. 2018).

### 3.7 Métodos de extracción

Como se ha mencionado anteriormente, el aceite esencial proviene de las plantas, frutos o cáscaras de estos, de modo que es necesario realizar una extracción, pues no es posible su obtención de forma directa. Actualmente existen varios métodos para efectuar este proceso, entre ellos se puede mencionar la extracción por arrastre de vapor, por solventes, por fluido supercrítico e hidrodestilación. Además del proceso asistido por microondas, por ultrasonido, prensado en frío, entre otros (Peters, 2016 ; Palazzolo et al., 2013).

Para la obtención del aceite esencial se han utilizado varios métodos extractivos con rendimientos y calidades variables. Los más usados son por arrastre por vapor, extracción por solventes, hidrodestilación, fluidos supercríticos (Marongiu et al., 2004). Siendo las dos primeras metodologías las más empleadas con rendimientos de oscilantes entre 6-14% dependiendo del método y de las condiciones de extracción (Ashokkumar et al., 2020; Marongiu et al., 2004; Rios et al., 2007). En general se ha visto que los rendimientos por extracción por solventes (hexano) son superiores al arrastre por vapor, aunque el costo asociado al primero es mayor (Rios et al., 2007). No obstante el rendimiento del aceite está asociado a la variedad de la capsula, secado, molienda (tamaño de partícula), composición del solvente, relación solvente-biomasa, tiempo de extracción y pretratamientos (ultrasonido, enzimas, microondas entre otros) (Trujillo-Mayol et al., 2019).

La extracción por arrastre de vapor se basa en el principio de asociación de las moléculas de agua en estado de vapor a las partículas de aceite. En este método se utiliza un balón con agua a temperatura de ebullición, así como otro balón que contiene el material vegetal, al cual se le inyecta vapor para lograr la liberación de compuestos volátiles. A partir de este sistema se logra la formación de una fase inmiscible, esta es enfriada a través de un condensador y cae en un matraz.

El vapor continúa circulando hasta que se obtiene la mayor cantidad de aceite esencial, posteriormente se realiza una decantación para separar la parte de interés. Esta metodología es una de las más utilizadas y da rendimientos de hasta 6.5% (Villada, 2016).

A diferencia, la extracción mediante el uso de solventes se utiliza como principio la penetración de los solventes orgánicos en un material vegetal, lo que permite la disolución de sus aceites de carácter volátil a raíz de las diferencias en el punto de ebullición. Para este método se coloca la muestra, previamente molida, en contacto directo con el solvente. El cual puede ser etanol, pentano, éter etílico, cloroformo o éter de petróleo. Una vez en contacto y por efecto de calor se genera una transferencia de masa interfacial que permite la obtención del aceite esencial. En donde se esperan rendimientos en un intervalo de 4.7% a 6.2% (Villada, 2016).

### 3.8 Valor funcional de los aceites esenciales y de las aguas florales en sistemas alimentarios

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, los aceites esenciales y aguas florales tienen el potencial de aplicarse en matrices alimentarias a raíz de su amplia gama de propiedades funcionales. Entre ellas resalta su actividad antioxidante, actividad microbiana, poder antifúngico, capacidad insecticida, entre otras. Estas características resultan de utilidad para la elaboración de preservantes naturales, por lo cual es necesario ampliar los estudios que existen hasta la fecha.

Entre los aceites esenciales que se utilizan para estas aplicaciones resaltan los de comino, como ajo, menta, hierba de limón, canela, lavanda, geranio y eucalipto. Entre ellas, una de las más relevantes en la actualidad es la extraída de cascara de limón, en donde a raíz de sus propiedades antimicrobianas ha generado investigaciones que confirman que su uso puede resultar efectivo para inhibir bacterias Gram positivas en los alimentos. Así mismo, también se han realizado estudios para tratar la contaminación cruzada en áreas de procesamiento, principalmente en utensilios de cocina como cuchillos, tablas de picar e instrumentos de acero inoxidable. Pues al aplicar esta sustancia se comprobó su efecto bactericida en contra de microorganismos de interés como *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* y *Arcobacter butzleri*. Además, se evaluó su poder antifúngico en contra de dos diferentes especies de *Penicillium* (Palazzolo et al., 2013).

De igual forma, recientemente se ha comenzado a estudiar la elaboración de preservantes del aceite esencial de limón como componente principal. Lo cual se atribuye a sus propiedades antimicrobianas que permiten actuar en contra de microorganismos de interés como la *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*, entre otros. La efectividad de estos estudios permitiría aumentar la vida útil de varios productos a través de una fuente natural que podría provenir incluso de los residuos de las cáscaras de limón (Palazzolo et al., 2013; Valdevieso - Ugarte et al., 2019).

En términos del cardamomo y resina de copal, se han estudiado la actividad antimicrobiana en variedad de microorganismos responsables de intoxicaciones y deterioro de matrices alimentarias. Gracias a esto se ha establecido que *S. aureus* es la bacteria más sensible a la inhibición por dichos aceites esenciales. De modo que podría aplicarse a productos que se ven afectados por ella, entre los cuales resaltan los de origen animal y vegetales. Por otro lado, en un ámbito más agrícola, se ha determinado que esta sustancia extraída del cardamomo tiene un efecto tóxico contra la plaga *Tuta absoluta*, la cual afecta a las plantas de tomate. Esto es ventajoso a raíz de que funciona como un insecticida natural que no es dañino para la salud ni causa contaminación en los suelos. De igual

forma, se ha comprobado que el extracto puede ser utilizado como aditivo sensorial en productos usados para la alimentación animal. Esto debido a que se ha establecido un nivel de uso seguro de 5 mg/kg en todas las especies de animales (Sarac, 2021; Bampidis, et al. 2019)

## 4. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial Guatemala es uno de los principales países productores de cardamomo representando alrededor del 61.5% de exportaciones del producto sin triturar, seguido muy por detrás de la India con una participación de 17.8% y Nepal con 10.8%. Una de las principales razones de estas cifras es el hecho de que en el territorio nacional la cosecha se da durante todo el año gracias a las idóneas condiciones climáticas. Esto representa una ventaja contra los otros competidores, principalmente de marzo a septiembre, pues estos ven afectada su producción por lluvias o temperaturas extremas (Pop, 2018; MAGA, 2014).

Únicamente en el año 2021, según estadísticas del Banco de Guatemala, el cardamomo generó un total de 520,827.1 millones de dólares de ingresos de divisas a partir de exportaciones. Lo cual representó cerca del 4.24% de las exportaciones a nivel nacional, siendo este el cuarto producto tradicional más exportado después del azúcar, banano y café. A pesar de que estas cifras representan un decrecimiento con años anteriores, a causa de las variaciones de precio en el mercado internacional, es importante reconocer que incluso mientras el país se enfrentaba a una crisis sanitaria, el año 2020 fue el que generó mayores ingresos con este alimento con un total de 789,957.7 millones de dólares. De modo que es posible afirmar que el cardamomo juega un papel importante en la economía de Guatemala gracias a los ingresos generados por las exportaciones. Siendo Arabia Saudita, los Emiratos Árabes Unidos, Bangladesh, Jordania y Pakistán los principales importadores. Sin embargo, se debe resaltar que no existen datos que denoten el consumo interno de este producto (Banco de Guatemala, 2022; Agexport, 2021; Pop, 2018).

Bajo el mismo orden de ideas, se debe mencionar que el cardamomo es exportado en múltiples presentaciones, siendo una de ellas en forma de aceite esencial. Guatemala no figura como uno de los mayores exportadores en este rubro, pero tomando en cuenta que existen empresas con la maquinaria necesaria para efectuar la extracción, tiene la posibilidad de comenzar a desempeñarse en este campo como una forma de potenciar su economía. Es importante remarcar, que el país sí cuenta con exportaciones de estas sustancias volátiles, siendo Panamá, Estados Unidos, Francia, Alemania y México de los principales países importadores. Sin embargo, la demanda para el territorio nacional no es elevada por la baja oferta, por lo cual los ingresos generados para el año 2021, hasta el mes de agosto, fueron de 103 millones de dólares. Los cuales se ven altamente superados por los gastos de exportación, siendo estos de 275 millones de dólares (Pop, 2018 ; MINECO, 2021).

Por lo mismo, Guatemala requiere la diversificación de productos derivados del cardamomo que permitan el aprovechamiento sostenible de este producto. Entre los cuales se deben mencionar también las aguas florales, las cuales se obtienen como subproducto en el proceso de extracción de aceites esenciales por métodos como el arrastre de vapor. De igual manera, tomando en cuenta que

el grano del producto de interés únicamente contiene una composición y posibilidad de extracción cerca del 2 al 8% de aceite esencial, es de vital importancia la determinación de un método que pueda aplicarse de forma industrial asegurando la obtención del mayor rendimiento posible. De esta forma, la sustancia podría ser utilizada mayormente en la industria de los alimentos y no únicamente en los ámbitos farmacéuticos por sus propiedades medicinales o en el cosmético por su aroma característico (Pop, 2018).

Por otro lado, también se debe mencionar que existen otros productos con alta presencia nacional, como la resina de copal, que usualmente no son uno de los puntos de partida para efectuar la extracción de aceites esencial o aguas florales, y en la actualidad no hay estudios que validen la viabilidad de esta alternativa. Esto a pesar de que se conocen las propiedades antifúngicas e insecticidas de este tipo de resinas. Debido a esto, es necesario aplicar los métodos de extracción y establecer si es posible la obtención de rendimientos elevados y comprobación de sus características funcionales. Lo que permitiría diversificar los subproductos, fortaleciendo así la cadena de valor de este producto (Gutiérrez, 2013).

Debido a lo expuesto anteriormente, la extracción y caracterización del aceite esencial y agua floral de cardamomo y resina de copal es un estudio de interés en la industria de alimentos y en Guatemala como tal, debido a que puede representar una ventaja competitiva económica y dar paso al desarrollo de productos funcionales que permitan brindarle un beneficio nutricional al consumidor o conservar las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de un alimento.

## 5. HIPÓTESIS

El aceite esencial y el agua floral extraído de la semilla de cardamomo y de la resina de copal puede ser utilizado como un preservante natural en alimentos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Estudiar la extracción de aceite esencial y agua floral de la capsula de *Elettaria cardamomum* (cardamomo) y de la resina de *Bursera copallifera* (copal) por arrastre de vapor y solventes, en términos de rendimiento, propiedades fisicoquímicas, volátiles, antioxidantes y antimicrobianas para su uso como preservante alimentario.

### 6.2 Objetivos específicos

- Establecer el método de extracción adecuado, en términos de rendimiento, de aceite esencial de la semilla de cardamomo y de la resina de copal por arrastre de vapor y con uso de solventes.
- Identificar los principales compuestos volátiles, por cromatografía gaseosa, presentes en los aceites esenciales y aguas florales de la semilla de cardamomo y de la resina de copal obtenidos por los diversos métodos extractivos.
- Determinar el poder antioxidante del aceite esencial y del agua floral de la semilla de cardamomo y de la resina de copal, obtenidos por los diversos métodos extractivos por medio de los indicadores DPPH, FRAP, contenido total de polifenoles y de flavonoides.
- Determinar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial y agua floral de la semilla de cardamomo y de la resina de copal, obtenidos por los diversos métodos extractivos a través de la metodología de microdilución contra bacterias.

## 7. Metodología y diseño del experimento

### 7.1 Métodos de extracción del aceite esencial

#### Arrastre de vapor

1. Se colocaron 1500 g de semillas de cardamomo previamente trituradas o resina de copal en un pedazo de tela manta.
2. A continuación, se empacaron las semillas o resina en la tela manta a modo de formar una bolsa. Con otro retazo de la tela manta se le hizo un nudo a la bolsa.
3. Posteriormente se colocó la bolsa adentro del alambique de acero inoxidable y se cerró. En el caso de la resina, la bolsa se colocó en un pirex de aluminio para evitar derrames dentro del equipo.
4. Luego, se conectaron tres mangueras al alambique de acero inoxidable, una para la salida del aceite esencial, otra para la entrada de agua y la última para su salida. Además, se colocó una ampolla de decantación en un soporte a la altura de la manguera de salida del aceite esencial.
5. Después se llenó el alambique con 4.5 L de agua, se abrió la fuente constante de agua y se encendió la fuente de calor.
6. Seguidamente se dejó pasar el flujo de vapor en ciclos de 10 horas cada uno. En los cuales se decantó el aceite y se almacenó el agua floral, en un frasco ámbar cubierto de aluminio a temperatura de refrigeración, cada vez que la ampolla alcanzaba su máxima capacidad.
7. Al finalizar el ciclo se cerró la fuente constante de agua, se apagó la fuente de calor y se esperaron 5 minutos para dejar caer las últimas gotas remanentes de aceite esencial.
8. A continuación, se decantó la última porción de aceite esencial y se colocó con el resto de la extracción.
9. Por último, se filtró el aceite esencial en un embudo con filtro de papel y 0.5 g de sulfito de sodio. Lo obtenido se pesó y se almacenó en un frasco ámbar cubierto de aluminio a temperatura de refrigeración.

(Espina, 2014; Hernández, 2019; Ríos, et. al, 2007)

## Por solventes

1. Se colocaron 50 g de semillas de cardamomo en un pedazo de tela manta.
2. A continuación, se empacaron las semillas en la tela manta a modo de formar un cilindro. Con tres retazos de manta adicionales se hicieron nudos en los extremos y en el centro de la tela manta para evitar el derrame del cardamomo dentro del equipo.
3. Seguidamente se depositó el cilindro con muestra dentro del extractor de soxhlet y se ensambló el equipo colocando el condensador encima de dicha parte. De igual forma, por debajo se introdujo un balón de 500 mL de fondo plano con 500 mL de hexano puro.
4. Luego, se colocó un soporte con unas pinzas y un aro de metal. Sobre el aro de metal se dispuso una manta de calor, encima de esta se situó el equipo anteriormente ensamblando, asegurando con las pinzas el condensador.
5. Posteriormente se conectaron dos mangueras al condensador, una para la entrada de agua de una fuente constante y otra para la salida. Adicionalmente se colocó un pedazo de algodón en la parte superior del mismo para evitar la salida de vapor.
6. Después se abrió la fuente de agua, se conectó la fuente calor y se dejó fluir el vapor durante ciclos de 10 horas cada uno.
7. Al finalizar el ciclo se apagó la fuente de calor, se cerró la fuente de agua y se dejó enfriar el equipo por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se desarmó el equipo, y el balón de fondo con el aceite y hexano se colocó en un rotavapor a una temperatura de 60°C para evaporar el solvente y separar el aceite esencial.
8. Por último, el aceite esencial extraído se filtró en un embudo de vidrio con filtro de papel y 0.5 g de sulfito de sodio. Lo obtenido se pesó y se almaceno en un frasco ámbar cubierto de aluminio a temperatura de refrigeración.

(Eslava y Fajardo, 2020; Ríos, et. al, 2007)

## 7.2 Análisis fisicoquímico

### Medición de pH

1. Se utilizó un potenciómetro de sobremesa Thermo Scientific Orion Star A211, fabricado en Singapur, el cual se calibró, siguiendo las indicaciones del manual, previo a llevar a cabo las mediciones. Para esto se utilizaron 3 buffers, uno de 4.01, otro de 7.00 y otro de 10.01.
2. Una vez calibrado el equipo se realizaron las mediciones de cada muestra, siendo estas el aceite de cardamomo, aceite de copal, agua floral de cardamomo y agua floral de copal. Las cuales se llevaron a cabo en triplicado, limpiando el potenciómetro con agua destilada después de cada cambio de muestra.

## Medición de densidad

1. Se utilizó un picnómetro de vidrio de 10 mL, el cual se pesó previamente, con su tapón y termómetro, en una balanza de 5 decimales.
2. A continuación, se llenó completamente el picnómetro con agua y se le colocó nuevamente el tapón y el termómetro para pesarlo en la balanza.
3. Una vez registrados los dos pesos se obtuvo el peso del agua por diferencia.
4. Seguidamente, se determinó el volumen en el interior del picnómetro a partir de una densidad teórica de 0.99654 g/mL a 27 °C.
5. Posteriormente se efectuaron las mediciones para cada una de las diferentes muestras y se prosiguió a calcular la densidad al dividir la diferencia del peso del picnómetro con la muestra con el peso del picnómetro vacío, entre el volumen del mismo, determinado en el paso anterior.

(Weast y Selby, 1968).

## Medición de índice de refracción

1. Se utilizó un refractómetro Atago Abbe Nar – 1T, manufacturado en Japón, el cual llevaba los líquidos a una temperatura de 20 °C.
2. De forma preliminar se midió el agua para confirmar que el equipo se encontraba calibrado.
3. A continuación, se prosiguió a medir cada una de las cuatro muestras en triplicado. Para esto se tomaron 1000 uL y se depositaron en el prisma de iluminación.
4. Luego se cerró la compuerta y se ajustó el mando de medición hasta tener una compensación de luz.
5. Posteriormente se tomaron los datos con cuatro cifras decimales, se levantó la compuerta y se limpió con agua destilada y kimwipes para las aguas florales y con etanol al 95% y kimwipes para los aceites.

## Medición de rotación óptica

1. Se utilizó un polarímetro Linos Photonics SR6, manufacturado en Alemania, en donde previo a su uso se llevaron las muestras a una temperatura de 20°C a través de un baño maría.
2. A continuación, se llenó el tubo ocular por completo, se colocó el lente por encima y se cerró.
3. Seguidamente se encendió la fuente de luz, se ingresó el tubo ocular en la cámara y posteriormente se cerró.
4. Luego se ajustó el mando de medición, observando a través del ocular, hasta tener una compensación de luz.
5. Posteriormente se tomaron los datos, se abrió la cámara, se retiró la muestra y el lente del tubo ocular y ambas partes se limpiaron con agua destilada y

kimwipes para las aguas florales y con etanol al 95% y kimwipes para los aceites.

6. Después se repitió el mismo procedimiento para cada muestra en triplicado.

### 7.3 Caracterización volátil

1. Se colocó 1.5 mL del aceite extraído en viales para cromatografía color ámbar.
2. A continuación, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6850, manufacturado en Canadá, acoplado a un detector de masas modelo 5975 con una columna capilar de polietilenglicol de 60 metros.
3. Seguidamente se empleó una temperatura inicial de horno de 60°C por 2 minutos y una rampa de 3°C por minuto hasta los 235°C por 20 minutos. Se trabajó con inyector sin división de flujo a una temperatura de 250°C y se mantuvo la temperatura de interfase a 280°C, usando helio como gas acarreador.
4. Por último, se integraron los resultados con el software ChemStation y se analizaron con la base datos NIST.

(Mendizábal y Rolz, 2021)

### 7.4 Capacidad antioxidante

#### Análisis DPPH

1. Se preparó una solución de DPPH a 0.1mM en etanol. Para esto, se pesaron 39.0 mg de reactivo DPPH y se disolvieron en 50 ml de etanol. Luego se aforo a 100 ml con el solvente.
2. A continuación, se preparó una solución madre de ácido gálico (100 µg/ml ). Para esto se pesaron 0.0100 g de reactivo de ácido gálico. Se aforo a 100 ml cubriendo el balón con papel aluminio y se homogenizo la solución.
3. Seguidamente se realizó una curva de calibración de ácido gálico preparando 7 soluciones como se muestran a continuación:

Patrón No.	1	2	3	4	5	6	7	Blanco	Control
Concentración (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	-	-
Volumen (µL) (solución madre de ácido gálico 100 µg/mL)	20	40	60	80	100	120	140	-	-
Agua destilada (µL)	1980	1960	1940	1920	1900	1880	1860	-	-
Homogenizar en vortex									
Tomar de cada uno de los patrones anteriores los siguientes volúmenes									
Patrones (mL)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	-
Solución DPPH (mL)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	0.7
Etanol absoluto (mL)	-	-	-	-	-	-	-	1.4	0.7
Homogenizar en el vortex									
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz									

Figura 1: Curva de calibración ácido gálico

4. Luego se midió la absorbancia de las disoluciones a una longitud de onda de 520 nm para obtener la recta que determinaba la concentración de radical (tiempo 0). Para esto se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS Thermo Scientific GENESYS 10 UV, manufacturado en Estados Unidos.
5. Posteriormente se guardaron las muestras de la curva y se midieron nuevamente a los 30 minutos y luego a los 60 minutos.
6. Con los datos recopilados se trazó la curva para obtener la recta que describe el comportamiento. La cual fue la siguiente regresión lineal  $\% = 23.991 \text{ GAE (concentración de ácido gálico equivalente } \mu\text{g/mL)} + 1.2614$  con una  $R^2$  de 0.9955.
7. A continuación, se prosiguió a medir cada una de las muestras de aceite esencial y agua floral en triplicado. Para esto se diluyó el DPPH preparado anteriormente agregando 1 mL de este a 5 mL de etanol.
8. Seguidamente se tomaron 500 µL de cada muestra en refrigeración y se colocaron en un tubo de ensayo junto con 500 µL del DPPH diluido y se homogenizaron. Estos se dejaron en reposo por 15 minutos en la oscuridad.
9. Transcurrido el tiempo de reposo se agregaron 1000 µL de agua destilada a cada tubo.
10. Después se leyó un blanco del DPPH diluido en etanol y un control de la solución de DPPH, ambos a una absorbancia de 520 nm en el espectrofotómetro.
11. Luego se midió la absorbancia de cada muestra en la misma longitud de onda. Sin embargo, ambas muestras de aceites esenciales no presentaron una lectura estable en el equipo, por lo que se hicieron ensayos disminuyendo la concentración de la muestra hasta lograr un valor que no oscilara. En el caso del aceite de cardamomo se emplearon 200 µL de la sustancia con 800 µL de DPPH diluido, mientras que para el aceite de copal fueron 25 µL de muestra con 975 µL de DPPH diluido.
12. A continuación, se determinó el porcentaje de inhibición a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left| 1 - \frac{\text{Abs. de la muestra} - \text{Abs. del blanco}}{\text{Abs. del control} - \text{Abs. del blanco}} \right| \times 100$$

13. Posteriormente se utilizó la regresión lineal asociada a la actividad antioxidante, determinada anteriormente, y se encontró la concentración de antioxidante. Los

resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes/mL de aceite o agua floral.

(CEEA, 2021).

### Análisis FRAP

1. Se elaboró una solución Buffer de fosfatos pH 6.6 (0.2M). Para esto se pesaron 3.5g de fosfato de sodio y 21g de bifosfato de sodio, para 1L de agua desmineralizada. Además, se evaluó que el pH se encontrara en 6.6, y de ser necesario se ajustó con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico.
2. Seguidamente se preparó una solución de ferricianuro de potasio 1%. Para esto se pesó 1 g de ferricianuro de potasio y se ajustó a 100 mL en matraz aforado con agua destilada.
3. A continuación, se elaboró una solución de Cloruro férrico 0.1%. Para esto se pesaron 0.05 g de cloruro férrico y se ajustó a 50 mL en matraz aforado con agua destilada.
4. Más adelante se preparó una solución de ácido tricloroacético al 10%.
5. Luego se prosiguió a elaborar la curva de calibración con el reactivo Trolox. Para esto se elaboraron soluciones seriadas de 0.0156, 0.0310, 0.0630, 0.125, 0.250 y 0.500 mg/mL, utilizando metanol al 80% como solvente.
6. Posteriormente, en un tubo de ensayo se agregó 1mL de la solución de 0.0156 mg/mL de Trolox la disuelta en metanol al 80%, 2.5mL de la solución de ferricianuro de potasio y 2.5mL del buffer de fosfatos.
7. Después este se introdujo en un baño de agua a 50°C por 20 minutos.
8. Una vez transcurrido el tiempo se tomaron 2.5mL del tubo de ensayo y se trasladaron a otro tubo de ensayo. A eso se le añadieron 2.5mL de agua destilada, 2.5mL de ácido tricloroacético y 0.5 mL de la solución de cloruro férrico. El cambio de color observado fue de amarillo a verde azulado.
9. Seguidamente se dejó reposar en oscuridad por 30min y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 700 nm, posterior a la lectura de un blanco de agua.
10. El mismo procedimiento se repitió para cada solución seriada, a partir de lo cual fue posible obtener la siguiente regresión lineal:  $y = 0.9699x$  (mg de Trolox equivalente /mL de muestra) + 0.0848, la cual presentó una  $R^2$  de 0.9985.
11. Luego de la obtención de la curva de calibración, se efectuó el mismo procedimiento partiendo de las muestras, tanto de aceite como de aguas florares, diluyéndolas en metanol al 80% en una proporción 1:10 en balones aforados de 10 mL. De igual forma, se debe resaltar que previo a la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro se realizó una filtración con papel filtro en embudo de vidrio, para evitar oscilaciones por parte del equipo. Sin embargo, en el caso de los aceites esenciales fue necesario diluir para que los valores de absorbancia se encontrarán dentro de los puntos establecidos previamente por la curva de calibración. Para el aceite de cardamomo se partió de la dilución previa de 1:10 y se tomó 1 mL para diluir nuevamente en

proporción 1:10 con metanol al 80%. Mientras que para el aceite de copal se efectuó el mismo procedimiento, pero se diluyó la dilución inicial en proporción 1:50.

12. Una vez obtenidas las absorbancias se prosiguió a calcular la capacidad de reducción de hierro a través de la ecuación de la curva de calibración, cuyos resultados se expresaron en mg de Trolox equivalente /mL de muestra.

(CEEA, 2021).

### Análisis de polifenoles

1. Se elaboró una solución de carbonato de sodio al 20%. Para esto se pesaron 20 g de carbonato de sodio y se colocó en un balón aforado de 100 mL, el cual se ajustó al volumen indicado con agua destilada.
2. A continuación, se prosiguió a la elaboración de una solución de 100 ppm de ácido gálico para efectuar la curva de calibración. Para esto se tomaron volúmenes de 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 y 1000  $\mu\text{L}$  de dicha solución y se combinaron 1000, 850, 700, 550, 400, 250, 100 y 0  $\mu\text{L}$  de agua destilada en un tubo de ensayo.
3. Seguidamente se agregaron 2000  $\mu\text{L}$  de la solución de carbonato de sodio y 2500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin C a cada tubo de ensayo y se dejaron reposar por 30 minutos en un lugar oscuro.
4. Transcurridos los 30 minutos se filtraron los tubos de forma individual, utilizando papel filtro y un embudo de vidrio. Luego se leyó un blanco de agua en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Posteriormente se leyeron todas las muestras elaboradas para armar la curva de calibración.
5. A partir de dichas lecturas se obtuvo la siguiente regresión lineal:  $y = 8.5482x(\text{concentración de ácido gálico equivalente (mg/mL)} + 0.0472$ , la cual presentó una  $R^2$  de 0.9908.
6. Después de la obtención de la curva de calibración, se efectuó el mismo procedimiento partiendo de las muestras, tanto de aceite como de aguas florares. Para lo cual se empleó un volumen de 200  $\mu\text{L}$ , en combinación con 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 2000  $\mu\text{L}$  de la solución de carbonato de sodio y 2500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin C. Cada muestra se trabajó en triplicado.
7. Una vez obtenidas las absorbancias se prosiguió a calcular el contenido total de polifenoles a través de la ecuación de la curva de calibración, cuyos resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente /mL de muestra.

(CEEA, 2021).

## Análisis de flavonoides

1. Se preparó una solución de acetato de sodio al 5%, para esto se colocaron 5 g del reactivo en un balón aforado de 100 mL y se ajustó al volumen indicado con agua destilada.
2. Seguidamente se preparó una solución de cloruro de aluminio al 10%. Para esto se pesó 1 g del reactivo y se disolvió de forma progresiva, en pequeñas cantidades en 10 mL de agua destilada. Esto se efectuó en campana de extracción y con guantes a raíz de la violenta reacción al entrar en contacto con el agua, de dicho compuesto.
3. A continuación, se prosiguió a la elaboración de una solución de 100 ppm de quercetina para efectuar la curva de calibración. Para esto se tomaron volúmenes de 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 y 1000  $\mu$ L de dicha solución y se agregaron a balones de 10 mL para ser aforados con etanol. De cada balón se tomó 1 mL y se trasladó a tubos de ensayo en combinación con 100  $\mu$ L de acetato de sodio, 100  $\mu$ L de cloruro de aluminio y 2800  $\mu$ L de agua destilada. Cada tubo se dejó reposar 30 minutos en un lugar oscuro.
4. Transcurridos los 30 minutos se leyó un blanco de agua en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. Posteriormente se leyeron todas las muestras elaboradas para armar la curva de calibración.
5. A partir de dichas lecturas se obtuvo la siguiente regresión lineal:  $y = 0.0271x(\text{concentración de quercetina equivalente (mg/mL)} + 0.0057$ , la cual presentó una  $R^2$  de 0.9997.
6. Después de la obtención de la curva de calibración, se efectuó el mismo procedimiento partiendo de las muestras, tanto de aceite como de aguas florares. Para lo cual se partió de un volumen de 500  $\mu$ L, el cual se aforo a 10 mL con etanol. En el caso de los aceites esenciales en dicho volumen no era posible obtener una lectura estable en el espectrofotómetro. Por lo que se tomó 1 mL de la solución de 10 mL y se aforo a 10 mL con etanol para repetir de nuevo el mismo procedimiento adicionando el acetato de sodio, cloruro de aluminio y agua destilada.
7. Una vez obtenidas las absorbancias se prosiguió a calcular el contenido total de polifenoles a través de la ecuación de la curva de calibración, cuyos resultados se expresaron en mg de quercetina equivalente /mL de muestra.

(CEEA, 2021).

## 7.5 Capacidad antimicrobiana

### Microdilución

1. Se inocularon 10  $\mu$ L de la bacteria gram positiva *S. aureus* (en 10 mL del medio de cultivo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI).
2. Seguidamente se inocularon 10  $\mu$ L de la bacteria gram negativa *E.coli* en 10 mL del medio de cultivo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI).
3. Ambas bacterias se incubaron por 24 horas a 37 °C en una incubadora manual marca VWR.

4. A continuación, se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton, para esto se disolvieron 0.60 g de extracto de carne, 10.62 g de peptona caseína, 0.9 g de almidón y 300 mg de indicador TTC en 300 mL de agua peptonada. Seguidamente se mezcló con un agitador y se calentó brevemente hasta asegurar que no quedaban grumos.
5. Posteriormente se distribuyó el medio de cultivo colocando 9.2 mL en tubos de ensayo. Los cuales se esterizaron en autoclave por una hora a una presión 15 psi.
6. Luego se prendió el mechero y se preparó el área de trabajo para asegurar su desinfección. A continuación, se tomaron 1000  $\mu$ L de la bacteria gram positiva inoculada, se depositaron en uno de los tubos de ensayo con el medio de cultivo Mueller Hinton y se agitó en vortex. A partir de esto se obtuvo una concentración del microorganismo de  $1 \times 10^7$ . Se repitió el mismo procedimiento partiendo del tubo de ensayo anterior y se obtuvo una concentración  $1 \times 10^6$  y posteriormente de  $1 \times 10^5$  UFC. El mismo proceso se llevó a cabo para la bacteria gram negativa.
7. Después, en una gradilla se colocaron 40 tubos eppendorf de 1.5 mL (previamente esterilizados en autoclave), disponiendo 10 en cada fila, cada una de las cuales correspondía a una de las muestras a evaluar (aceite esencial de cardamomo, aceite esencial de resina de copal, agua floral de cardamomo y agua floral de resina de copal). En cada tubo se agregaron 750  $\mu$ L del medio de cultivo Mueller Hinton.
8. Seguidamente se tomaron 750  $\mu$ L de aceite esencial de cardamomo y se colocaron en uno de los tubos correspondientes a la fila de dicha muestra. Posteriormente se cerró el tubo y se agitó en el vortex por 30 segundos. Luego, se tomaron 750  $\mu$ L de dicho tubo y se depositaron en el siguiente tubo para después agitarlo en el vortex. Dicho procedimiento se repitió hasta obtener 10 soluciones seriadas en la siguiente proporción: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512. Lo cual a su vez se repitió para cada una de las 3 muestras restantes.
9. Una vez obtenidas las soluciones para cada muestra se prosiguió al sembrado en placas ELISA de 96 posos. Para esto cada columna, identificada con una letra correspondía a una muestra, mientras que cada fila, del 1 al 10, correspondía a una solución seriada, empezando de la más a la menos concentrada. De igual forma, en la fila 11 se colocó un control de la solución seriada 1:1 sin microorganismo y en la fila 12 se añadió únicamente el microorganismo en concentración de  $1 \times 10^5$  UFC. Cada 4 columnas correspondían a un microorganismo, es decir la mitad de la placa.
10. Para el sembrado, en cada poso se colocaban 100  $\mu$ L de la solución seriada correspondiente junto con 100  $\mu$ L del microorganismo de dicha columna.
11. Al finalizar el sembrado se cerraba la placa, se identificaba y se incubaba a 37 °C por un periodo de 24 horas. Este procedimiento se repitió dos veces más para realizarlo en triplicado. Además, se debe mencionar que en la experimentación también se evaluó el microorganismo *Bacillus Cereus*, sin embargo, este no presentó crecimiento, por lo que no es reportado en los resultados.
12. Luego de la incubación se determinaba la concentración mínima de inhibición de forma visual con ayuda del indicador TTC.

(Balouiri, M., et al. 2016); (Argote, et al. 2017; Trujillo, 2021).

## 7.6 Análisis estadístico

Todos los métodos y análisis llevados a cabo se trabajarán en triplicado para cada muestra. Los resultados numéricos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar con  $n = 3$ . Los valores serán analizados estadísticamente con varianza unidireccional seguidamente de la prueba Tukey Posthoc con un valor  $p$  de  $< 0.05$  para establecer diferencias significativas. Todos los análisis estadísticos, incluyendo el análisis de componente principal PCA, serán efectuados en el software STATGRAPHICS Centurion XVI.

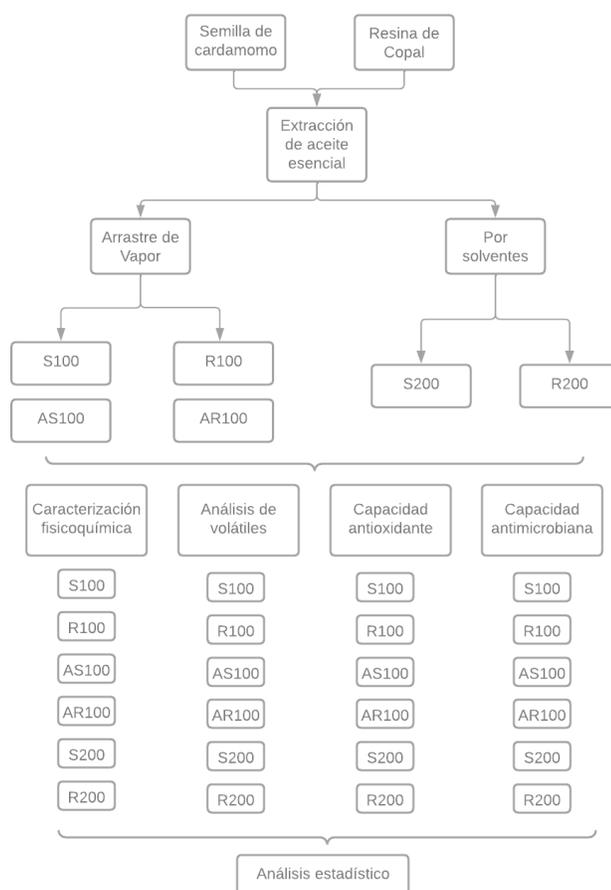


Figura 2: Diseño experimental y variables respuesta

(En donde cada aceite esencial y agua floral extraído de la semilla y resina por extracción de vapor o solventes es caracterizado fisicoquímicamente y evaluado por análisis volátil, capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana; S100: Aceite esencial extraído de la semilla por arrastre de vapor, R100: Aceite esencial extraído de la resina por arrastre de vapor, AS100: Agua floral de cardamomo extraída por arrastre de vapor, AR100: Agua floral de copal extraída por arrastre de vapor, S200: Aceite esencial extraído de la semilla por solventes, R200: Aceite esencial extraído de la resina por solventes)

## 8. RESULTADOS

Cuadro 1: Parámetros fisicoquímicos evaluados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

Parámetro fisicoquímico	Muestra					
	Aceite esencial de cardamomo	Valores reportados en normativa ISO 4733 para aceite de cardamomo	Aceite esencial de copal	Valores reportados en literatura para aceite de copal	Agua floral de cardamomo	Agua floral de copal
<b>Rendimiento extracción por arrastre de vapor (%)</b>	0.734 ± 0.349 <sup>a</sup>	N/A	1.50 ± 1.39 <sup>a</sup>	N/A	N/A	N/A
<b>Rendimiento extracción por solventes (%)</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>pH</b>	4.16 ± 0.030	<6.00	4.91 ± 0.010	<5.80 – 6.00	3.98 ± 0.020	4.60 ± 0.020
<b>Densidad (g/mL)</b>	0.921 ± 0.000197	0.920 – 0.940	0.824 ± 0.000120	0.846 ± 0.00230	1.00 ± 0.000789 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.000193 <sup>b</sup>
<b>Índice de refracción</b>	1.46 ± 0.000458	1.46 – 1.47	1.47 ± 0.000600	1.48	1.33 ± 0.000600 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.000100 <sup>c</sup>
<b>Rotación óptica (°)</b>	22.7 ± 1.15	24.0 – 39.0	34.7 ± 1.53	12.2 – 14.0	3.67 ± 0.577 <sup>d</sup>	2.67 ± 0.577 <sup>d</sup>

\*Los valores con la misma letra para cada parámetro no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

Cuadro 2: Compuestos volátiles mayoritarios determinados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

Compuesto	Porcentaje relativo (%)			
	Aceite de cardamomo	Aceite de copal	Agua de cardamomo	Agua de copal
Eucaliptol (1,8-cineol)	33.11	-	4.330	-
Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilideno)-	26.73	0.1900	-	-
Beta felandreno	4.760	55.97	-	-
Limoneno	-	14.71	-	-
Agua	-	-	95.67	71.44
Ácido ftálico	-	-	-	18.54

(Fuente: Elaboración propia)

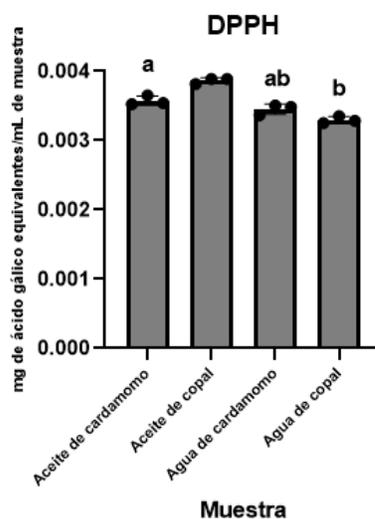


Figura 3: Determinación de capacidad antioxidante, en términos de indicador DPPH, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

\*Las columnas con la misma letra para cada parámetro no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

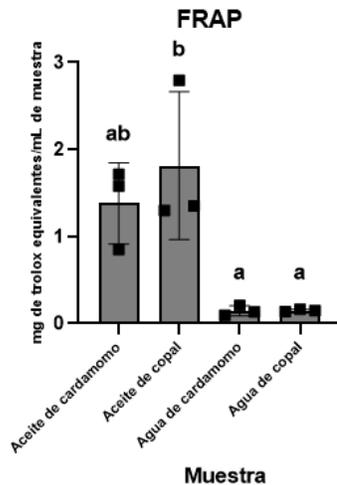


Figura 4: Determinación de capacidad antioxidante, en términos de indicador FRAP, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

\*Las columnas con la misma letra para cada parámetro no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

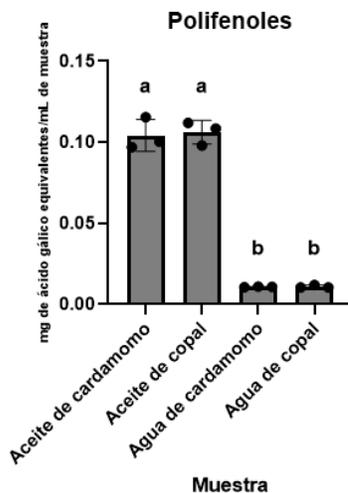


Figura 5: Determinación de capacidad antioxidante, en términos del contenido total de polifenoles, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

\*Las columnas con la misma letra para cada parámetro no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

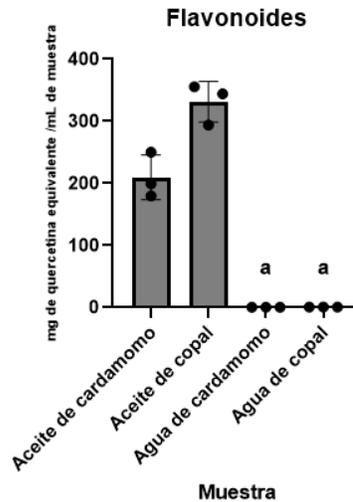


Figura 6: Determinación de capacidad antioxidante, en términos del contenido total de flavonoides, en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

\*Las columnas con la misma letra para cada parámetro no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

Cuadro 3: Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

Muestra	Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria determinada de forma visual (uL/mL)	Concentración mínima inhibitoria promedio (uL/mL)
Aceite de cardamomo	<i>E.coli</i>	62.5	72.9 ± 0.048
	<i>S. Aureus</i>	15.6	20.8 ± 0.009
Aceite de copal	<i>E.coli</i>	250	250 ± 0.000
	<i>S. Aureus</i>	62.5	125 ± 0.000
Agua floral de cardamomo	<i>E.coli</i>	0.00	0.00 ± 0.000 <sup>b</sup>
	<i>S. Aureus</i>	0.00	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>
Agua floral de copal	<i>E.coli</i>	0.00	0.00 ± 0.000 <sup>b</sup>
	<i>S. Aureus</i>	0.00	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>

\*Los valores con la misma letra para cada microorganismo no demuestran una diferencia estadísticamente significativa

(Fuente: Elaboración propia)

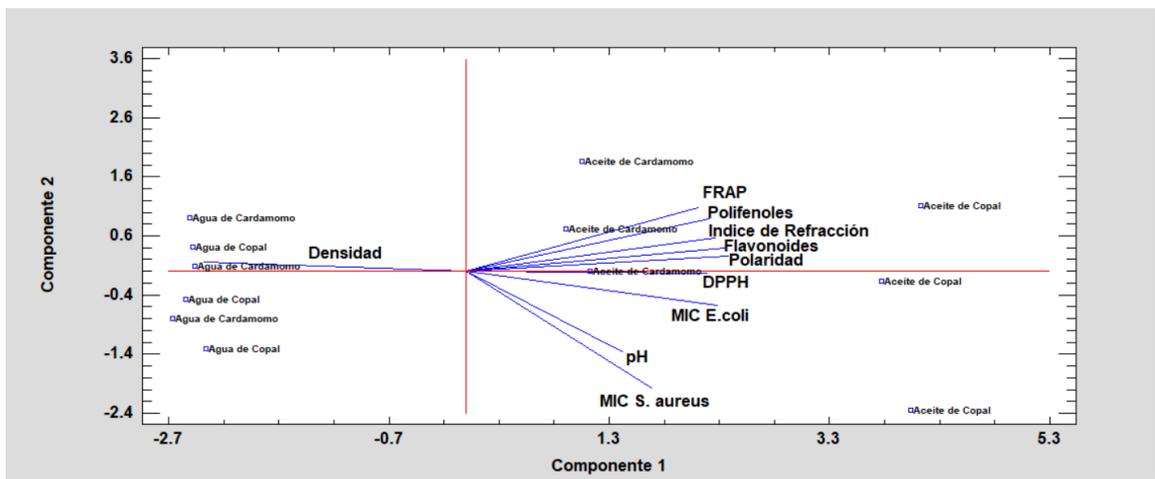


Figura 7: Análisis de componentes principales para cada una de las muestras de aceite esencial y agua floral evaluadas

(Fuente: Elaboración propia)

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de esta investigación era estudiar la extracción de aceite esencial y agua floral de la capsula de *Elettaria cardamomum* (cardamomo) y de la resina de *Bursera copallifera* (copal) por arrastre de vapor y solventes, en términos de rendimiento, propiedades fisicoquímicas, volátiles, antioxidantes y antimicrobianas para su uso como preservante alimentario. Una vez obtenidos los resultados de cada uno de los análisis realizados en triplicado, se determinó la media y desviación estándar para cada parámetro, al mismo tiempo que se estableció si existía o no una diferencia estadísticamente significativa entre cada uno. Sin mencionar que a su vez se realizó un análisis de componentes principales.

Como resultado, en el Cuadro 1 es posible observar los parámetros fisicoquímicos determinados para cada una de las cuatro diferentes muestras. Iniciando por el rendimiento, para el caso de la extracción por arrastre de vapor, el valor obtenido para el aceite esencial de cardamomo fue de  $0.734 \pm 0.349\%$  y de  $1.50 \pm 1.39\%$  para el aceite esencial de resina de copal. En primer lugar, se debe mencionar que estos datos no muestran diferencias significativas entre sí, por lo que se puede afirmar que la materia utilizada para la extracción no es una fuente de variación que deba considerarse para la metodología. Por otro lado, se debe notar que en ambos casos las desviaciones estándar son elevadas, lo que indica que los datos obtenidos en cada replica se encuentran bastante dispersos entre sí. Esto puede atribuirse al hecho de que hubo variaciones en la cantidad de muestra introducida y el tiempo de ciclo a medida que se perfeccionaba el método. Sin mencionar, que, en el caso del cardamomo, en las primeras repeticiones se utilizaron semillas totalmente molidas, sin embargo, se observó que esto dañaba la partícula y no permitía una penetración total de vapor y por lo mismo se obtenían mínimas cantidades del aceite.

Ahora bien, en cuanto a los rendimientos obtenidos, estos se encuentran por debajo de los datos observados en la literatura, los cuales oscilan entre 6.00 y 14.0%. En ambos casos, esto puede atribuirse al hecho de que las muestras utilizadas no eran recientes ni se encontraban frescas, lo que puede causar un deterioro en sus propiedades y a su vez afectar el contenido de aceite esencial en su interior. En el caso del cardamomo, esto también puede deberse a las condiciones de almacenamiento, pues a pesar de que se encontraba aislado de la luz, la humedad pudo contribuir de igual forma a su deterioro, al ser una bolsa su única barrera de protección. Por otro lado, de igual forma se debe mencionar que la calidad del cardamomo y variedad puede ser una fuente de variación en este parámetro, por lo que en futuras experimentaciones se recomienda evaluar diferentes rangos de calidad y variedades para descartar que la muestra sea la causante de la

obtención de estos valores. O bien, se puede aplicar un método de deshidratación por pergamino a temperaturas controladas para que la humedad no cause interferencia (Espina, 2014).

Al mismo tiempo, se debe notar que para las aguas florales no se reportó un valor de rendimiento. Esto a raíz de que es un valor dependiente al total de agua que fluye durante toda la operación dentro del equipo. De modo que no puede cuantificarse a partir de la materia prima, como con los aceites esenciales, y se obtiene en grandes volúmenes.

En el caso de la extracción por solventes, esta metodología no presentó resultados a raíz de que después de varias réplicas no se logró la obtención de los aceites esenciales. Al igual que en el método anterior, esto puede atribuirse al deterioro que presentaban las muestras utilizadas. Pues a pesar de que se emplearan ciclos de la misma duración, 10 horas, no se lograba la extracción de la sustancia de interés. Esto se debe a que, al momento de realizar la separación del solvente del aceite, por evaporación del hexano, se obtenía un líquido viscoso y quemado a raíz de que no se empleaban temperaturas controladas. Al contrario, si se efectuaba por medio de rotavapor, el producto obtenido no tenía la coloración característica de los aceites, era más oscuro y no presentaba el aroma buscado. Por lo que se definió que no era aceite esencial, sin mencionar que únicamente se lograba la extracción de menos de 1 mL después cada ciclo.

A raíz de los problemas evidenciados en el método se intentó efectuar la extracción a través de un equipo Soxhlet utilizado para la extracción de grasas en matrices alimentarias. El procedimiento era bastante similar, a excepción de que los ciclos eran de 4 horas. Sin embargo, a pesar de que en este caso si se logró efectuar una extracción, la materia grasa obtenida se solidificaba y no era posible utilizarla para los análisis posteriores. De modo que esta metodología no brindó resultados y para este estudio demostró ser menos efectiva que el arrastre de vapor. De igual forma, se debe resaltar que, a pesar de lo observado, en otras investigaciones se ha demostrado que este método presenta altos rendimientos y es replicable. Además, al haberse utilizado hexano, uno de los pocos solventes autorizados para la extracción en alimentos, se recomienda profundizar su estudio. Por lo mismo, si se desea replicar la metodología, se sugiere someter las muestras a un baño ultrasónico para estimular las semillas y lograr elevar el rendimiento (Government of Canada, 2016).

En cuanto al resto de parámetros fisicoquímicos, en el caso del pH es posible observar que se obtuvieron valores significativamente diferentes entre cada una de las diferentes muestras, siendo de  $4.16 \pm 0.030$  para el aceite de cardamomo,  $4.91 \pm 0.010$  para el aceite de copal,  $3.98 \pm 0.020$  para el agua floral de cardamomo y  $4.60 \pm 0.020$  para el agua floral de copal. En primer lugar, es posible notar que las desviaciones estándar para cada dato no son elevadas, lo que indica que los resultados para cada medición estuvieron bastante cercanos entre sí, reduciendo así la existencia de fuentes de error y demostrando su replicabilidad. Además, en el caso del cardamomo, el valor obtenido es menor al máximo de pH 6 esperado para las variedades extraídas en Guatemala, por lo que se puede afirmar que cumple con los parámetros de calidad. Mientras que, para el copal, se encuentra por debajo del rango de 5.8 a 6 visualizado en otros aceites. De igual forma, se debe resaltar que todos los valores obtenidos indican un potencial de hidrógeno ácido, por lo que en futuras experimentaciones debería evaluarse si el pH de la matriz alimentaria a utilizar tiene relación con el del conservante que se desea desarrollar, pues de ser así debería indicarse que su funcionamiento se da únicamente en medios no alcalinos (ISO, 2004).

En términos de la densidad, para todas las muestras los valores obtenidos se encontraban contenidos en un rango de 0.800 a 1.00 g/mL. Siendo estos de  $0.921 \pm 0.000197$  g/mL para el aceite de cardamomo,  $0.824 \pm 0.000120$  g/mL para el aceite de resina de copal,  $1.00 \pm 0.000789$  g/mL para el agua de cardamomo y  $1.00 \pm 0.000193$  g/mL para el agua de copal. Nuevamente, a simple vista pueden observarse las cifras mínimas de desviación estándar obtenidas, lo que indica que en todas las mediciones los datos eran bastante cercanos entre sí y el método es replicable. En cuanto a las diferencias estadísticamente significativas, en la prueba de múltiples rangos se determinó que ambas aguas florales no mostraban diferencia. Lo cual puede deberse a que no son diferentes al agua y contienen una mínima cantidad de compuestos volátiles que le otorgan su aroma y turbidez características, los cuales fueron obtenidos durante el proceso de arrastre de vapor. En el caso de los aceites, el de cardamomo fue el más denso, lo que indica que un mayor peso equivale al mismo volumen. De igual forma, se debe indicar que siguiendo con la normativa ISO 4733 para dicho aceite, el valor promedio obtenido se encuentra en el rango establecido para el aceite esencial extraído de semillas cultivadas en Guatemala, el cual va de 0.920 a 0.940 g/mL. Mientras que, para el aceite de copal, la cifra obtenida es bastante cercana a lo encontrado en literatura, en donde se ha reportado un promedio de  $0.8456 \pm 0.0023$  g/mL (ISO, 2004); (Valarezo, et al. 2020).

Para el índice de refracción, los valores obtenidos fueron de  $1.46 \pm 0.000458$  para el aceite de cardamomo,  $1.47 \pm 0.000600$  para el aceite de resina de copal,  $1.33 \pm 0.000600$  para el agua floral de cardamomo y  $1.33 \pm 0.000100$ . Como se ha expuesto anteriormente, los valores de desviación estándar son los suficientemente bajos como para demostrar que el método es replicable y los datos no se encuentran dispersos. Además, nuevamente no se observó una diferencia significativa entre las aguas florales, lo cual se debe a que ambas son sumamente parecidas al agua pura, pues la cifra determinada es la teóricamente establecida para dicha sustancia. En cuanto a los aceites esenciales, en el caso del cardamomo, el dato se encontraba dentro del rango de 1.460 y 1.467, establecido por la normativa ISO previamente mencionada. Mientras que para el de copal, de igual forma se encontraba bastante cercano al valor de literatura de 1.475. En ambos casos, ya que los valores son similares, esto indica que la luz viaja a rapidezces parecidas en las dos sustancias (ISO, 2004); (Valarezo, et al. 2020).

Por otro lado, para la rotación óptica, se obtuvieron valores de  $22.7 \pm 1.15$  ° para el aceite de cardamomo,  $34.7 \pm 1.53$  ° para el aceite de resina de copal,  $3.67 \pm 0.577$  ° para el agua floral de cardamomo y  $2.67 \pm 0.577$  para el agua floral de copal. En este caso, a raíz de que el equipo de medición no presentaba cifras decimales, las desviaciones estándar son ligeramente elevadas en comparación con los demás parámetros fisicoquímicos previamente mencionados, pero aún son lo suficientemente bajas como para demostrar que el método fue eficiente y los datos no se encuentran ampliamente dispersos entre sí. Para las aguas florales, nuevamente no se observa una diferencia estadísticamente significativa, por lo que presentan la misma rotación en un plano de luz polarizada. En el caso del aceite de cardamomo, el valor observado se encuentra por debajo del rango de 24 a 39° reportado por la normativa ISO 4733. Mientras que, para el aceite de resina de copal, la cifra determinada está por encima de lo encontrado en literatura, lo cual va de 12.2 a 14 °. En ambos casos, debido a que la rotación óptica es una medida de pureza, esto quiere decir que las sustancias extraídas no son lo suficientemente puras. Lo que puede deberse a la calidad de las semillas o resinas o bien, del método utilizado y los rendimientos obtenidos. De igual forma, se debe notar que al ser

más alto el valor del aceite de resina de copal, esto indica que es un líquido que se encuentra más concentrado, lo que puede atribuirse a que la extracción se efectuó de una materia que se volvía líquida en presencia de calor y la penetración de vapor sucedía de forma más directa (ISO, 2004); (Valarezo, et al. 2020).

Ahora bien, en cuanto al análisis de compuestos volátiles, en el Cuadro 2 es posible observar los resultados obtenidos para cada una de las diferentes muestras. Es importante tomar en consideración que esta metodología también se utiliza para verificar la pureza de las muestras, por lo que la ausencia o bajo porcentaje de compuestos requeridos por la literatura, podría denotar que los aceites extraídos carecen de dicho parámetro. En el caso del aceite de cardamomo, a simple vista se puede notar que el compuesto mayoritario es el 1,8 cineol o Eucaliptol con una presencia de 33.11%, lo cual es deseable a raíz de que es uno de los principales responsables en otorgarle el aroma característico a la sustancia. De igual forma, al verificar la normativa ISO 4733, es posible ver que dicho valor se encuentra entre el rango establecido para Guatemala, el cual va de 27 a 35%. Por otro lado, el otro compuesto principal que se buscaba era el acetato de terpenilo, el cual debía estar en una proporción de 35 a 45%. Sin embargo, en su lugar se obtuvo Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilideno)-, en un 26.73%. Este es similar al terpinoleno, por lo que puede ser el causante del color ligeramente ámbar observado en el aceite esencial y a su vez del aroma frutal. De todas maneras, la ausencia de dicho compuesto puede denotar y apoyar lo expuesto con anterioridad, en donde se explica que el aceite extraído no demuestra los niveles de pureza deseados (ISO, 2004).

Para el resto de los elementos, en el Cuadro 4 de anexos, es posible observar que se identificaron diversos compuestos secundarios encontrados en la literatura. Entre los cuales resalta el  $\alpha$  y  $\beta$  pineno y el limoneno. Sin embargo, hay ausencia de monoterpenos como el  $\alpha$  Sabineno, terpenos oxigenados como el eugenol y terpenos esterificados como el acetato de geranilo, entre otros. Lo cual a su vez apoya y refirma la falta de pureza y calidad observada en el aceite esencial. En futuras experimentaciones se recomienda efectuar un análisis de la composición química de las semillas de cardamomo, esto con el fin de verificar que los compuestos mayoritarios no se encuentran en la muestra y así asegurar que el problema de calidad viene desde la semilla (Mendizábal y Rolz, 2021).

En cuanto al aceite de resina de copal, los compuestos mayoritarios observados fueron el  $\beta$  Felandreno con un 55.97% y el Limoneno con un 14.71%. En un análisis de composición química efectuado a otra variante del copal, siendo esta *Dacryodes peruviana*, se determinó como compuesto mayoritario el  $\alpha$  Felandreno con una proporción del 50.32%, por lo que a pesar de que no es exactamente el mismo mono terpeno cíclico, se puede notar que el Felandreno sí forma una parte principal de estos aceites y en proporciones similares. Dicho compuesto contribuye al aroma frutal y amaderado que posee la sustancia. En el caso del Limoneno, este compuesto también fue el segundo mayoritario en lo reportado en la literatura, sin embargo, en dicha investigación se reportó un porcentaje de 23.03%. Se debe mencionar que este es característico por un aroma cítrico y es común encontrarlo en diversos aceites esenciales. El resto de los compuestos como el  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, Careno, Mirceno y Terpenol también se encontraban en ambas variantes del copal, por lo que es posible afirmar que los aceites eran bastante similares. Sin embargo, es importante resaltar que las variaciones de proporción entre cada elemento pueden atribuirse al hecho de que en el estudio consultado la extracción se efectuó directamente del fruto, mientras que aquí se hizo a partir de la

resina. De igual forma, contrario al cardamomo, actualmente no existen estándares de calidad que evalúen los aceites esenciales de este tipo. Por lo que no es posible concluir en su totalidad acerca de la pureza (Valarezo, et al. 2020).

Para el agua floral de cardamomo, se observó que su composición se basaba en un 95.67% de agua y un 4.330% de 1, 8 cineol. Esto era de esperarse debido a que las aguas florales retienen una mínima cantidad de los compuestos contenidos en la matriz a la que se le está efectuando la extracción. En este caso, solo se conservó el componente mayoritario observado en el aceite esencial, lo cual a su vez explica el aroma característico de esta sustancia. En el caso del agua floral de resina de copal, es posible notar una proporción menor de agua, con un 71.44%, lo cual puede atribuirse a lo mencionado anteriormente, donde se explicaba que el aceite de esta materia orgánica se encontraba más concentrado a raíz de que no es un sólido a altas temperaturas y permite una mayor penetración de vapor. Ahora bien, es importante notar que el agua no posee ni retuvo ninguno de los componentes principales presentes en el aceite esencial. Esto se debe a que el agua y el aceite fueron extraídos de distintas muestras de resina de copal, siendo la del aceite la más fresca y reciente. De modo que al no contar con  $\beta$  Felandreno, puede asumirse que el aceite extraído con la resina de copal que no era fresca sería de una menor calidad y a su vez no contaría con los aromas característicos en la intensidad deseada.

En términos de la actividad antioxidante, en la Figura 3 es posible observar los resultados para las diversas muestras con el indicador DPPH. En este caso, se obtuvo un porcentaje de inhibición de  $86.99 \pm 1.651$  y una concentración de  $0.0036 \pm 0.0001$  mg de ácido gálico equivalente/mL de muestra para el aceite de cardamomo. Así como un  $92.98 \pm 1.4806\%$  de inhibición y  $0.0038 \pm 0.0001$  de mg de ácido gálico equivalente/mL de muestra para el aceite de resina de copal. Junto con un  $84.08 \pm 0.0001$ ,  $80.33 \pm 1.226\%$  y  $0.0035 \pm 0.0001$ ,  $0.0033 \pm 0.0001$  mg de ácido gálico equivalente/mL para las aguas florales de cardamomo y resina de copal. A simple vista se observan bajos valores de desviación estándar, indicando un método replicable con datos que no exhiben una dispersión. Al mismo tiempo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el agua floral de cardamomo y el aceite de cardamomo, al igual que entre ambas aguas florales. Sin embargo, con los porcentajes de inhibición establecidos, los cuales son elevados, en esta metodología, todas las muestras presentan actividad antioxidante. Esto implica que las aguas florales son capaces de retener los compuestos responsables de esta característica, siendo estos los mono terpenos o fenoles, como el ácido ftálico presente en el agua floral de copal. Aun así, la muestra más indicada para prevenir oxidación sería el aceite esencial de resina de copal a raíz de lo observado y su diferencia estadísticamente significativa. Pero, se debe considerar que, según lo reportado en la literatura, para el aceite de cardamomo se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición usando únicamente 200  $\mu$ L de muestra en comparación de lo previamente establecido de 56.34% con 500  $\mu$ L (Ayala y Murillo, 2015; Valarezo, et al. 2020; Ivanovic, et al. 2021).

En el caso del análisis FRAP, en la Figura 4 se observa que los resultados obtenidos fueron de  $1.380 \pm 0.4662$  mg de trolox equivalente/mL de muestra para el aceite esencial de cardamomo,  $1.815 \pm 0.8486$ ,  $0.1452 \pm 0.0575$  y  $0.1497 \pm 0.0134$  mg de trolox equivalente/mL de muestra para el aceite de resina de copal, agua floral de cardamomo y de resina de copal. Aquí es posible observar que las desviaciones estándar son ligeramente elevadas, lo que indica una dispersión de los datos

determinados a raíz de variaciones en las mediciones causadas por la inestabilidad de las muestras al presentar una parte grasa que dificultaba la obtención de una mezcla homogénea. Por otro lado, en esta metodología no hubo una muestra que difiriera estadísticamente del resto, por lo que la actividad antioxidante de los aceites no varía significativamente, al igual que la del aceite de cardamomo de las aguas florales.

Sin embargo, de forma general, es posible observar que ambos tipos de aceites esenciales exhiben una alta capacidad antioxidante al reducir el ion de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Esto se puede afirmar al comparar los resultados con otras sustancias de la misma índole, pues en un estudio se reportó que tanto el aceite esencial de comino, como el de ajo, menta, hierba de limón, canela, lavanda, geranio y eucalipto presentaban menos de 1.250 mg de trolox equivalente/mL de muestra. Lo que ubicaría al copal y cardamomo por encima de estos líquidos con una notable y mayor actividad antioxidante. Colocándose únicamente por debajo del clavo de olor y tomillo, los cuales poseían cerca de 4.000 mg de trolox equivalente/mL de muestra. Los mismos resultados se obtuvieron en dicha investigación para el indicador DPPH, por lo que se podría afirmar que ambos aceites esenciales estudiadas resultarían de utilidad para retardar la oxidación en matrices alimentarias y a su vez muestran un mayor poder que varias opciones en el mercado. Por otro lado, para las aguas florales, nuevamente se observa una baja actividad antioxidante, lo cual se atribuye a lo explicado anteriormente y al hecho de que únicamente retienen una mínima cantidad de mono terpenos y fenoles. Aun así, muestran un mayor poder que el del aceite esencial de eucalipto, el cual es menor a 0.1000 mg de trolox equivalente/mL de muestra (Nazeam, et al. 2021).

En términos del análisis de polifenoles, en la Figura 5 se visualiza que como resultado se obtuvieron  $0.1042 \pm 0.0098$  mg ácido gálico equivalente/mL de muestra para el aceite esencial de cardamomo, así como  $0.1061 \pm 0.0073$ ,  $0.0108 \pm 0.0002$  y  $0.0109 \pm 0.0008$  mg ácido gálico equivalente/mL de muestra para el aceite esencial de resina de copal y aguas florales de ambas sustancias. En este caso las desviaciones estándar si son lo suficientemente bajas como para denotar que la metodología es replicable y los datos no se encuentran dispersos entre sí. De igual forma, en esta ocasión no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los aceites esenciales ni entre las aguas florales, por lo que, para cada caso, exhiben un contenido total de polifenoles similar. Por otro lado, de forma general se debe notar que los valores determinados son bastante bajos, por lo que la actividad antioxidante que ha presentado cada muestra en los indicadores anteriores no puede atribuirse a los polifenoles, en cambio debe ser a otro tipo de compuesto que tenga la capacidad de donar átomos de hidrógeno a radicales libres. Sin embargo, las cifras obtenidas no son comunes para los aceites esenciales, pues en otros estudios se han observado de 33.45 a 20.36 mg ácido gálico equivalente/mL de muestra para el cardamomo. Y tomando esto en consideración el aceite esencial de resina de copal debería demostrar un valor mayor a dicho 33.45. Esto puede deberse al hecho de que, como se ha mencionado con anterioridad, la muestra no era fresca y los polifenoles son compuestos que se degradan en función del tiempo, por lo que los valores obtenidos serían significativamente bajos al tener un tiempo de almacenamiento de más de 6 meses. Aun así, es necesario verificar que la metodología sea replicable y brinde los mismos resultados. De ser así, en futuras experimentaciones se recomienda probar distintas concentraciones de aceite esencial, pues puede que la utilizada no haya sido suficiente para demostrar un contenido de polifenoles que se relacione con la capacidad antioxidante mostrada anteriormente (Tarfaoui, et al. 2022).

Ahora bien, en el caso del contenido total de flavonoides, en la Figura 6 se observaron  $209.7 \pm 362.3$  mg quercetina equivalente/mL de muestra para el aceite esencial de cardamomo,  $331.3 \pm 327.8$  mg quercetina equivalente/mL de muestra para el aceite esencial de resina de copal y  $0.4932 \pm 0.0426$ ,  $0.7023 \pm 0.0213$  8 mg quercetina equivalente/mL de muestra para las respectivas aguas florales. Aquí, las desviaciones estándar no son lo suficientemente elevadas como para demostrar que el método no es replicable y los datos no muestran bastante dispersión. De igual forma, en esta ocasión únicamente las aguas florales no exhibieron una diferencia estadísticamente significativa. Por lo que para los aceites esenciales se puede afirmar que el extraído de la resina de copal presenta un mayor y elevado contenido.

Al contrario de lo observado en los polifenoles, en este caso el poder antioxidante determinado con los indicadores DPPH y FRAP puede atribuirse al contenido total de flavonoides. Pues tiene correlación al demostrar que el aceite de copal es el de la mayor actividad antioxidante, seguido del aceite esencial de cardamomo, el agua floral de copal y por último la de cardamomo. Así mismo, los datos obtenidos para el aceite esencial de cardamomo tienen relación con lo encontrado en la literatura, en donde en múltiples ocasiones se ha estimado que el contenido total de dichos compuestos es de 14.63 g/100 g de cardamomo, lo cual, utilizando la densidad calculada previamente, se traduciría a 158.9 mg/mL de muestra y se encuentra bastante cercano a lo determinado (Singh, et al. 2018).

Por otro lado, en el caso de la capacidad antimicrobiana, en el Cuadro 3 es posible observar las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para cada una de las diferentes muestras y los dos microorganismos evaluados. En este caso, las desviaciones estándar calculadas son lo suficientemente bajas como para demostrar que el método aplicado es replicable y los datos establecidos no muestran una dispersión excesiva que pudiera indicar la presencia de fuentes de error. Para la bacteria gram negativa *E.coli*, de forma visual y con ayuda del indicador colorimétrico TTC, se identificó que el aceite esencial de cardamomo era capaz de evitar el crecimiento de dicho microorganismo con una concentración mínima de 62.5  $\mu\text{L/mL}$ , mientras que para el aceite esencial de resina de copal se requerían por lo menos 250  $\mu\text{L/mL}$ . De modo que es posible afirmar que para esta bacteria el aceite de cardamomo posee una mayor capacidad antimicrobiana, pero, ambos podrían utilizarse como antimicrobianos, únicamente en dosis diferentes. Esto al contrario de las aguas florales, las cuales no presentaron inhibición a ninguna de las concentraciones evaluadas.

De igual forma, se debe mencionar que los valores obtenidos son más grandes que las concentraciones mínimas inhibitorias encontradas en la literatura, los cuales para el aceite esencial de cardamomo van de 1.00 a 8.00  $\mu\text{L/mL}$  y para el aceite de resina de copal son de aproximadamente 2.5  $\mu\text{L/mL}$ . Esto puede deberse al estado de frescura de la muestra y a la pérdida de esta capacidad en función del tiempo. De igual forma, es necesario verificar la precisión de la metodología efectuada para descartar que los crecimientos observados en la placa sean a raíz de una contaminación externa. Sin mencionar que en futuras experimentaciones se recomienda calcular el porcentaje de inhibición para un 50 y 90% de crecimiento, de esta forma se tendrá otra fuente de comparación para comprobar la capacidad antimicrobiana de estas sustancias (Valarezo, et al. 2020).

En el caso del *S. Aureus*, para el aceite esencial de cardamomo se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 15.6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y de 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para el aceite esencial de resina de copal. Nuevamente las desviaciones estándar son lo suficientemente reducidas como para asegurar que el método es replicable. Por otro lado, las aguas florales no mostraron capacidad inhibitoria a ninguna concentración, siendo la máxima de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , por lo mismo no presentan una diferencia estadísticamente significativa. Bajo el mismo orden de ideas, otra vez es posible observar que el aceite esencial de cardamomo presenta una actividad antimicrobiana superior que el aceite de resina de copal, tanto para las bacterias gram negativas como para las gram positivas. Al mismo tiempo, también posee, una mayor capacidad que el aceite esencial de eucalipto, lavanda, romero y del árbol de té. Los cuales, según lo encontrado en la literatura, no presentaron inhibición ante el crecimiento de dicho microorganismo a una concentración de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Este fenómeno puede deberse al hecho de que, como se observó en el análisis volátil, el aceite esencial de cardamomo es rico en terpenos, los cuales han sido ubicados por sus altas propiedades antimicrobianas en resistencia a diversos patógenos responsables de deterioro. Lo cual también confirmaría el hecho de que las aguas florales no poseen actividad, pues presentaron una mínima cantidad de dichos compuestos de interés (Puvaca, et al. 2021); (Safaei, J., et al. 2010).

Finalmente, para el análisis de componentes principales, el cual puede observarse en las Figuras 4, 5 y 6, se observó que existía una correlación entre los parámetros de actividad antimicrobiana y pH, lo que podría indicar que este valor debe considerarse al seleccionar la bacteria, puesto que la concentración mínima inhibitoria podría verse afectada por el medio, siendo este ácido o básico. Según lo observado, los valores de pH más ácido presentaron la mayor capacidad antimicrobiana, esto siempre y cuando contarán con una elevada cantidad de compuestos que lo otorgarán esta característica, esto al contrario de las aguas florales. Por otro lado, también se observó una relación para la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos de índice de refracción y polarimetría. En este caso, para los valores más altos de ambas propiedades se observó una mayor actividad antioxidante, lo que podría sugerir que la velocidad en la que viaja la luz y el nivel de pureza de una sustancia son relevantes para mejorar la capacidad de donar átomos de hidrogeno a radicales libres. Por último, no se observó que la densidad estuviera relacionada a ninguno de los parámetros evaluados. Sin mencionar que las correlaciones observadas únicamente aplican a los aceites esenciales, puesto a que las aguas florales se encuentran en otros cuadrantes.

## 10. CONCLUSIONES

1. El método de extracción que presentó los mejores rendimientos para el aceite esencial de cardamomo y de resina de copal fue el de arrastre vapor a raíz de que fue el único que permitió la obtención de las sustancias con los parámetros organolépticos deseados. Sin embargo, la eficiencia de la metodología se vio influenciada por la calidad y nivel de frescura de las muestras, pues al no ser recientes sus propiedades se veían afectadas por condiciones de almacenamiento como la humedad.
2. Al contrario del aceite esencial de resina de copal, el extraído de la semilla de cardamomo presentó únicamente uno de los componentes volátiles mayoritarios característicos de esta sustancia, siendo este el eucaliptol. La ausencia de terpenilo junto con la obtención de una rotación óptica fuera del rango establecido en la normativa ISO 4733 indica que la muestra extraída no cuenta con los niveles de pureza esperados, lo cual puede atribuirse a la calidad y frescura de las semillas utilizadas.
3. Las aguas florales de cardamomo y resina de copal presentaron una mínima cantidad de compuestos volátiles y se componían principalmente de agua, lo que indica que durante el proceso de extracción solo retienen algunos de los elementos principales del aceite esencial.
4. Tanto las muestras de aceites esenciales como de aguas florales presentaron actividad antioxidante, siendo el aceite de resina de copal el que la demostró en mayor grado. Esto indica que posee una capacidad mayor de donar átomos de hidrógenos a radicales libres y prevenir el proceso de oxidación, lo cual puede atribuirse a su alto contenido de flavonoides.
5. El aceite esencial de cardamomo presentó la mayor actividad antimicrobiana para la bacteria gram negativa *E. coli* y la gram positiva *S.aureus*. Esto al denotar las concentraciones mínimas inhibitorias más reducidas, lo que puede atribuirse su alto contenido de terpenos, los cuales son compuestos con propiedades antimicrobianas. De igual forma, se estableció que únicamente las muestras de aceites esenciales presentaron dicha actividad, lo que sugiere que las aguas florales no son capaces de retener, en una proporción suficiente, los compuestos que otorgan esta propiedad.

6. Se determinó la existencia de una correlación entre el pH de las muestras y la capacidad antimicrobiana, lo que sugiera que la actividad aumenta en sustancias con mayor acidez. De igual forma se estableció otra correlación entre el índice de refracción y la rotación óptica, lo que sugiere que, a mayor pureza y velocidad de la luz para viajar en las sustancias, mayor capacidad antioxidante.
  
7. El aceite esencial de cardamomo y resina de copal pueden utilizarse como preservantes naturales en alimentos debido a que ambos poseen capacidades antioxidantes y antimicrobianas. Mientras que las aguas florales de cardamomo y resina de copal pueden emplearse únicamente como antioxidantes de fuentes naturales a raíz de que demuestran indicios de actividad antioxidante.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Realizar un secado o deshidratación de las semillas de cardamomo previo al proceso de extracción, así como evaluar diversas calidades del producto y no emplear muestras con más de 1 mes de almacenamiento, puesto que puede afectar la pureza de los aceites esenciales obtenidos.
2. Profundizar en el estudio de extracción de aceites esenciales por el método de solventes, esto incorporando el de paso de someter las muestras a un baño ultrasónico para estimular las semillas o resina y así lograr elevar el rendimiento.
3. Utilizar un mayor rango de concentraciones para la comprobación de la capacidad antimicrobiana, así como calcular los porcentajes de inhibición y las proporciones que inhibirían el 50 y 90% de crecimiento. Además de probar otros análisis adicionales como la del halo de inhibición.
4. Comprobar la actividad antimicrobiana en una mayor gama de bacterias gram positivas y gram negativas, así como en mohos y levaduras.
5. Probar ambos aceites esenciales, por separado y en combinación, en una matriz alimentaria para comprobar sus capacidades antioxidantes y antimicrobianas en un periodo de tiempo definido.
6. Comparar la actividad antioxidante y antimicrobiana de todas las muestras, en una matriz alimentaria, con preservantes de origen sintético.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Albarracín, W., et al. (2012). Aplicación de aceites esenciales como conservantes para mejorar el tiempo de vida útil en tilapia nilótica (*Oreochro misniloticus*). *Vitae*, 19(1). 121 – 132.

Argote, F., et al. (2016). Estudio de mercado y conservación de carne de pescado mediante aceites esenciales. *Revista Investigación Pecuaria, suplemento*. 95 – 96.

Argote, F., et al. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2(1). 52 – 60.

Ayala, X., & Murillo, H. (2015). Procesamiento, caracterización y extracción del aceite esencial de Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) enfocado en la Industria [Tesis de pregrado]. Universidad de Guayaquil.

Balouiri, M., et al. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2016). 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Barragan, A., et al. (2016). Investigación sobre la formulación y elaboración de Néctar con Cardamomo. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 1(1). 8-20.

Bampidis, V., Azimonti, G., de Lourdes Bastos, M., Christensen, H., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R., Woutersen, R., Brantom, P., Chesson, A., Kolar, B., ... Dusemund, B. (2019). Safety and efficacy of an essential oil from *Elettaria cardamomum* (L.) Maton when used as a sensory additive in feed for all animal species. *EFSA Journal*, 17(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5721>

Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios [CEAA]. (2021). *Determinación de actividad antioxidante*. Instituto de Investigaciones Universidad del Valle de Guatemala. Primera edición. LAA-PTE -032. 1 - 4.

Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios [CEAA]. (2021). *Determinación del poder reductor: método FRAP*. Instituto de Investigaciones Universidad del Valle de Guatemala. Primera edición. PFRAP-018. 1 - 4.

Colmenares de Ruíz, A. S., Mendizábal de Montenegro, A., Bran, M. J., & Rodrigues, E. (2021). Caracterización fisicoquímica de la cápsula de la semilla de cardamomo (*Tlatarria dardamomun*) cultivado en la zona norte de Guatemala. *Revista Universidad Del Valle de Guatemala*, 41, 117.

Dolati, M., et al. (2016). Study of the Effects of Essential Oils of Cumin, Savory and Cardamom as Natural Antioxidants on the Flavor and Oxidative Stability of Soybean Oil During the Storage. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(1), 176-184. DOI: 10.1080/0972060X.2014.935030

Eslava, L., Fajardo, E. (2020). Obtención de un aceite esencial a partir de la semilla del mango utilizando el método de extracción con solventes. [Tesis de pregrado]. Fundación Universidad de América.

Espina, S. (2014). Evaluación del rendimiento extractivo y caracterización fisicoquímica del aceite esencial de cardamomo (*Elettaria cardamomum*, L. Maton) de primera, segunda y tercera calidad mediante el método de hidrodestilación a escala laboratorio [Tesis de pregrado]. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Golmakani, M., Moayyedi, M. (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave- assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food Science & Nutrition*, 3(6). 506-518.

Government of Canada. (2016). *List of Permitted Carrier or Extraction Solvents (Lists of Permitted Food Additives)*. Extraído de: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/15-carrier-extraction-solvents.html>

Hernández, U. (2019). Obtención de aceite esencial de salvia (*Buddleja Perfoliata*) mediante el proceso de extracción por arrastre de vapor y evaluación de su actividad antioxidante [Tesis de pregrado]. Universidad Autónoma de Puebla, México.

Hien, T., et al. (2018). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Essential Oil from Vietnamese Basil (*Ocimum basilicum* L.) Using Response Surface Methodology. *Processes MDPI*, 6(206). 2-12.

Internacional Organization for Standardization [ISO]. (2004). *Oil of cardamom [Elettaria cardamomum (L.) Maton]*. ISO 4437. Extraído de: <https://www.sis.se/api/document/preview/904961/>

Ivanović, M., Makoter, K., & Razboršek, M. I. (2021). Comparative Study of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils and Crude Extracts of Four Characteristic Zingiberaceae Herbs. *Plants* 10(3). 501 - 519. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10030501>

Khairullah, N., et al. (2016). The Effects of Different Extraction Methods on Antioxidant Properties, Chemical Composition, and Thermal Behavior of Black Seed (*Nigella sativa* L.) Oil. *Hindawi* 16(1). 1 - 10. <https://doi.org/10.1155/2016/6273817>

Luiz Franco, O., Viana, J., Kumar, P., Imran, M., Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Khan, S. U., Ihsan, A., Javed, S., Bokhari, H., & Hospital, A.-S. (2016). Encapsulation of Cardamom Essential Oil in Chitosan Nanocomposites: In-vitro Efficacy on Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens and Cytotoxicity Studies. *Frontiers in Microbiology*, 7(1). 1 - 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01580>

- Marongiu, B., Piras, A., & Porcedda, S. (2004). Comparative analysis of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Elettaria cardamomum* (L). *Maton. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6278–6282. <https://doi.org/10.1021/jf034819i>
- Mbacké, S., et al. (2018). Chemical composition of essential oils and floral waters of *Ocimum basilicum* L. from Dakar and Kaolack regions, Senegal. *Journal of essential oil-bearing plants*, 21(2018). 1-8.
- Mendizabal, A., Rolz, C. (2021). Composición química del aceite volátil del cardamomo, *Elettaria cardamomum* (L.) *Maton. Revista de la Universidad del Valle de Guatemala* 2021(41). 140 - 170.
- Nazeam, J., et al. (2021). Topical Nano Clove/Thyme Gel Against Genetically Identified Clinical Skin Isolates: In Vivo Targeting Behavioural Alteration and IGF-1/pFOXO-1/PPAR  $\gamma$  Cues. *Molecules*, 26 (5608). 1 – 21. <https://doi.org/10.3390/molecules26185608>
- Palazzolo, E., Armando Laudicina, V., & Antonietta Germanà, M. (2013). Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042–3049. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990122>
- Peguero, I. (2020). Aceites Esenciales para Cuerpo y Mente. Independently Published. ISBN: B087CRP3Z7.
- Peters, M. (2016). Essential Oils: Historical Significance, Chemical Composition, and Medicinal Uses and Benefits. *Chemistry Research and Applications*. Nova. ISBN: 978-1-63484-351-5
- Puvaca, N., et al. (2021). Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Selected Pathogenic Bacteria: In Vitro Study. *Antibiotics* 10(546). 2-14.
- Ramírez, K. (2019). Evaluación comparativa de la calidad y rendimiento de la oleoresina de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) obtenida a nivel laboratorio utilizando materia prima sana y materia prima infestada con trips (*Frankliniella occidentalis*) [Tesis de pregrado]. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ríos, L., et al. (2007). Extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *DYNA*, 74(151). 47 - 52.
- Safaei, J., et al. (2010). Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag.* 6(23): 172–175.
- Sarac, H. (2021). Bioactive components and biological activities of the cardamom (*Elettaria cardamomum* L.) *Research & Reviews in Science and Mathematics*. Gece Kitapligi. Turquía. 91 – 108.
- Singh, R., et al. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of green cardamom and rosemary extract in food products: A brief review. *The Pharma Innovation Journal*, 7(6): 568-573.
- Tafoya, N. (2013). *Extracción del aceite de copal y su aplicación en productos cosméticos* [Tesis de pregrado]. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas.

Tarfaoui, K., et al. (2022). Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Potential of Zingiber officinale Roscoe and Elettaria cardamomum (L.) Maton Essential Oils and Extracts. *Plants*, 11(1487). 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/plants11111487>

Trujillo, I., et al. (2019). Improvement of the polyphenol extraction from avocado peel by assisted ultrasound and microwaves. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6). 1 – 11.  
DOI:10.1111/jfpe.13197

Trujillo, I., et al. (2021). Fractionation and Hydrolyzation of Avocado Peel Extract: Improvement of Antibacterial Activity. *Antibiotics*, 10(23). 2 – 22. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010023>

Valarezo, E., et al. (2020). Extraction and Study of the Essential Oil of Copal (*Dacryodes peruviana*), an Amazonian Fruit with the Highest Yield Worldwide. *Plants*, 9(1658). 1- 13.  
doi:10.3390/plants9121658

Villada, M., et al. (2017). Caracterización del aceite microencapsulado de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) extraído por fluidos supercríticos a escala semi-industrial. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 20, e2015099. Extraído de: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.09915>

Villada, M. (2016). Extracción por fluidos supercríticos y microencapsulación por spray dryer del aceite esencial de cardamomo (*Elettaria cardamomum* L.), como alternativa de desarrollo para la industria de alimentos [Tesis de postgrado]. Corporación Universitaria Lasallista.

## 13. APÉNDICE

Cuadro 4: Compuestos volátiles determinados en las muestras de aceites esenciales y aguas florales\*

Compuesto	Porcentaje de área bajo la curva (%)			
	Aceite de cardamomo	Aceite de copal	Agua de cardamomo	Agua de copal
<b>Eucaliptol (1,8-cineol)</b>	33.11	-	4.330	-
<b>Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilideno)-</b>	26.73	0.1900	-	-
<b>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-</b>	8.512	-	-	-
<b>Beta felandreno</b>	4.760	55.97	-	-
<b>D-limoneno</b>	4.314	-	-	-
<b>p-menta-1-en-8-ol</b>	3.539	-	-	-
<b>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-, 2-aminobenzoato</b>	3.034	-	-	-
<b>Piridina</b>	2.705	-	-	-
<b>Alfa pineno</b>	2.201	11.39	-	-
<b>Éster mono(2-etilhexilo) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico</b>	2.104	-	-	-
<b>3-ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletilo)-</b>	2.016	0.21	-	-
<b>2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E)</b>	1.978	-	-	-
<b>1,4-Ciclohexadieno, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-</b>	1.289	0.1900	-	-
<b>1,3-ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletilo)-</b>	0.7760	0.0800	-	-
<b>Beta pineno</b>	0.5240	2.190	-	-
<b>Benceno, 1-metil-2-(1-metiletilo)</b>	0.3390	0.1100	-	-
<b>Nerolidol</b>	0.2620	-	-	-
<b>2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (z)</b>	0.2420	-	-	-
<b>2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-, acetato, (Z)-</b>	0.1360	-	-	-
<b>Alfa 3-ciclohexeno-1-metanol</b>	0.1260	0.6700	-	-
<b>Ácido acético, 1-metil-1-(4-metil-5-oxo-ciclohex-3 enil)etilo éster</b>	0.1070	-	-	-
<b>cis-.beta.-terpineol</b>	0.0970	-	-	-
<b>Ácido geránico</b>	0.0970	-	-	-

<b>2-ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletilo)-, trans-</b>	0.0870	-	-	-
<b>Acetato de isobornilo</b>	0.0870	-	-	-
<b>1,2,4,4-tetrametilciclopenteno</b>	0.0780	-	-	-
<b>Naftaleno, 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletilo)-</b>	0.0780	-	-	-
<b>Ácido acético, éster octílico</b>	0.0680	-	-	-
<b>2-Ciclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-m 24319 001197-06-4 95 ethylethenyl)-, cis-</b>	0.0680	-	-	-
<b>Alfa felandreno</b>	0.0580	2.150	-	-
<b>1,3,6-Octatrieno, 3,7-dimetil-(E)</b>	0.0580	-	-	-
<b>Octanal</b>	0.0580	-	-	-
<b>Trifluoroacetyl-lavandulol</b>	0.0580	-	-	-
<b>5-hepten-2-ona, 6-metil-</b>	0.0580	-	-	-
<b>Octaetilenglicol</b>	0.0580	-	-	-
<b>2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl-</b>	0.0480	-	-	-
<b>(+)-4-careno</b>	0.0390	-	-	-
<b>Guanidine</b>	0.0390	-	-	-
<b>1-dodecino</b>	0.0390	-	-	-
<b>Canfeno</b>	0.0290	0.2400	-	-
<b>Limoneno</b>	-	14.71	-	-
<b>3-Careno</b>	-	6.310	-	-
<b>Piridina, 2-propil-</b>	-	3.420	-	-
<b>Beta Mirceno</b>	-	0.5200	-	-
<b>Benceno, 1-metil-4-(1-metiletilo)</b>	-	0.5100	-	-
<b>Cis, beta, Terpeneol</b>	-	0.4500	-	-
<b>1,6-ciclododecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletilo)-, [s-(E,E)]-</b>	-	0.3100	-	-
<b>p-menth-1-en-8-ol</b>	-	0.1300	-	-
<b>1,6,10-dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno-, (E)-</b>	-	0.0700	-	-
<b>2-ciclohexen-1-ona, 4-(1-metiletilo)-</b>	-	0.0700	-	-
<b>Acetato de bornilo</b>	-	0.0600	-	-
<b>1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano</b>	-	0.0500	-	-
<b>Agua</b>	-	-	95.67	71.44
<b>Ácido ftálico</b>	-	-	-	18.54
<b>Ácido 1,3-bencenodicarboxílico, éster bis(2-etilhexílico)</b>	-	-	-	4.680
<b>Ftalato de bis(2-etilhexilo)</b>	-	-	-	3.220
<b>2-etil-2-metil-1,3-propanodiol</b>	-	-	-	2.120

\*En donde se muestra el porcentaje del área bajo la curva de todos los compuestos volátiles encontrados, con sus nombres estequiométricos, a través del método de cromatografía gaseosa.

(Fuente: Elaboración propia)

Cuadro 5: Análisis de capacidad antioxidante en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

Análisis de capacidad antioxidante	Muestra			
	Aceite esencial de cardamomo	Aceite esencial de copal	Agua floral de cardamomo	Agua floral de copal
<b>DPPH</b> (mg de ácido gálico equivalente/mL de muestra)	0.0036 ± 0.0001 <sup>a</sup>	0.0038 ± 0.0001	0.0035 ± 0.0001 <sup>ab</sup>	0.0033 ± 0.0001 <sup>b</sup>
<b>DPPH (% de inhibición)</b>	86.99 ± 1.651 <sup>c</sup>	92.98 ± 1.4806	84.08 ± 0.0001 <sup>cd</sup>	80.33 ± 1.226 <sup>d</sup>
<b>FRAP</b> (mg de trolox equivalente/mL de muestra)	1.380 ± 0.4662 <sup>ef</sup>	1.815 ± 0.8486 <sup>f</sup>	0.1452 ± 0.0575 <sup>e</sup>	0.1497 ± 0.0134 <sup>e</sup>
<b>Polifenoles</b> (mg ácido gálico equivalente/mL de muestra)	0.1042 ± 0.0098 <sup>g</sup>	0.1061 ± 0.0073 <sup>g</sup>	0.0108 ± 0.0002 <sup>h</sup>	0.0109 ± 0.0008 <sup>h</sup>
<b>Flavonoides</b> (mg quercetina equivalente/mL de muestra)	209.7 ± 362.3	331.3 ± 327.8	0.4932 ± 0.0426 <sup>i</sup>	0.7023 ± 0.0213 <sup>i</sup>

(Fuente: Elaboración propia)

	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>
<b>pH</b>	0.209469	0.670651
<b>Indice de Refracción</b>	0.332594	-0.269784
<b>Polaridad</b>	0.350289	-0.0918071
<b>Densidad</b>	-0.350852	-0.0707946
<b>DPPH</b>	0.322127	-0.0279656
<b>FRAP</b>	0.309432	-0.253098
<b>Polifenoles</b>	0.325307	-0.331115
<b>Flavonoides</b>	0.346888	-0.109106
<b>MIC E.coli</b>	0.335073	0.205603
<b>MIC S. aureus</b>	0.248517	0.485128

Figura 8: Valores de los componentes principales para cada uno de los parámetros evaluados

(Fuente: Elaboración propia)

<b>Fila</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>
<b>1</b>	Aceite de Cardam	1.12611	-1.24498
<b>2</b>	Aceite de Cardam	0.908085	-1.2607
<b>3</b>	Aceite de Cardam	1.05078	-1.5402
<b>4</b>	Aceite de Copal	4.04002	1.81412
<b>5</b>	Aceite de Copal	3.77306	0.389597
<b>6</b>	Aceite de Copal	4.12704	-0.0210285
<b>7</b>	Agua de Cardamom	-2.66088	-0.195902
<b>8</b>	Agua de Cardamom	-2.46329	-0.273771
<b>9</b>	Agua de Cardamom	-2.50429	-0.264967
<b>10</b>	Agua de Copal	-2.36286	0.87146
<b>11</b>	Agua de Copal	-2.54827	0.89652
<b>12</b>	Agua de Copal	-2.4855	0.829838

Figura 9: Valores de los componentes principales para cada una de las muestras evaluadas

(Fuente: Elaboración propia)

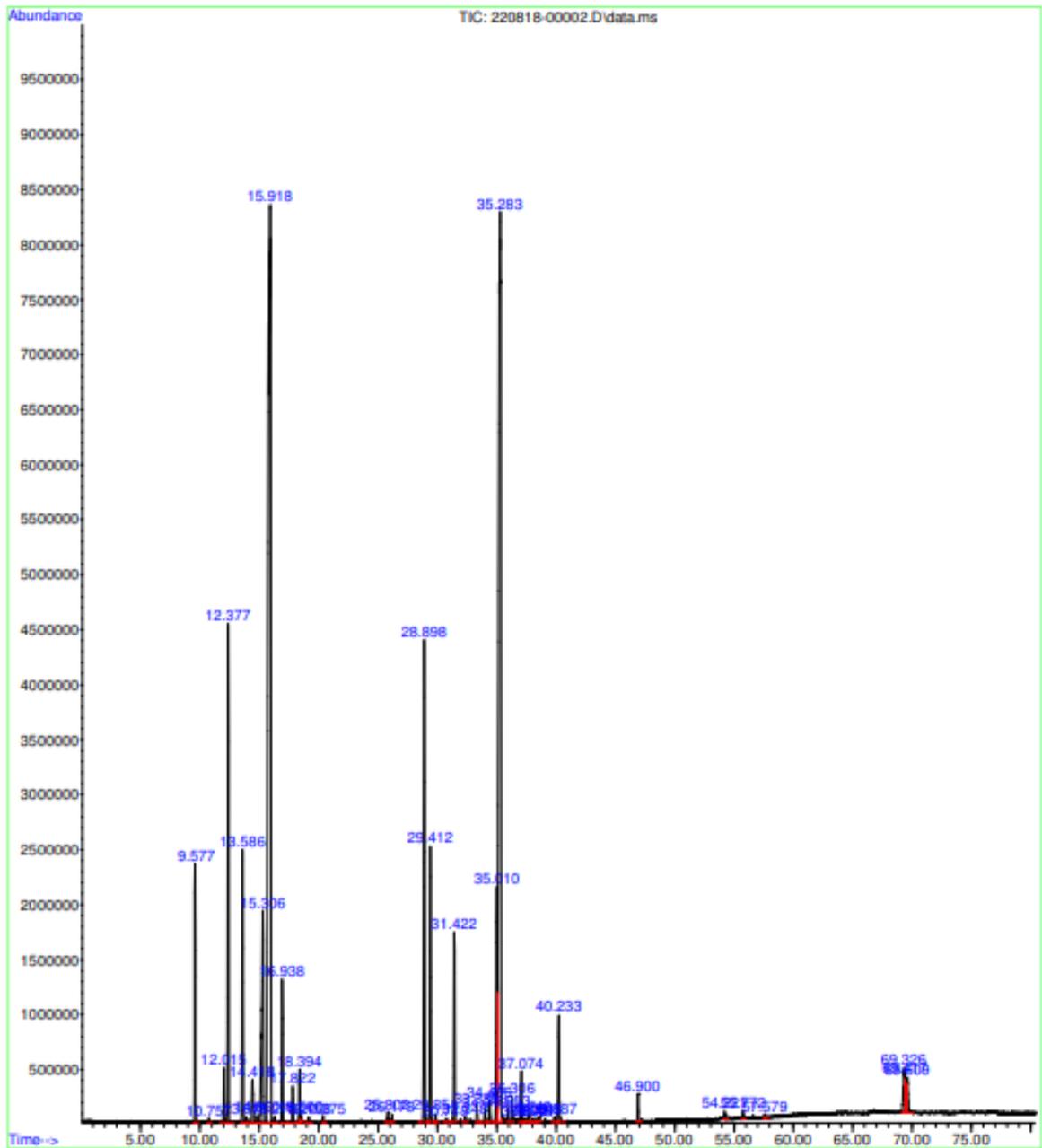


Figura 10: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de cardamomo

(Fuente: Elaboración propia)

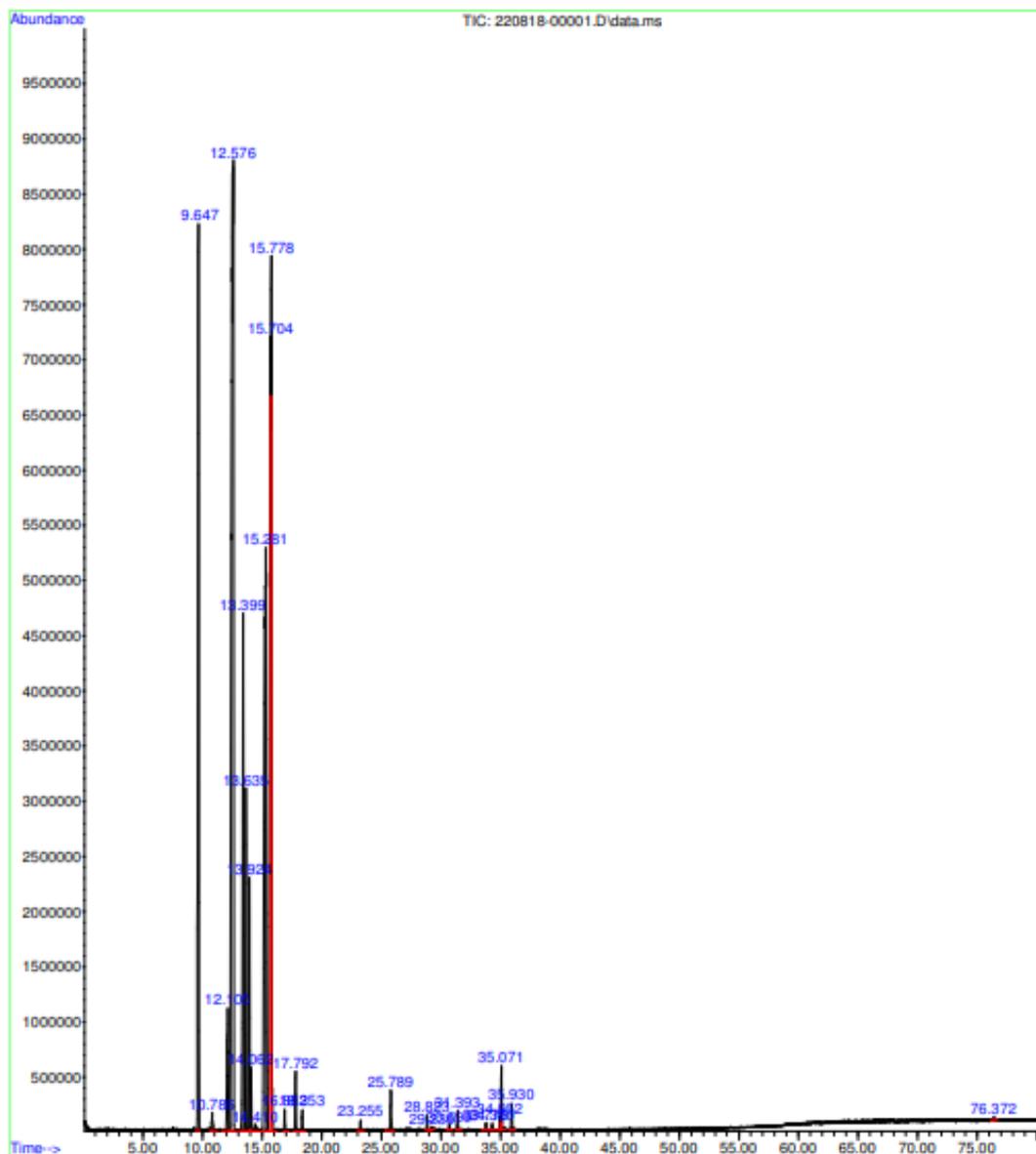


Figura 11: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de resina de copal

(Fuente: Elaboración propia)

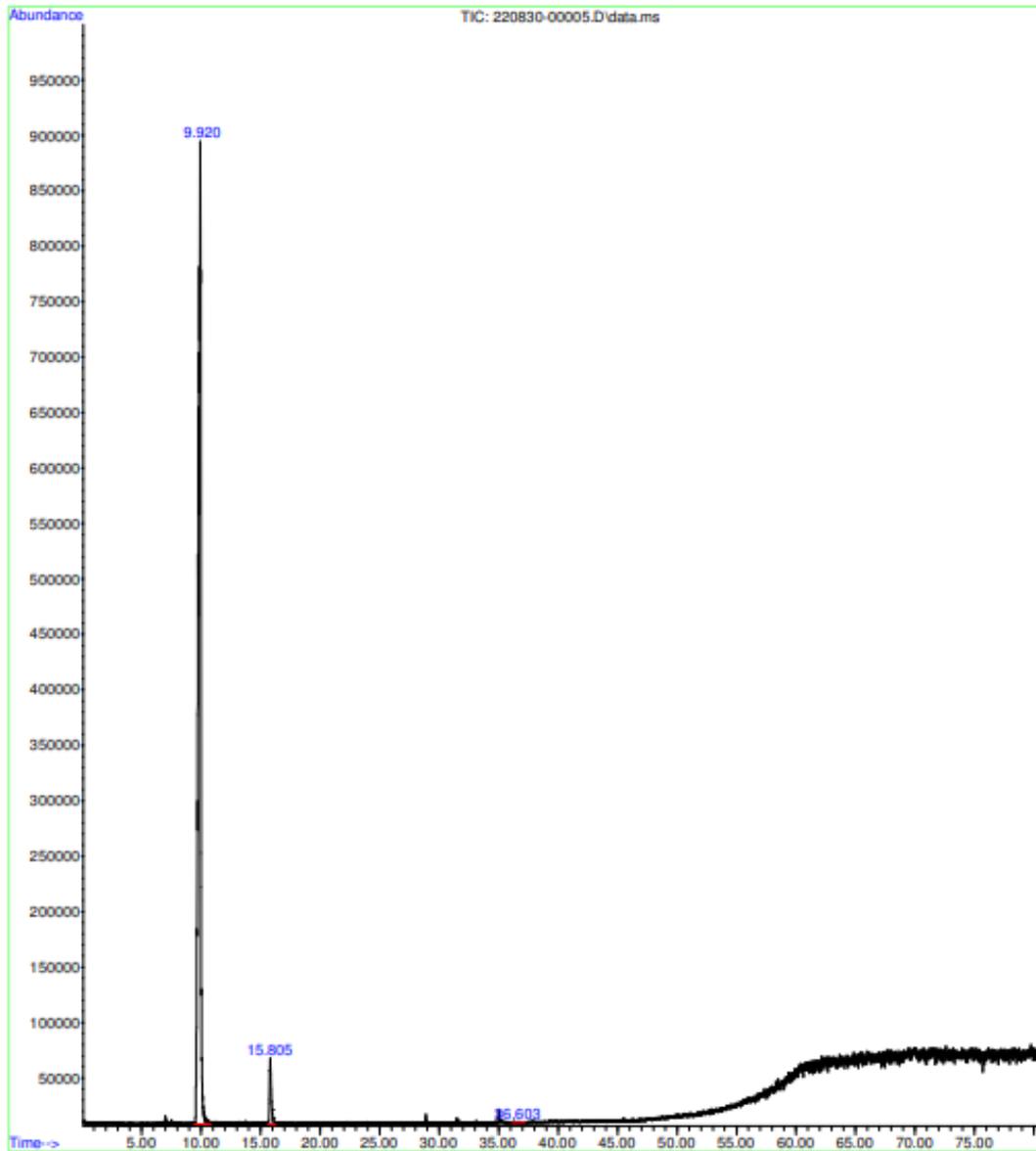


Figura 12: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de agua floral de cardamomo

(Fuente: Elaboración propia)

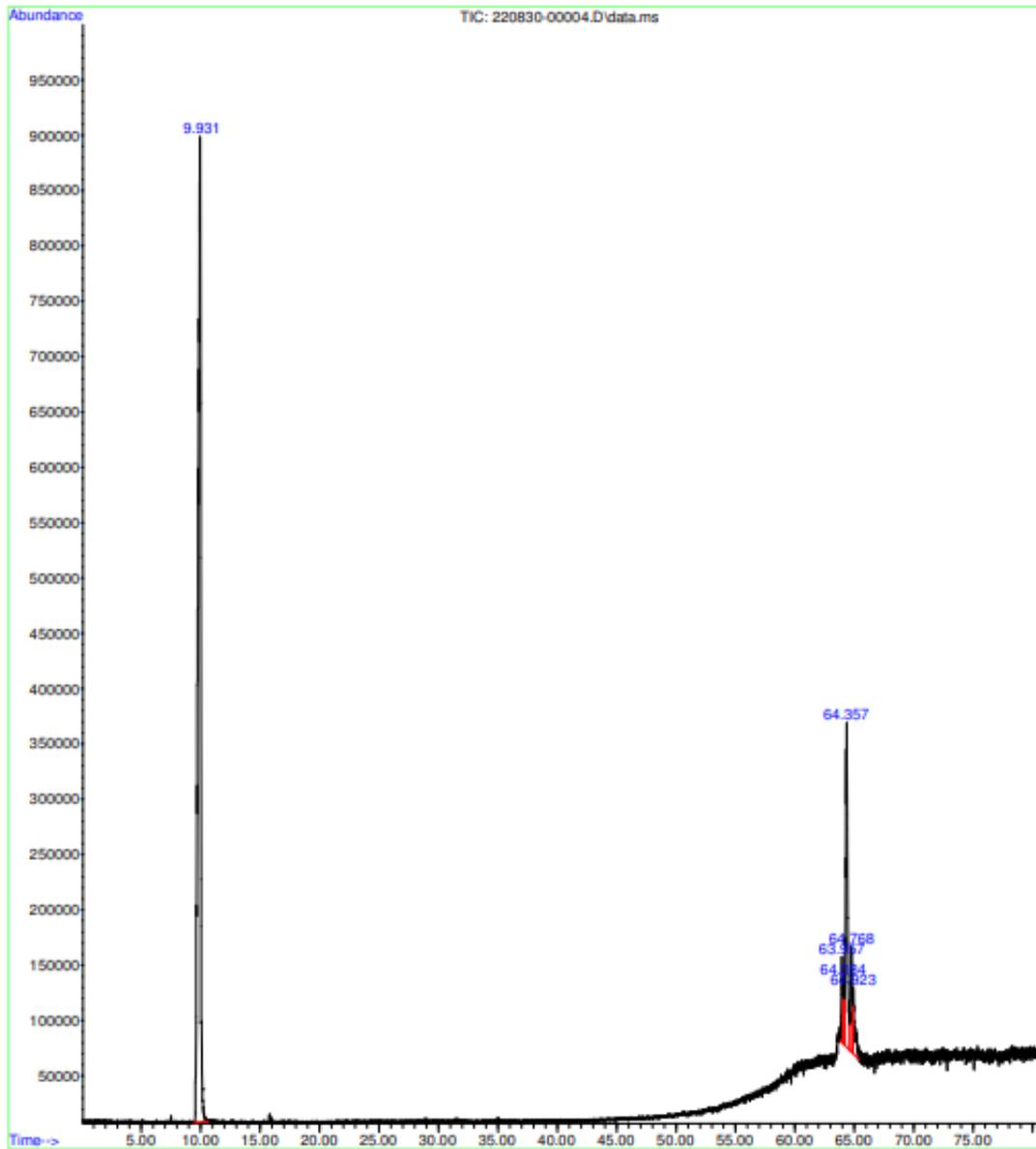


Figura 13: Cromatograma obtenido para el análisis de compuestos volátiles del aceite esencial de agua floral de resina de copal

(Fuente: Elaboración propia)

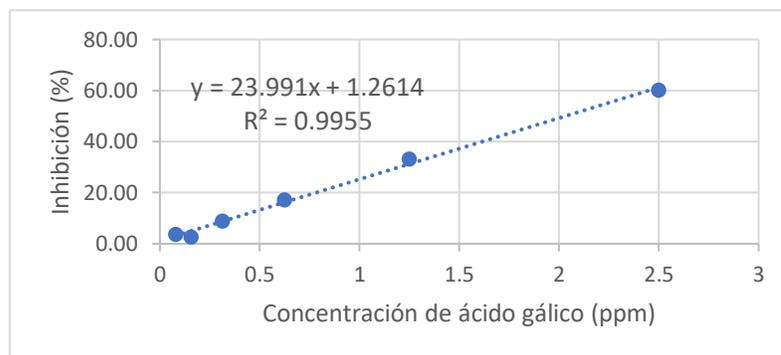


Figura 14: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes DPPH (CEEA, 2021)

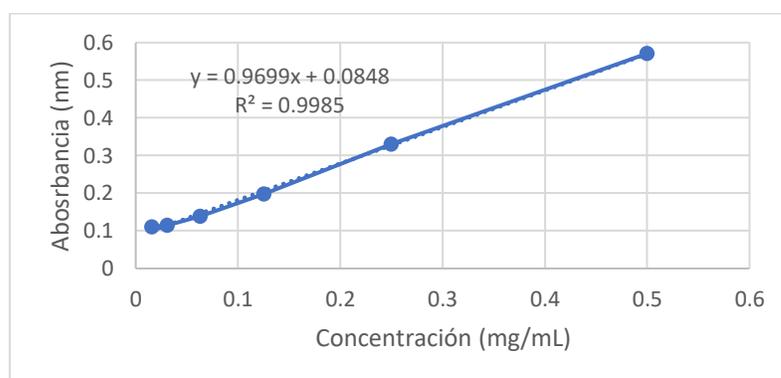


Figura 15: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes FRAP (Fuente: Elaboración propia)

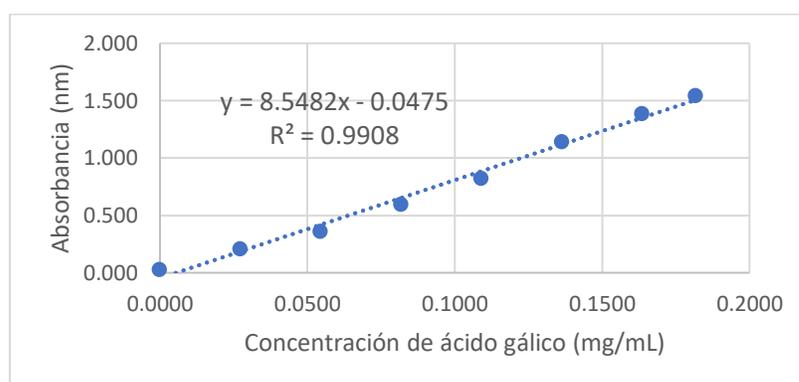


Figura 16: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes de contenido total de polifenoles (CEEA, 2021)

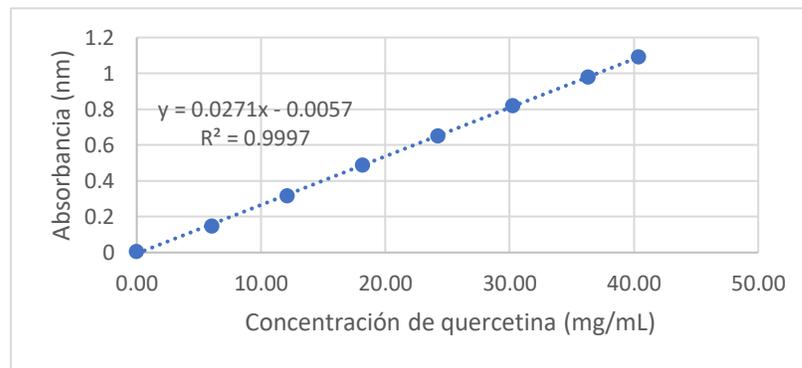


Figura 17: Curva de calibración para el análisis de antioxidantes de contenido total de flavonoides

(CEEA, 2021)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.38886	1	1.38886	1.73	0.2244
Intra grupos	6.40851	8	0.801064		
Total (Corr.)	7.79737	9			

Figura 18: Tabla ANOVA para el parámetro de rendimiento de extracción de los aceites esenciales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Aceite de Cardamomo	6	0.734233	X
Aceite de Copal	4	1.49495	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal		-0.760717	1.33226

\* indica una diferencia significativa.

Figura 19: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de rendimiento de extracción de los aceites esenciales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.61549	3	0.538497	1292.39	0.0000
Intra grupos	0.00333333	8	0.000416667		
Total (Corr.)	1.61883	11			

Figura 20: Tabla ANOVA para el parámetro de pH evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	3.98	X
Aceite de Cardamomo	3	4.15667	X
Agua de Copal	3	4.6	X
Aceite de Copal	3	4.91333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-0.756667
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	0.176667
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	-0.443333
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	0.933333
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	0.313333
Agua de Cardamomo - Agua de Copal	*	-0.62

Figura 21: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de pH evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0553357	3	0.0184452	77664.18	0.0000
Intra grupos	0.0000019	8	2.375E-7		
Total (Corr.)	0.0553376	11			

Figura 22: Tabla ANOVA para el parámetro de índice de refracción evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Copal	3	1.33303	X
Agua de Cardamomo	3	1.33337	X
Aceite de Cardamomo	3	1.4632	X
Aceite de Copal	3	1.47437	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-0.0111667
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	0.129833
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	0.130167
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	0.141
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	0.141333
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		0.000333333

Figura 23: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de índice de refracción evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2168.25	3	722.75	667.15	0.0000
Intra grupos	8.66667	8	1.08333		
Total (Corr.)	2176.92	11			

Figura 24: Tabla ANOVA para el parámetro de rotación óptica evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Copal	3	2.66667	X
Agua de Cardamomo	3	3.66667	X
Aceite de Cardamomo	3	22.6667	X
Aceite de Copal	3	34.6667	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-12.0
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	19.0
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	20.0
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	31.0
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	32.0
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		1.0

Figura 25: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de rotación óptica evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
Entre grupos	0.0638574	3	0.0212858	119352.63
Intra grupos	0.00000142675	8	1.78344E-7	
Total (Corr.)	0.0638588	11		

Figura 26: Tabla ANOVA para el parámetro de densidad evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Aceite de Copal	3	0.824355	X
Aceite de Cardamomo	3	0.920925	X
Agua de Copal	3	1.00121	X
Agua de Cardamomo	3	1.00192	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	0.0965697
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	-0.0809988
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	-0.0802895
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	-0.177568
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	-0.176859
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		0.000709273

Figura 27: Prueba de múltiples rangos para el parámetro de densidad evaluado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.45692E-7	3	1.48564E-7	35.20	0.0001
Intra grupos	3.37611E-8	8	4.22014E-9		
Total (Corr.)	4.79453E-7	11			

Figura 28: Tabla ANOVA para el análisis de DPPH efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Copal	3	0.00329595	X
Agua de Cardamomo	3	0.00345201	XX
Aceite de Cardamomo	3	0.00357322	X
Aceite de Copal	3	0.00382322	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-0.000250003
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo		0.000121214
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	0.000277276
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	0.000371216
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	0.000527279
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		0.000156062

Figura 29: Prueba de múltiples rangos para el análisis de DPPH efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.59034	3	2.19678	9.34	0.0054
Intra grupos	1.88198	8	0.235247		
Total (Corr.)	8.47232	11			

Figura 30: Tabla ANOVA para el análisis FRAP efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	0.1452	X
Agua de Copal	3	0.1497	X
Aceite de Cardamomo	3	1.3802	XX
Aceite de Copal	3	1.81463	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal		-0.434433
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo		1.235
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal		1.2305
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	1.66943
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	1.66493
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		-0.0045

Figura 31: Prueba de múltiples rangos para el análisis FRAP efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0266829	3	0.00889431	235.58	0.0000
Intra grupos	0.000302033	8	0.0000377542		
Total (Corr.)	0.026985	11			

Figura 32: Tabla ANOVA para el análisis de polifenoles efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	0.0107667	X
Agua de Copal	3	0.0109333	X
Aceite de Cardamomo	3	0.1042	X
Aceite de Copal	3	0.1061	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal		-0.0019
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	0.0934333
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	0.0932667
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	0.0953333
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	0.0951667
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		-0.000166667

Figura 33: Prueba de múltiples rangos para el análisis de polifenoles efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.41553E7	3	8.05178E6	134.91	0.0000
Intra grupos	477454.	8	59681.7		
Total (Corr.)	2.46328E7	11			

Figura 34: Tabla ANOVA para el análisis de flavonoides efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	0.4932	X
Agua de Copal	3	0.7023	X
Aceite de Cardamomo	3	2097.29	X
Aceite de Copal	3	3312.55	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-1215.25
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	2096.8
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	2096.59
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	3312.05
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	3311.84
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		-0.2091

Figura 35: Prueba de múltiples rangos para el análisis de flavonoides efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.125244	3	0.041748	73.29	0.0000
Intra grupos	0.00455729	8	0.000569661		
Total (Corr.)	0.129801	11			

Figura 36: Tabla ANOVA para el análisis de concentración mínima inhibitoria de *E.coli* efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	0	X
Agua de Copal	3	0	X
Aceite de Cardamomo	3	0.0729167	X
Aceite de Copal	3	0.25	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal	*	-0.177083
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo	*	0.0729167
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal	*	0.0729167
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo	*	0.25
Aceite de Copal - Agua de Copal	*	0.25
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		0

Figura 37: Prueba de múltiples rangos para el análisis de concentración mínima inhibitoria de *E.coli* efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0322266	3	0.0107422	3.64	0.0639
Intra grupos	0.0236003	8	0.00295003		
Total (Corr.)	0.0558268	11			

Figura 38: Tabla ANOVA para el análisis de concentración mínima inhibitoria de *S.aureus* efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua de Cardamomo	3	0	X
Agua de Copal	3	0	X
Aceite de Cardamomo	3	0.0208333	X
Aceite de Copal	3	0.125	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Aceite de Cardamomo - Aceite de Copal		-0.104167
Aceite de Cardamomo - Agua de Cardamomo		0.0208333
Aceite de Cardamomo - Agua de Copal		0.0208333
Aceite de Copal - Agua de Cardamomo		0.125
Aceite de Copal - Agua de Copal		0.125
Agua de Cardamomo - Agua de Copal		0

Figura 39: Prueba de múltiples rangos para el análisis de concentración mínima inhibitoria de *S.aureus* efectuado en las muestras de aceites esenciales y aguas florales

(Fuente: Elaboración propia)

#### Análisis de Componentes Principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	8.04192	80.419	80.419
2	1.03547	10.355	90.774
3	0.51366	5.137	95.911
4	0.215478	2.155	98.065
5	0.150415	1.504	99.569
6	0.0277872	0.278	99.847
7	0.00940978	0.094	99.941
8	0.00546179	0.055	99.996
9	0.000391121	0.004	100.000
10	0.00000367493	0.000	100.000

Figura 40: Porcentaje acumulado para cada uno de los parámetros evaluados en el análisis de componentes principales

(Fuente: Elaboración propia)



Figura 41: Semillas de cardamomo utilizadas para la extracción de aceite esencial y agua floral



Figura 42: Semillas de cardamomo molidas utilizadas para la extracción de aceite esencial y agua floral



Figura 43: Resina de copal utilizada para la extracción de aceite esencial y agua floral



Figura 44: Bolsa de manta armada para introducir la muestra en el alambique de acero inoxidable para la extracción por arrastre de vapor



Figura 45: Alambique de acero inoxidable y sistema utilizado para la extracción por arrastre de vapor de aceite esencial y agua floral de semilla de cardamomo y resina de copal

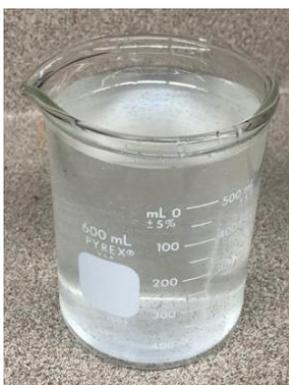


Figura 46: Agua floral de cardamomo extraída por el método de arrastre de vapor



Figura 47: Proceso de decantación para la separación del aceite esencial y agua floral de cardamomo obtenidas por el método de arrastre de vapor



Figura 48: Aceite esencial de cardamomo extraído por el método de arrastre de vapor



Figura 49: Proceso de decantación para la separación del aceite esencial y agua floral de resina de copal obtenidas por el método de arrastre de vapor



Figura 50: Sistema utilizado para la extracción por solventes de aceite esencial y agua floral de semilla de cardamomo y resina de copal



Figura 51: Aceite esencial de cardamomo obtenido por el método de extracción por solventes



Figura 52: Rotavapor utilizado para la separación de aceite esencial de cardamomo y hexano tras la extracción por el método de solventes



Figura 53: Pícnómetro utilizado para la medición de densidad de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor



Figura 54: Polarímetro utilizado para la medición de rotación óptica de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor



Figura 55: Tubo óptico utilizado para la medición de rotación óptica de los aceites esenciales y aguas florales extraídas por arrastre de vapor



Figura 56: Muestras de aceite esencial de cardamomo, aceite esencial de resina de copal y agua floral de cardamomo tras el análisis de antioxidantes FRAP



Figura 57: Preparación de medio de cultivo Mueller Hilton para el análisis de capacidad antimicrobiana en muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal



Figura 58: Gradilla utilizada para la preparación de soluciones seriadas para el análisis de capacidad antimicrobiana en muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal

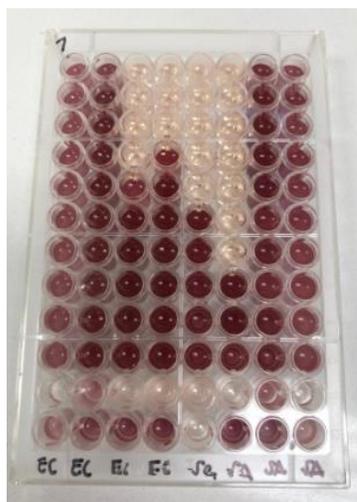


Figura 59: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *E. coli* y *S.aureus*

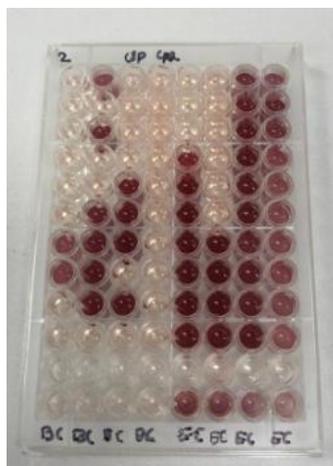


Figura 60: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *B. cereus* y *E. coli*

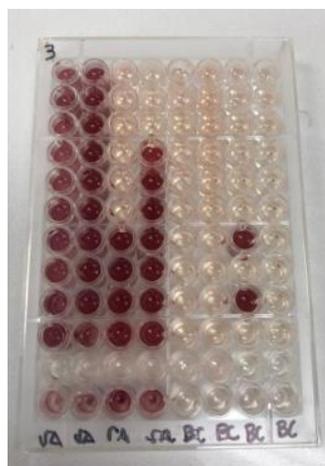


Figura 61: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *S. aureus* y *B. cereus*



Figura 62: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *E. coli* y *S.aureus*



Figura 63: Placa ELISA utilizada para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras de aceite esencial y agua floral de cardamomo y aceite resina de copal contra *B. cereus*