

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA



Caracterización de compuestos fenólicos y
actividad antioxidante de extractos
hidroalcohólicos, infuso y decocto de *Prosopis*
pallida

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Autora: Ms. Suarez Rebaza, Luz Angelica

Asesor: Dr. Alva Plasencia, Pedro Marcelo

TRUJILLO – PERÚ
2019

N° de Registro: _____

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Noé Ildefonso Costilla Sánchez

Presidente

Dr. Pascual Ancelmo Castillo Valdiviezo

Secretario

Dr. Pedro Marcelo Alva Plasencia

Miembro

*A Dios,
ser infinito de armonía y paz,
por ser la fuente de vida eterna
quien me dio la energía necesaria
para alcanzar mis metas,
gracias
amado padre.*

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

*A mi amado esposo **MAYER**,
quien es el ser
que me da las fuerzas necesarias
para comenzar el día,
y que con su entusiasmo y optimismo
me motiva a seguir avanzando
cada día de mi vida.*

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

A mis amados hijos
Mayer Manuel,
y **Emy Luz,**
quienes son la luz de mis ojos,
quienes, con sus ternura y amor,
son el soporte y motor
que me impulsan
a seguir creciendo
día a día.

*A mis queridos padres,
Manuel y Manuela,
por saber guiarme durante toda la vida,
cuidándome y enseñándome con su ejemplo de vida
y los valores inculcados;
el camino que debo seguir
para poder alcanzar mis anhelos.*

*A mis queridos hermanos
Camilo,
y **Susana,**
que con su presencia y consejos me
acompañaron todo este tiempo.*

*A todas aquellas personas,
amigos y familiares,
que han aportado en mi
formación personal y académica.*

AGRADECIMIENTO

A mi asesor, **Dr. Pedro Alva Plasencia**, por su tiempo y conocimientos en la realización del presente trabajo de investigación.

Al proyecto de investigación PIC 06-2014: “Tuberculosis, parasitosis, diabetes e hipertensión: calidad fisicoquímica de los medicamentos adquiridos por el estado peruano”, financiado por recursos del canon minero, por facilitar el equipo espectrofotómetro de microplacas ultravioleta/visible Fisher Scientific® AccuSkan GO®.

BIBLIOTECA DE POSGRADO, UNH

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. Introducción.....	1
II. Material y método.....	12
III. Resultados.....	22
IV. Discusión.....	46
V. Conclusiones.....	51
VI. Referencias bibliográficas.....	52
VII. Anexos.....	57

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNIT

RESUMEN

Los frutos del “algarrobo” contienen compuestos fenólicos (CF) a los que se le atribuyen importantes propiedades nutraceuticas. El objetivo fue caracterizar el compuesto fenólico con mayor abundancia y determinar la actividad antioxidante (AA) en cinco extractos (etanol de 45%, 70%, 96%, infuso y decocto) de frutos de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth de las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad. Los CF se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu y la AA se evaluó por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS. El mejor extracto con CF fue etanol 96% de los frutos de Piura con $58,03 \pm 2,50$ mg equivalentes de ácido gálico/g (EAG/g). La AA fluctuó entre $5,27 \pm 0,30$ - $2,12 \pm 0,08$; $8,46 \pm 0,45$ - $5,32 \pm 0,34$ y $17,63 \pm 0,53$ - $11,16 \pm 0,29$ mg de equivalentes de Trolox/g, para el DPPH, FRAP y ABTS, respectivamente en las muestras sin purificar. Mientras que, entre los extractos purificados, el decocto de La Libertad presentó mayor concentración de CF ($90,65 \pm 1,70$ mg EAG/g) y mayor AA por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS. Por otro lado, se llevó a cabo la caracterización del compuesto fenólico de mayor concentración y con actividad antioxidante por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, elucidando su correspondiente estructura y formula general $C_{27}H_{31}O_{15}$. Se concluye que el compuesto fenólico de mayor concentración con AA es Apigenin-6,8-digalactósido (vicenin) y pertenece a las flavonas.

Palabras claves: compuestos fenólicos; antioxidante; *Prosopis pallida*; DPPH, FRAP, ABTS.

ABSTRACT

The fruits of the "algarrobo" contain phenolic compounds (PC) to which important nutraceutical properties are attributed. The objective was to characterize the phenolic compound with greater abundance and to determine the antioxidant activity (AA) in five extracts (45%, 70%, 96% ethanol, infusion and decoction) of fruits of *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Kunth of the regions of Tumbes, Piura, Lambayeque and La Libertad. The PC were quantified by the Folin-Ciocalteu method and the AA was evaluated by the DPPH, FRAP and ABTS methods. The best extract with PC was ethanol 96% of the fruits of Piura with 58.03 ± 2.50 mg Gallic acid equivalents/g (GAE/g). The AA fluctuated between 5.27 ± 0.30 - 2.12 ± 0.08 , 8.46 ± 0.45 - 5.32 ± 0.34 and 17.63 ± 0.53 - 11.16 ± 0.29 mg of Trolox equivalents/g, for DPPH, FRAP and ABTS, respectively in the unpurified samples. While, among the purified extracts, the decoction of La Libertad showed higher concentration of PC (90.65 ± 1.70 mg GAE/g) and higher AA by the methods of DPPH, FRAP and ABTS. On the other hand, the phenolic compound of higher concentration and with antioxidant activity was characterized by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, elucidating its corresponding structure and general formula $C_{27}H_{31}O_{15}$. It is concluded that the phenolic compound of higher concentration with AA is Apigenin-6,8-digalactoside (vicenin) and belongs to the flavones.

Keywords: phenolic compounds; antioxidant; *Prosopis pallida*; DPPH, FRAP, ABTS.

I. INTRODUCCION

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, a consecuencia de su metabolismo secundario. Los polifenoles son metabolitos secundarios distribuidos ampliamente en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de la planta, variando su concentración a lo largo de su ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en muchas funciones, como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Muñoz *et al.*, 2015).

En general se puede considerar a los frutos del algarrobo como un alimento con potente capacidad antioxidante que incluyéndolo en la dieta diaria ayudaría a satisfacer los requerimientos diarios de antioxidantes y prevenir ciertas enfermedades de patología inflamatoria, además de los beneficios que se obtendrían por los demás nutrientes que contiene como es el caso de la proteína, fibra, y ácidos grasos omega 3 y 6 (Perez *et al.*, 2014).

El jarabe tradicional hecho de las vainas de *Prosopis*, conocido como "algarrobina" o "arope de algarrobo" en los países andinos, se utiliza comúnmente en repostería y cocina local para preparar dulces y cócteles. En un trabajo realizado en la Universidad de Talca-Chile se evaluó el contenido polifenólico de cuatro vainas de *Prosopis*

muestras de jarabe a partir de la fracción retenida con Amberlite, se analizó utilizando un cromatógrafo líquido de alto rendimiento con detector de arreglo de diodos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS/MS). Los principales compuestos fenólicos en los jarabes fueron flavonoides C-glicosil apigenina derivados, incluyendo 6,8-C-pentosido-C-hexosido, 6,8-hexosido y glicósidos de quercetina. El derivado de azúcar 5-hidroximetil furfural estaba presente en la mayoría de las muestras. Todos los jarabes carecían de citotoxicidad hacia fibroblastos de pulmón humano y células AGS gástricos humanos. Los constituyentes fenólicos de los jarabes son flavonoides C-glicosídicos con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y nutracéuticas. La composición fenólica de jarabe de algarrobo de América del Sur se presenta por primera vez (Quispe *et al.*, 2014).

Las especies de *Prosopis* se consideran árboles y arbustos de usos múltiples de la FAO y sus frutos constituyen una fuente de alimento para los seres humanos y los animales. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino, la "harina de algarrobo" se obtiene moliendo todo el fruto maduro, pero en el proceso tradicional de la mayoría de las semillas se descartan. De las semillas se obtiene harina y se evalúa las proteínas mediante hidrólisis enzimática. De acuerdo a su perfil de aminoácidos y la calificación química, las proteínas de *Prosopis alba*, no son deficientes en aminoácidos esenciales. En la Universidad Nacional de Tucumán-Argentina, se evaluó la capacidad antioxidante de las proteínas hidrolizadas (valores CI_{50} : 50-5 $\mu\text{g/mL}$). Se describió la actividad inhibidora de enzimas pro-inflamatorias (lipooxigenasa y fosfolipasa). También se analizó la mutagenicidad/antimutagenicidad de proteínas e hidrolizados de proteínas de la harina de semilla. La harina de cotiledón *P. alba* podría ser una nueva alternativa en la formulación de alimentos funcionales no sólo por su alto contenido en

proteínas, sino también por las propiedades biológicas y funcionales de sus proteínas e hidrolizados de proteínas (Cattaneo *et al.*, 2014).

Según Pérez *et al.* (2014), en un trabajo realizado en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRON), Instituto de Química del NOA (INQUINOA-CONICET), Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán-Argentina, encontraron que la harina de *P. alba* mostró mayor significancia total (suma de libres y unidos) contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales que *P. nigra* ($p < 0,05$) mientras que *P. nigra* tuvo mayores concentraciones de antocianinas que el *P. alba* ($p < 0,05$). La harina *P. nigra* muestra un patrón se caracteriza por la aparición de antocianinas, así como 14 glicósidos flavonoides, con mayor diversidad química de *P. alba*, que muestra 8 glucósidos flavonoides como constituyentes relevantes. Los principales compuestos se quercetina O-glucósidos y basada en la apigenina C-glucósidos. La composición fenólica de dos harinas de la vaina de algarrobo de América del Sur se presenta por primera vez. Las vainas de *P. nigra* que tienen un mayor contenido de antocianinas son más oscuro (morado) que las de *P. alba* (marrón claro). Además, los extractos polifenólicos sin azúcar de *P. nigra* y *P. alba*, así como antocianinas enriquecidos extractos de *P. nigra* mostraron actividad antioxidante. *P. nigra* y *P. alba* extractos polifenólicos mostraron actividad contra una enzima pro-inflamatoria. En conclusión, la harina de vainas de algarrobo contenía polifenoles biológicamente activos, con un impacto positivo en la salud humana (Pérez *et al.*, 2014).

Especies reactivas del oxígeno es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente

convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de radicales libres sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos tienen por finalidad o mecanismo su capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales, incluida la contaminación atmosférica. Dichos radicales actúan sobre ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, ADN y lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica. Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar de cualquiera de los componentes anteriormente mencionados, protegiendo de esta manera las células contra el daño que causan los radicales libres (Ruiz *et al.*, 2013).

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales, son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Un método muy usado para medir la capacidad antioxidante, se basa en la estabilidad del radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 518 nm (Molyneux, 2004).

Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. El parámetro IC_{50} , que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método (Suárez *et al.*, 2004).

Los constituyentes de la biomasa se pueden dividir en Celulosa, hemicelulosa, lignina, ceniza y agua. Los niveles de constituyentes químicos del género *Prosopis* han sido estimados como 25% -30% de hemicelulosa, 40% -45% de celulosa, 11% -28% de lignina. La biomasa incluye compuestos químicos como: azúcares, resinas, aceites volátiles, ácidos grasos, taninos, alcoholes y fenoles con una con un contenido de taninos de hasta el 9% del material leñoso. (Prabha *et al.*, 2014)

Los polifenoles poseen acciones antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento. Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora (Seeram *et al.*, 2006; Prabha *et al.*, 2014).

Existe evidencia epidemiológica acerca de los beneficios para la salud del consumo abundante de frutas y verduras en la dieta. Altas ingestas de frutas y verduras están asociadas con el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. El pensamiento vigente vincula el alto contenido de antioxidantes con la inhibición de las enfermedades provocadas por el daño oxidativo, tales como la enfermedad cardíaca, las hemiplejias y el cáncer (Ramirez *et al.*, 2014).

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario (Paladino, 2007).

Las frutas en general, y en particular, las frutas pequeñas ó berries, contienen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos que muestran actividad antioxidante. Los principales subgrupos en berries y frutas son los antocianos, proantocianidinas, flavonoles y catequinas. Los extractos de blackberries, corintos rojos y negros, blueberries, frambuesas negras y rojas poseen una alta actividad como captadores de radicales superóxido. Los ácidos hidroxinámicos típicamente presentes en las frutas han demostrado inhibir la oxidación en las LDL *in vitro* (Paladino, 2007).

Los extractos fenólicos de berries (blackberries, frambuesas, cerezas, blueberries, y frutillas) inhiben la oxidación de las LDL humanas y la oxidación de los liposomas (Maurya y Singh, 2010).

A diferencia de otras fibras alimentarias, la fibra de algarrobo obtenida de su fruto contiene taninos, antes considerados producto tóxicos y hoy revalorizados dentro del grupo de los polifenoles como antioxidantes y potentes protectores que evitan la formación de las cancerígenas nitrosaminas, son antiinflamatorios, antirreumáticos y benéficos para el corazón y los riñones. Los polifenoles solubles se absorben a través de la pared intestinal, con lo que pueden ejercer su efecto en diferentes zonas del

organismo, mientras que los polifenoles insolubles permanecen fundamentalmente en el intestino, donde pueden captar compuestos reactivos contenidos en los alimentos o producidos por bacterias. Estudios in vitro han demostrado que la fibra de algarrobo puede inactivar de modo eficaz los radicales libres y otras sustancias reactivas, algo que solo ha podido demostrarse de forma limitada en otras fuentes de fibra alimentaria (Tamayo, 2008).

Se menciona entre las especies frutales al algarrobo, aunque no sea su uso más frecuente, con fines de enfatizar el extraordinario valor nutritivo de la pulpa comestible que rodea las semillas. Es uno de los alimentos vegetales más ricos que se conocen por su alta concentración en almidón y proteínas y constituía una parte importante de la dieta de muchos pueblos indígenas. La pulpa es dulce, se consume cruda, se incorpora como harina en galletas y sopas, o se mezcla con agua para preparar una bebida llamada atole y a los niños se les da con leche por ser un excelente alimento. También puede constituir un alimento concentrado de primera calidad para animales. Sus polisacáridos llamados galactomananos forman la famosa goma de algarroba, conocida bajo la sigla E410 en las sustancias aditivas de los alimentos. Se utiliza para fabricar los helados más apreciados. La goma de algarroba se usa así mismo en la industria como agente estabilizador, espesante y aditivo en la industria alimenticia, farmacéutica, textil, papelera (Tamayo, 2008).

Numerosos investigadores han desarrollado en los últimos tiempos nuevas alternativas para el arte culinario. Con la harina de algarrobo, por ejemplo, ya se realizan galletas con mayores proporciones de fibra, calcio y hierro que las convencionales. También crearon “supersopas” y queso prebiótico, destinado a mejorar el sistema inmunológico.

Así fue como investigadores de Argentina crearon desde quesos que mejoran el sistema inmunológico, “superguisos” y “supersopas” que optimizan los niveles de nutrición, hasta galletas con harina de algarrobo, que contienen mayores proporciones de fibra, calcio y hierro que las convencionales (Tamayo, 2008)

Actualmente el estudio de alimentos con propiedades antioxidantes ha aumentado considerablemente debido al interés que se tiene sobre los efectos benéficos en la salud que previenen dichos compuestos, tales como la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio. Además de que el consumo frecuente de antioxidantes se relaciona con la disminución de otras enfermedades como diabetes y enfermedades coronarias.

Es importante realizar este tipo de trabajo porque sustenta una buena fuente de información para introducir en la alimentación productos con actividad antioxidante que servirán para proponer una futura terapia alternativa preventiva antioxidante no invasiva, sin repercusiones para el organismo y más barata, y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como enfermedades autoinmunes (Lupus eritematoso sistémico, rosácea, artritis, etc.) ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas.

Este tipo de trabajo es una buena fuente de información en la realización de futuras investigaciones que conllevan a la elaboración de diversos fitofármacos que tienen un impacto importante en la sociedad, y a su vez marca la pauta para futuras investigaciones y que deberían ser tomadas en cuenta por la Organización Mundial de Salud para regular y fomentar políticas y normas para la aplicación de estos estudios

en la medicina alternativa sobre el ser humano, invirtiendo en investigaciones farmacéuticas para controlar las dosis administradas y saber en qué tiempo hace efecto cada fitofármaco.

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

OBJETIVOS

General

Caracterizar los compuestos fenólicos y determinar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos, infuso y decocto de *Prosopis pallida* del norte del Perú.

Específicos

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos de los extractos acuosos e hidroalcohólicos, por el método de Folin-Ciocalteu de las muestras de las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad.
- Determinar la actividad antioxidante de los cinco sistemas de extracción por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS de las muestras de las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad.
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos de los extractos acuosos e hidroalcohólicos, purificados con Amberlite por el método de Folin Ciocalteu
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos purificados con Amberlite por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS.
- Caracterizar el compuesto fenólico de mayor concentración con actividad antioxidante.

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. Material

2.1.1. Material de estudio

1 kg de frutos de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth “algarrobo” de las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad.

2.1.2. Material de Laboratorio

2.1.2.1. Material de vidrio y otros

- Balones fondo redondo de 25 mL, 50 mL y 100 mL
- Embudos de filtración
- Espátulas
- Matraces aforados de 10 mL, 25 mL, 100 mL y 500 mL
- Frascos ámbar
- Gradillas
- Guantes de nitrilo
- Jeringas de 3 mL y 5 mL
- Matraces Erlenmeyer de 100 mL y 250 mL
- Morteros
- Papel de aluminio
- Papel filtro MN751
- Papel Kraft
- Pinzas
- Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Pizetas
- Probetas de 100 mL
- Varillas de vidrio

- Vasos de precipitación de 50 mL, 100 mL, 250 mL y 1000 mL

2.1.2.2. Equipos de laboratorio

- Agitador magnético IKA, modelo C-MAG HS10
- Agitador vibratorio – Heidolph, modelo Reax Control
- Balanza analítica - A&D, modelo 5004
- Baño de ultrasonido con calefacción – Mrs Laboratory Equipment, modelo DC-150H
- Baño maría Memmert, modelo WNE14
- Equipo Cromatógrafo líquido de alta resolución Hitachi modelo Elite LaChrom
- Espectrofotómetro de microplacas UV/VIS Fisher Scientific, modelo accuSkan GO
- Estufa - JP Selecta, modelo 2000210
- Liofilizador Millrock Technology, modelo BT85B-A
- Micropipetas de 200 µL – Brand, modelo transferpette
- Refrigeradora - Coldex
- Rotaevaporador – Heidolph, modelo Laborota 4003 control
- Tamices N°20
- Ultracongelador Artiko
- Ultrapurificador – Simplicity, modelo UV System

2.1.2.3. Reactivos y solventes

- Acetato de sodio - Merck
- Ácido acético glacial - Merck
- Ácido gálico - Merck
- Agua destilada

- Ambelite® XAD7HP
- Carbonato de sodio
- Carbonato de sodio - J.T.Baker
- Etanol 96% CKF
- Etanol 96° %. CKF
- FeCl₃.6H₂O - Sigma-Aldrich
- Metanol grado HPLC
- Reactivo de Folin-CioCalteu - Sigma-Aldrich
- Reactivo de FRAP Sigma-Aldrich
- Reactivo DPPH - Sigma-Aldrich
- TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) - Sigma-Aldrich
- Trolox Sigma-Aldrich

2.2. Método

2.2.1. Recolección de la muestra

Los frutos de *P. pallida* se recolectaron durante la temporada de noviembre 2016 - marzo del 2017, en las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad.

2.2.2. Identificación y determinación taxonómica de la especie

La identificación botánica del material vegetal se realizó en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo; utilizándose muestras de frutos de *P. pallida*., recolectadas en cuatro localidades:

- Sector alrededores del parque Nacional cerros de Amotape, distrito de Casitas, provincia Contralmirante Villar, departamento de Tumbes, con coordenadas de latitud sur 04° 05' 39.3''; longitud oeste 80° 41' 28.9'' y altitud de 600 m s. n. m. y con código HUT 59850.

- Sector Batán Grande, distrito de Pitipo, provincia Ferreñafe, departamento de Lambayeque, con coordenadas de latitud sur 06° 28' 32.6''; longitud oeste 79° 42' 12.29'' y altitud de 97 m s. n. m. y con código HUT 59851.
- Ciudad de Piura, distrito de Piura, provincia de Piura, departamento de Piura con coordenadas de latitud sur 05° 10' 43.7''; longitud oeste 80° 37' 09.8'' y altitud de 37 m s. n. m. y con códigos HUT 59858 y 59859.
- Sector bosque algarrobal, distrito San Pedro de Lloc, provincia Pacasmayo, departamento de La libertad, con coordenadas de latitud sur 07° 27' 17.8''; longitud oeste 79° 30' 05.2'' y altitud de 45 m s. n. m. y con códigos HUT 59852 y 59853.

2.2.3. Preparación de la muestra

2.2.3.1. Selección de la muestra

Se seleccionaron los frutos que se encontraron maduros y en buen estado, eliminándose las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

2.2.3.2. Secado y pulverización

Se secaron los frutos de las especies de *P. pallida* en estufa a 40 °C.

Se separaron las semillas y luego se pulverizó con la ayuda de un mortero para la obtención de una muestra homogénea. Finalmente fueron guardados hasta su posterior uso en frascos de color ámbar.

2.2.4. Preparación de los extractos

Los extractos fueron preparados al 10% peso/volumen, tres hidroalcohólicos (etanol 96%, 70% y 45%) y dos acuosos (infuso y decocto). (Ganoza Yupanqui *et al.*, 2015; Torres-Guevara; Ganoza-Yupanqui, 2017)

2.2.4.1. Extractos Hidroalcohólicos

Al material vegetal pulverizado y tamizado se le adicionó etanol (96%, 70% y 45%), luego se sonicó por 20 minutos a temperatura ambiente, luego se filtró a través de papel de filtro.

2.2.4.2. Extractos acuosos

El decocto fue obtenido por la adición de agua destilada al material vegetal y llevado a ebullición por 10 minutos. El infuso se preparó adicionando agua recientemente hervida al material vegetal, se tapó y se dejó en contacto por 10 minutos; en ambos casos se filtraron y se obtuvieron los extractos.

2.2.5. Liofilización de los extractos

Los extractos fueron secados al vacío en un rotaevaporador, luego fueron resuspendidos con agua destilada y llevados a -80 °C en un ultracongelador por 72 horas, posteriormente se colocaron en un liofilizador por 48 horas y fueron almacenados en frascos ámbar entre 2 y 8 °C. (Zavala-Urtecho *et al.*, 2018).

2.2.6. Purificación de los extractos

El extracto seco resultante fue suspendido mediante el uso de un baño de ultrasonido en 15 mL de agua destilada y luego se mezcló con Amberlite. La resina se lavó con 1 L de agua destilada y se eluyó con 1 L de metanol grado HPLC. El eluato se concentró bajo presión reducida y después se almacenó a -20 ° C hasta su uso (Cattaneo *et al.*, 2014; Quispe *et al.*, 2014).

2.2.7. Determinación de compuestos fenólicos

Preparación de la curva de calibración

Se obtuvo una curva de calibración con la solución patrón de ácido gálico preparándose una solución 1 mg/mL de ácido gálico en etanol, fueron realizadas 6 diluciones estándar entre 0,02 y 0,16 mg/mL. Se tomó 25 μ L de cada dilución y se mezcló con 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y se agitó por 20 minutos a 45 °C. Posteriormente se adicionó 100 μ L de Na₂CO₃ al 7%, se dejó reposar por 10 minutos en oscuridad y se realizó la medición en un espectrofotómetro de microplacas UV/VIS a 760 nm (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2018).

Determinación de compuestos fenólicos en los extractos

Se pesaron 10 mg de cada liofilizado y se disolvió en 1 mL de su respectivo solvente, luego se realizó una dilución al 1/4, se tomó 25 μ L y se mezcló con 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y se agitó por 20 minutos a 45 °C. Posteriormente se adicionó 100 μ L de Na₂CO₃ al 7%, se dejó reposar por 10 minutos en oscuridad y se realizó la medición en un espectrofotómetro de microplacas UV/VIS a 760 nm. Los valores fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado (mg EAG/g), las mediciones fueron realizadas por triplicado. (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2018)

2.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió por medio de la captura de radicales libres de los extractos que fue determinada por los métodos de:

- DPPH, que utiliza como referencia la disolución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
- ABTS 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y sulfato de potasio (peroxdisulfato de potasio)
- FRAP, que utiliza una mezcla de los reactivos:

Buffer de acetato: 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ): Cloruro férrico hexahidratado, en proporciones de 10:1:1

2.2.8.1. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH

Para hallar la curva de calibración, se preparó una solución de Trolox a 1 mg/mL en etanol, a partir de esta solución, se prepararon 6 diluciones a concentraciones estándar entre 0,25 y 0,025 mg/mL, se tomó 10 µL de cada dilución, se le agregó 300 µL del reactivo DPPH preparado al 0,2 mM, se agitó por 15 minutos y se midió en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

De igual manera se procedió con los extractos preparados a 10 mg/mL y se siguió con el procedimiento realizado con los estándares. Los ensayos fueron realizados por triplicado y expresados en mg de equivalentes de Trolox por gramo de extracto liofilizado (mg ET/g)

(Alam *et al.*, 2013; Alarcón-Aguilar *et al.*, 2018).

2.2.8.2. Determinación de la actividad antioxidante por ensayo ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl- benzothiazolline-6-sulfonic acid))

Se preparó una solución patrón de Trolox a 1 mg/mL en etanol de 96%, a partir de esta solución, se prepararon diluciones a concentraciones estándar entre 0.013 y 0.2 mg/mL. Se tomó 10 µL de cada dilución y se agregó 300 µL del ABTS con una absorbancia de

0.7 a 750 nm aproximadamente. Se agitó por 5 minutos y se midió en un espectrofotómetro de microplacas UV/VIS a 750 nm. Asimismo, se procedió con los extractos preparados a 10 mg/mL y se procedió del mismo modo que las soluciones estándar. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores fueron expresados en mg de equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mg TE/g). (Re *et al.*, 1999; Seeram *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2013).

2.2.8.3. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El reactivo de FRAP fue preparado utilizando buffer acetato 300 mM (pH 3,6), solución TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM y una solución de FeCl₃.6H₂O, 20 mM. Se mezclaron 25 mL de buffer acetato con 2,5 mL de solución TPTZ y 2,5 mL de solución de FeCl₃.6H₂O, luego se incubó a 37 °C. A partir de la solución de Trolox de 1 mg/mL se prepararon 6 diluciones a concentraciones estándar entre 0,013 y 0,13 mg/mL. Se hizo reaccionar 8 µL de cada dilución con 200 µL del reactivo de FRAP por 30 minutos a 37 °C y se midió en un espectrofotómetro UV/VIS a 593 nm. Con el mismo procedimiento se evaluaron los extractos preparados a 10 mg/mL por triplicado y se expresaron en mg ET/g (Benzie y Strain, 1996; Alam *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2014).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores fueron expresados en mg de equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mg TE/g).

2.2.9. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El sistema de HPLC empleado fue un Elite LaChrom con arreglo de diodos, con columna RP 18-5 μ (250 x 4,6 mm). Aproximadamente 5 mg de cada fracción retenida por Amberlite, se disolvieron en 1 mL de metanol:agua (1:1 v/v), luego se filtró a través de un filtro PTFE de 0,45 micras y se inyectó en el HPLC-DAD. Las lecturas de los extractos se realizaron a 254 y 330 nm. Además, el extracto fue sujeto de un barrido espectrofotométrico desde 200 hasta 600 nm, para la caracterización de los picos. Los análisis de HPLC se realizaron usando un sistema de disolvente de gradiente: Ácido fórmico al 0,1% v/v en H₂O y CH₃CN se emplearon como fases móviles A y B, respectivamente. Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 0,0-15 min 3-30% B; 15-25 min 30-50% B; 25-35 min 50-90% B, 35,0-40,0 min 90% B, 40,0-45,0 min 3% B. Columna: C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), velocidad de flujo 1 mL/min, volumen de inyección de 20 μ L, longitudes de onda 254 nm y 330 nm y temperatura 30 °C.

2.2.10. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Obtenido los perfiles de HPLC de los extractos purificados se procedió a analizar la muestra por un cromatógrafo líquido de ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas (UPLC-MS/MS).

LC-MS/MS se realizó en una UHPLC Cuaternaria de rápida separación Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). La separación se logró en una columna Kinetex de 1,7 μ m EVO C18 (50 \times 2,1 mm; 1,7 μ m, 100 Å, Phenomenex). Para eluir 0,1% (v/v) ácido fórmico en H₂O y MeCN (suministrado con 0,1% (v/v) de ácido fórmico) se emplearon como fases móviles A y B, respectivamente.

Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 0.0–15 min 3-30% B; 15–25 min 30–50% B; 25–35 min 50–90% B, 35.0–40.0 min 90% B, 40.0–45.0 min 3% B. El caudal de la fase móvil fue de 300 μ L/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. El UHPCL se acopló a un espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de ion electrospray calentada (HESI) operada en los modos de ionización positiva o negativa. El voltaje de pulverización iónica se mantuvo a 4000 o 4200 V en los modos de ionización positiva y negativa, respectivamente. La temperatura de secado se ajustó a 300 ° C y el flujo de gas seco se ajustó a 10 L/min. Se usó nitrógeno como gas seco, gas nebulizador y gas de colisión. La energía de colisión se fijó a 35 eV. Los espectros HRESIMS y MS/MS se adquirieron en un rango m/z de 200 a 2000 amu.

2.2.11. Análisis de datos

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para verificar la diferencia entre las concentraciones de los extractos y su actividad antioxidante y luego se realizó la comparación múltiple (Test de Tukey) utilizando un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$). Los datos fueron procesados en el software IBM SPSS Statistics versión 23.

III. RESULTADOS

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

TABLA 1. Compuestos fenólicos expresado en ácido gálico, obtenidos de cinco extractos de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO	COMPUESTOS FENÓLICOS (mg EAG/g± DS) ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	51,4434±1,16	52,1648±0,81	39,4730±0,76	52,3402±0,25
Infuso	57,2921±1,00	38,8687±1,09	47,9342±0,89	50,7221±1,21
Etanol 45%	53,3345±2,83	49,1819±2,10	35,2814±3,25	50,5466±0,84
Etanol 70%	49,5913±0,99	34,5991±0,60	48,1096±2,23	54,1338±2,61
Etanol 96%	55,5180±1,39	58,0330±2,50 ^b	48,2851±3,02	50,6246±1,08

^a mg EAG/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

TABLA 2. Actividad antioxidante utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, en cinco extractos de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO	DPPH (mg ET/g±DS) ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	3,8361±0,42	4,1641±0,16	3,3374±0,19	5,2664±0,30 ^b
Infuso	4,4397±0,10	2,1171±0,08	3,0750±0,17	3,7049±0,24
Etanol 45%	4,0067±0,24	2,5108±0,18	2,4714±0,47	3,3637±0,37
Etanol 70%	3,6393±0,32	2,3008±0,32	2,7994±0,38	3,7311±0,40
Etanol 96%	4,8071±0,34	4,3478±0,40	3,6786±0,18	4,0985±0,10

^a mg ET/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

TABLA 3. Actividad antioxidante utilizando el ensayo del Ferric Reducing Antioxidant Power, en cinco extractos de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO	FRAP (mg ET/g±DS) ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	6,9242±0,34	5,4762±0,39	5,5107±0,08	6,0738±0,44
Infuso	7,3839±0,45	5,9474±0,22	5,6486±0,12	8,4642±0,45 ^b
Etanol 45%	6,5910±0,15	5,3842±0,25	5,6486±0,34	7,7977±0,04
Etanol 70%	7,3782±0,25	5,3153±0,20	5,5049±0,04	6,6657±0,17
Etanol 96%	7,2748±0,28	6,4243±0,31	6,5278±0,22 ^{bb}	7,6655±0,42

^a mg ET/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

TABLA 4. Actividad antioxidante por ensayo con 2,2'-azinobis (3-ethyl- benzothiazolline-6-sulfonic acid), en cinco extractos de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO	ABTS (mg ET/g±DS)			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	17.0049±0,62	15.4383±0,29	13.7048±0,38	16.9029±0,24
Infuso	16.7917±0,25	14.5391±0,17	12.6387±0,39 ^b	16.1057±0,23
Etanol 45%	17.4684±0,67	15.1509±0,61	13.4916±0,31	15.8739±0,11
Etanol 70%	17.0327±0,49	14.2980±0,35	11.6468±0,13	14.6874±0,53 ^{bb}
Etanol 96%	17.6260±0,53 ^b	12.8797±0,71	11.1648±0,29	11.9713±0,22 ^{bb}

^a mg ET/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

TABLA 5. Compuestos fenólicos expresado en ácido gálico, obtenidos de extractos purificados de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO PURIFICADO	COMPUESTOS FENÓLICOS (mg EAG/g± DS)^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	43,5230± 0,51	50,3904± 0,59	69,1136± 2,96	90,6515± 1,70 ^b
Infuso	63,6792± 0,50	61,9441± 1,88 ^b	69,5766± 1,30	81,0401± 1,58 ^b
Etanol al 45%	68,7042± 1,43 ^b	56,8411± 0,40	85,3511± 1,87 ^b	70,7683± 0,64
Etanol 70%	56,8508± 0,58	61,6468± 0,52	76,0468± 0,37	64,2933± 0,86
Etanol 96%	63,9789± 0,61	60,9690± 0,51	64,6735± 0,74	44,5466± 1,01

^a mg EAG/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

TABLA 6. Actividad antioxidante utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, extractos purificados de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO PURIFICADO	DPPH (mg ET/g)±DS ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	12,6743±1,74	31,7860±0,62 ^b	43,5999±1,49 ^b	37,0307±1,50 ^b
Infuso	24,5441±1,83	22,7709±0,22	27,1827±1,06	35,2523±0,87
Etanol 45%	24,4006±0,34	18,1480±0,28	36,3935±1,72	29,4941±2,45
Etanol 70%	18,6912±0,10	22,6427±3,05	34,9684±0,44	29,7258±1,12
Etanol 96%	19,5061±2,10	23,1227±1,01	27,3681±1,39	20,5730±1,03

^a mg ET/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

Tabla 7. Actividad antioxidante utilizando el ensayo del Ferric Reducing Antioxidant Power, extractos purificados de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO PURIFICADO	FRAP (mg ET/g) \pm DS ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	28,2946 \pm 0,10	31,2511 \pm 1,22	51,9692 \pm 2,11	69,8228 \pm 1,62 ^b
Infuso	47,6969 \pm 2,48	37,0691 \pm 0,92	48,3634 \pm 2,20	63,6198 \pm 2,27
Etanol 45%	55,8336 \pm 2,19 ^b	32,0297 \pm 1,02	62,3470 \pm 3,94 ^b	39,9739 \pm 1,40
Etanol 70%	39,6952 \pm 1,52	42,2925 \pm 1,16	52,6013 \pm 0,42	43,4619 \pm 0,65
Etanol 96%	43,3383 \pm 0,74	43,1238 \pm 1,01	36,6238 \pm 0,87	22,8960 \pm 1,06

^a mg ET/g \pm DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra \pm desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

Tabla 8. Actividad antioxidante por ensayo con 2,2'-azinobis (3-ethyl- benzothiazolline-6-sulfonic acid), en extractos purificados de frutos de *P. pallida*, procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú.

EXTRACTO PURIFICADO	ABTS (mg ET/g)±DS ^a			
	Tumbes	Piura	Lambayeque	La Libertad
Decocto	66,4381±2,92	72,0974±0,59	62,1044±2,86	76,5424±4,47 ^b
Infuso	77,2979±2,83	82,6745±1,30	52,3523±0,89	36,2735±3,86
Etanol 45%	95,8518±0,99 ^b	80,3987±1,31	82,5354±1,72 ^b	49,2608±4,53
Etanol 70%	82,4520±0,49	81,6826±2,16	70,6791±3,70	49,3998±4,84
Etanol 96%	82,4103±0,22	80,1232±1,01	47,8703±3,31	21,6501±1,50

^a mg ET/g± DS: Promedios de miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ± desviación estándar (n=3)

^b extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, p<0,05 (Prueba post hoc de Tukey HSD)

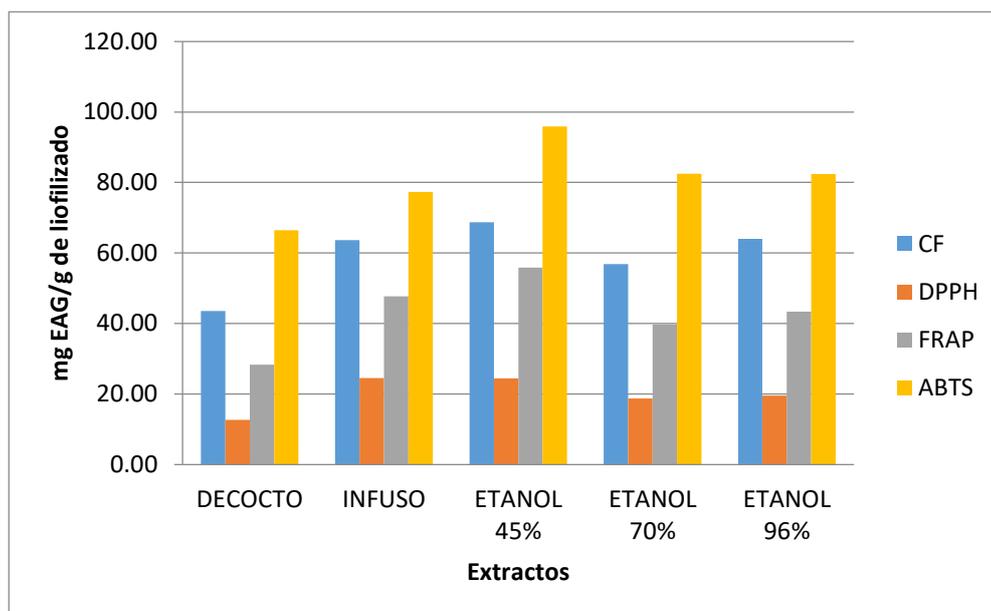


Figura 1. Concentración de compuestos fenólicos (CF) versus la actividad antioxidante, (DPPH, FRAP, ABTS) de los extractos purificados de frutos de *P. pallida* procedentes de Tumbes.

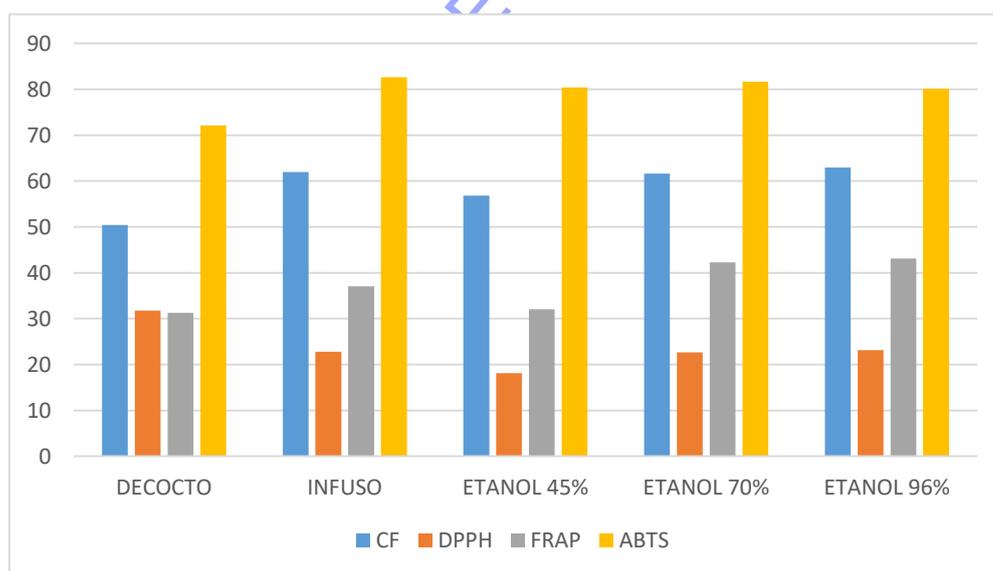


Figura 2. Concentración de compuestos fenólicos (CF) versus la actividad antioxidante, (DPPH, FRAP, ABTS) de los extractos purificados de frutos de *P. pallida* procedentes de Piura

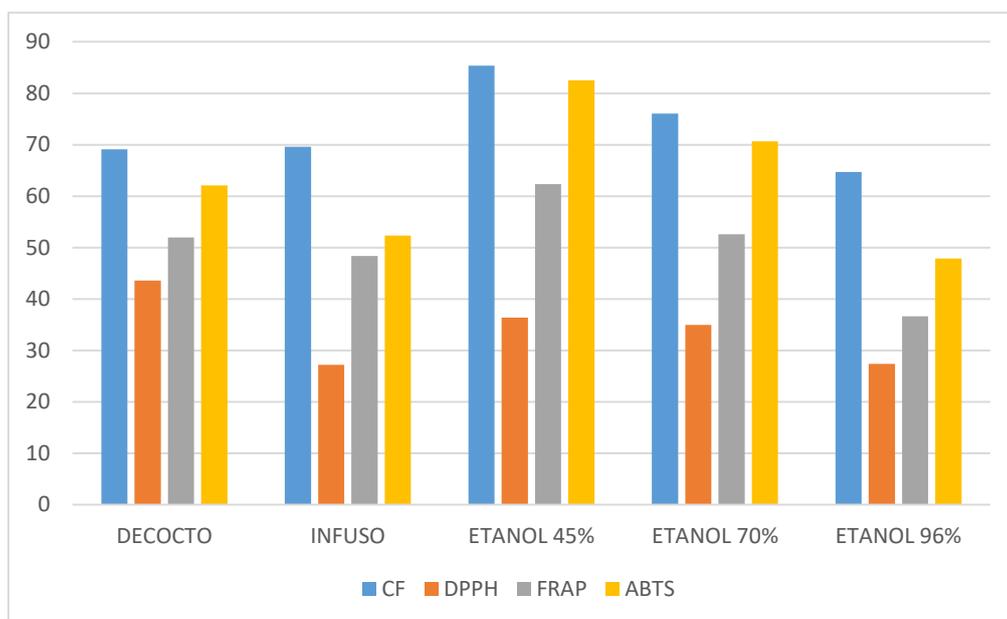


Figura 3. Concentración de compuestos fenólicos (CF) versus la actividad antioxidante, (DPPH, FRAP, ABTS) de los extractos purificados de frutos de *P. pallida* procedentes de Lambayeque

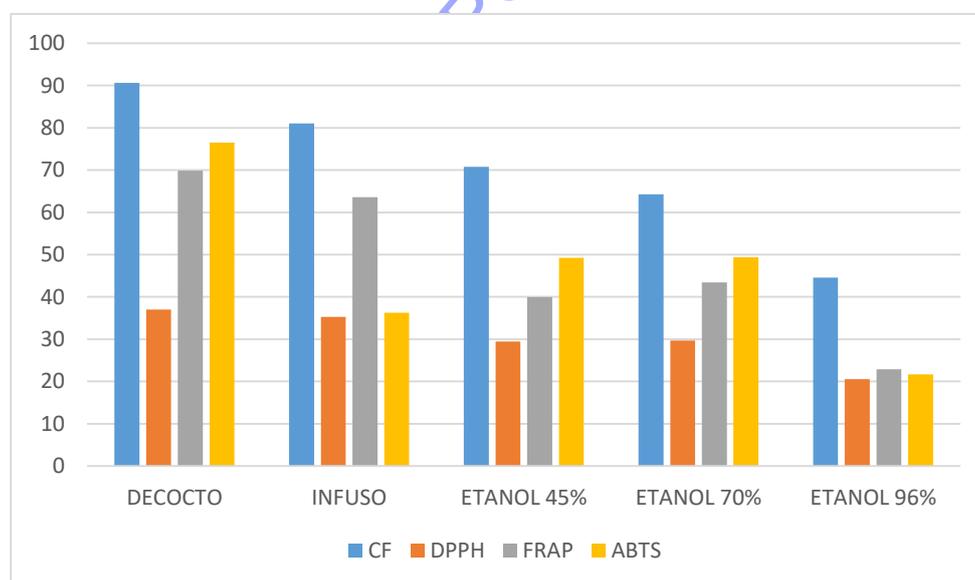


Figura 4. Concentración de compuestos fenólicos (CF) versus la actividad antioxidante, (DPPH, FRAP, ABTS) de los extractos purificados de frutos de *P. pallida* procedentes de La Libertad

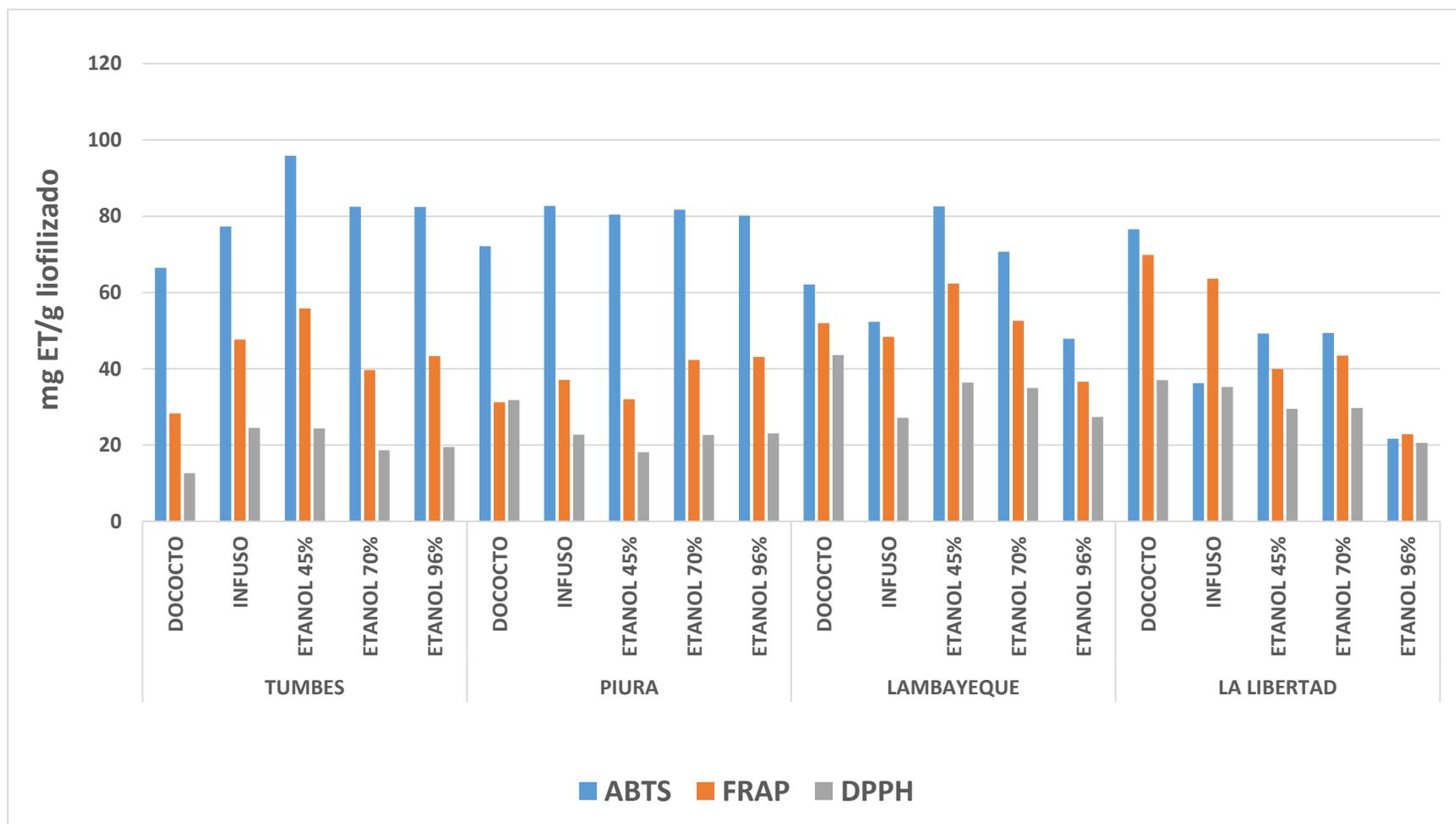


Figura 5. Actividad antioxidante de los extractos purificados expresados en Trolox (mg ET/g), de los extractos purificados de frutos de *P. pallida* procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú

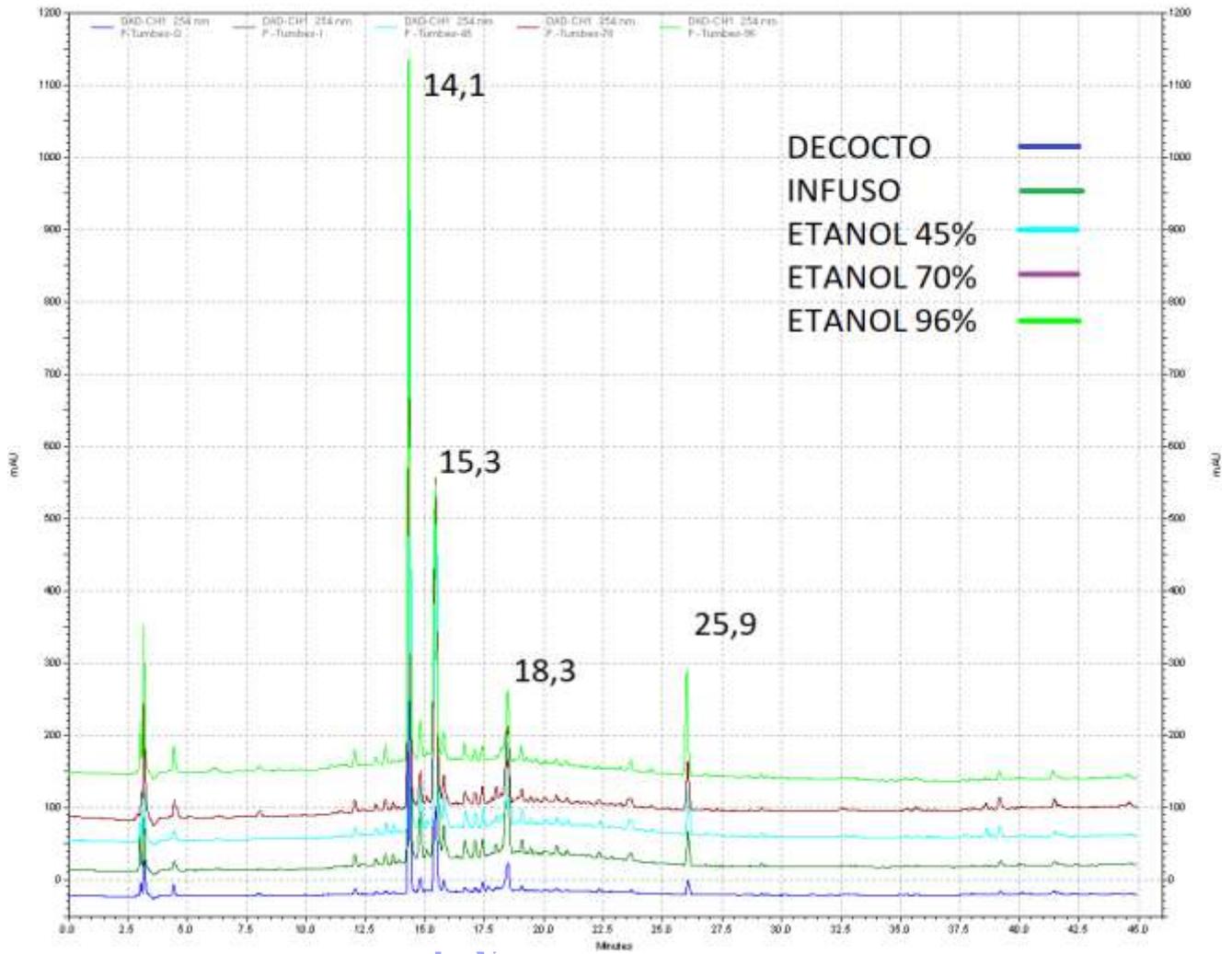


Figura 6. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de Tumbes a 254 nm

BIBLIOTECA

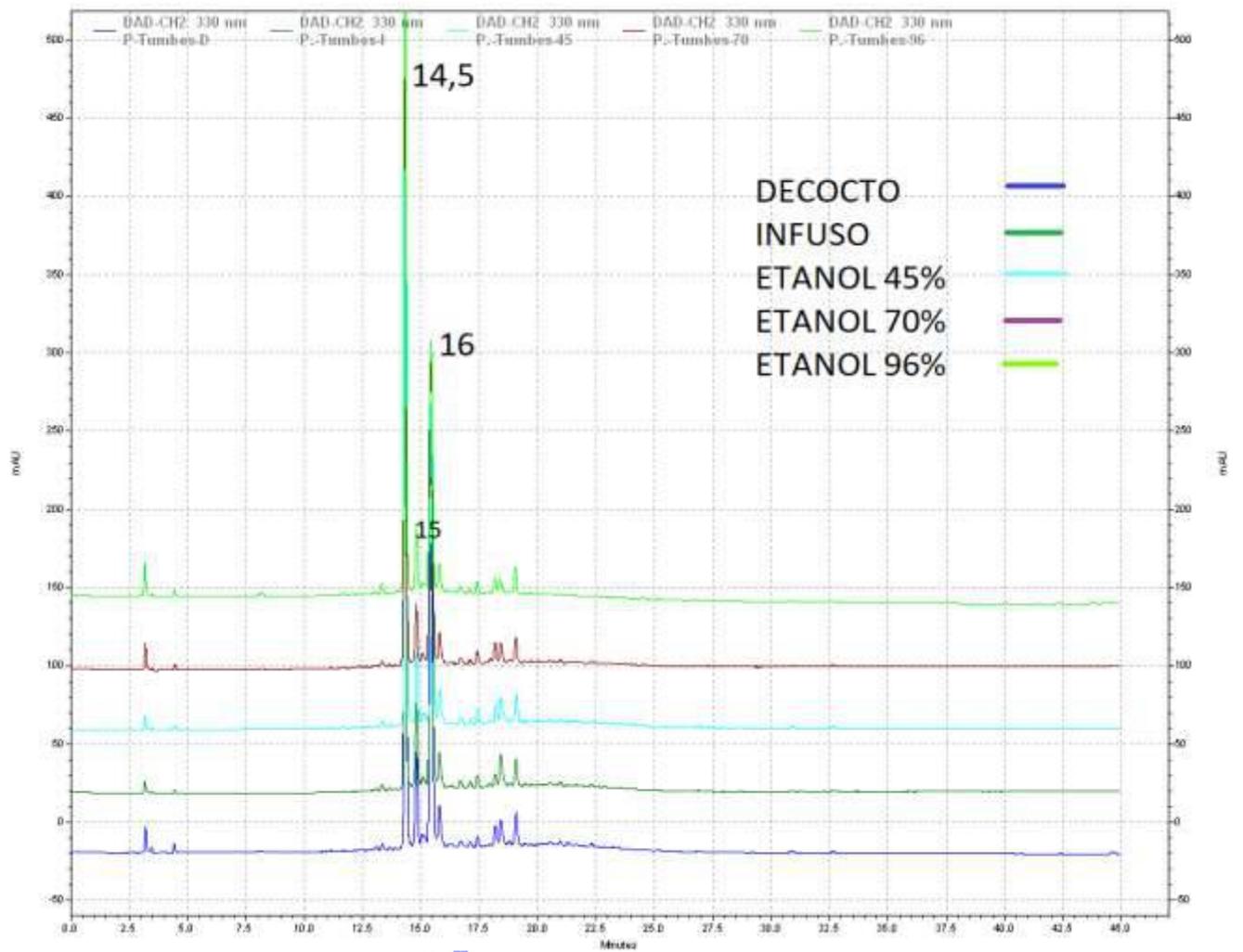


Figura 7. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de Tumbes a 330 nm

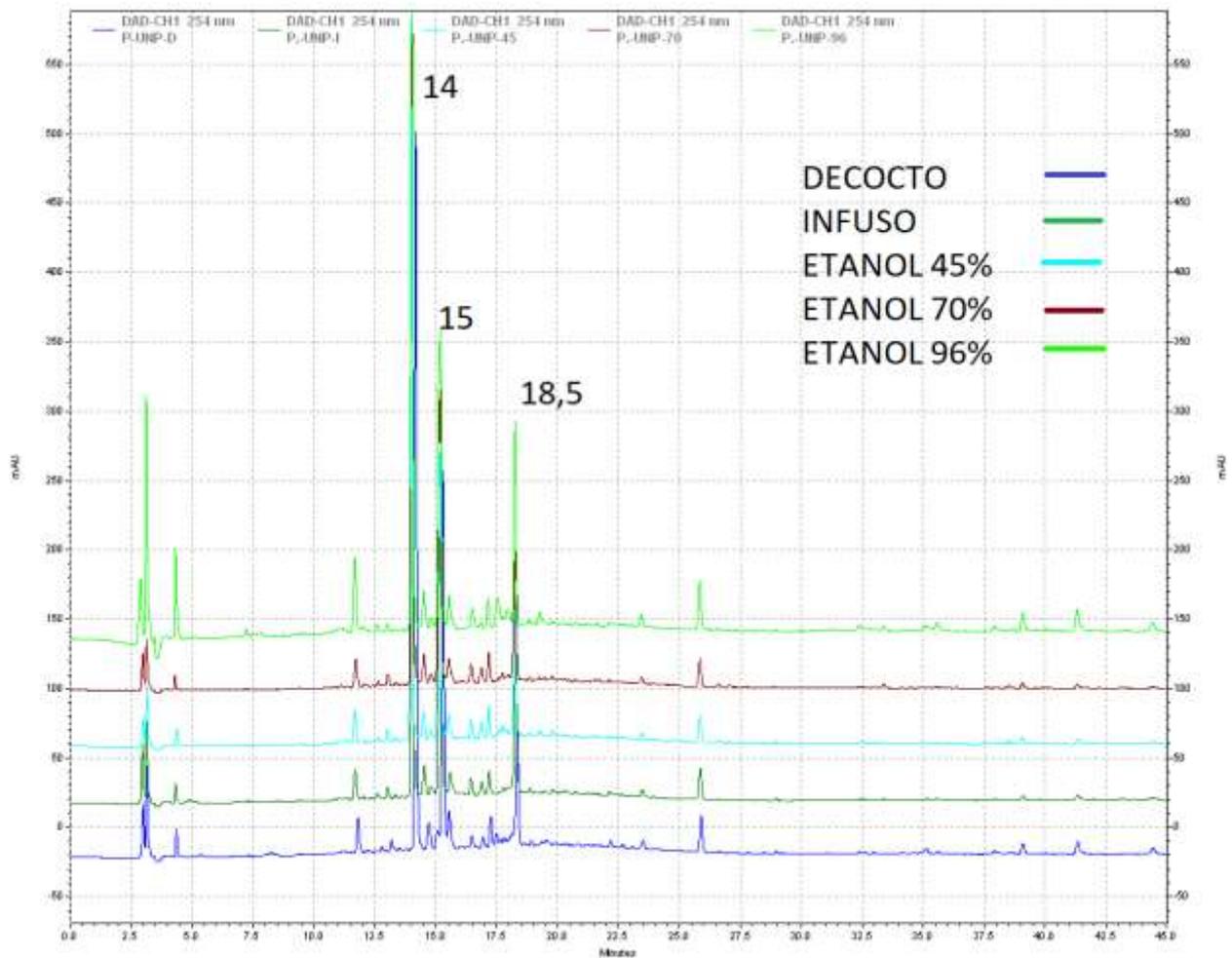


Figura 8. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de Piura a 254 nm

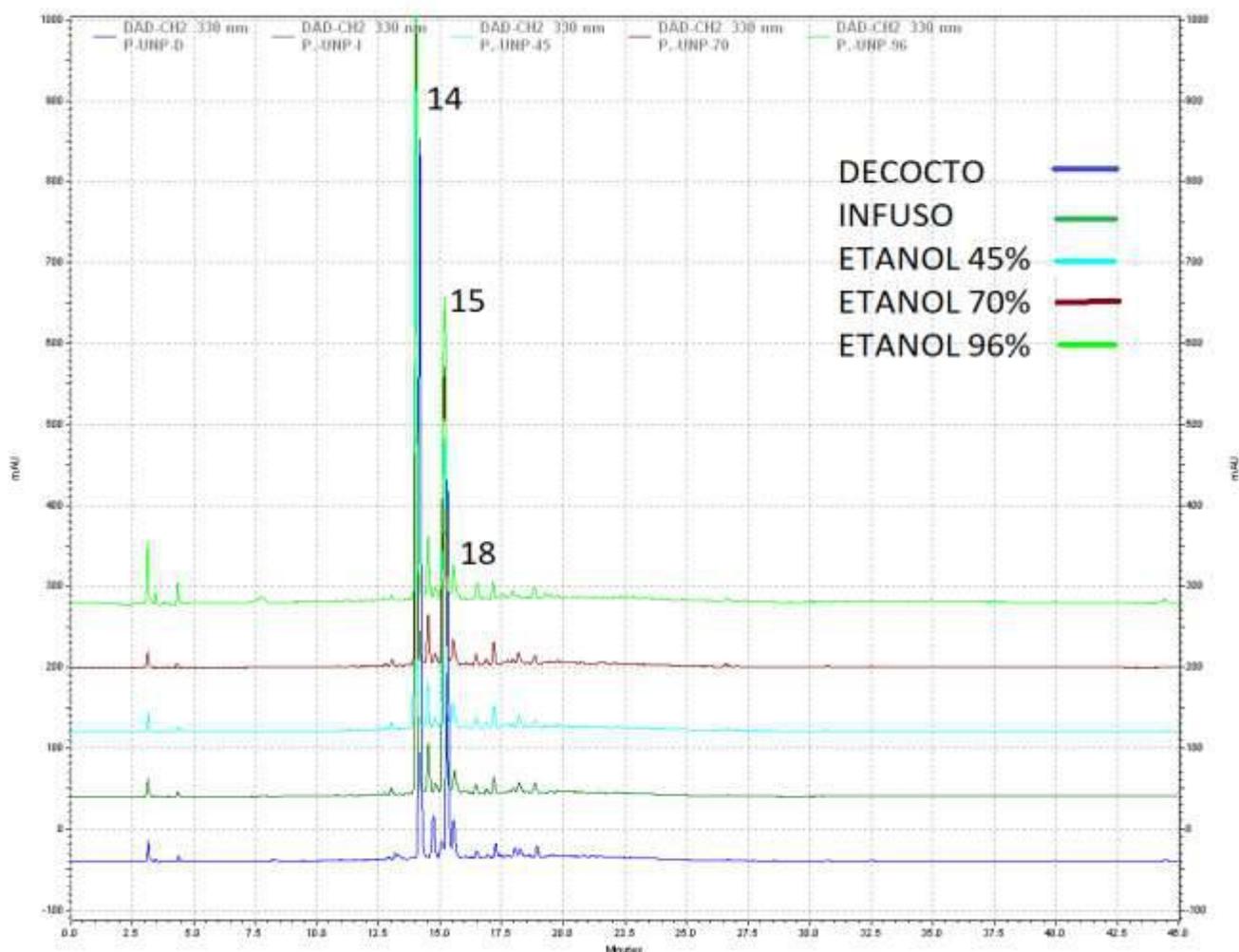


Figura 9. Perfiles cromatográficos de extractos acuoso e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de Piura a 330 nm

BIBLIOTECA

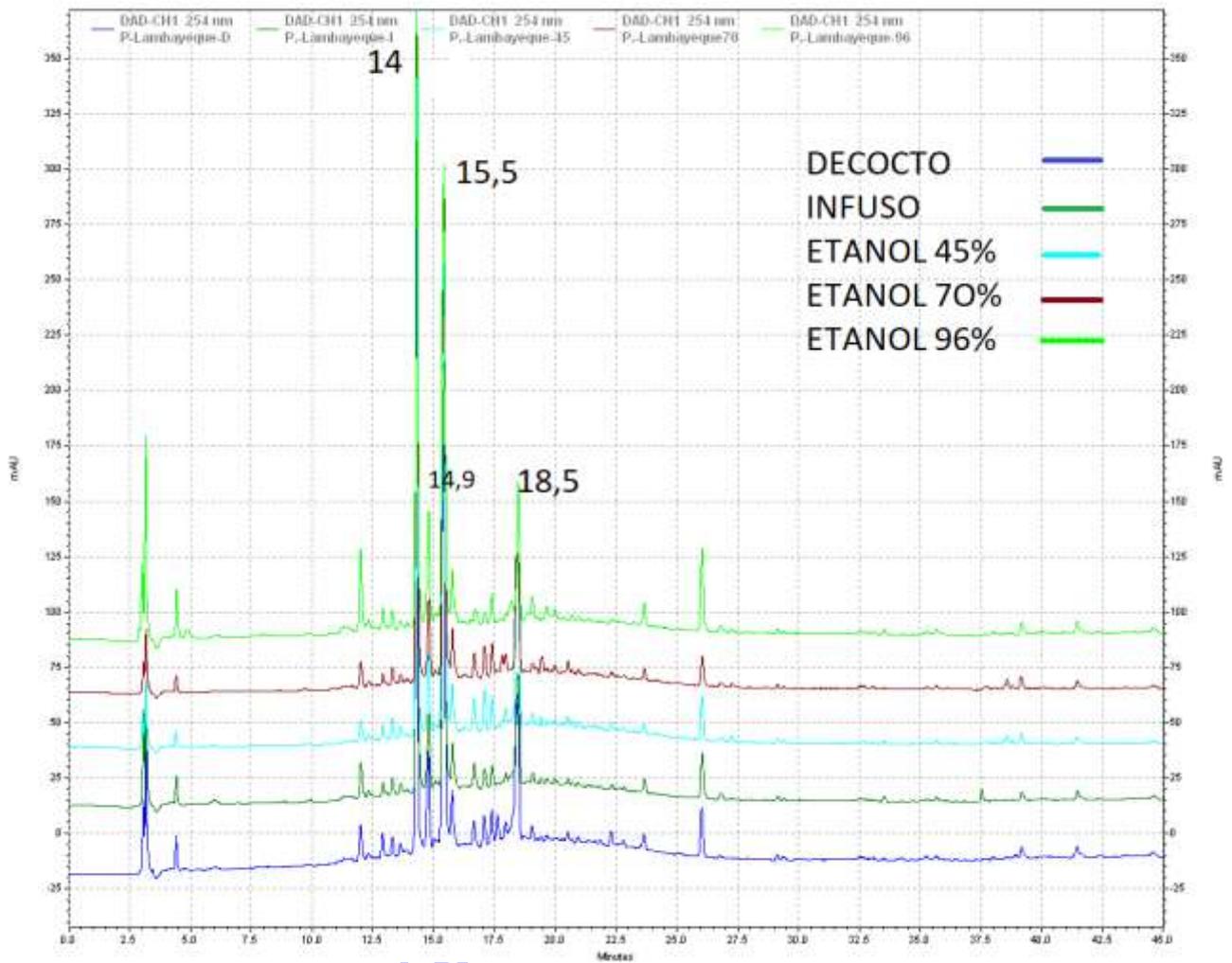


Figura 10. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de Lambayeque a 254 nm

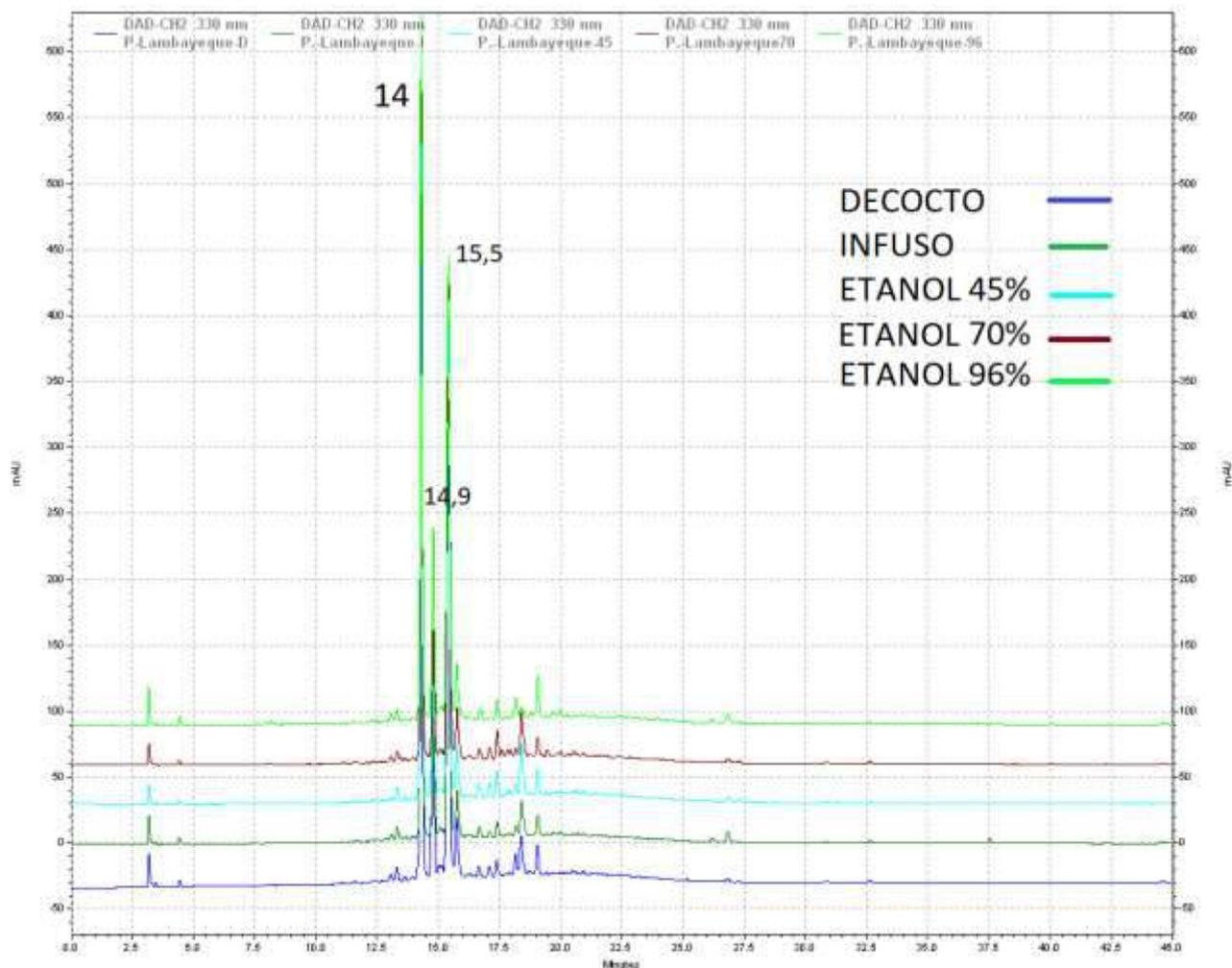


Figura 11. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos *P. pallida* procedentes de Lambayeque a 330 nm

BIBLIOTECA

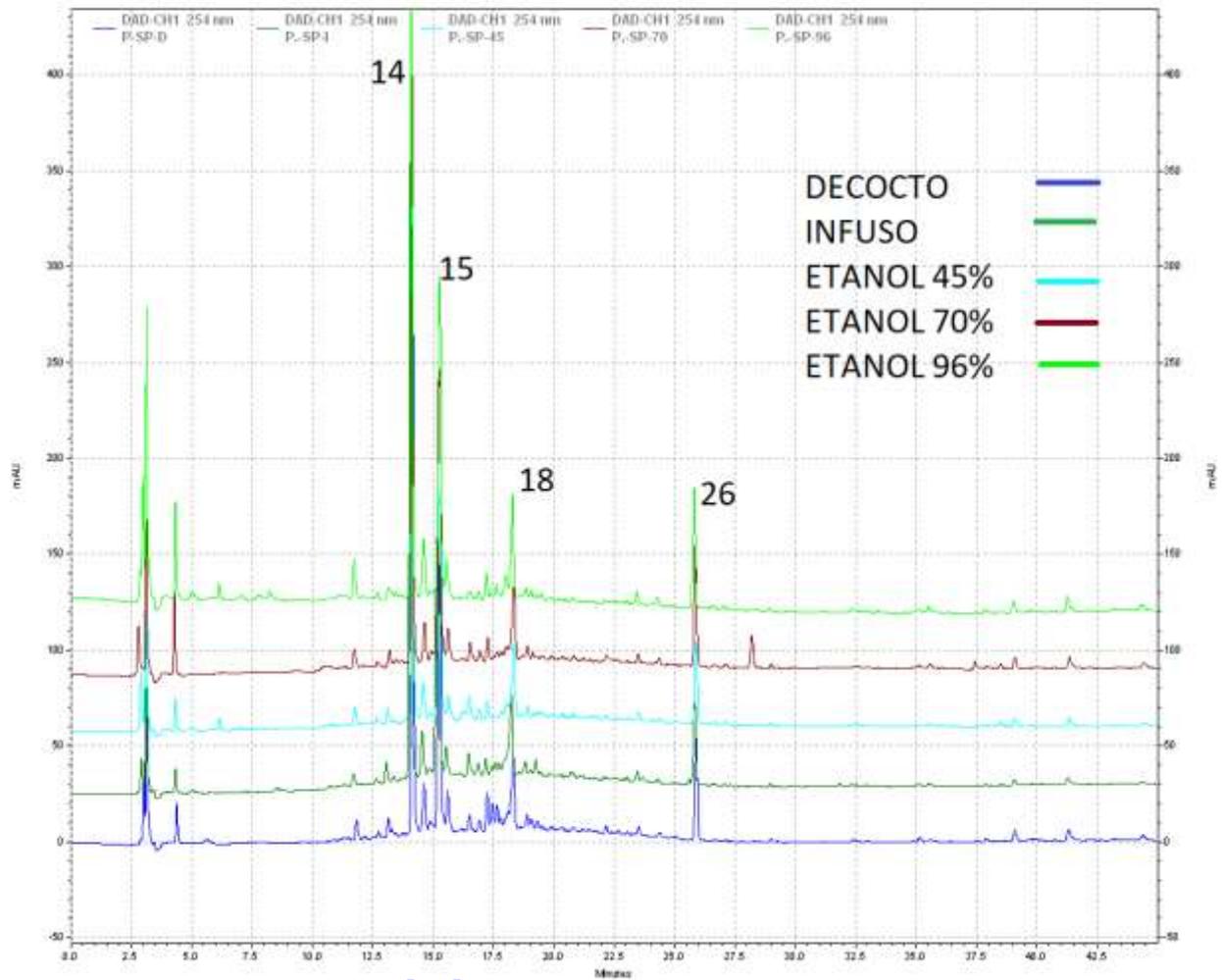


Figura 12. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de La Libertad a 254 nm

BIBLIOTECA

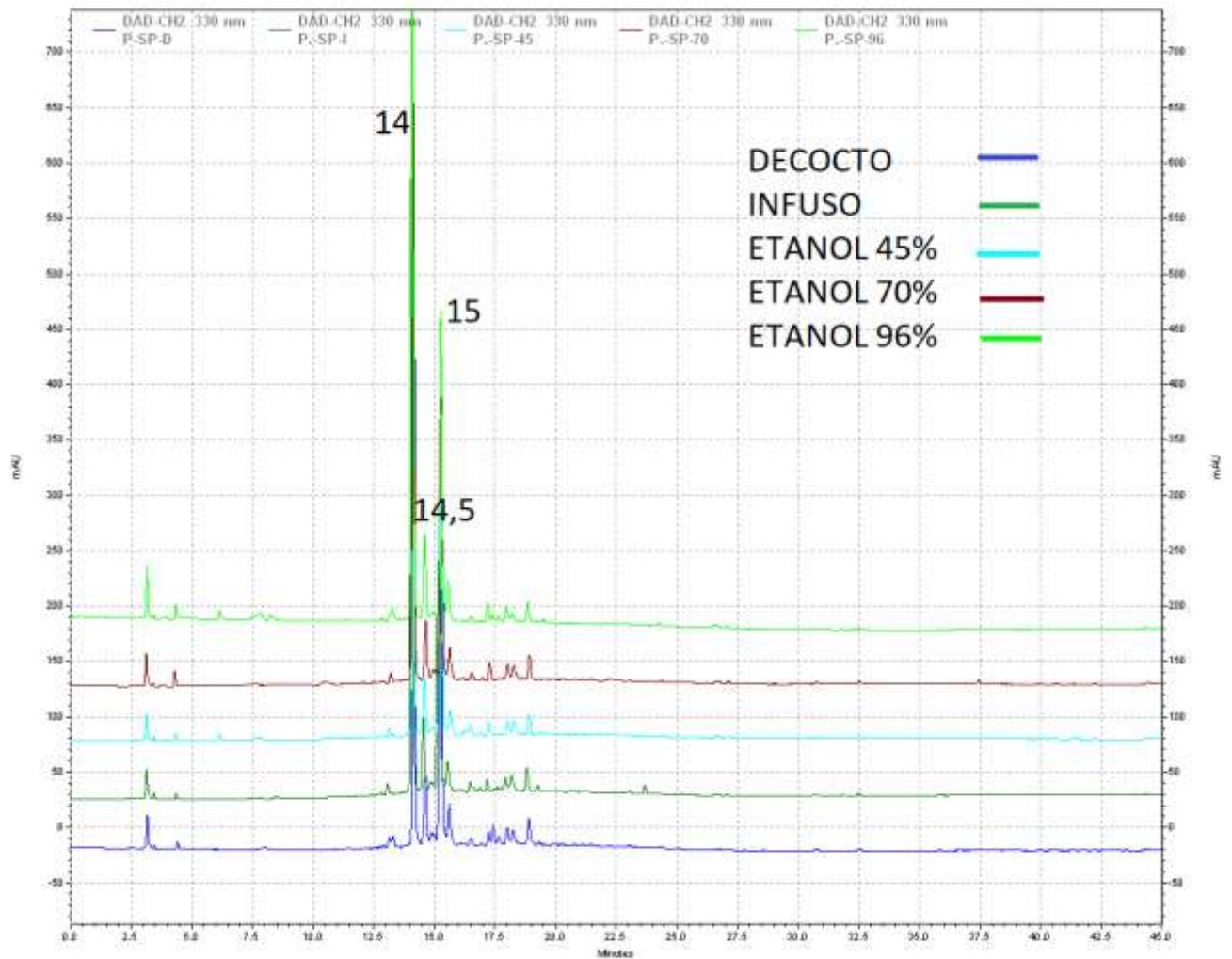


Figura 13. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos e hidroetanólicos purificados, de frutos de *P. pallida* procedentes de La Libertad a 330 nm

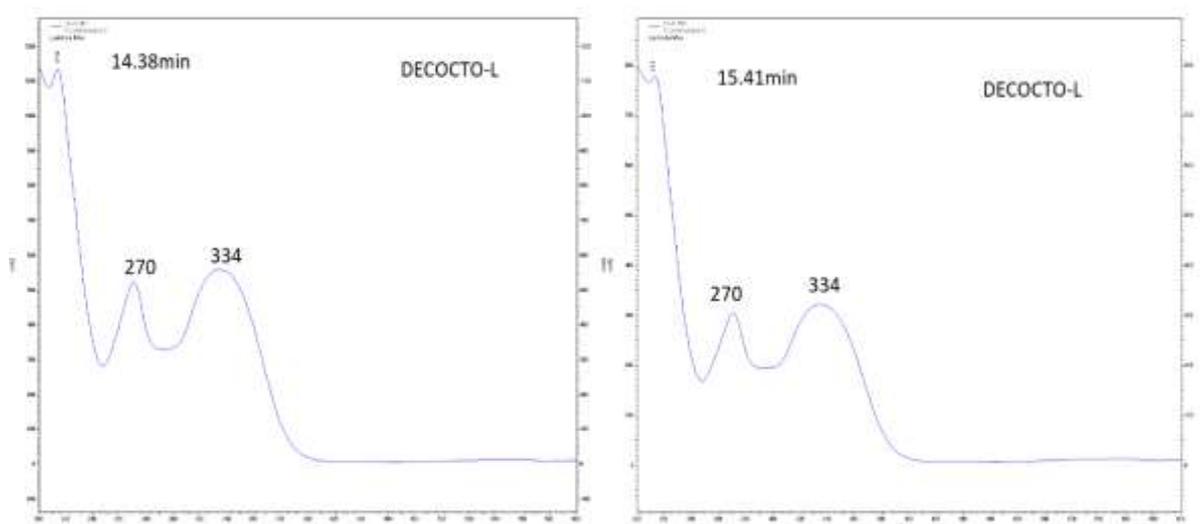


Figura 14. Perfiles UV-VIS de los compuestos fenólicos con tiempos de retención de 14,38 y 15,41; contenidos en el decocto de frutos de *P. pallida* procedentes de Lambayeque

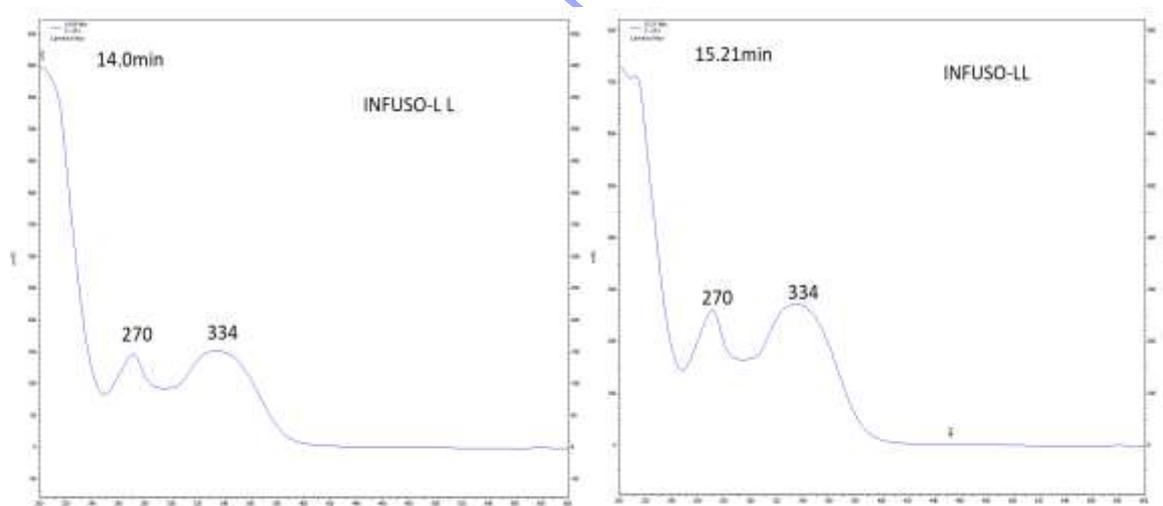


Figura 15. Perfiles UV-VIS de los picos a los tiempos de retención de 14,0 y 15,21 para el infuso de las muestras procedentes de La Libertad

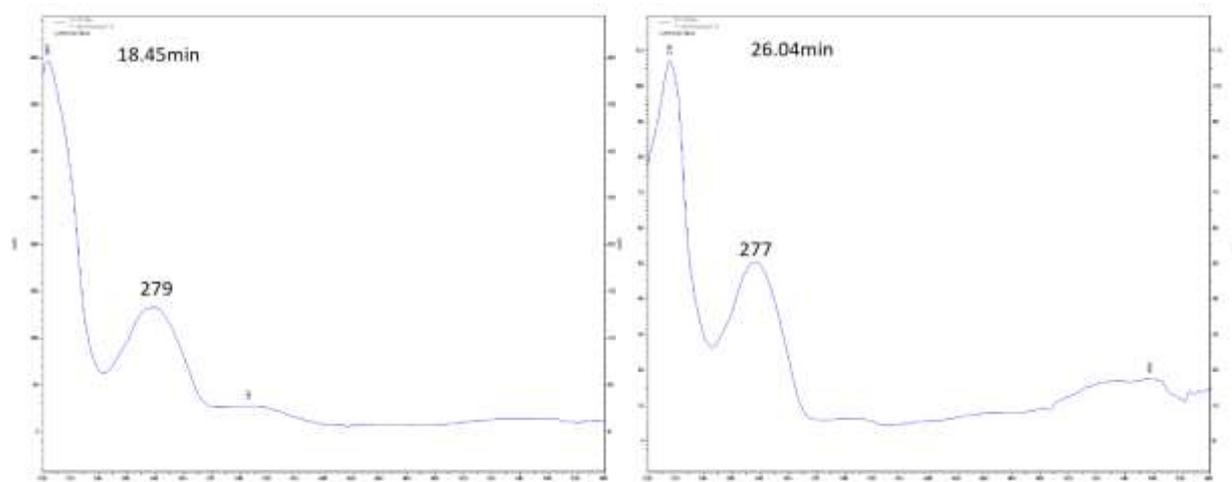


Figura 16. Perfiles UV-VIS de los picos a los tiempos de retención de 18,45 y 26,04 para el decocto de las muestras procedentes de Lambayeque

RT: 0.00 - 34.15

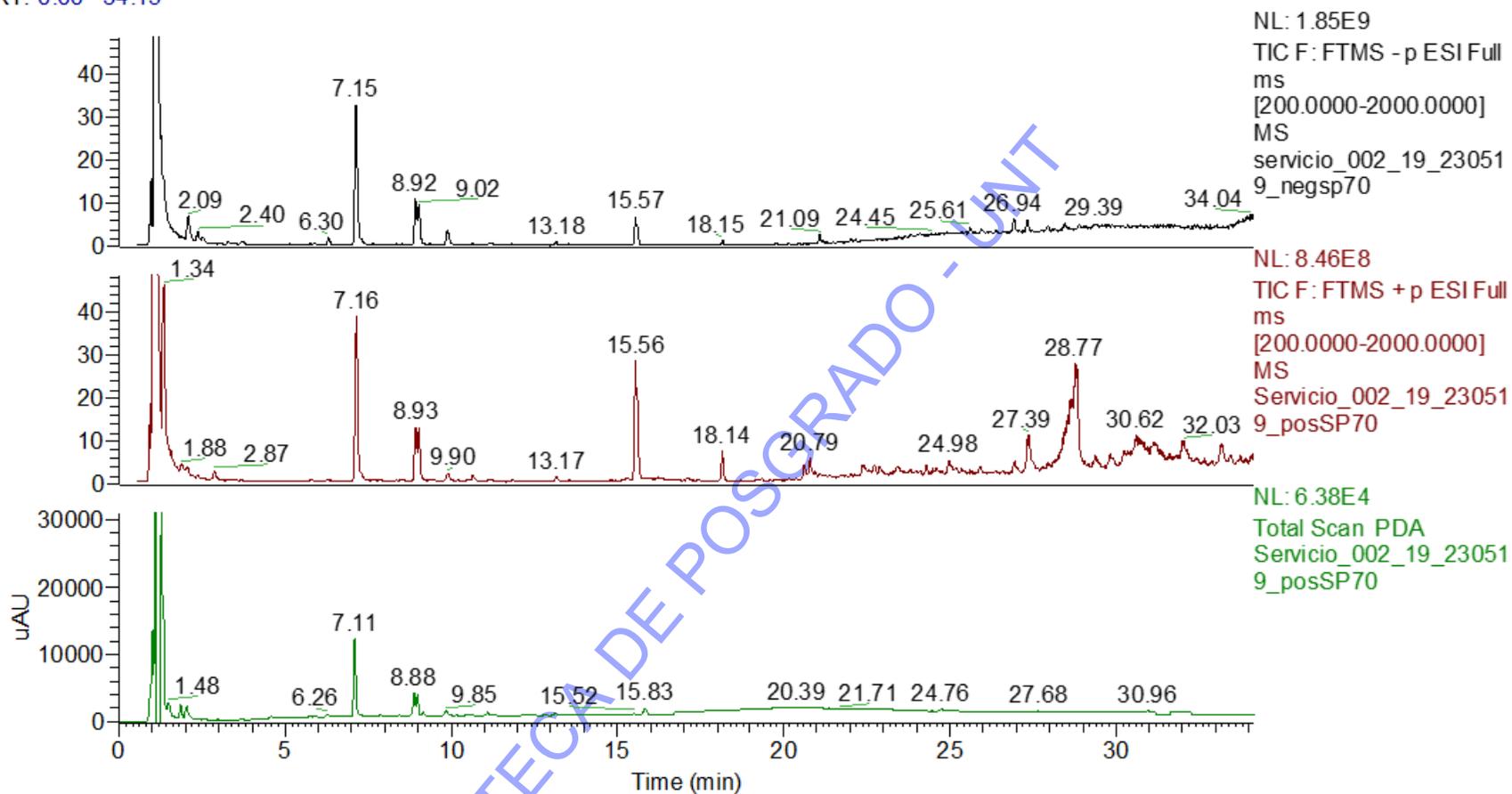


Figura 17. Cromatograma UPLC-MS/MS en ion modo negativo (negro), ion modo positivo (rojo) y barrido total con arreglo de fotodiodos (verde); del extracto etanólico al 70% de frutos de *P. pallida* del norte del Perú

Servicio_002_19_230519_posSP70

05/23/19 23:54:57

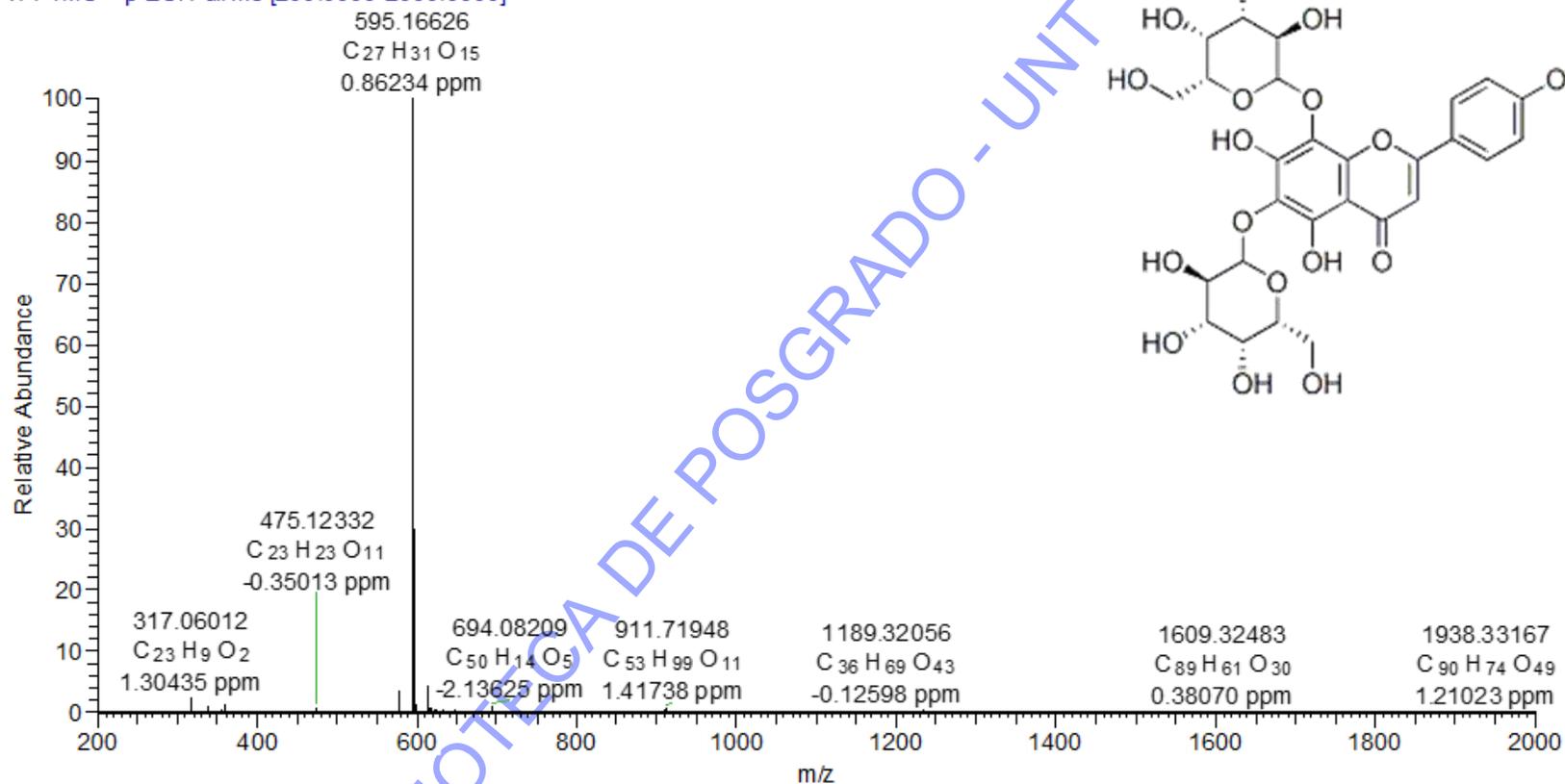
Servicio_002_19_230519_posSP70 #3455 RT: 7.16 AV: 1 NL: 1.80E8
T: FTMS +p ESI Full ms [200.0000-2000.0000]

Figura 18. Identificación del pico mayoritario (m/z 595,1662), ion modo positivo: apigenin-6,8-digalactósido (vicenin)

IV. DISCUSIÓN

En la determinación de los compuestos fenólicos de los extractos sin purificar (Tabla 1) se encontró que el extracto de etanol 96% de Piura presentó mayor concentración de compuestos fenólicos (58,0330 mg EAG/g) con un nivel de significancia de $p < 0,05$ respecto a los demás extractos, según la prueba post hoc de Tukey HSD, así mismo en las regiones de Tumbes, Lambayeque y La Libertad, no se presentaron diferencia significativa de los compuestos fenólicos entre el extracto de mayor concentración con los demás extractos en la misma región. Esto demuestra que hay influencia del hábitat y de los factores edafoclimáticos en la composición de los metabolitos (Mostacero León, 2005; Lester *et al.*, 2012).

Se evidencio la actividad antioxidante de los cinco extractos sin purificar de las cuatro regiones por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS; encontrándose por el método de DPPH (Tabla 2), que el decocto de los frutos de la región La Libertad fue altamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con los demás extractos, sin embargo, en las demás regiones el extracto de etanol 96% presentó mayor actividad sin significancia estadística. Mientras que por el método del FRAP la mejor diferencia significativa fue presentada en el extracto de etanol 96% de la región Lambayeque (Tabla 3), pero los mejores valores promedio de ET/g se presentaron en los extractos de la región La Libertad. Por otro lado, Al evaluar la actividad antioxidante utilizando el radical catión ABTS, se encontró que las muestras procedentes de Tumbes presentaron mayor actividad antioxidante (Tabla 4), respecto al resto de regiones, pero no hubo diferencia significativa en comparación con los demás extractos.

Debido a que el método de El método de Folin-Ciocalteu puede tener interferentes tales como glúcidos, aminas aromáticas, ácidos orgánicos, ácido ascórbico, enodioses, etc; resulta importante descartar la presencia de estas sustancias para robustecer los resultados (Prior *et al.*, 2005; Shahidi y Zhong, 2015). Una forma de eliminar interferentes es utilizando una resina absorbente polimérica, Ambelite XAD7HP, la cual retiene los compuestos fenólicos para luego proceder a su cuantificación.

Se realizó la determinación de los compuestos fenólicos en los cinco extractos purificados de las cuatro regiones (Tabla 5), evidenciándose que el decocto de La Libertad presenta presentó mayor concentración de compuestos fenólicos con un valor de 90,6515mg EAG/g y un nivel de significancia de $p < 0,05$ respecto a los demás extractos de su misma región y entre los mejores extractos de cada región (Etanol 45%-Tumbes, Infuso-Piura, Etanol 45%-Lambayeque), según la prueba post hoc de Tukey HSD. Los compuestos fenólicos son solubles mayormente en solventes polares; cabe resaltar que la solubilidad en agua y alcohol de los compuestos fenólicos, generalmente es mayor para los compuestos difenoles y polifenoles, señalando que este tipo de compuestos pueden estar presentes en la *P. pallida*, teniendo en cuenta que los flavonoides se caracterizan por ser polifenoles solubles en agua. (Muñoz *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante de los extractos purificados de expresaron en miligramos equivalentes de Trolox para los tres métodos utilizados; en el método del DPPH (Tabla 6) el extracto con mayor actividad antioxidante fue el decocto de la región de Lambayeque con un valor de 43,5999mgET/g y una significancia de $p < 0,05$; cabe señalar que en las regiones de Piura y La Libertad también fue el decocto el extracto que presentó mayor actividad antioxidante, evidenciándose una correlación positiva entre la concentración de

compuestos fenólicos con la actividad antioxidante (figuras 1,2,3,4). Se debe tener en cuenta que el método del DPPH es el método *in vitro* más usado y de rápida aplicación que permite realizar un análisis de la actividad antioxidante de numerosas muestras en corto tiempo (Alam *et al.*, 2013).

El método de FRAP permite determinar polifenoles de características hidrofílicas, la reacción se genera con la formación del complejo $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (azul) (Shalaby y Shanab, 2013; Moreno *et al.*, 2014). La mayor diferencia significativa fue presentada por el decocto de la libertad (Tabla 7) con un valor de 69,82228 mg ET/g y una significancia de $p < 0,05$ frente a los demás extractos y a las demás regiones según la prueba post hoc de Tukey HSD.

Al determinar la actividad antioxidante utilizando el radical catión ABTS, se encontró que el extracto de etanol de 45% de la región Tumbes y Lambayeque presentaron mayor actividad antioxidante (Tabla 8); a diferencia de los extractos de la región la Libertad, donde se observa una marcada diferencia significativa entre el decocto (76,5424 mg ET/g) y los demás extractos, con una significancia $p < 0,05$. En general el método del ABTS es de alta reactividad, eso se evidencia con valores más altos de ET/g en los extractos respecto a los demás métodos (Figura 5) con buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Floegel *et al.*, 2011; Kuskoski *et al.*, 2005).

Los perfiles cromatográficos permiten identificar picos correspondientes a tiempos de retención de biomoléculas características para cada especie vegetal, Al realizar el análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC de los extractos purificados de las muestras procedentes de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad, se obtuvieron tiempos

de retención característicos a 14 y 15 minutos a 254 nm (Figura 6, 8, 10, 12) los mismos que coinciden en concentración cuando se realizó la lectura a 330 nm (Figura 7, 9, 11,13) y que por aparecer a ambas longitudes de onda se sugeriría que corresponderían a estructuras de flavonoides y que se corrobora con sus espectros UV-VIS obtenidos en el rango de 200 nm a 600 nm (Figuras 14 y 15); mientras que los picos obtenidos a los tiempos de retención de 18,3 y 25,9 minutos (Tumbes); 18 y 26 minutos (La Libertad); 18,5 minutos (Lambayeque); podría corresponder a derivados del radical benzoilo ya que corresponden a los perfiles UV-VIS (Figura 16) en los mismos tiempos de retención con señales a 279 nm, la cual es característica de este radical.

Del análisis por cromatografía líquida de alta resolución de los purificados de los extractos de *P. pallida*, se elige este extracto etanólico de 70% de La Libertad para seguir con los ensayos de UHPLC MS/MS, por presentar mejor resolución en los picos del perfil cromatográfico; de igual manera, los demás extractos presentan el mismo patrón en su perfil cromatográfico, así mismo en este perfil cromatográfico se identifica un pico adicional definido el cual se identificó por su tiempo de retención.

En el modo de ion negativo (figura 17), el pico que se encuentra en mayor abundancia fue a un tiempo de retención de 7,15 minutos y en el modo de ion positivo fue de 7,16 minutos en el extracto etanólico de 70%. de *P. pallida* purificado con Amberlite analizados por UHPLC. En el modo de ion negativo y en el modo de ion positivo se ha identificado una cantidad de quince picos en cada uno de los modos de ion los cuales son señales de compuestos fenólicos.

En los compuestos fenólicos de los extractos de frutos de *P. pallida* purificados con Amberlite y analizados por MS y MS/MS data, se han identificado un compuesto que es un

tipo de apigenina, tiempo de retención de 7,16 minutos (figura 18), la relación masa/carga de este compuesto es 595,1662 m/z y su fórmula general $C_{27}H_{31}O_{15}$ y su estructura se muestra en la figura 18, y correspondería al Apigenin-6,8-digalactósido (vicenin); que también fue reportada por Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2015; quien estudio la harina del mesocarpio de un género de *Prosopis*.

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

V. CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración de compuestos fenólicos de los extractos de las muestras de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad, encontrándose que el extracto de etanol 96% presentó mayor concentración con un valor de 58,0330 mg EAG/g respecto a los demás extractos.
- Se cuantificó la actividad antioxidante de los cinco extractos de las muestras de procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú; encontrándose que los extractos con mayor actividad antioxidante fueron: decocto de la Libertad (5,2664 mg ET/g), infuso de La Libertad (8,4642 mg ET/g) y etanol 96% de Tumbes (17,6260 mg ET/g); para DPPH, FRAP y ABTS respectivamente.
- Se determinó la concentración de compuestos fenólicos de los extractos purificados con Amberlite, encontrando una diferencia significativa en la concentración del extracto del decocto de la Libertad (90,6515 mg ET/g) con respecto a los demás extractos y entre las cuatro regiones.
- Los extractos purificados con Amberlite de las muestras procedentes de cuatro departamentos del norte del Perú; con mayor actividad antioxidante fueron: decocto de Lambayeque (43,5999 mg ET/g), decocto de La Libertad (69,8228mg ET/g) y Etanol 45% de Tumbes (95,8518mg ET/g); para DPPH, FRAP y ABTS respectivamente.
- Se caracterizó el compuesto fenólico de mayor concentración con actividad antioxidante por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, elucidando la estructura de fórmula general $C_{27}H_{31}O_{15}$ la cual es una Apigenin-6,8-digalactósido perteneciente a las familias de las flavonas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21(2):143-52.
- Alarcón-Aguilar BA, Zavala-Urtecho ED, Suárez-Rebaza LA, Ganoza-Yupanqui ML, Fernández-Sosaya JL. (2018). Polifenoles, capacidad antioxidante y factor de protección solar de *Borago officinalis* L. “borraja” dispensada en las farmacias naturales de EsSalud. Revista Peruana de Medicina Integrativa 3(3):138-143.
- Avello, M. Suwalsky. M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección, Atenea, 494 (II semestre): 161-172.
- Benzie IFF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Anal Biochem 239(1):70-76.
- Cattaneo, F. Sayago, J. Alberto, M. Zampini, I. Ordoñez, R. Chamorro, V. Pazos, A. Isla, M. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour. Food Chemistry, 161:391-399.
- Chen LY, Cheng CW, Liang JY. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. Food Chemistry 170:10-15.
- Chuquimia F, Alvarado J, Peñarrieta J, Bergenståhl B, Åkesson B. (2008) Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia. Revista Boliviana de Química. 25(1): 75-83.

- Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón J. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). Rev Soc Quím. [revista en internet]. enero - marzo [acceso el 14 de diciembre del 2015]; 79 (1): [pp: 75-63].
- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J Food Compos Anal 24:1043-1048.
- Ganoza Yupanqui M, Costilla Sánchez N, Velásquez Arévalo S, Polo Vidal M. (2015). Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de extractos de especies vegetales de Cachicadán, La Libertad-Perú. Perspectiva 16(1-2):203-208.
- Gutiérrez, D. Ortiz, A. Mendoza, A, (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. En: Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro; Centro Nacional de Metrología, México, SM2008-M220-1108-1-SM2008-M220-1108-5.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc Tecnol Aliment 25(4):726-732.
- Lester GE, Lewers KS, Medina MB, Saftner RA. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. J Food Compos Anal 27(1):102–107.
- Maurya S, Singh D. (2010). Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhatoda vasica* Nees extracts. International Journal of PharmTech Research 2(4):2403-2406.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26(2):211-219.
- Mostacero León, J. (2005). Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú. 314 pp.
- Muñoz CW, Chavez RW, Pabón, LC.; Rendón F, MR, Patricia-Chaparro M, Otálvaro-Álvarez AM (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 46:38-46.
- Paladino, C. (2007). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*vitis vinifera* L.). Tesis de maestría, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Argentina. 100 pp.
- Pérez, M. Cuello, A. Zampini, I. Ordoñez R, Alberto, M. Quispe, C. Schmeda-Hirschmann, G. Isla, M. (2014). Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. *Food Research International* 64:762-771.
- Prabha D, Dahms H, Malliga P. (2014). Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(11):918-924
- Quispe, C. Petroll, K. Theoduloz, C. Schmeda-Hirschmann, G. (2014). Antioxidant effect and characterization of South American *Prosopis* pods syrup. *Food Research International* 56:174-181.

- Ramirez JE, Zambrano R, Sepúlveda B, Simirgiotis MJ. (2014). Antioxidant properties and hyphenated HPLC-PDA-MS profiling of Chilean Pica mango fruits (*Mangifera indica* L. Cv. piqueño). *Molecules* 19(1):438-458.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9-10):1231–1237.
- Ruíz, S. Venegas, E. Chávez, M. (2010). Eustaquio Saldarriaga C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *Revista UCV-Scientia* 2(2):11-22.
- Ruiz, S. Venegas, E. Ruidías, D. Horna, L. López, C. (2013). Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* h.b.k. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. *Revista Farmaciencia* 1(2):57-64.
- Schmeda-Hirschmann G, Quispe C, Soriano Mdel P, Theoduloz C, Jiménez-Aspée F, Pérez MJ, Cuello AS, Isla MI. (2015). Chilean *prosopis* mesocarp flour: phenolic profiling and antioxidant activity. *Molecules* 20:7017-7033.
- Seeram NP, Henning SM, Niu Y, Lee R, Scheuller HS, Heber D. (2006). Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 54(5):1599-1603.
- Suárez, V. Serrano, R. Pelz, P. Balderas, P. (2004). Atlas de Malezas Arvenses del Estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Tamayo, L. Arteaga, D. Jramillo, Y. (2008). Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) de interés para la industria de alimentos, Revista Lasallista de Investigación 5(2):100-111.

Torres-Guevara FA, Ganoza-Yupanqui ML. (2017). Etnobotánica y sistemas de extracción para compuestos fenólicos, actividad antioxidante y toxicidad de plantas de páramos y bosques nublados del norte peruano. Revista Peruana de Medicina Integrativa 2(2):101-109.

Zavala-Urtecho ED, Ganoza-Yupanqui ML, Ybañez-Julca RO, Mantilla-Rodriguez AE, Gajardo-Solari SKN, Benites-Vilchez JW. (2018). Perfil ultravioleta y actividad regeneradora de liofilizados de cáscara del fruto de variedades *de Mangifera indica*, mango. Revista Peruana de Medicina Integrativa 3(1):40-45.

BIBLIOTECA DE POSGRADO UNT

ANEXOS

Anexo 1. Obtención y recolección de *Prosopis pallida*

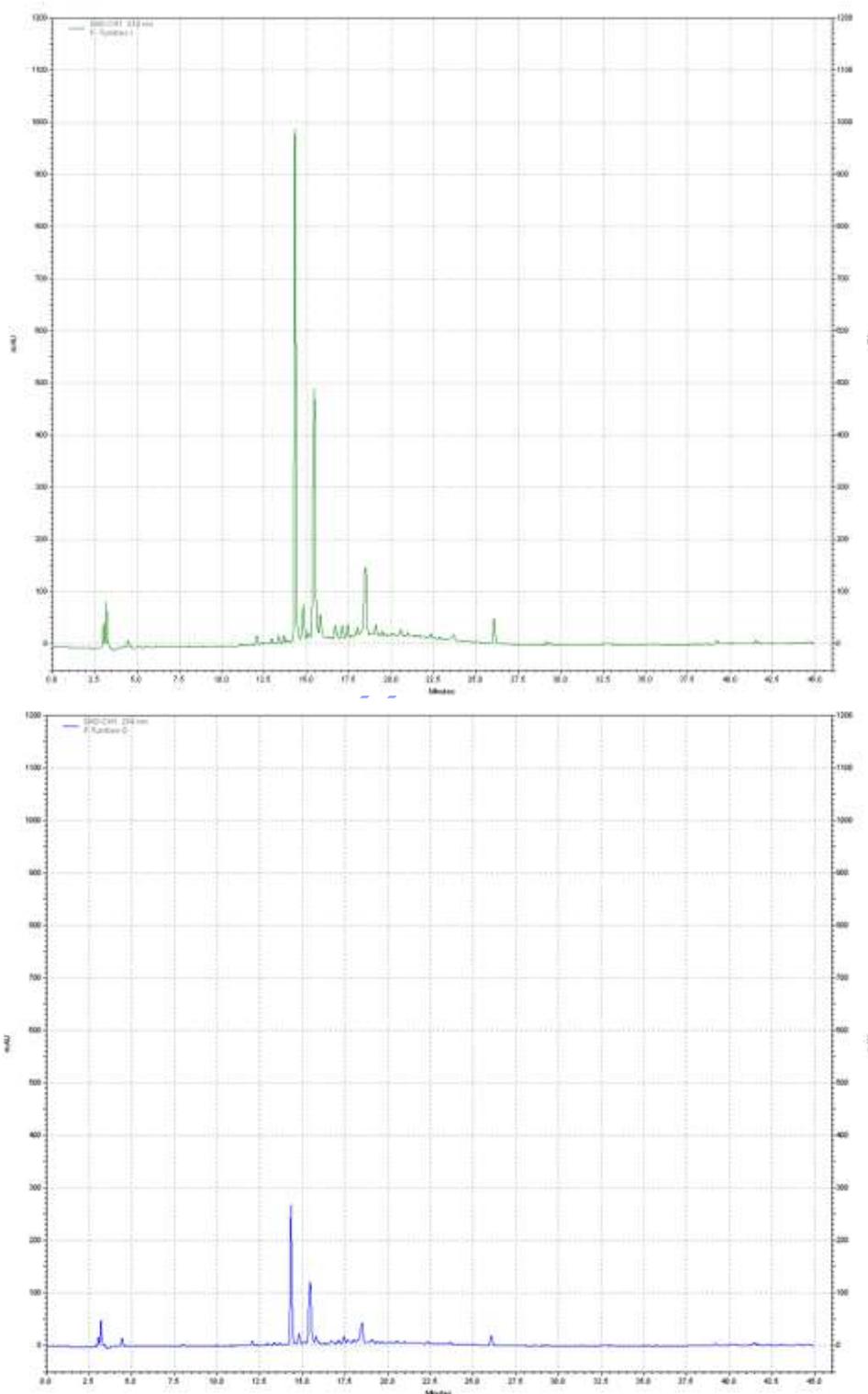


Anexo 2. Selección de la muestra, secado, pulverización y almacenamiento

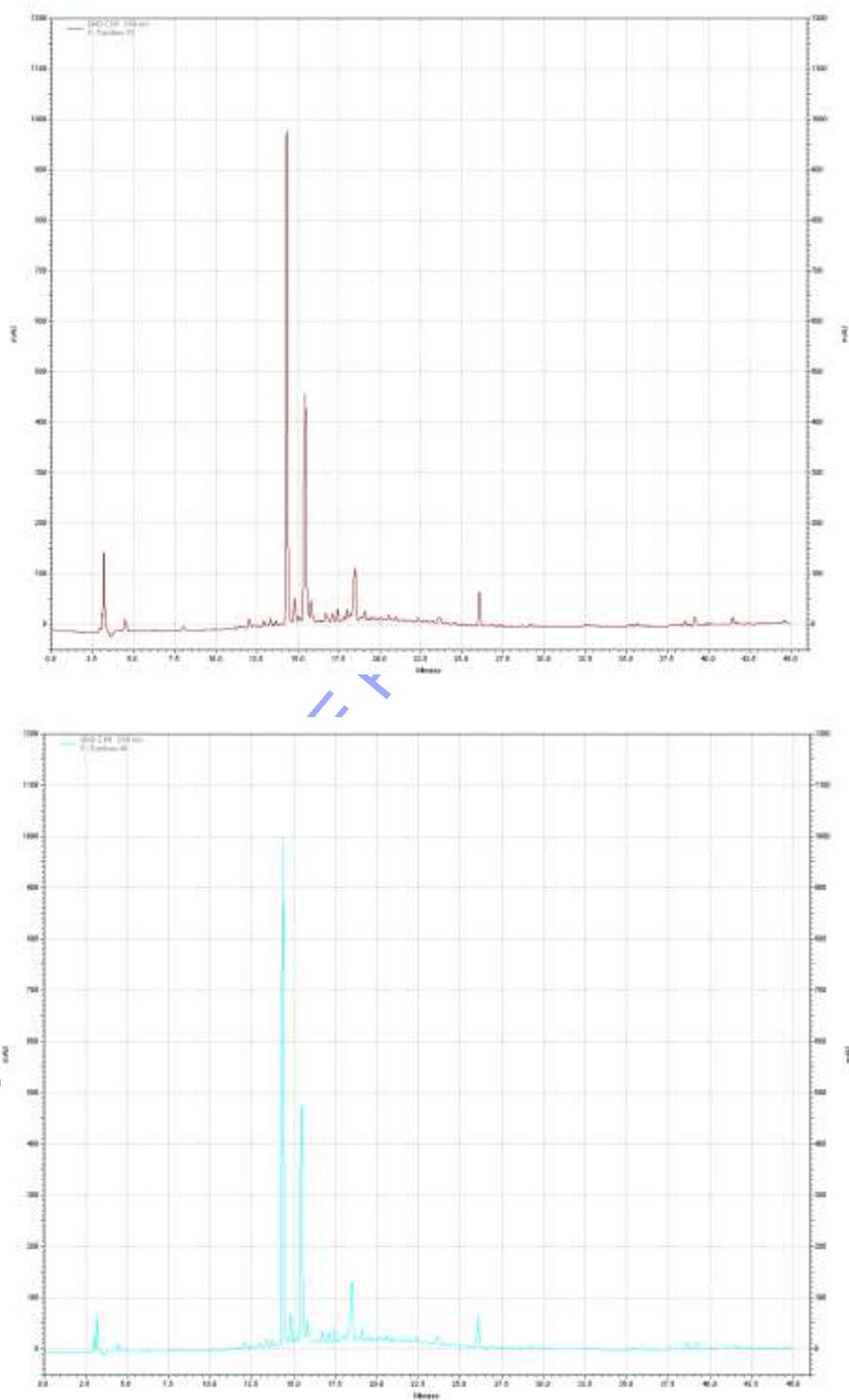
Se seleccionaron los frutos que se encuentren maduros y en buen estado y se eliminaron las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.



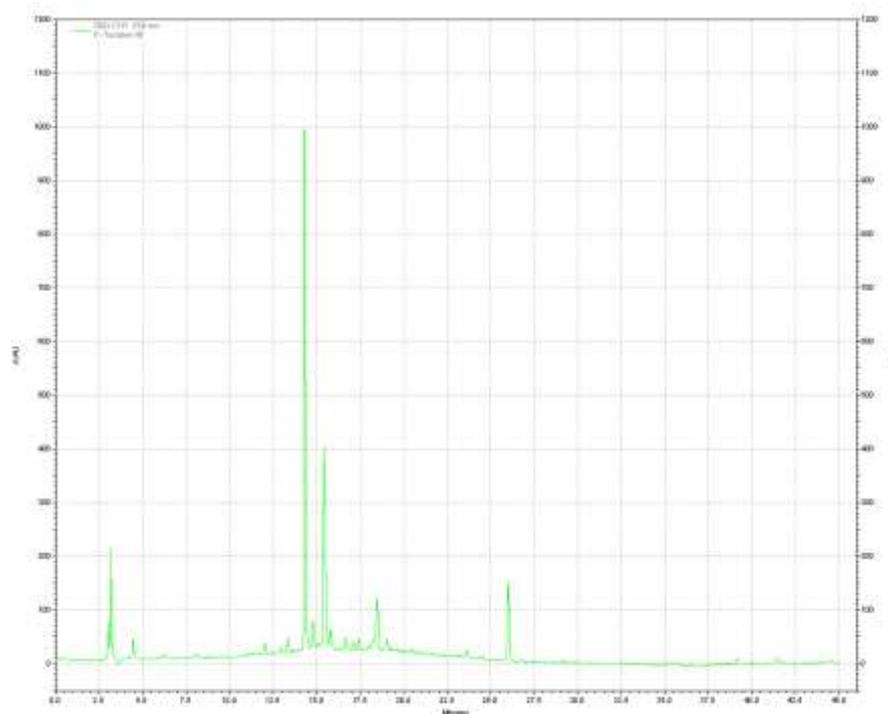
Anexo 3. Perfiles cromatográficos de los extractos de infuso y decocto purificados de muestras procedentes de Tumbes a 254 nm



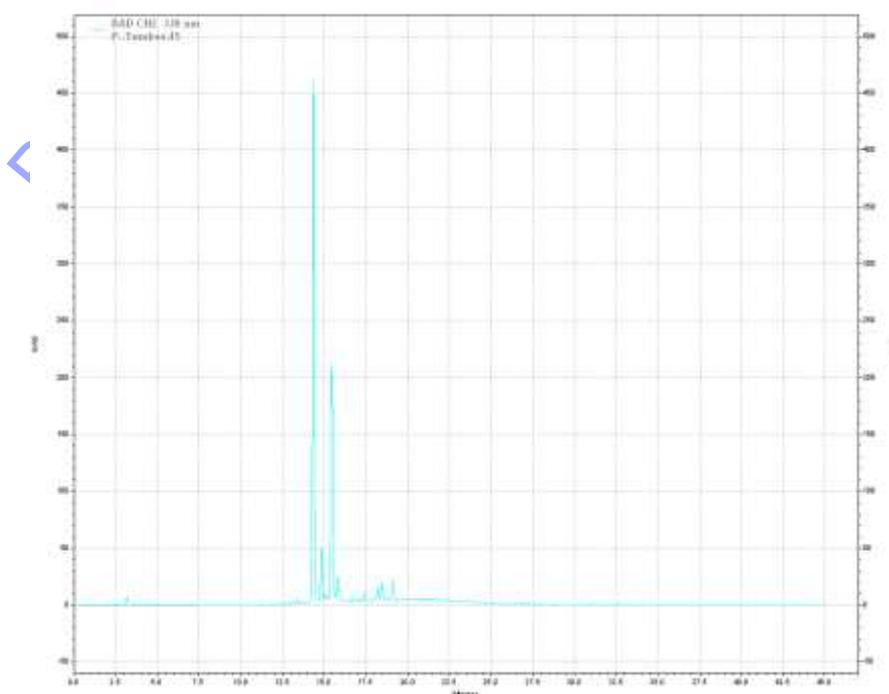
Anexo 4. Perfiles cromatográficos de los extractos de etanol 70% y 45% purificados de muestras procedentes de Tumbes a 254 nm



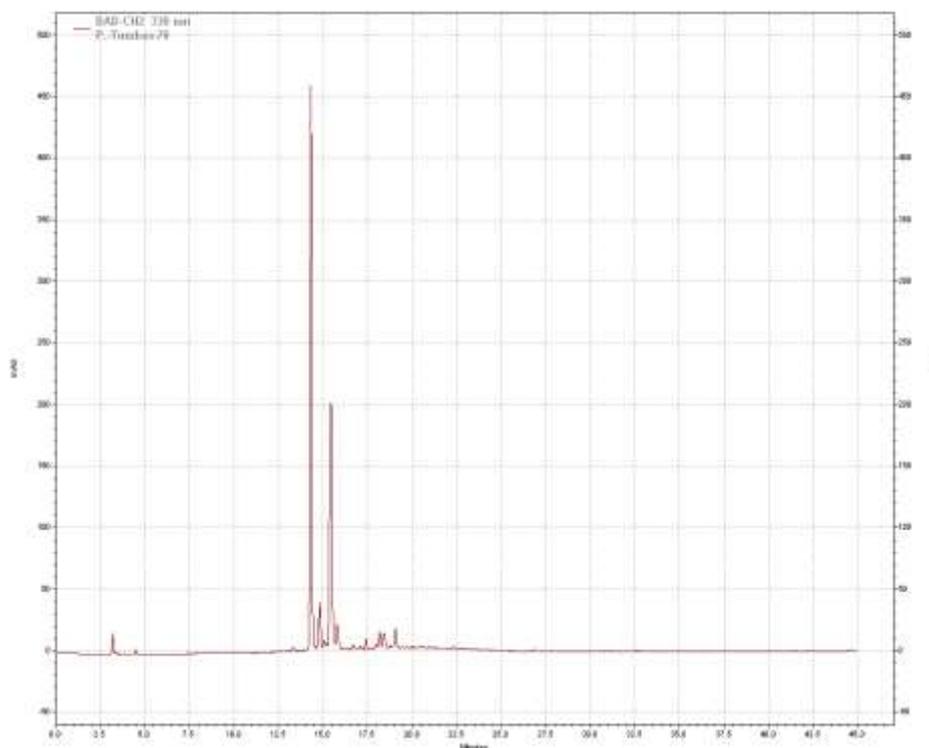
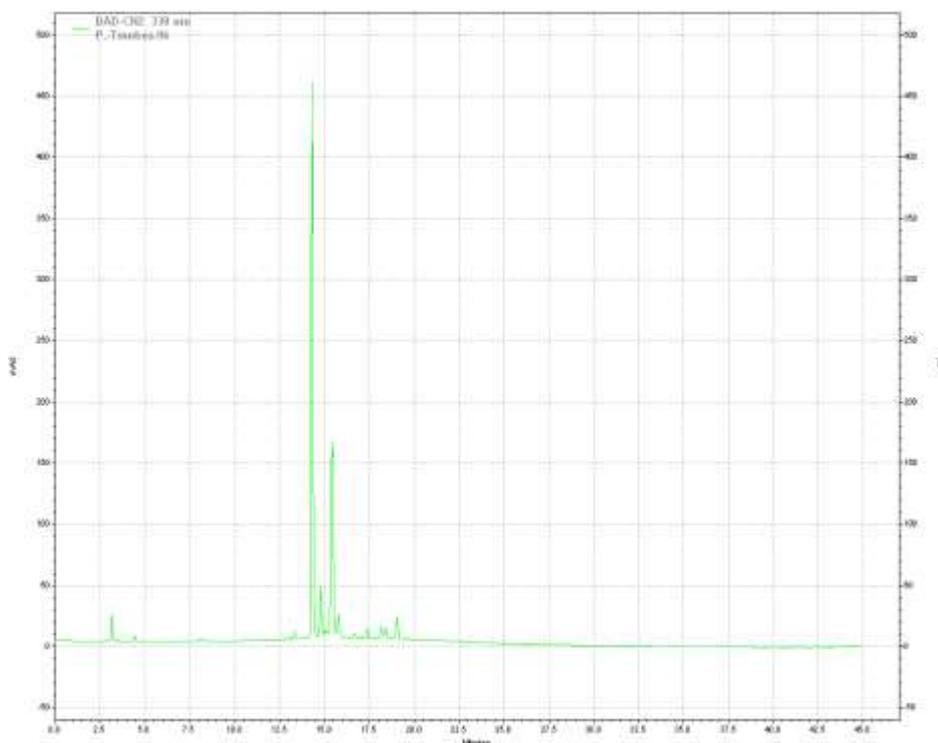
Anexo 5. Perfil cromatográficos del extracto de etanol 96% purificado de muestras procedentes de Tumbes a 254 nm



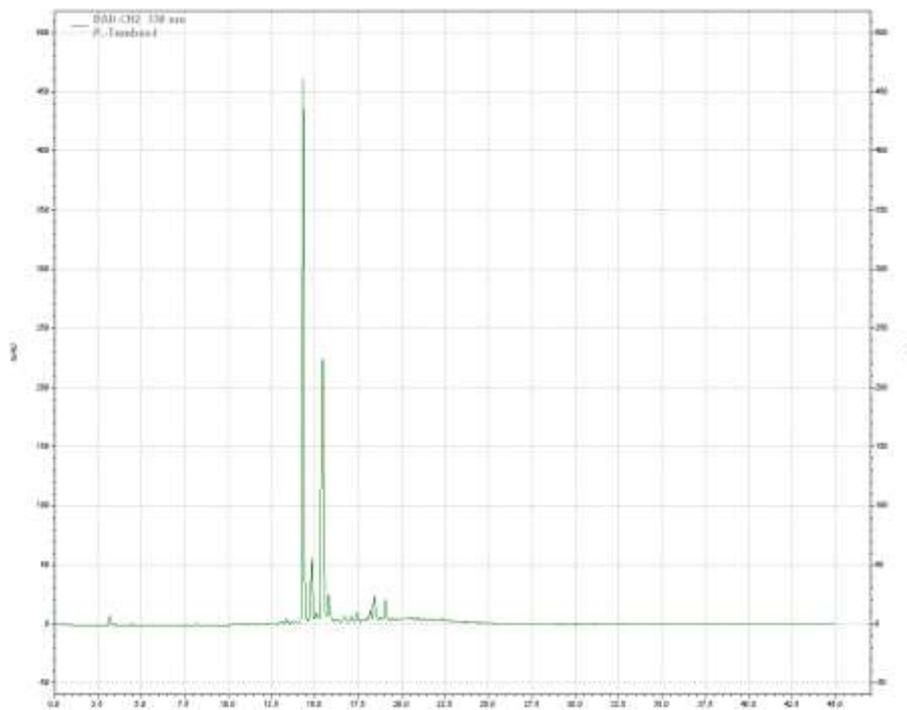
Anexo 6. Perfil cromatográficos del extracto de etanol 45% purificado de muestras procedentes de Tumbes A 330 nm



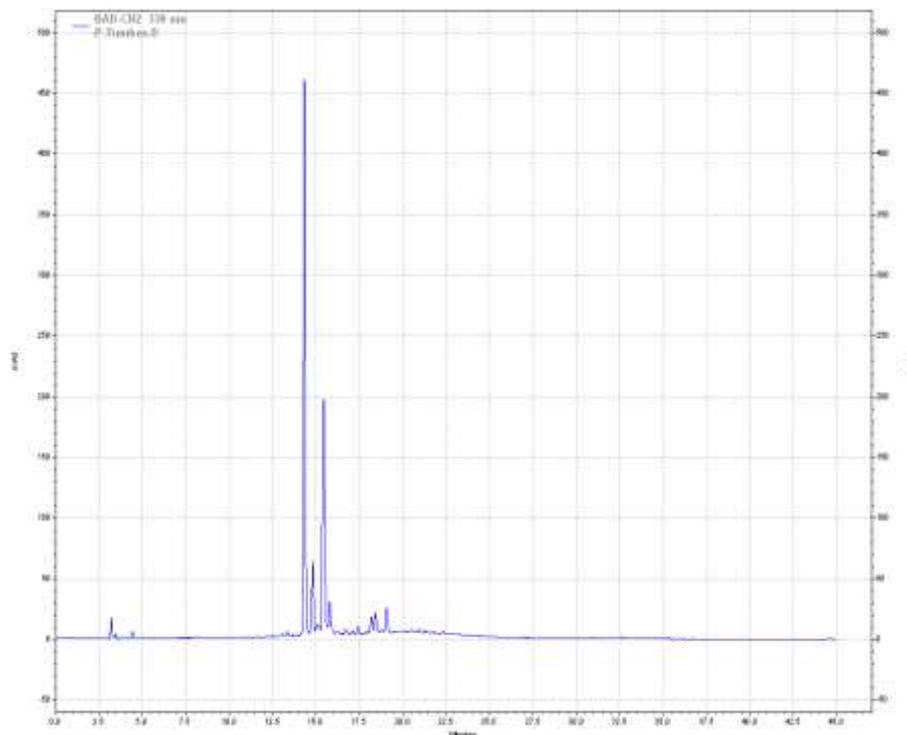
Anexo 7. Perfil cromatográficos del extracto 96% y 70% purificado de muestras procedentes de Tumbes a 330 nm



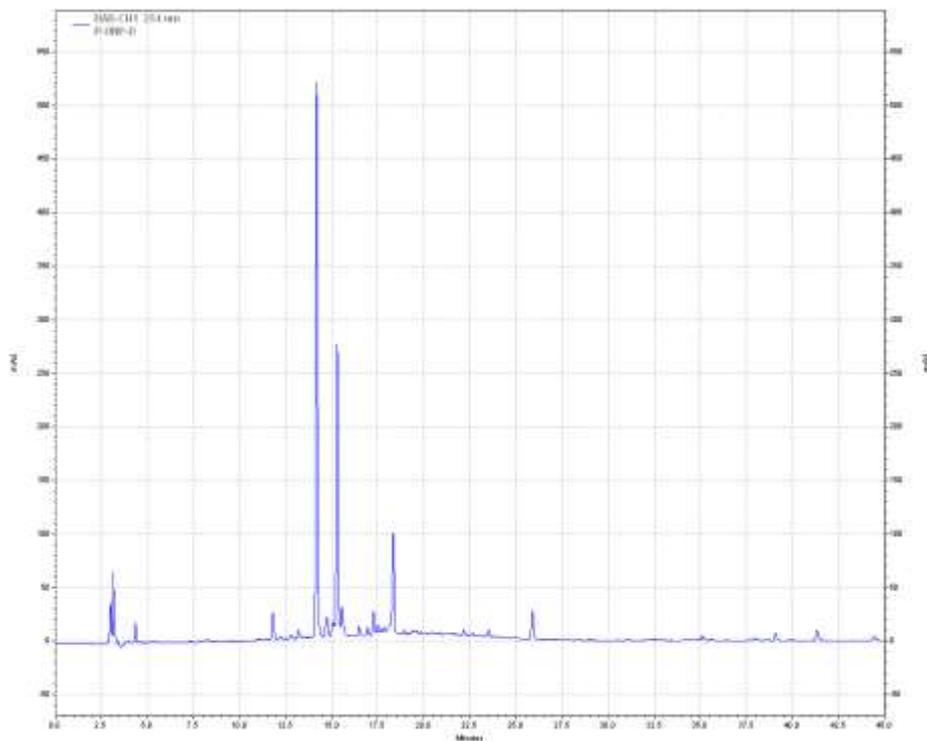
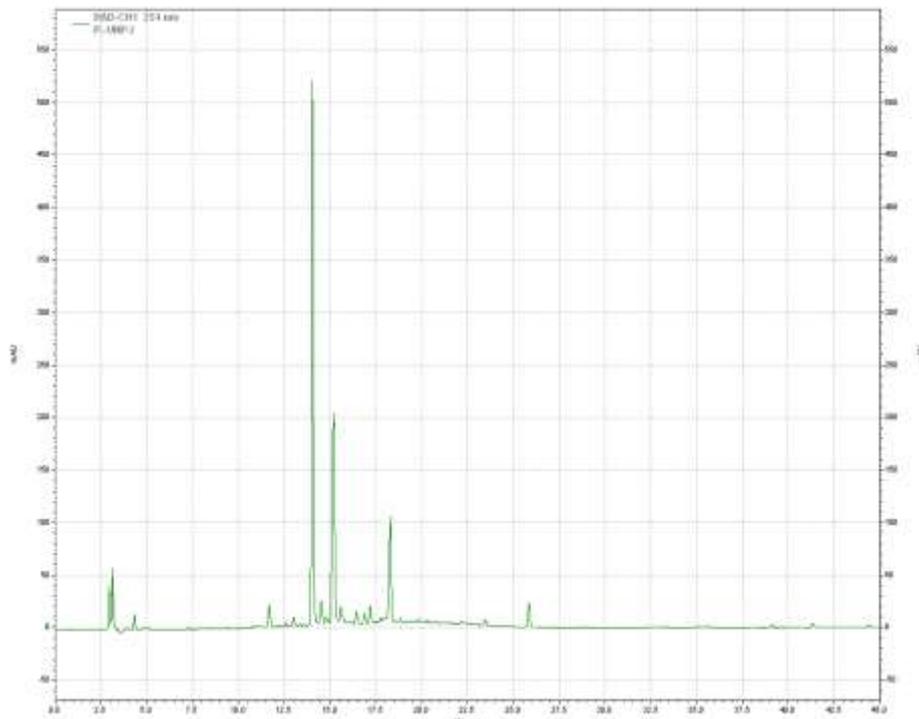
Anexo 8. Perfiles cromatográficos de los extractos de infuso y decocto purificados de muestras procedentes de Tumbes a 330 nm



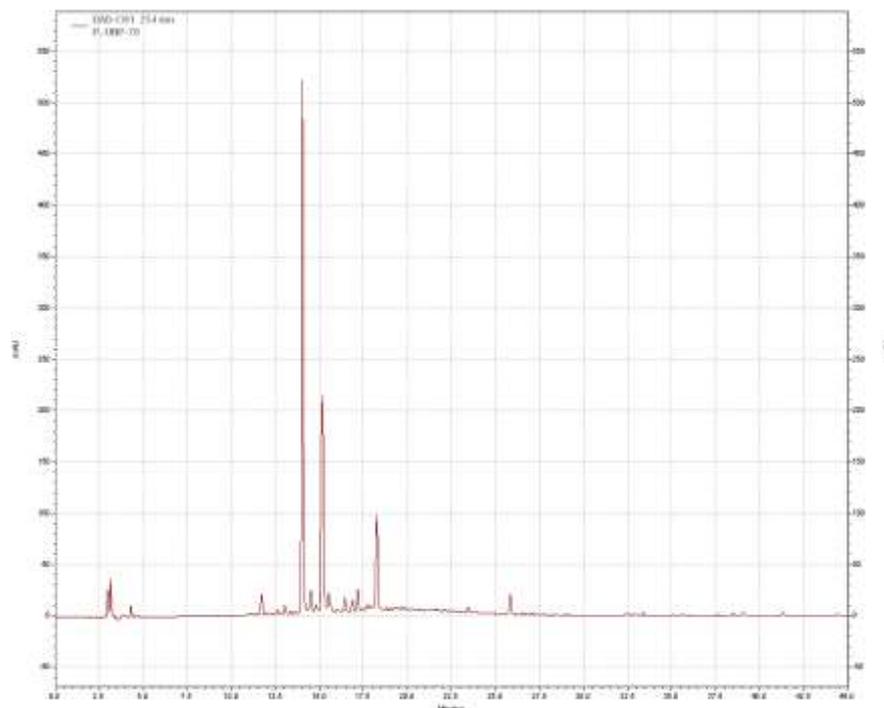
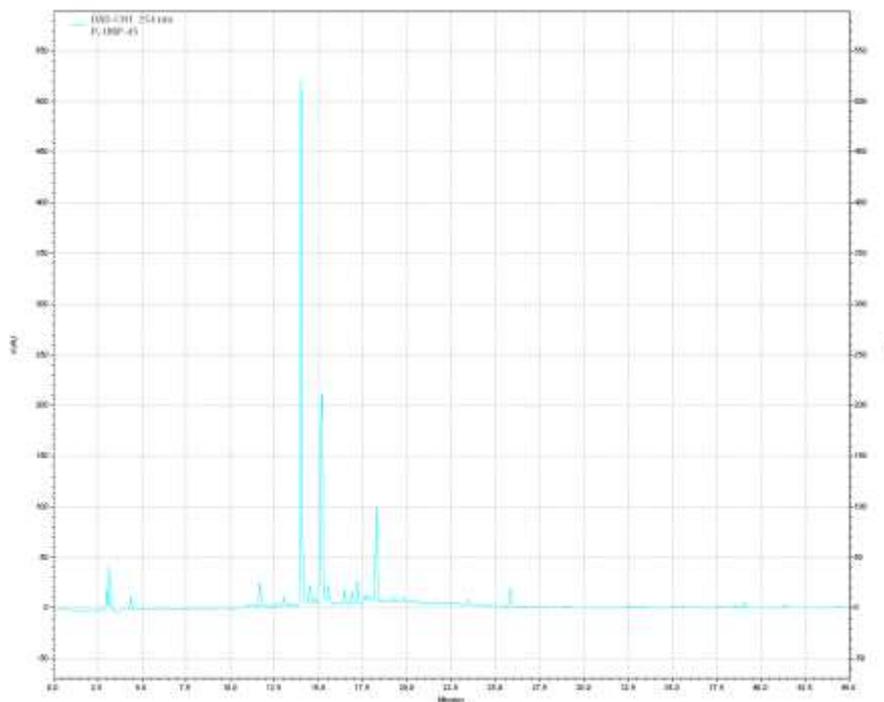
0



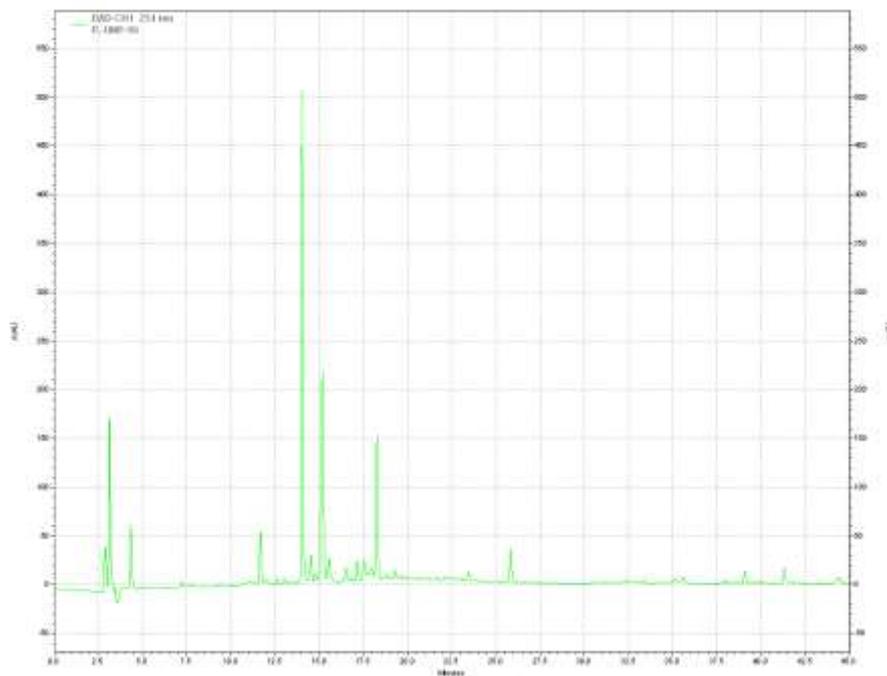
Anexo 9. Perfiles cromatográficos del infuso y decocto purificados, de muestras procedentes de Piura a 245 nm



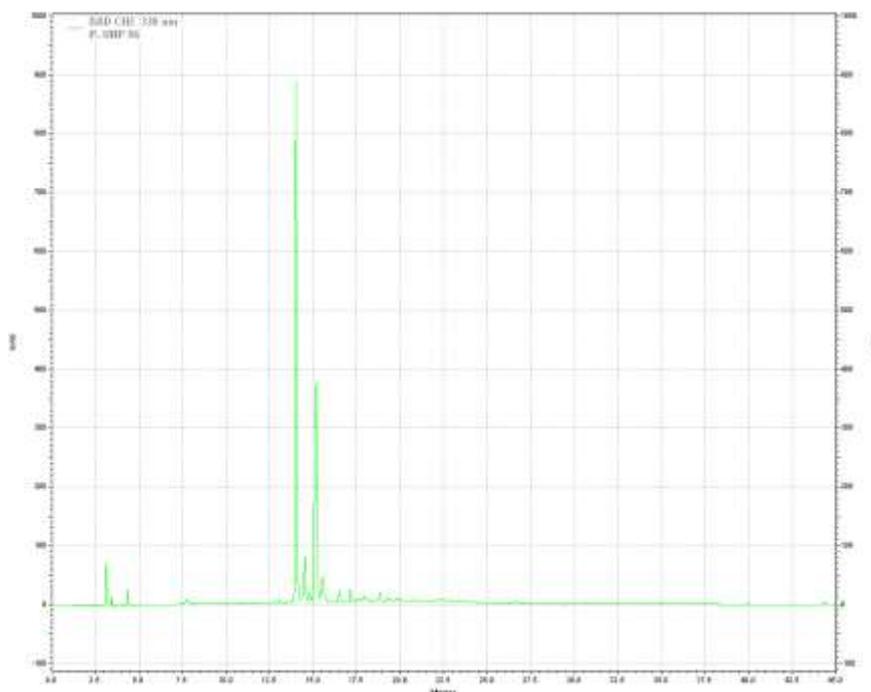
Anexo 10. Perfiles cromatográficos de los extractos de etanol 45% y 70% purificados de muestras procedentes de Piura a 254 nm



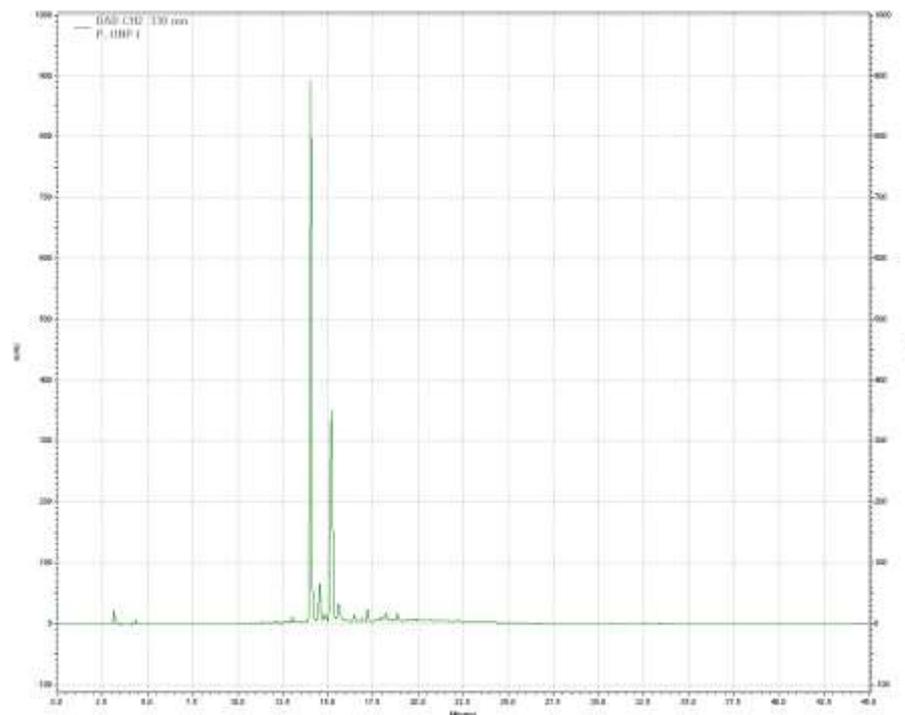
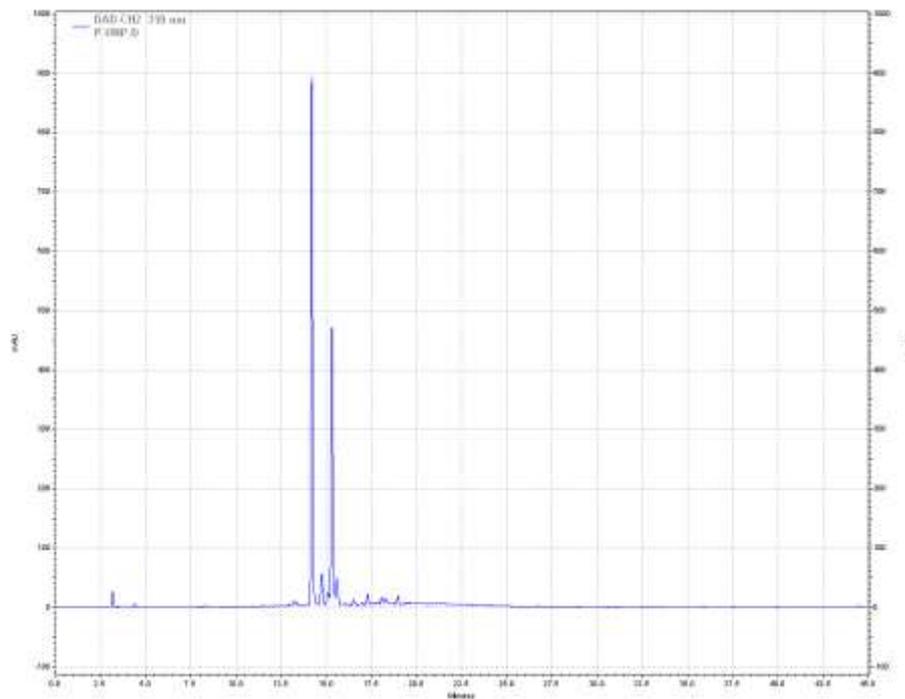
Anexo 11. Perfil cromatográfico del extracto etanol 96% purificado de muestras procedentes de Piura a 254 nm



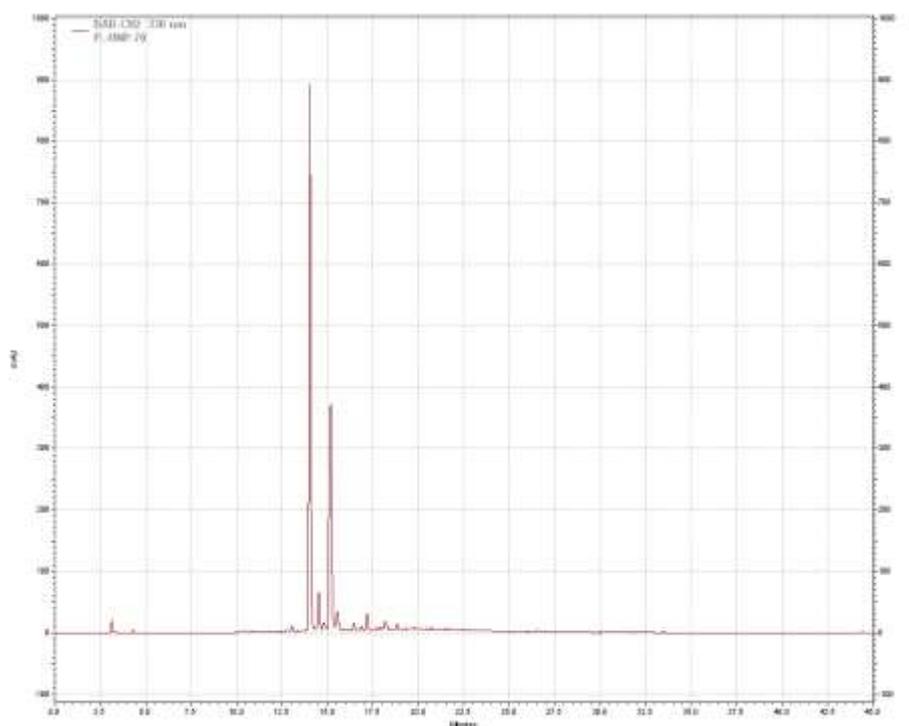
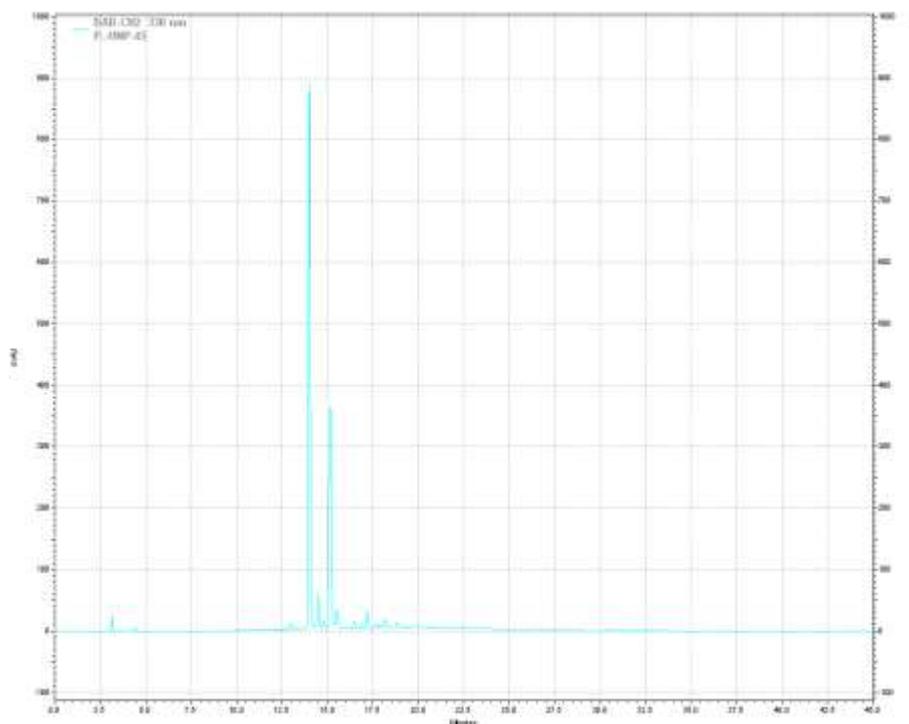
Anexo 12. Perfil cromatográfico del extracto etanol 96% purificado de muestras procedentes de Piura a 330 nm



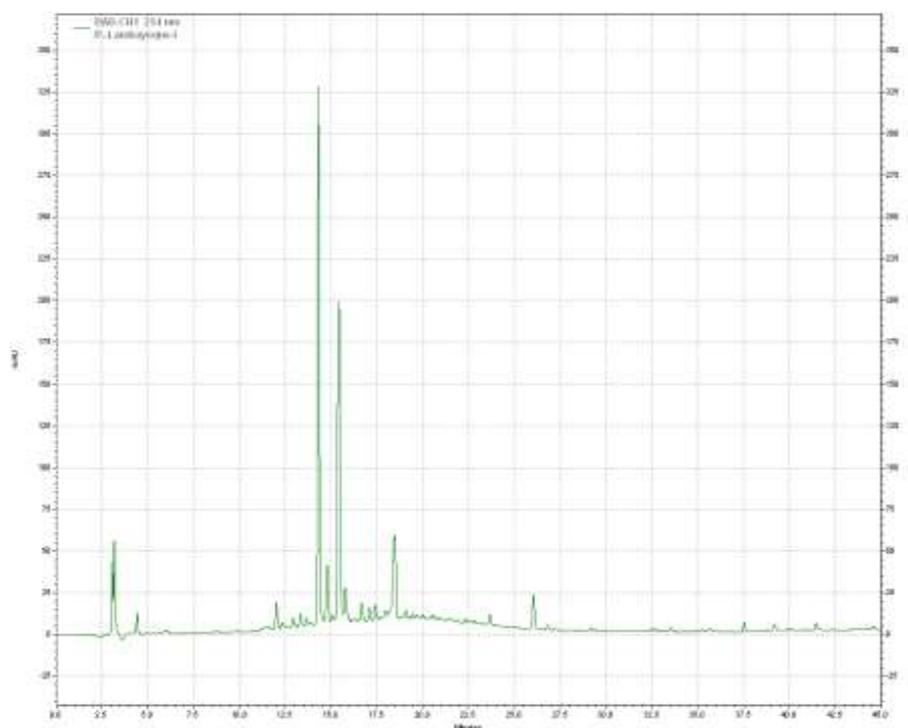
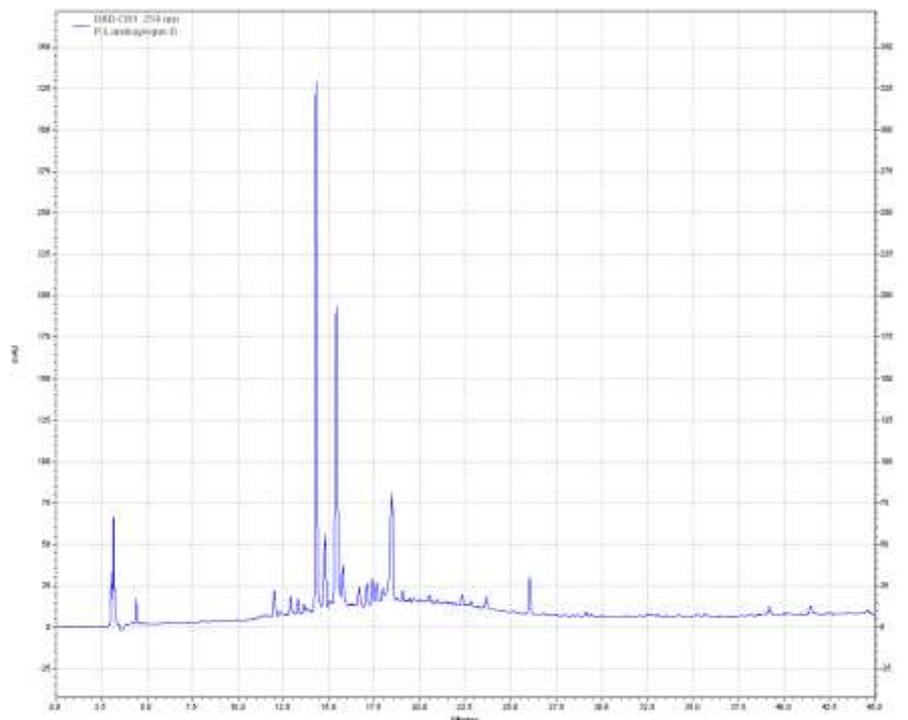
Anexo 13. Perfiles cromatográficos del decocto e infuso purificados de muestras procedentes de Piura a 330 nm



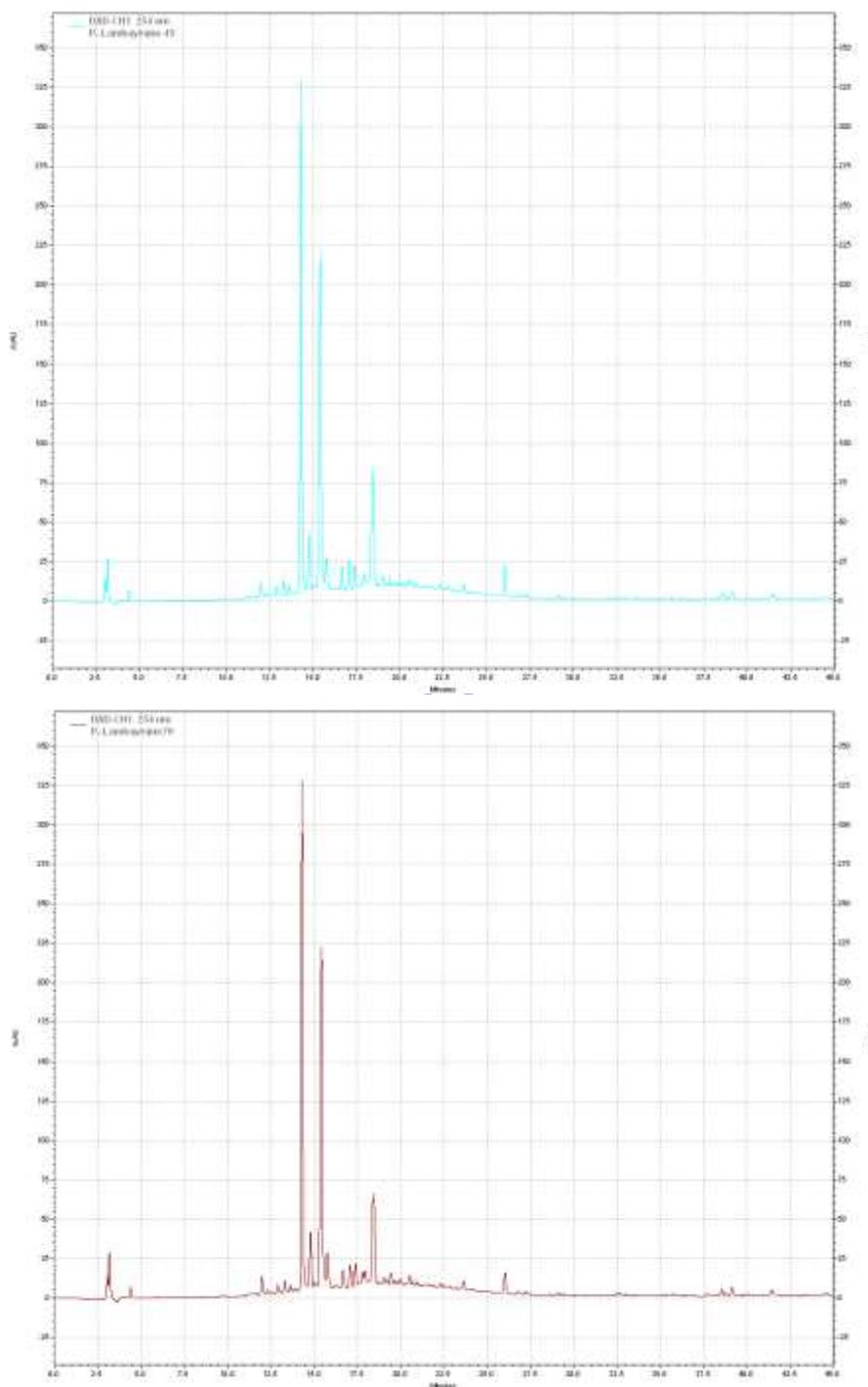
Anexo 14. Perfiles cromatográficos de los extractos de etanol 45% y 70% purificados de muestras procedentes de Piura a 330 nm



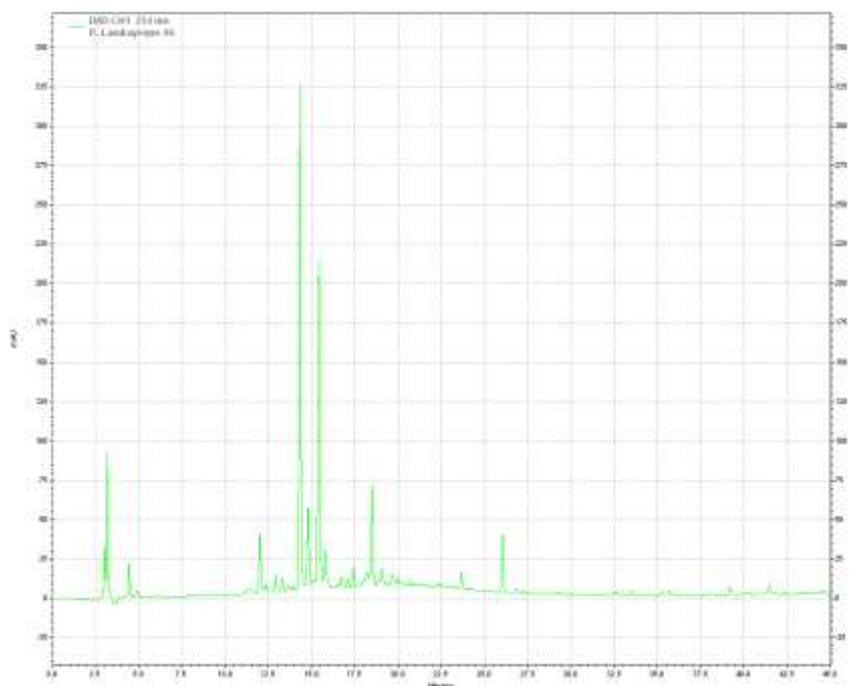
Anexo 15. Perfiles cromatográficos del decocto e infuso purificados de muestras procedentes de Lambayeque a 254 nm



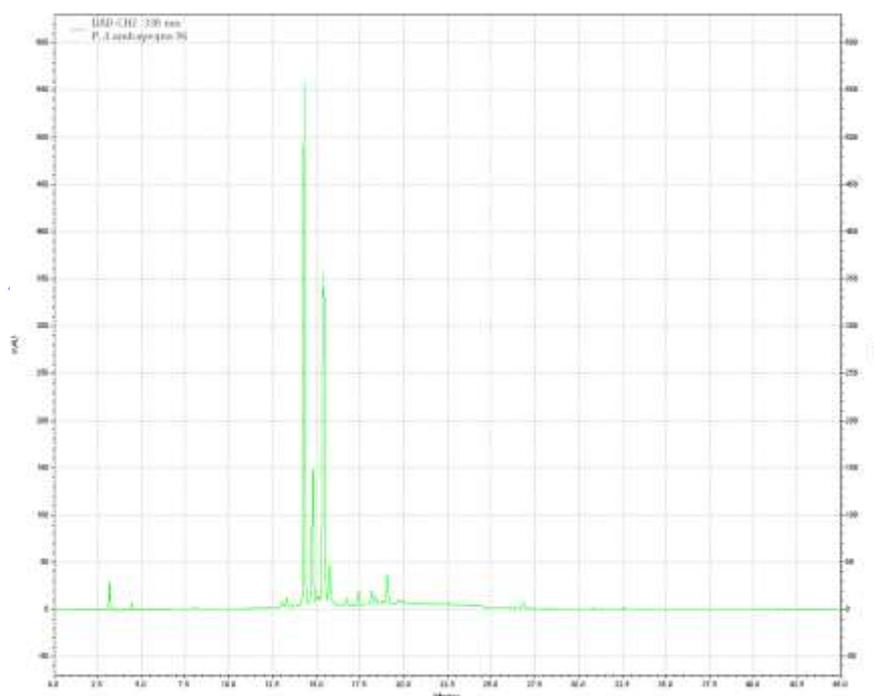
Anexo 16. Perfiles cromatográficos de los extractos de etanol 45% y 70%, purificados de muestras procedentes de Lambayeque a 254 nm



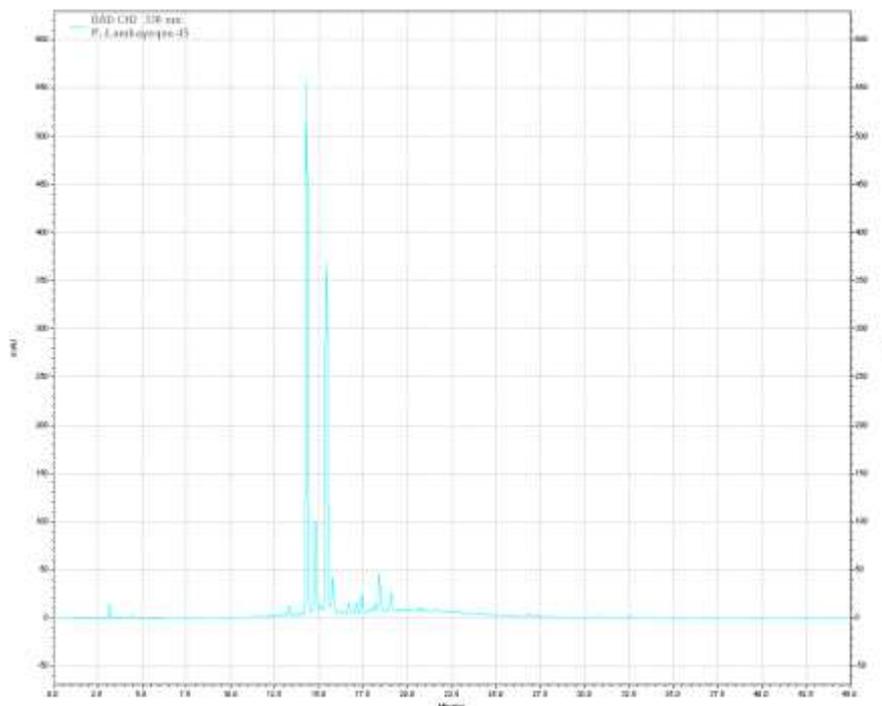
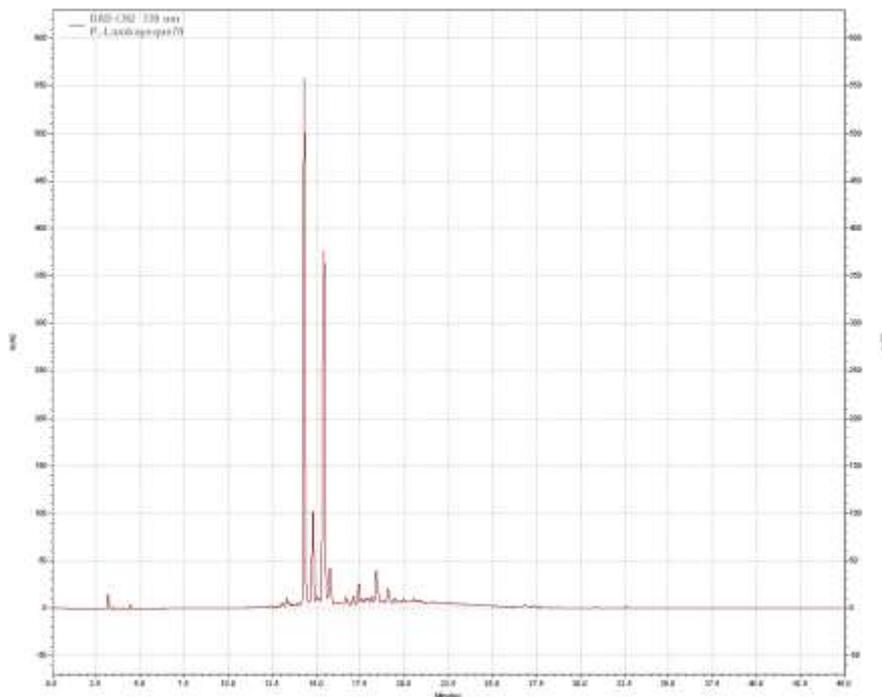
Anexo 17. Perfil cromatográfico del extracto de etanol 96% purificado, de muestras procedentes de Lambayeque a 254 nm



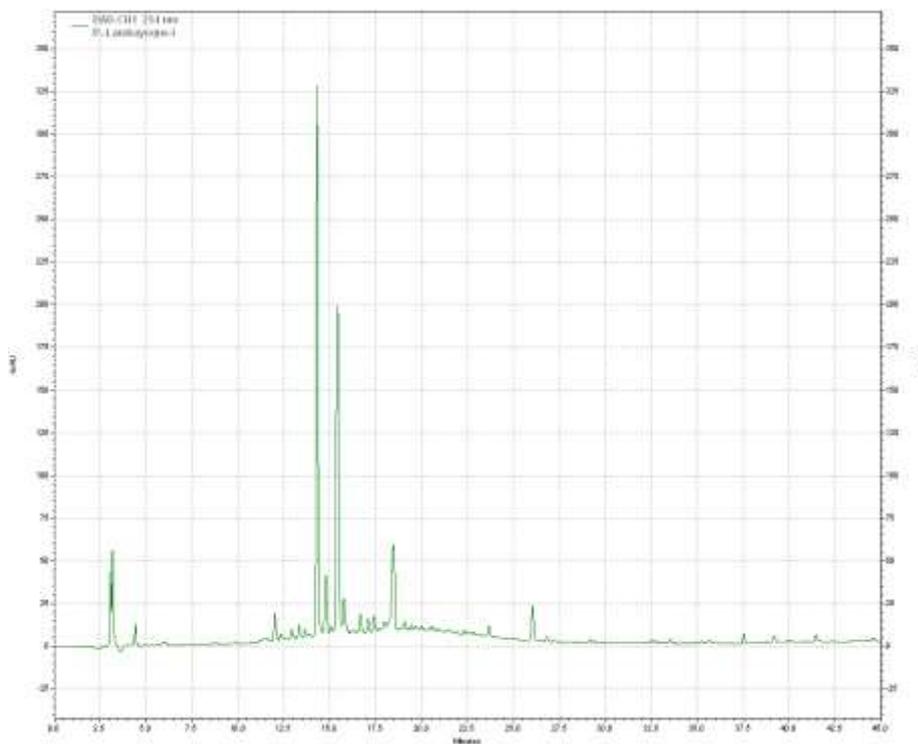
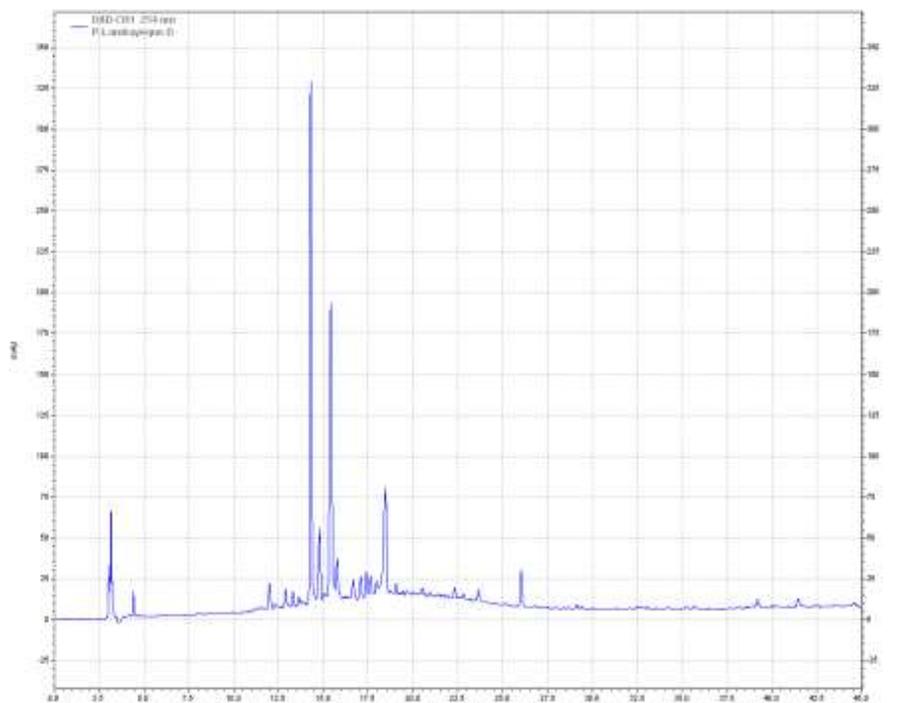
Anexo 18. Perfil cromatográfico del extracto de etanol 96% purificado, de muestras procedentes de Lambayeque a 330 nm



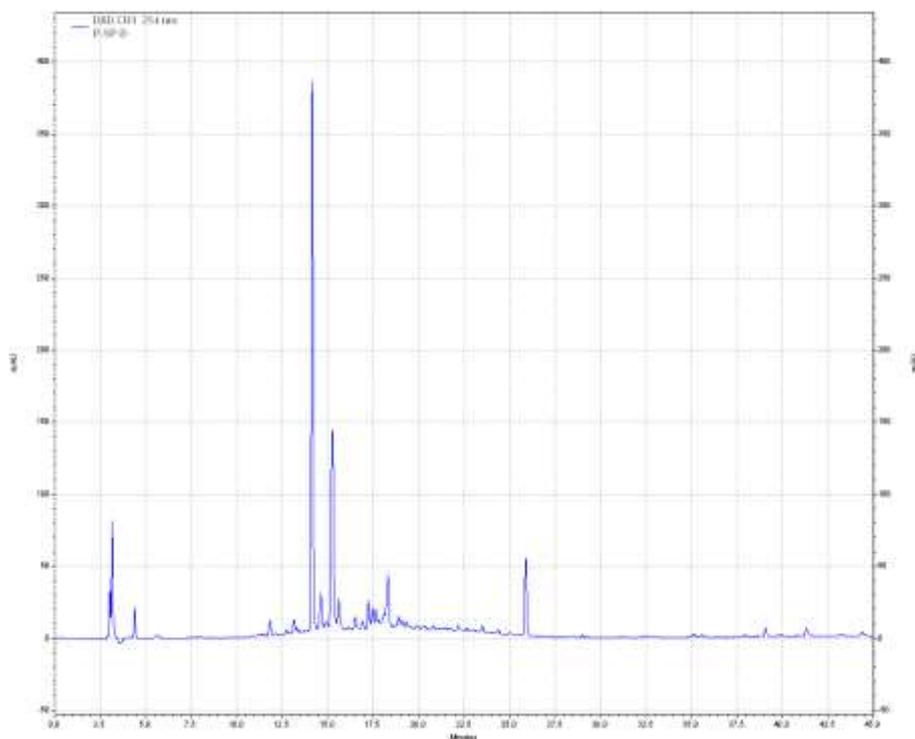
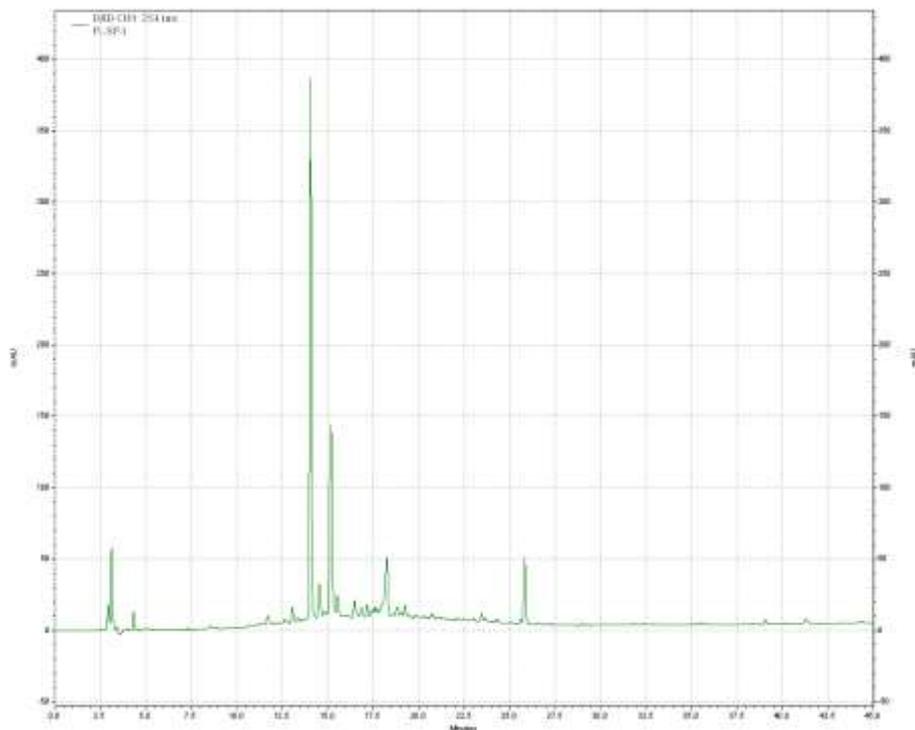
Anexo 19. Perfiles cromatográficos de los extractos de etanol 45% y 70%, purificados de muestras procedentes de Lambayeque a 330 nm



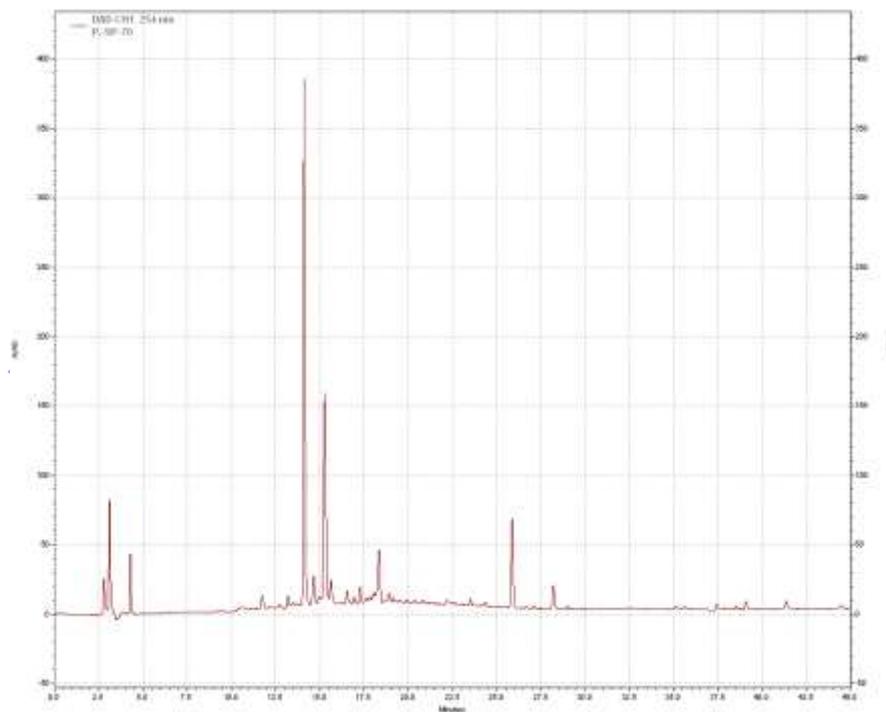
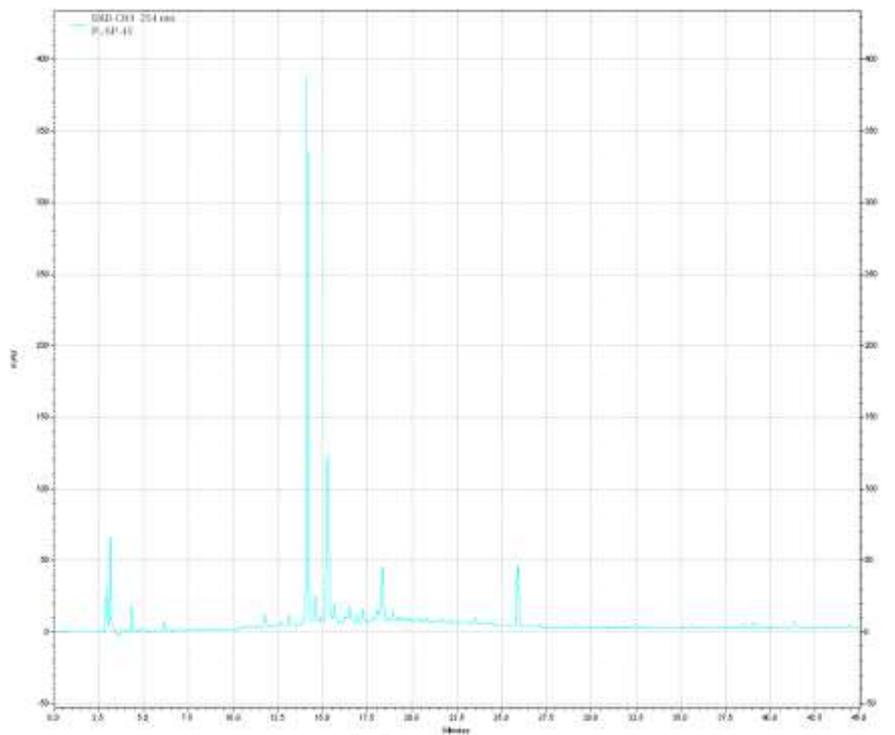
Anexo 20. Perfiles cromatográficos del decocto e infuso, purificados, de muestras procedentes de Lambayeque a 330 nm



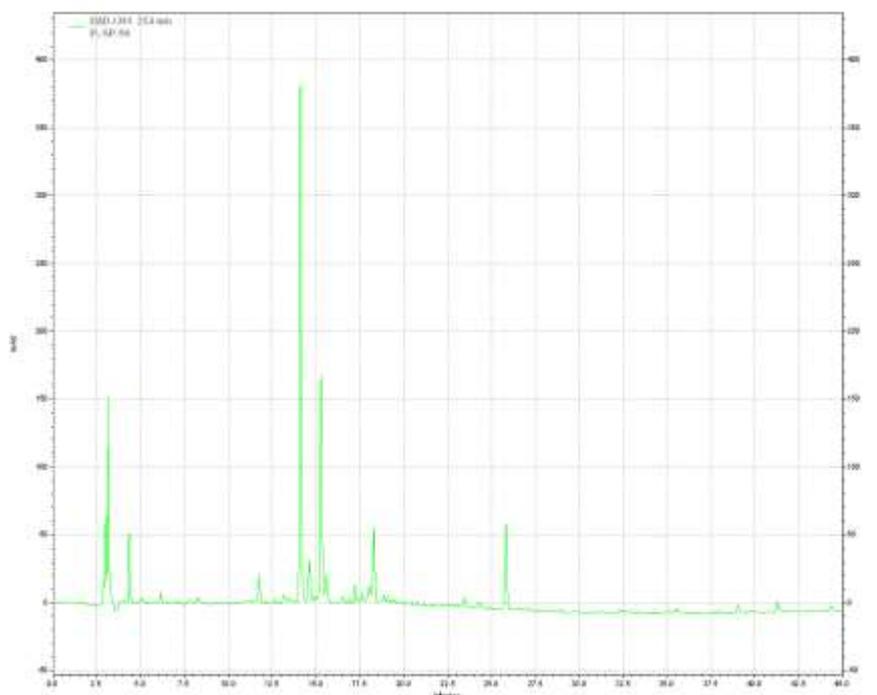
Anexo 21. Perfiles cromatográficos del decocto e infuso, purificados, de muestras procedentes de La Libertad a 254 nm



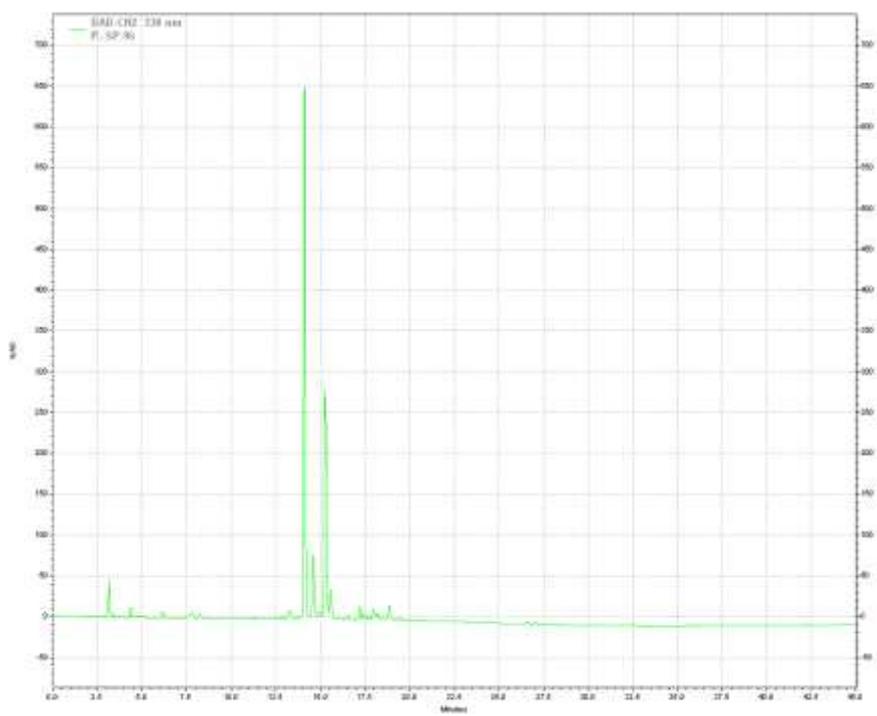
Anexo 22. Perfiles cromatográficos de extractos de etanol 45% y 70% purificados, de muestras procedentes de La Libertad a 254 nm



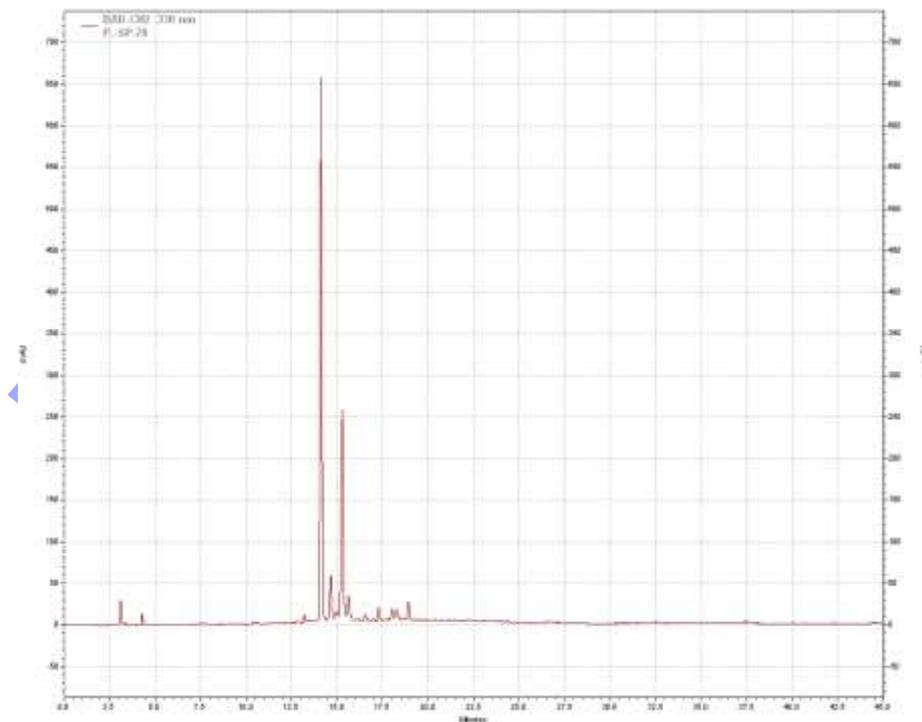
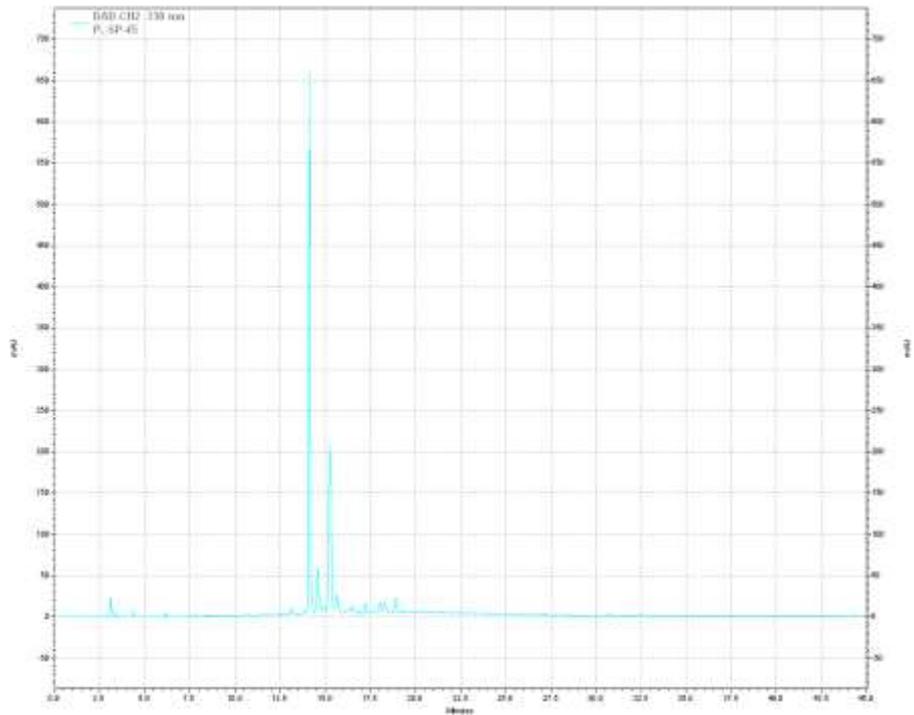
Anexo 23. Perfil cromatográfico del extracto de etanol 96% purificado, de muestras procedentes de La Libertad a 254 nm



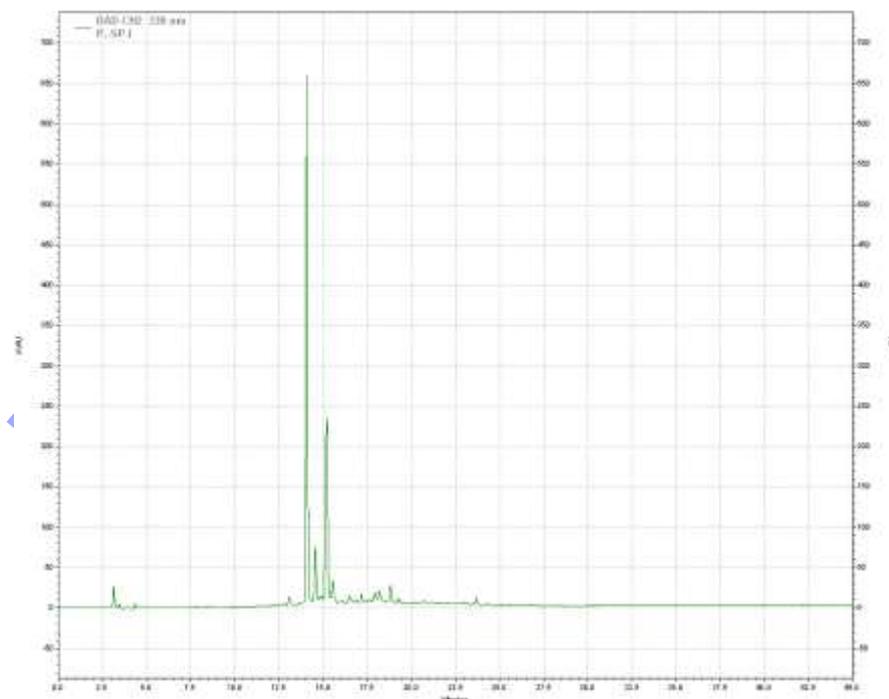
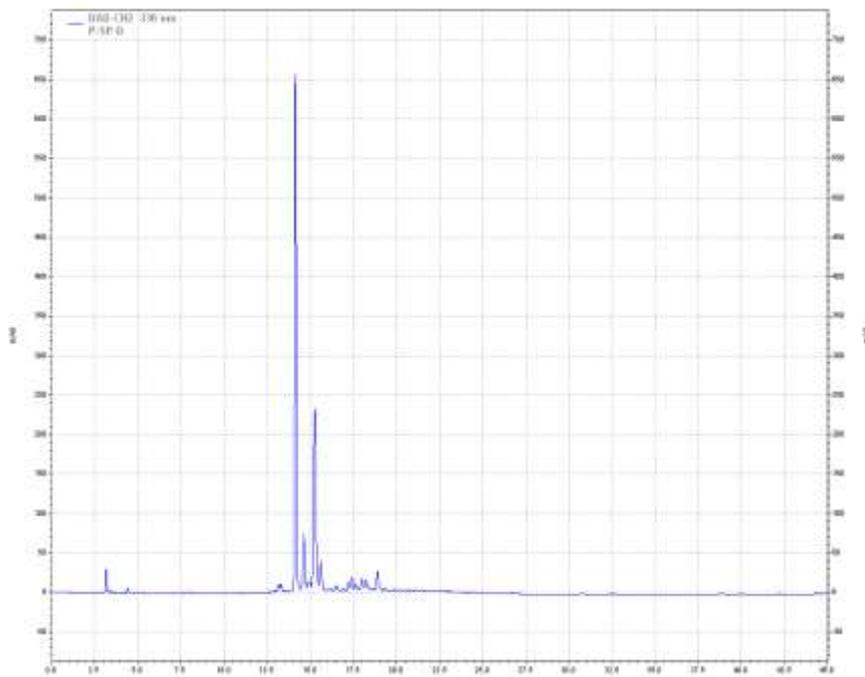
Anexo 24. Perfil cromatográfico del extracto de etanol 96% purificado, de muestras procedentes de La Libertad a 330 nm



Anexo 25. Perfiles cromatográficos de extractos de etanol 45% y 70% purificados, de muestras procedentes de La Libertad a 330 nm



Anexo 26. Perfiles cromatográficos del decocto e infuso purificados, de muestras procedentes de La Libertad a 330 nm



Anexo 27. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para compuestos fenólicos de las muestras purificadas procedentes de Tumbes

Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	1153,2278	4	288,3070	435,9913	3,5973e-11
Dentro de los grupos	6,6127	10	0,6613		
Total	1159,8405	14			

Test de tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
Decocto	3				43,523
Infuso	3		63,679		
45%	3	68,704			
70%	3			56,851	
96%	3		63,979		
Sig.		0,001	0,899	0,001	0,001

El análisis estadístico nos muestra que el infuso y etanol de 96% no presentan diferencias significativas, a diferencia de los demás grupos que si son estadísticamente significativos.

Anexo 28. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para compuestos fenólicos de las muestras purificadas procedentes de Piura.

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	263,2706	3	87,7569	80,7134	2,5415e-06
Dentro de los grupos	8,6981	8	1,0873		
Total	271,9687	11			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Decocto	3			50,390
Infuso	3	61,944		
45%	3		56,841	
70%	3	61,646		
Sig,		0,899	0,002	0,001

Anexo 29. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para compuestos fenólicos de las muestras purificadas procedentes de Lambayeque.

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	567,7042	4	141,9261	83,3848	1,2235e-07
Dentro de los grupos	17,0206	10	1,7021		
Total	584,7248	14			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
Decocto	3			69,114	69,577
Infuso	3				
45%	3	85,351			
70%	3		76,047		
96%	3				64,673
Sig.		0,001	0,006	0,899	0,060

Anexo 30. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para compuestos fenólicos de las muestras purificadas procedentes de La Libertad.

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	496,0660	4	124,0165	54,5176	9,3679e-07
Dentro de los grupos	22,7480	10	2,2748		
Total	518,8139	14			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05				
		1	2	3	4	5
Decocto	3	90,652				
Infuso	3		81,040			
45%	3			70,768		
70%	3				64,293	
96%	3					44,547
Sig.		0,001	0,001	0,001		0,001

Anexo 31. Análisis estadístico de compuestos fenólicos entre los mejores extractos purificados de cada localidad

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	586,2837	3	195,4279	94,5634	1,3771e-06
Dentro de los grupos	16,5331	8	2,0666		
Total	602,8168	11			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
Tumbes(45%)	3	68,704			
Piura(I)	3		61,944		
Lambayeque (45%)	3			85,351	
La Libertad (D)	3				90,651
Sig.		0,006	0,006	0,023	0,001

El análisis estadístico nos muestra que existen diferencias significativas entre todos los grupos, por lo tanto, se tomará como mejor extracto el que extrajo más compuestos fenólicos de los cuatro seleccionados y que corresponde al decocto de La Libertad

Anexo 32. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para actividad antioxidante de las muestras de Tumbes

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	286,8903	4	71,7226	32,5330	1,0443e-05
Dentro de los grupos	22,0461	10	2,2046		
Total	308,9364	14	Subconjunto para alfa = 0,05		
Muestra	N	1	2	3	
DECOCTO	3	12,674			
INFUSO	3		24,544		
ETANOL 45%	3		24,401		
ETANOL 70%					18,691
ETANOL 96%	3				19,506
Sig.		0,004		0,899	0,899

Prueba de Tukey

Anexo 33. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para actividad antioxidante de las muestras de Piura

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	294,3411	3	98,1137	39,8596	3,7082e-05
Dentro de los grupos	19,6919	8	2,4615		
Total	314,0330	11			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Decocto	3	31,786		
Infuso	3		22,771	
45%	3			18,148
70%	3		22,643	
Sig.		0,028	0,899	0,028

Anexo 34. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para actividad antioxidante de las muestras de Lambayeque

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	567,7042	4	141,9261	83,3848	1,2235e-07
Dentro de los grupos	17,0206	10	1,7021		
Total	584,7248	14			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Decocto	3	43,600		
Infuso	3		27,183	
45%	3			36,393
70%	3			34,968
96%			27,368	
Sig.		0,001	0,899	0,661

Anexo 35. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para actividad antioxidante de las muestras de La Libertad.

Prueba de Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	496,0660	4	124,0165	54,5176	9,3679e-07
Dentro de los grupos	22,7480	10	2,2748		
Total	518,8139	14			

Prueba de Tukey

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Decocto	3	37,031		
Infuso	3	35,252		
45%	3		29,494	
70%	3		29,726	
96%				20,573
Sig.		0,607	0,899	0,001

Anexo 36. Tratamiento estadístico de datos obtenidos para actividad antioxidante entre los mejores extractos de cada localidad.

Prueba de Análisis de Varianza

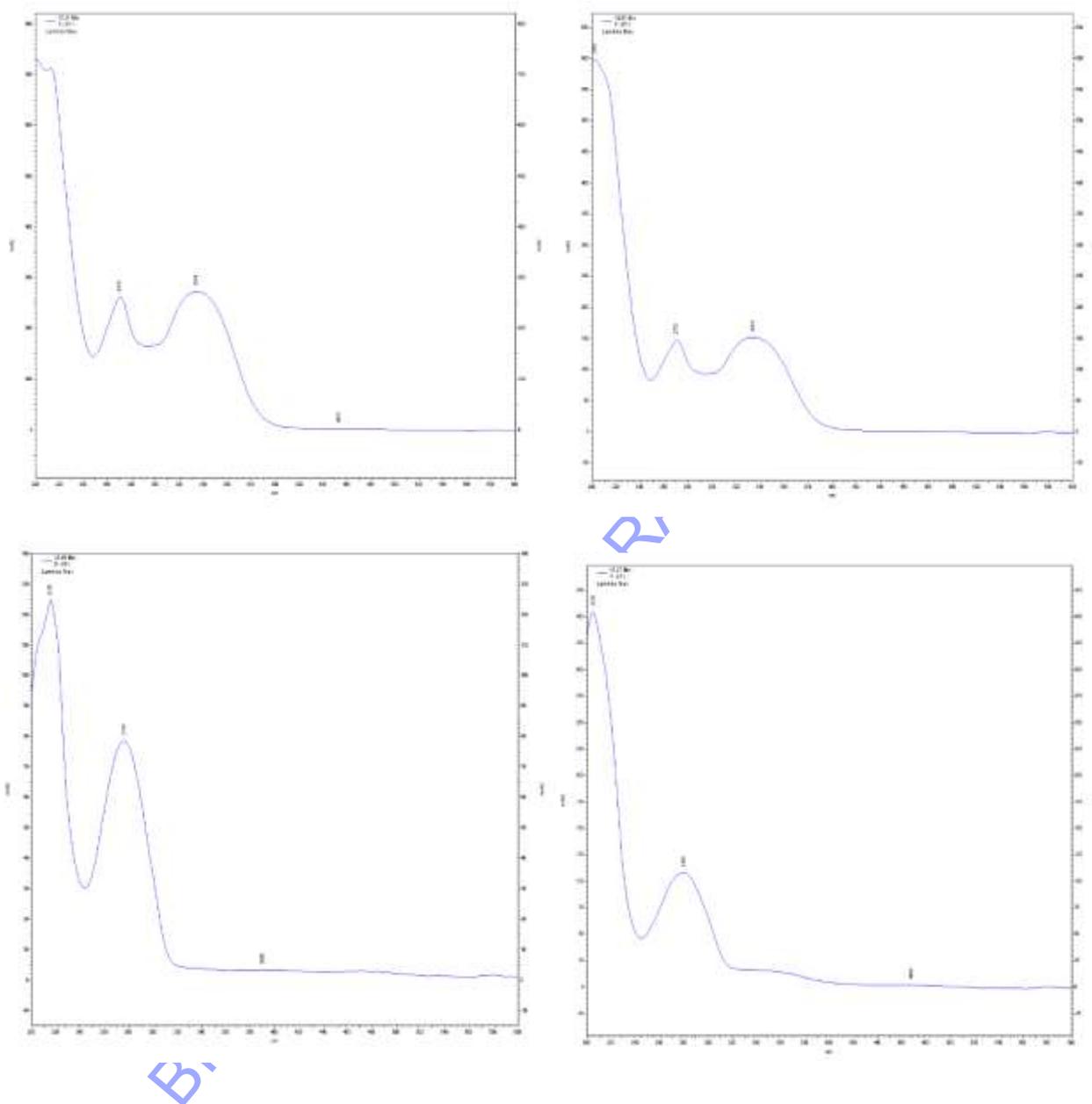
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	586,2837	3	195,4279	94,5634	1,3771e-06
Dentro de los grupos	16,5331	8	2,0666		
Total	602,8168	11			

Prueba de Tukey

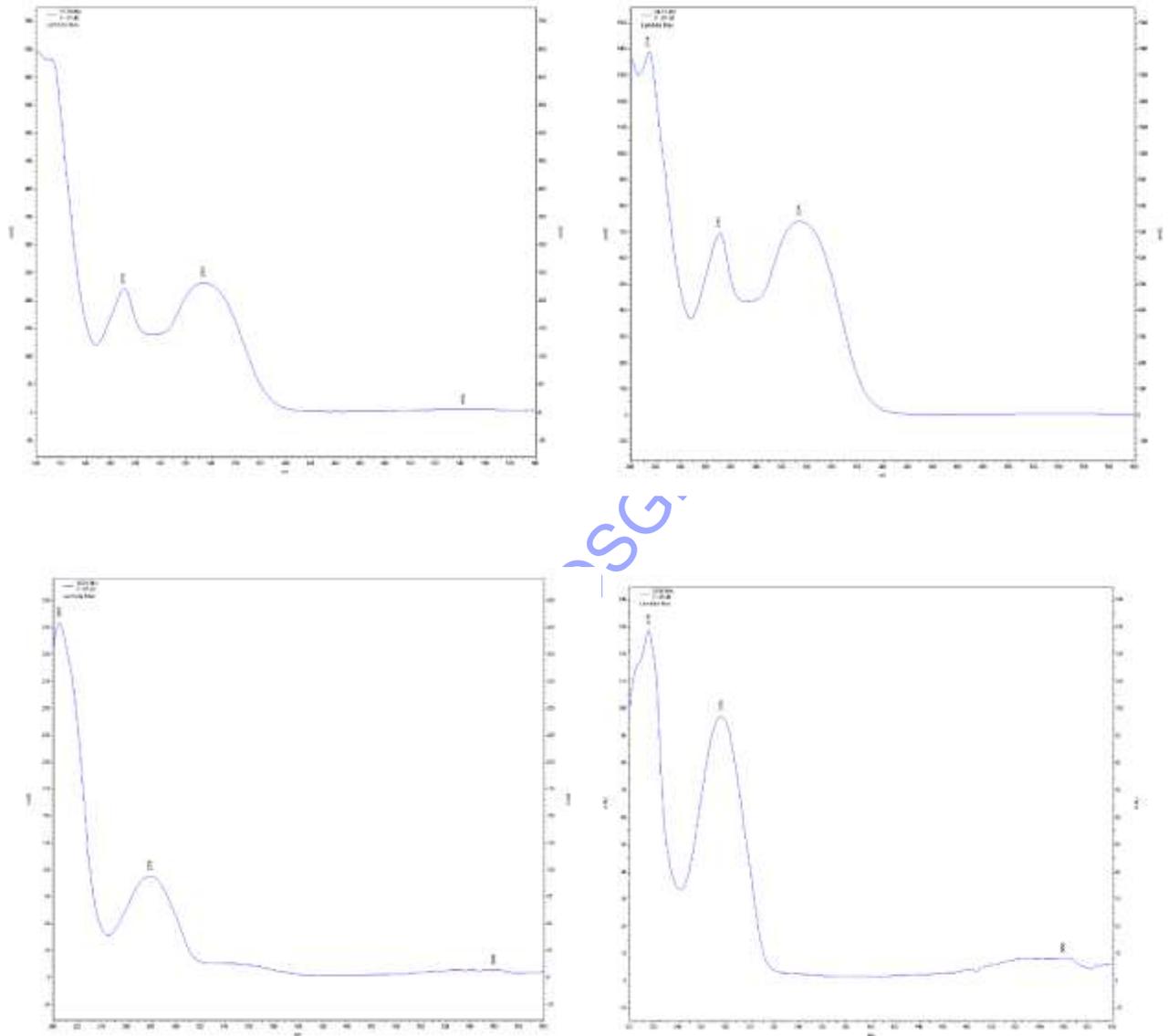
Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
Tumbes(I)	3	24,544			
Piura(D)	3		31,785		
Lambayeque (D)	3			43,599	37,030
La Libertad (D)	3				
Sig.		0,001	0,001	0,001	0,001

El análisis estadístico nos muestra que existen diferencias significativas entre todos los grupos, por lo tanto, se tomará como mejor extracto con mejor actividad antioxidante de los cuatro seleccionados y que corresponde al decocto de Lambayeque

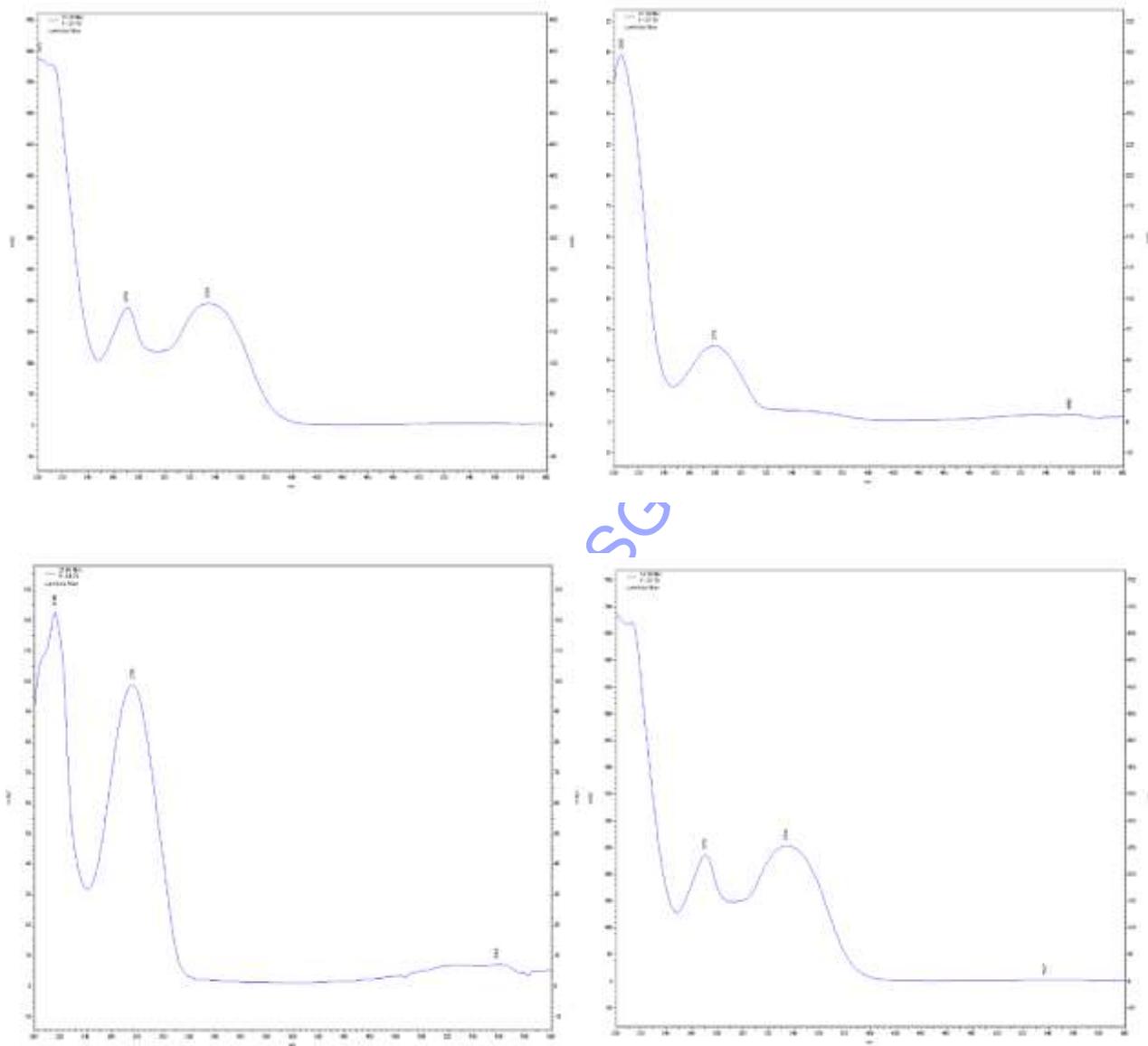
Anexo 37. Perfiles UV-Vis del infuso de La Libertad a diferentes tiempos de retención



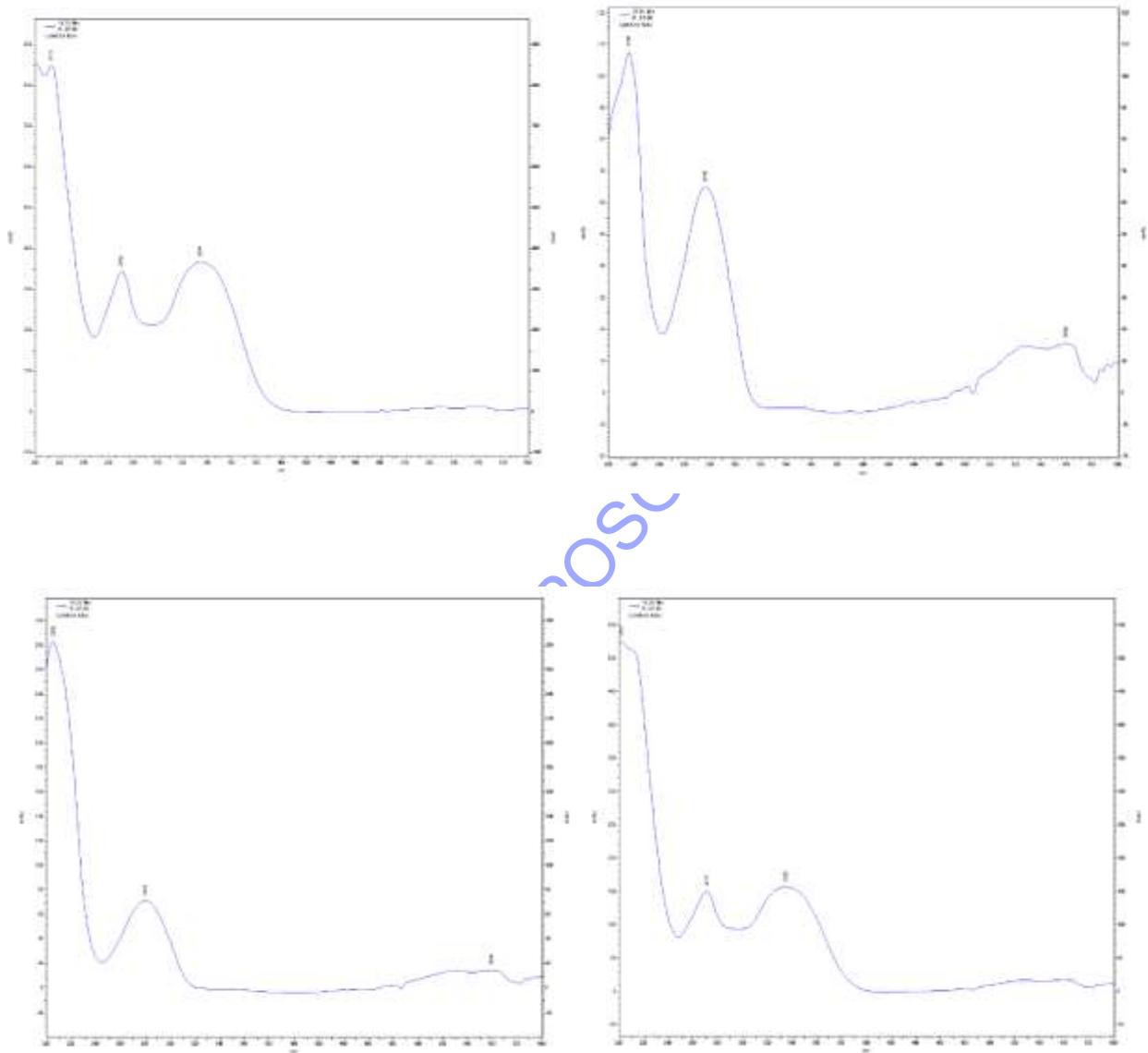
Anexo 38. Perfiles UV-Vis del etanol 45% de La Libertad a diferentes tiempos de retención



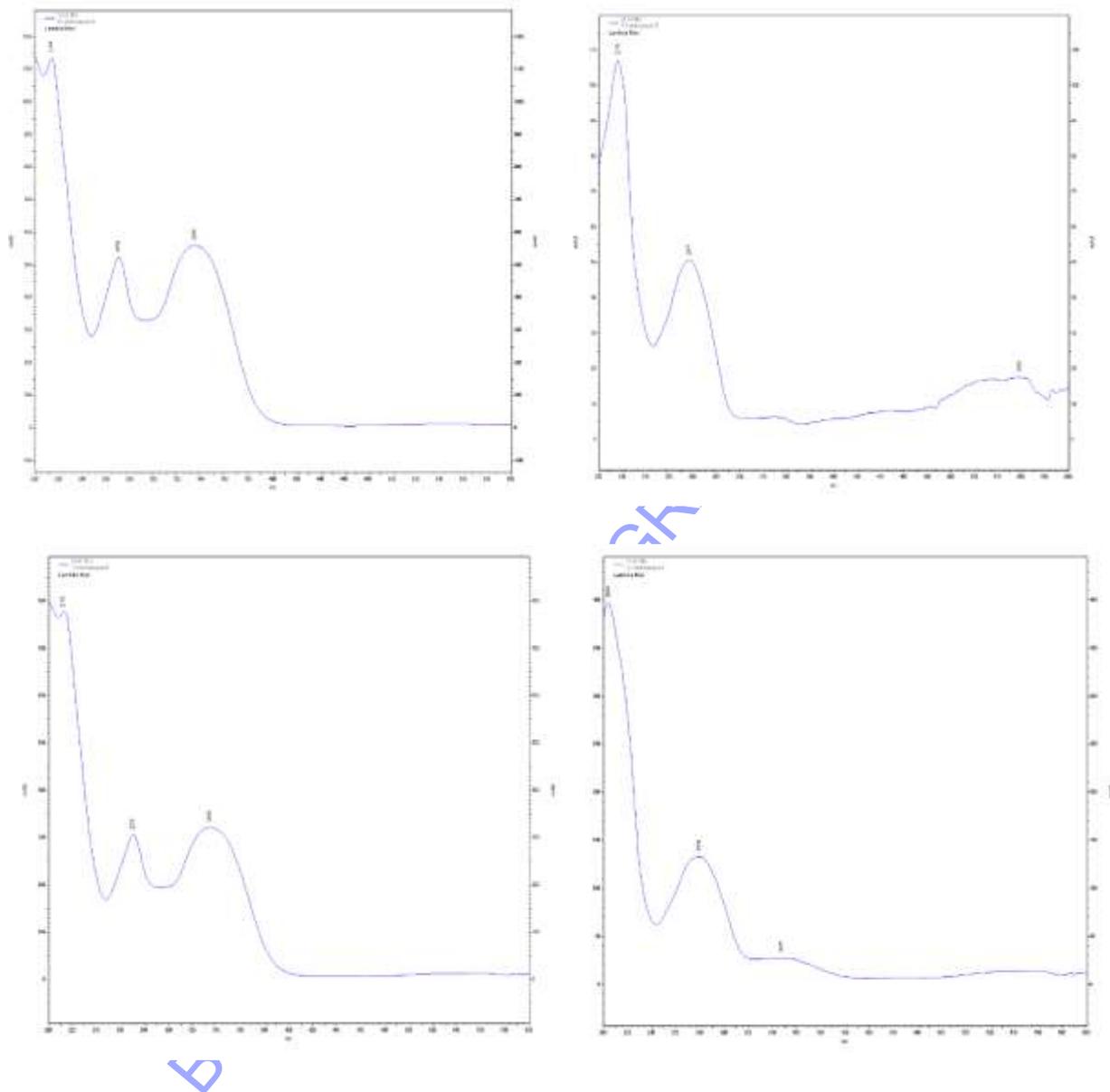
Anexo 39. Perfiles UV-Vis del etanol 70% de La Libertad a diferentes tiempos de retención



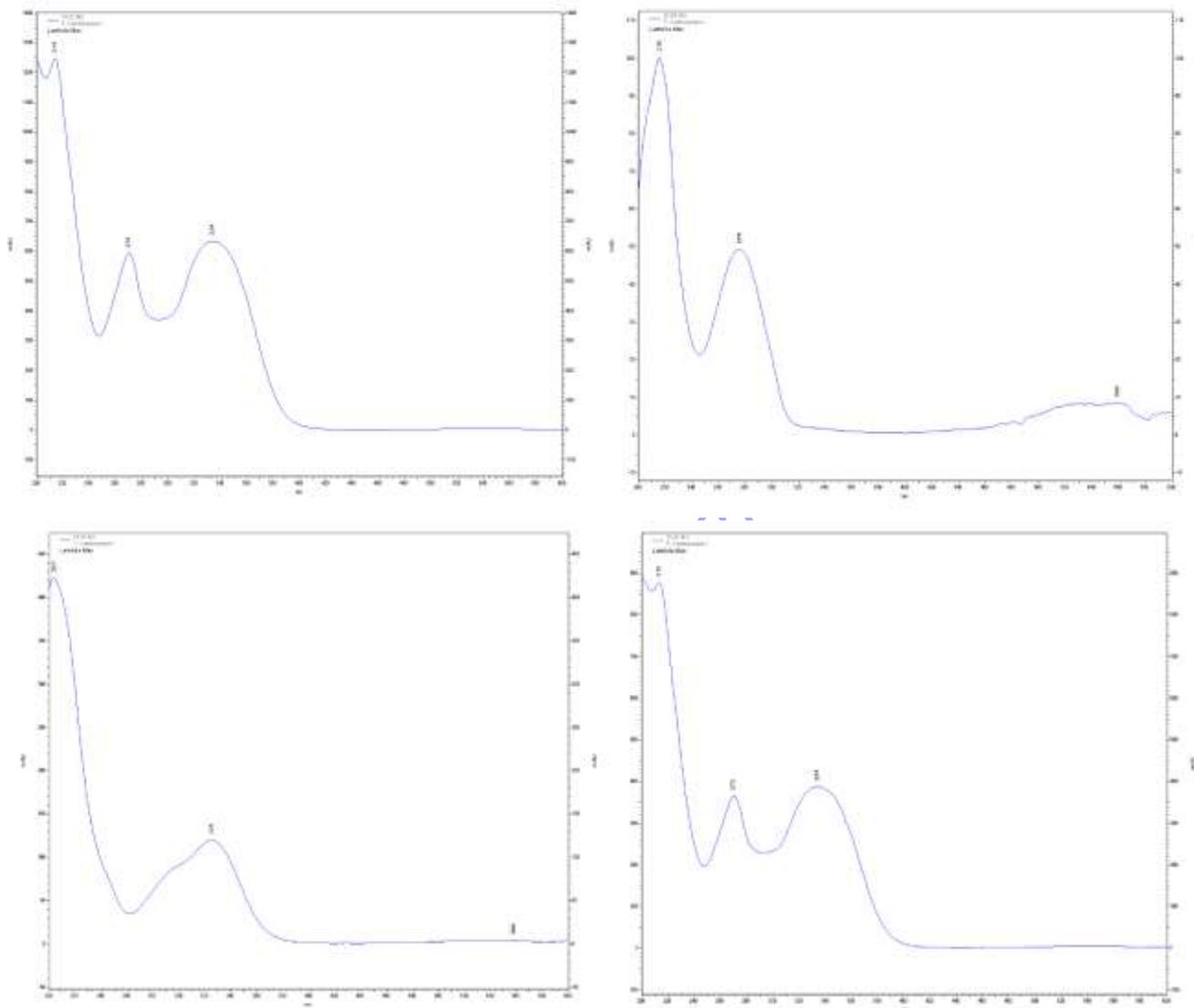
Anexo 40. Perfiles UV-Vis del etanol 96% de La Libertad a diferentes tiempos de retención



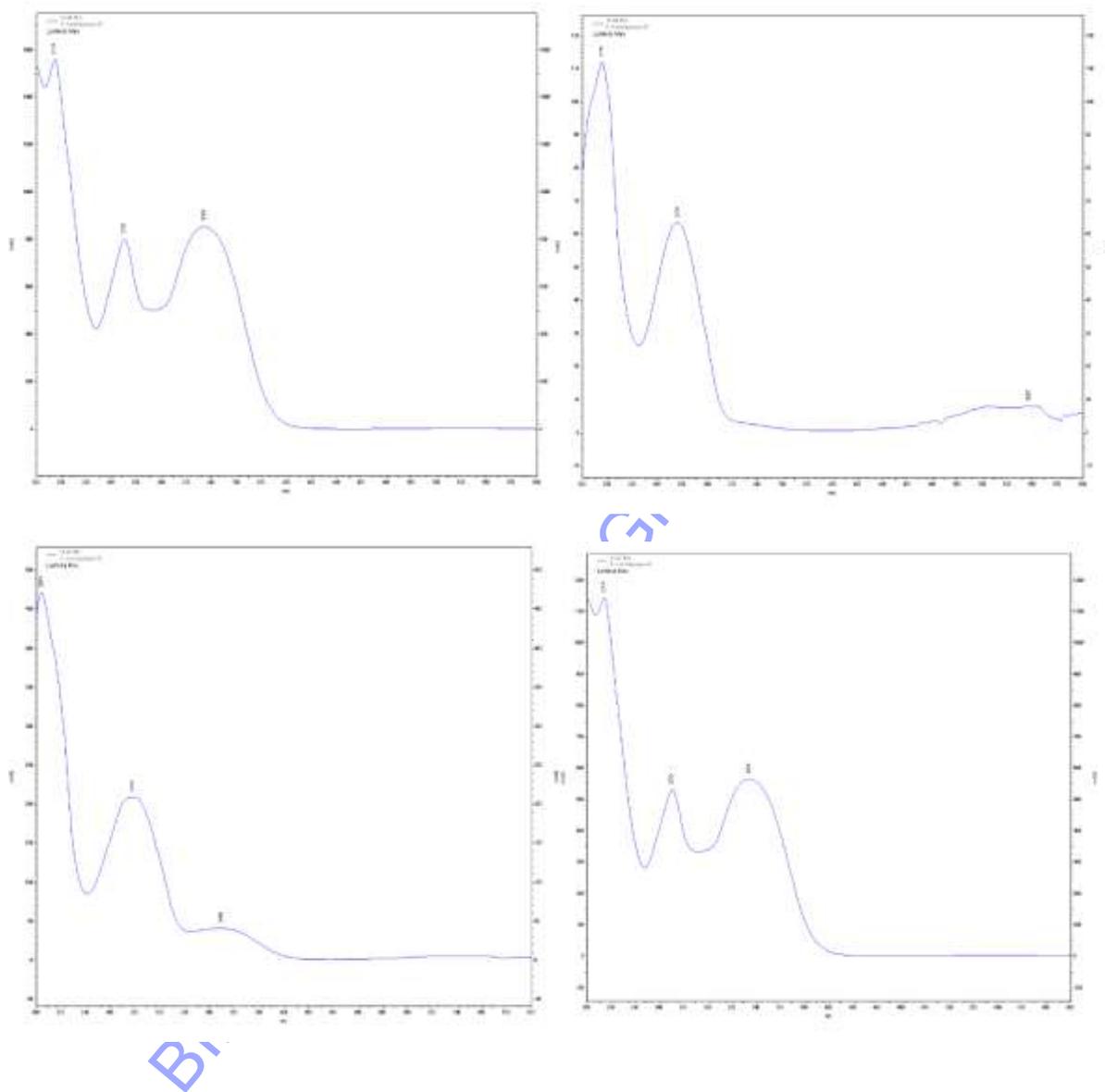
Anexo 41. Perfiles UV-Vis del decocto de Lambayeque a diferentes tiempos de retención



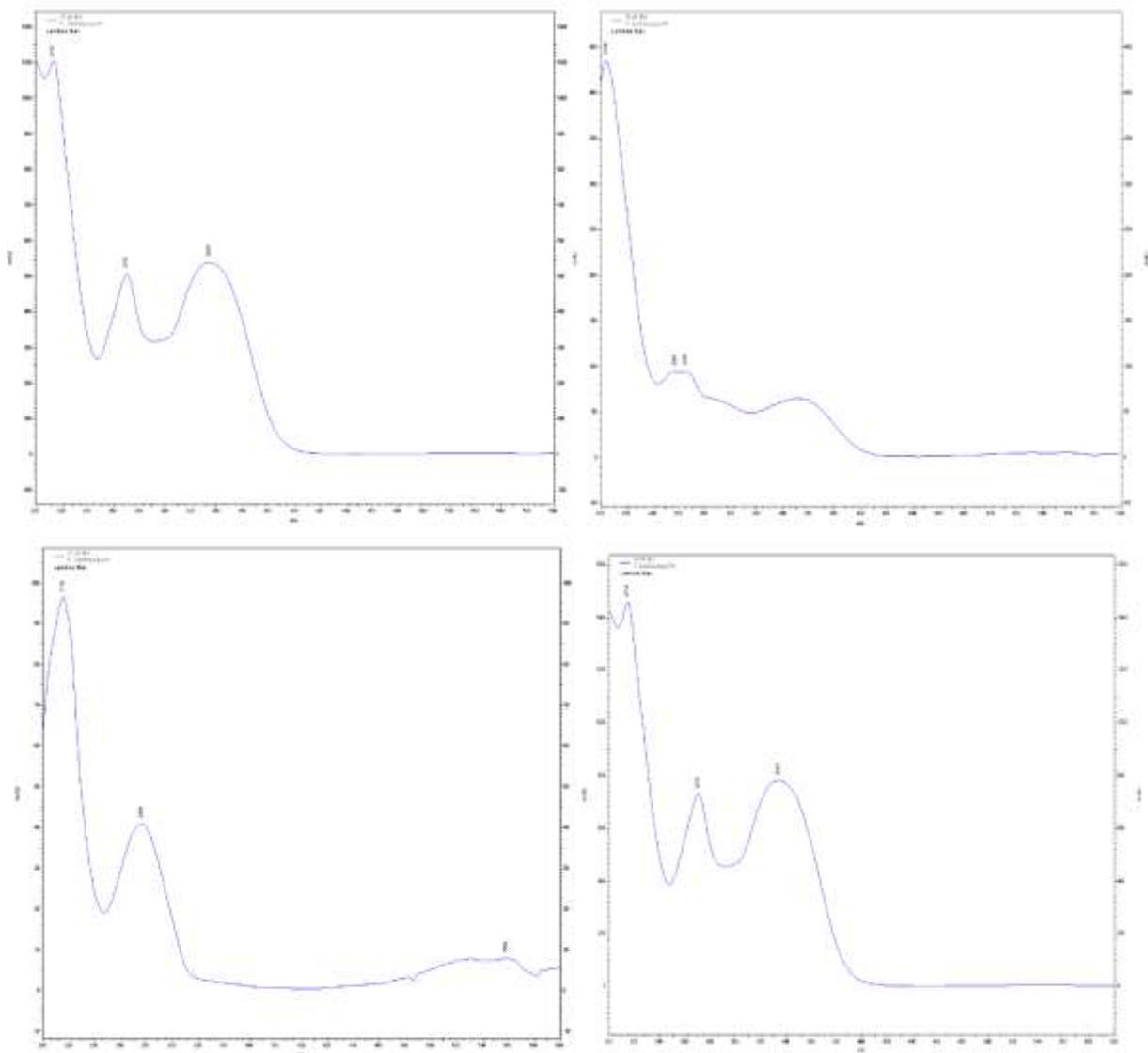
Anexo 42. Perfiles UV-Vis del infuso de Lambayeque a diferentes tiempos de retención



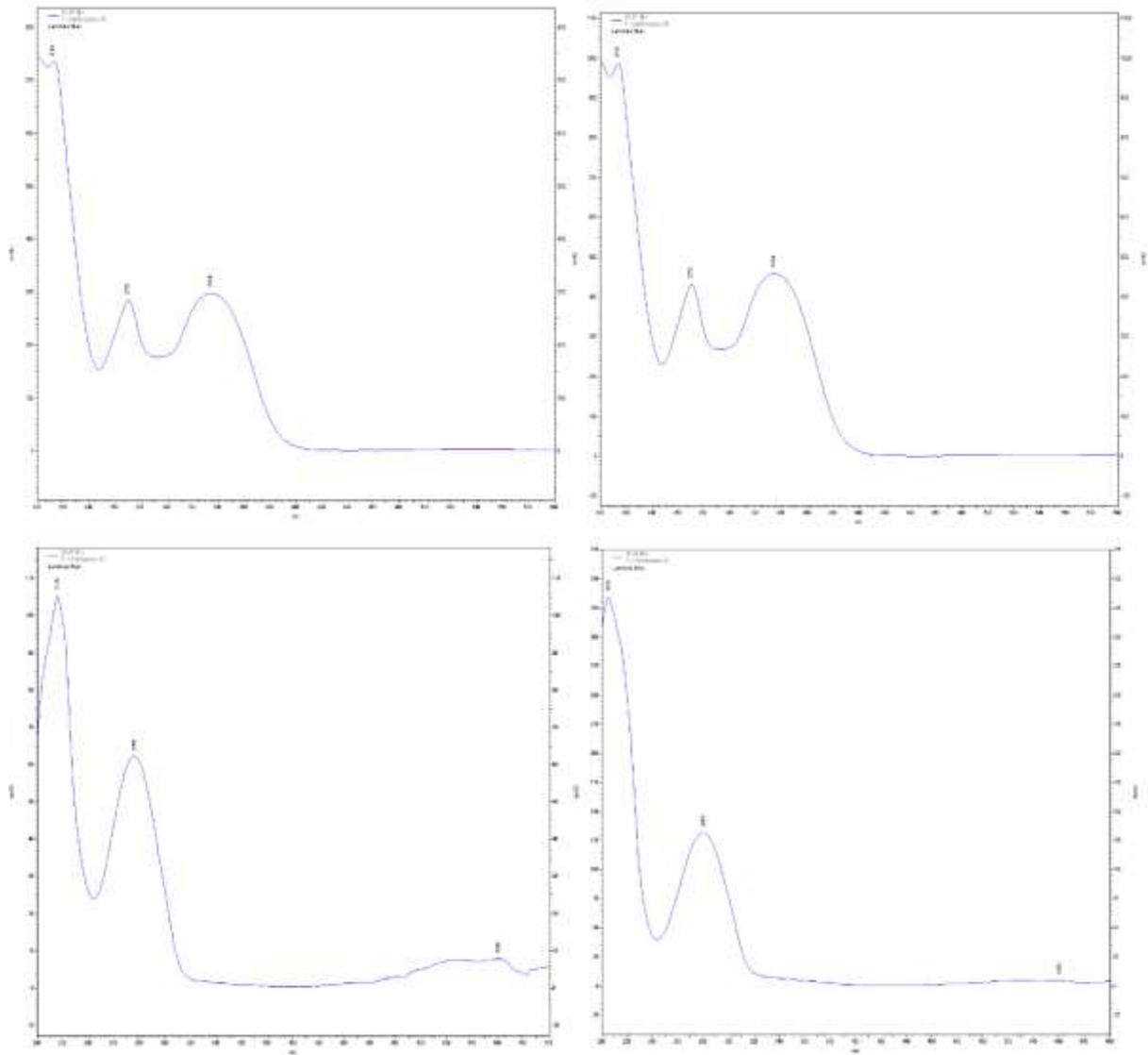
Anexo 43. Perfiles UV-Vis del etanol 45% de Lambayeque a diferentes tiempos de retención



Anexo 44. Perfiles UV-Vis del etanol 70% de Lambayeque a diferentes tiempos de retención



Anexo 45. Perfiles UV-Vis del etanol 96% de Lambayeque a diferentes tiempos de retención



Anexo 46. Voucher de identificación taxonómica realizada por el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo de las muestras procedentes de Tumbes.



Anexo 47. Voucher de identificación taxonómica realizada por el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo de las muestras procedentes de Piura.



BIBLIOTECA

Anexo 48. Voucher de identificación taxonómica realizada por el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo de las muestras procedentes de Lambayeque.

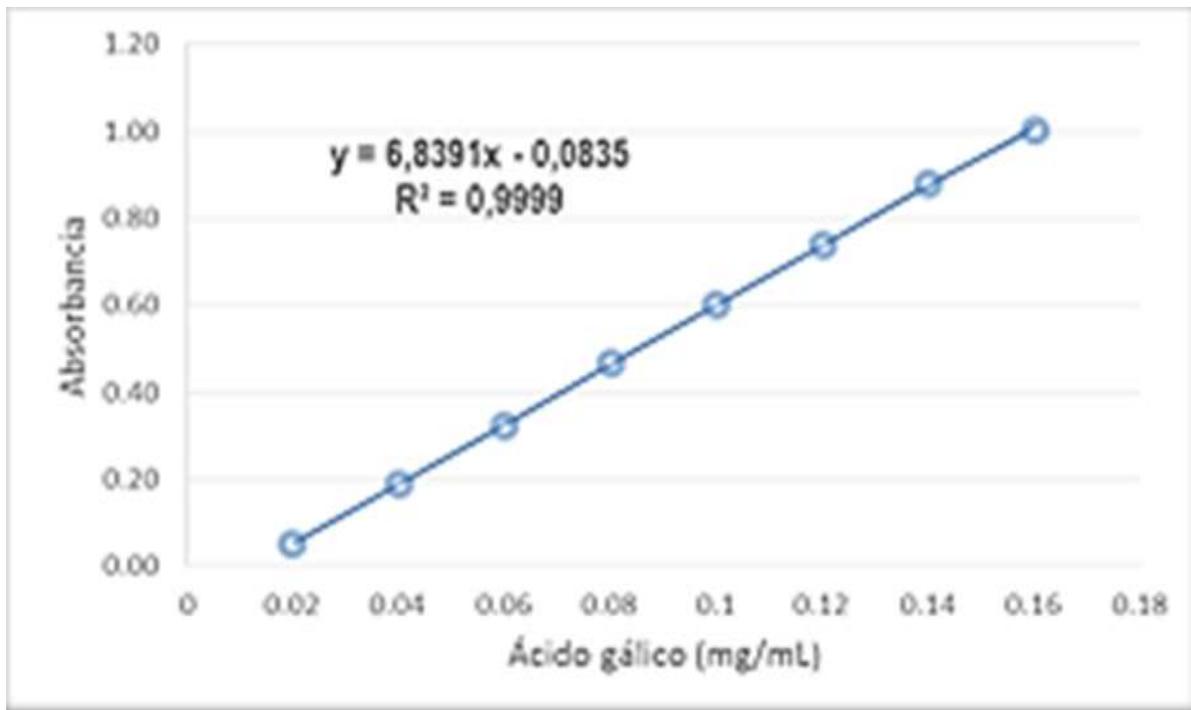


Anexo 49. Voucher de identificación taxonómica realizada por el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo de las muestras procedentes de La Libertad.



BIBLIOTECA

Anexo 50. Curva de calibración del ácido gálico



BIBLIOTECA DE I