

**NO SALE A
DOMICILIO**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONIA
PERUANA**



UNAP

TESIS:

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
DE LAS FRACCIONES ALCOHÓLICAS DE LA
CORTEZA DE *Theobroma obovatum*, IIAP-2012.”**

**Trabajo de Grado Requisito
para Optar al Título de Químico Farmacéutico.**

AUTÓR:

Bach. Heinz Charles Rebatta Ríos.

ASESOR:

Q.F. Luís Alberto Vilchez Alcalá Mgr.

CO-ASESOR:

Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís.

SAN JUAN BAUTISTA – PERÚ

Mayo, 2013.

00126



DONADO POR:

HEINZ CH. REBATA RÍOS

Iquitos, 29 de 10 de 2013



UNAP

"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"



Farmacia y Bioquímica

ACTA DE SUSTENTACION

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 29 días del mes de MAYO de dos mil trece, siendo las 13:10 horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designados según Resolución de Coordinación N° 160-FFB-UNAP-2012, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- ING.REYNA GLADYS CÁRDENAS DE REÁTEGUI
- ING.CLETO JARA HERRERA
- Q.F.HENRY VLADIMIR DELGADO WONG

Presidente
Miembro
Miembro



Se constituyeron en el Auditorio del Colegio Químico Farmacéutico Departamental de Loreto, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS FRACCIONES ALCOHÓLICAS DE LA CORTEZA DE *Theobroma obovatum*, IIAP-2012" presentado por el Bachiller: HEINZ CHARLES REBATA RÍOS, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición del sustentante, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

SATIS FACTORIA MENTE

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADO POR EXCELENCIA
- 2.- Observaciones NINGUNA



Siendo las 13:50 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándole al sustentante por su ADECUADA EXPOSICION.

.....
ING.REYNA GLADYS CÁRDENAS DE REÁTEGUI
Presidente

.....
ING.CLETO JARA HERRERA
Miembro

.....
Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
Miembro

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis, tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antioxidante e identificar los compuestos fenólicos de la fracción alcohólica de la corteza de *Theobroma obovatum*. La parte biológica (corteza) de la especie seleccionada fue recolectada en el Distrito de San Juan Bautista, Maynas, en la Región Loreto, del Jardín Botánico del Centro de Investigaciones Allpahuayo (C.I.A.) del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (I.I.A.P.), en el ámbito de la Reserva Nacional Allpahuayo - Mishana. Se lavaron y secaron en la estufa a 33°C por 10 a 14 días, luego fueron pulverizadas y almacenadas a -20°C, en total oscuridad. La extracción alcohólica, para la cual se utilizó condensador con reflujo y rotavapor¹. La determinación de polifenoles totales del extracto (50 mg/ml) y fracciones mediante espectrofotómetro UV-Vis a 700 nm². El proceso de fraccionamiento se realizó por medio de cromatografía de columna abierta y capa fina. La evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas se realizó mediante el ensayo de secuestro de radicales libres con el reactivo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)³. En la determinación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) fase reversa a 280 nm⁴; y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS). Se obtuvo un total de 19 fracciones, la cual con mayor actividad antioxidante fue la denominada F-10 con 90% de capacidad antioxidante y 10% de reducción y una concentración de polifenoles totales en g/100g EC 30.88 ± 0.0478. En la identificación y cuantificación la fracción F-10, se demostró por HPLC, que tuvo 41.97 x 10⁻³ g/100g de ácido clorogénico y 5 compuestos no identificados, y por GC-MS/MS, probables compuestos fenólicos que son: ácido fosfónico, (p-hidroxifenil); Mequinol; alcohol homovanililo; 3,4,5-trimetoxifenol.

Palabras Claves: Actividad antioxidante, compuestos fenólicos, fracciones alcohólicas, *Theobroma obovatum*, radicales libres, HPLC, GC-MS/MS.

SUMMARY

In the present thesis work, it has main goal which is evaluate the antioxidant activity and identify phenolics components of alcoholic fraction of *Theobroma obovatum* skin. The biological part (skin) of the selected species was collected in San Juan Bautista district, Maynas, in Loreto region from Allpahuayo Investigations Center (A.I.C.) of Peruvian Amazon Investigations Institute (P.A.I.I.), in the National Allpahuayo Reserve – Mishana area. They were washed and dried in a stove to 33°C during 10 to 14 days then they were pulverized and stored to -20°C in a complete darkness. We used condenser with reflux and rotavapor for alcoholic extraction¹. The total polyphenol determination from extract (50 mg/ml) and fractions through spectrophotometer UV-Vis 700 nm². The division into fraction process was through chromatography of open column and thin cape. The evaluation of antioxidant activity of get fractions was through abductions essays of free radicals with DPPH reactive (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl)³. The determination, identification and quantization of phenolics components were get through high pressure liquid chromatography (HPLC) reverse phase to 280 nm⁴; and gases chromatography of mass/mass (GC-Ms/Ms). We get a total of 19 fractions which with a best antioxidant activity was named F-10 with 90% of antioxidant capability and 10% of reduction and a concentration of total polyphenol in g/100g CE 30.88 ± 0.0478 . In identification and quantization the fraction F-10 was showed by HPLC which had de 41.97×10^{-3} g/100g of chlorine acid and 5 components no identified and by GC-Ms/Ms, it showed probable phenolics components which are phosponic acid, (p-hidroxyphenyl); mequinol; homovanillyl alcohol; 3,4,5-trimetoxyphenol.

Key words: antioxidant activity, phenolics components, alcoholical fractions, *Theobroma obovatum*, free radicals, HPLC, GC-Ms/Ms.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos:

Que son el empuje que
siempre necesité en cada
momento y la educación
que me instruyeron y
esfuerzo que me dieron.

*Armando Rebatta Parra y
Maritza Ríos Vásquez*

*Brizzia Corallia Rebatta Ríos
y Pietro Joan Rebatta Ríos*

AGRADECIMIENTO

A Díos, por guiarme y protegerme durante toda la vida hasta ahora.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana y al director del Programa de Investigación en Biodiversidad Amazónica, el Blgo. Kember Mejía, por brindarme la oportunidad y depositar su confianza en mí, de desarrollar la tesis en la Línea de Antioxidantes.

Al Dr. Víctor E. Sotero Solís y la Blga. Elsa Rengifo, por estar siempre en el momento que más lo necesité, con los consejos y enseñanzas durante la experimentación del estudio, al mismo tiempo por la confianza que me brindaron.

Al Q.F. Luís Alberto Vílchez Alcalá Mgr., por el asesoramiento, además de las sugerencias y orientaciones manifestados en la redacción de la tesis.

A los amigos y miembros del equipo de investigadores del proyecto: Ing. Claudia Merino Zegarra, Ing. Éricka Dávila, Ursula Monteiro, por las informaciones proveídas, los consejos y apoyo durante la ejecución.

A la Q.F. Martha Maco Luján por las orientaciones e ideas.

A mi srta. enamorada Priscila Suárez Alvarado por ser la persona que más apoyo me dio en mi carrera universitaria y compañera de trabajo donde también adquirí su sabiduría en los momentos de duda en la realización de la tesis.

GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

1.1. Introducción.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.2.1. Formulación del problema.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. General.....	4
1.3.2. Específicos.....	4

CAPÍTULO II

2.1. Marco teórico.....	6
2.1.1. Antecedentes.....	6
2.1.2. Actividad antioxidante.....	10
2.1.2.1. Antioxidantes.....	10
2.1.2.2. Clasificación de los antioxidantes.....	12
2.1.2.3. Radicales libres.....	12
2.1.2.4. Reacción de DPPH.....	14
2.1.2.5. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	14
2.1.2.6. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	17
Ácido ascórbico.....	17
Glutación.....	18
Tocoferoles.....	19

Carotenoides.....	19
Compuestos fenólicos.....	20
2.1.3. Compuestos fenólicos.....	21
2.1.3.1. Clasificación química.....	25
a) Compuestos fenólicos simples.....	25
b) Compuestos fenólicos complejos.....	25
2.1.3.2. Polaridad de compuestos fenólicos.....	26
2.1.3.3. Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	26
2.1.3.4. Compuestos fenólicos-Actividad antioxidante.....	28
2.1.3.5. Concentración de polifenoles totales	
Método de Folin-Ciocalteu.....	30
2.1.3.6. Relación concentración de polifenoles totales,	
actividad antioxidante y poder reductor.....	30
2.1.4. Familia Malvaceae.....	31
2.1.5. Descripción del género <i>Theobroma</i>	31
2.1.6. Descripción de la especie <i>Theobroma obovatum</i>	32
2.2. Definiciones operacionales.....	34
2.2.1. Variable independiente.....	34
2.2.2. Variable dependiente.....	34
2.3. Hipótesis.....	37

CAPÍTULO III

3.1. Población y muestra.....	39
3.2. Técnicas e instrumentos.....	40
3.2.1. Preparación del extracto alcohólico.....	41
3.2.2. Fraccionamiento del extracto alcohólico.....	41

3.2.3. Actividad antioxidante de las fracciones.....	42
3.2.4. Determinación de polifenoles totales de las fracciones.....	43
3.2.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos de la fracción.....	44
3.2.6. Elucidación por GC-Ms/Ms.....	45
3.2.7. Materiales e instrumentos.....	46
3.3. Procedimientos de recolección de datos.....	47
3.3.1. Recolección de la muestra vegetal.....	47
3.3.1.1. Jardín botánico del Centro de Investigaciones Allpahuayo (CIA).....	47
3.4. Análisis de datos.....	47
3.4.1. Actividad antioxidante.....	47
3.4.2. Determinación de compuestos fenólicos.....	48
3.4.3. Cuantificación de los compuestos fenólicos.....	48

CAPÍTULO IV

4.1. Resultados.....	48
4.1.1. Fraccionamiento del extracto alcohólico de la especie <i>T. obovatum</i>	51
4.1.2. Actividad antioxidante de las fracciones Ensayo de DPPH.....	52
4.1.3. Determinación de la concentración de polifenoles totales de las fracciones – Método de Folin-Ciocalteau.....	55
4.1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos de la fracción alcohólica por HPLC.....	56

4.1.5. Identificación de compuestos fenólicos	
de la fracción alcohólica por GC-Ms/Ms.....	58
4.1.5.1. Compuesto “b”.	
<i>Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-</i>	59
4.1.5.2. Compuesto “d”.- <i>Mequinol</i>	60
4.1.5.3. Compuesto “h”.- <i>Homovanillyl alcohol</i>	61
4.1.5.4. Compuesto “j”.- <i>Phenol, 3,4,5-trimethoxy-</i>	62
4.2. Discusión.....	64
4.3. Conclusión.....	66
4.4. Recomendaciones.....	67
4.5. Bibliografía.....	68
4.6. Anexos.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	14
Figura 2. Estructura del glutatión, γ - glutamil-cisteinil- glicina.....	18
Figura 3. Estructura del α -, β -, γ -, y δ - tocoferol.....	19
Figura 4. Estructura química de algunos carotenoides.....	20
Figura 5. Fenol.....	21
Figura 6. Estructura básica de los flavonoides.....	22
Figura 7. Flavonoides con actividad antioxidante.....	23
Figura 8. Taninos (Polímeros de catequina).....	23
Figura 9. Ruta biosintética de compuestos fenólicos.....	27
Figura 10. Ruta de biosíntesis de fenoles.....	28
Figura 11. (1) Árbol de <i>Theobroma obovatum</i> . (2) Fruto maduro de <i>Theobroma obovatum</i> . (3) Pulpa del fruto de <i>Theobroma obovatum</i>	33
Figura 12. Curva estándar de catequina, por Espectrofotometría UV/Vis.....	48
Figura 13. Curva estándar de ácido clorogénico, por HPLC.....	49
Figura 14. Actividad antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de <i>T. obovatum</i> (Absorbancia vs Tiempo).....	54
Figura 15. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la corteza de <i>T. obovatum</i> por HPLC.....	56
Figura 16. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la corteza de <i>T. obovatum</i> por GC-Ms/Ms.....	58
Figura 17. Espectro de masas del compuesto “b”.....	59

Figura 18. Espectro de masas del compuesto “d”.....	60
Figura 19. Espectro de masas del compuesto “h”.....	61
Figura 20. Espectro de masas del compuesto “j”.....	62
Figura 21. Agrupamiento de las fracciones por cromatografía de capa fina.....	79
Figura 22. Repetición 3, del ensayo de DPPH.....	80
Figura 23. Ensayo de DPPH - Promedio de absorbancias de las fracciones alcohólicas de la corteza de <i>T. obovatum</i>	81
Figura 24. Porcentajes de Capacidad antioxidante y Poder reductor.....	81
Figura 25. Concentración de polifenoles totales (g/100g EC) de las fracciones con actividad antioxidante.....	82
Figura 26. Espectrogramas por HPLC a diferentes concentraciones de ácido clorogénico.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes.....	12
Tabla 2. Tipos de radicales libres.....	13
Tabla 3. Principales sistemas antioxidantes enzimáticos presentes en las plantas.....	16
Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto alcohólico.....	51
Tabla 5. Efecto antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de <i>T. obovatum</i>	52
Tabla 6. Concentración de polifenoles totales de las fracciones alcohólicas de la corteza de <i>T. obovatum</i>	55
Tabla 7. Concentración de ácido clorogénico de la fracción 10 de la corteza de <i>T. obovatum</i>	57
Tabla 8. Fitocomponentes no fenólicos identificados en la fracción 10 de la corteza <i>T. obovatum</i> por GC-MS/MS.....	63
Tabla 9. Matriz de consistencia.....	75
Tabla 10. Valores del Estándar de catequina en diferentes concentraciones.....	82

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Flujograma general para la realización del estudio.....	40
Esquema 2. Procedimiento de la obtención del extracto alcohólico de la corteza de <i>Theobroma obovatum</i>	76
Esquema 3. Procedimiento del fraccionamiento del extracto alcohólico de la corteza de <i>Theobroma obovatum</i>	77
Esquema 4. Determinación de la Concentración de polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu) de la fracción 10 del extracto alcohólico de la corteza de <i>Theobroma obovatum</i>	78

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

CAPITULO I

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

1.1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes, son sustancias que cuando están presentes retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las concentraciones de antioxidantes que presenta la alimentación de cada individuo dependerá en gran medida de cuan balanceada y correcta sea la misma, así como de la forma como se prepare y el nivel de nutrimentos que contenga al momento de ser ingerida ⁵. Los principales antioxidantes naturales son el ácido ascórbico, el α -tocoferol, los carotenoides y los compuestos fenólicos, los cuales son encontrados en diferentes fuentes vegetales ⁶.

No obstante, las plantas medicinales siempre han sido objeto de estudio. En las 2 últimas décadas, en particular, ha resurgido un renovado interés, sobre todo en lo concerniente al aprovechamiento de sus propiedades terapéuticas, las cuales han aportado un gran valor en la etnomedicina porque han permitido evitar y controlar la proliferación de muchas enfermedades en humanos ⁷. Es por ello que el interés por el estrés oxidativo y las sustancias antioxidantes se han intensificado en la última década, por la posible relación etiológica con diversas patologías cardiovasculares, cáncer artritis y entre otras ⁸.

En la actualidad, la búsqueda de nuevas fuentes de sustancias bioactivas preferiblemente con potencial antioxidante, desempeñarían un papel importante en la reducción de las reacciones de degradación oxidativa involucradas en muchas enfermedades de los sistemas biológicos, y también en la rancidez de los alimentos ⁹.

Finalmente, con el desarrollo de la reciente tesis se intenta manifestar el potencial antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*, además de lograr identificar a aquellos compuestos fenólicos que son responsables del efecto en dicha fracción con mayor actividad biológica, para contribuir en la investigación de nuevos agentes o compuestos que circunstancialmente puedan cumplir el papel de antioxidante.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

- ¿Presenta actividad antioxidante las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*?
- ¿Presentan compuestos fenólicos las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. GENERAL.

- Evaluar la actividad antioxidante e identificar los compuestos fenólicos de las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*.

1.3.2. ESPECÍFICOS.

- a. Realizar el fraccionamiento del extracto alcohólico de la corteza de *Theobroma obovatum*, mediante cromatografía de columna abierta, y cromatografía de capa fina.
- b. Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*, por medio del método de secuestro de radicales libres utilizando el radical DPPH.
- c. Determinar la concentración de polifenoles totales de las fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*, por el método de Folin-Ciocalteu.
- d. Cuantificar los compuestos fenólicos de la fracción alcohólica de la corteza de *Theobroma obovatum*, responsables de la actividad antioxidante, por HPLC fase reversa.
- e. Identificar los compuestos fenólicos de la fracción alcohólica de la corteza de *Theobroma obovatum*, responsables de la actividad antioxidante, por GC-MS/MS.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] **CAPITULO II**

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. ANTECEDENTES.

Los antioxidantes naturales son encontrados en las diversas partes de las plantas, como semillas, frutos, hojas, cáscara de la corteza y de la raíz; en las especias, algas, productos microbianos de fermentación y de la reacción de Maillard, entre otros. Siendo las principales fuentes de antioxidantes, fueron inicialmente investigaciones en las especias por:

a. En 1952 Chipault *et al.* Estudiaron las propiedades antioxidantes de especias naturales, donde que los condimentos fue comparado como fuentes de antioxidantes de diversas grasas ¹².

b. En 1982, Inatani *et al.* Estudiaron la estructura de un nuevo antioxidante fenólico diterpeno del Romero, donde la actividad más fuerte de romero no era sorprendente y los componentes activos relacionados, tales como carnosol, rosmanol, rosmariquinona, carnósico y ácidos ursólico, etc ¹³.

c. En 1983, Inatani *et al.* Estudiaron el efecto antioxidante de los constituyentes del Romero, que es una de las especias más utilizadas en los alimentos procesados, ya que tiene un sabor deseable y procesa alta actividad antioxidante, donde que los extractos crudos y refinados del romero están ahora disponibles comercialmente para la aplicación de estabilizadores de alimentos ¹⁴.

d. En 1984, Houlihan *et al.* Estudiaron la estructura química del Rosmari difenol aislado del Romero, donde menciona que los aceites esenciales como romero y aceites sabios carecen de cualquier actividad antioxidante aunque las hierbas son antioxidantes sabidos y encuentran muchos aplicaciones en las preparaciones de comida ¹⁵.

e. En 1984, Nakatani *et al.* Estudiaron los compuestos diterpénicos como sustancias antioxidantes en el Romero, lo cual entre ellos: rosmanol, epirosmanol e isorosmanol que fueron cuatro veces más eficaz que el hidroxitolueno butilado (BHT) y carnosol era dos veces más activo ¹⁶.

Las moléculas típicas de antioxidantes son derivadas de las formas isoméricas de los polifenoles, flavonas, isoflavonas, flavonoides, catequinas, eugenol, cumarina, tocoferoles, ácido cinámico, fosfátidos, ascorbatos, ácidos orgánicos y otros, estudiados por:

a. En 1994, Marinova *et al.* Estudiaron la actividad antioxidante de algunos fenólicos en ácidos grasos ¹⁷.

b. En 1995, Johnson *et al.* Efectuó una revisión de los antioxidantes en tecnología de alimentos ¹⁸.

c. En 2001, García Bacallao, L. *et al.* Proporciona información científica y de medicina popular acerca de las plantas antioxidantes, como *Musa paradisiaca L* (plátano burro) que contiene una mezcla compleja de polihidroxifenoles y taninos que inhiben la peroxidación lipídica en el modelo de homogeneizado de cerebro de ratas; *Arachis hypogea* (cacahuete) que duplican la resistencia de las paredes de los vasos sanguíneos en animales de experimentación por la presencia de sustancias con actividad antioxidante; *Theobroma cacao L.* (Cacao), que contienen abundantes polifenoles con comprobadas propiedades antioxidantes ¹⁹.

d. En 2002, García, D.E. *et al.* Estudió la caracterización química en vitro y en vivo del macambo, reportando que el valor nutricional de este fruto está considerado con el tenor de lípidos 32,95 %, proteínas 13,30 % y fibras (fibras alimenticias insolubles y solubles FAI-FAS) 9,90 % y 2,30 % respectivamente, complejos muy importantes por que ejercen efectos fisiológicos directos a través del tracto intestinal ²⁰.

e. En 2008, Padilla, F.C. *et al.* Estudiaron productos de origen vegetal del *Theobroma cacao*, *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor*, L. Moench (sorgo), *Melicoccus bijugatus* (mamón), el contenido de polifenoles totales y su relación con la actividad antioxidante, donde el pericarpio del cacao presentó más alto (6,66 EAGg/100g) con poder reductor del cacao equivalente a 5,80g de ácido ascórbico/100g. Asimismo, las semillas de cacao presentaron una actividad antioxidante, comparable a la del butil hidroxianisol antioxidante sintético. El contenido de polifenoles totales se correlaciona bien con la actividad antioxidante ²¹.

f. En 2010, Leandro, C. *et al.* Realizaron la extracción de antocianinas y polifenoles asistido por ultrasonido en cascarilla de cacao orgánico (*Theobroma cacao* L.) ²².

g. En 2011, Sotero, V. *et al.* Evaluaron la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutas Amazónicas de la familia Sterculiaceae (Malvaceae), donde reporta que la actividad antioxidante presenta los siguientes IC₅₀, mg/ml: cacao: 0,52; cacahuillo: 1,69; copoazú: 2,32 y macambo: 7,55. La mayor concentración de polifenoles se presentan en las semillas de cacao con 12101,46 mg/100g, de copoazú con 9691,94 mg/100g y en pulpa de macambo con 5738,81 mg/100g. Las mayores concentraciones de flavonoides fueron para las semillas de cacao y cacahuillo con 2037,16 y

1542,91 mg/100, respectivamente; por último, está la pulpa de macambo con 711,68 mg/100g; en antocianinas obtuvieron que la semilla del cacao presentó la mayor concentración con 638,02 mg/100g. Cuantificaron por HPLC ciertos flavonoides de los cuales observaron alta presencia de rutina trihidratada, tanto en semillas como en la pulpa de estos frutos, con valores de 7022,0 a 10689,0 mg/100g para semillas de macambo y cacao, respectivamente. Alta concentración de quercitina en las semillas de copoazú con 18173,0 mg/100g y de cacahuillo con 17280,0 mg/100g. La epicatequina, fue encontrada en la semilla de cacahuillo que presenta 578,2 mg/100g²³.

2.1.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

2.1.2.1. ANTIOXIDANTES.

Los antioxidantes son compuestos o sustancias, cuya función primordial en nuestro organismo es retardar o inhibir la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las ERO_s.

La oxidación de las moléculas biológicas, membranas y tejidos, es inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, siendo la causa del aumento de la incidencia de enfermedades degenerativas en los seres humanos.

El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Estas especies con oxígenos activos incluyen el radical superóxido (O_2^\ominus), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical óxido nítrico (NO^\cdot) y el oxígeno singulete (O_2). Además, la radiación cósmica y la radiación electromagnética de baja longitud de onda (por ejemplo los rayos gama) pueden dividir el agua en el organismo para generar el radical hidroxilo, OH^\cdot . Este radical, débilmente reactivo, una vez producido ataca a cualquier molécula que esté cerca, siendo su vida media extremadamente pequeña y reaccionando en su punto de formación dejando tras de sí una secuela de reacciones en cadena, de radicales libres en propagación.

Asimismo, cierta parte de los superóxidos son producidos por reacciones químicas, en las que muchas moléculas del cuerpo interactúan directamente con el oxígeno, para producir superóxido. Ejemplos de estas moléculas constituyen las catecolaminas, tetrahidrofolatos y algunos componentes de la cadena mitocondrial y otras cadenas de transporte de electrones. Esta producción de superóxido es inevitable. Además, cierta cantidad de superóxido se produce, deliberadamente, por células como fagocitos activados (neutrófilos, monocitos,

macrófagos, eosinófilos) dando lugar a grandes cantidades de superóxido, como parte de los mecanismos de defensa, del organismo, frente a las agresiones de diversa índole, tales como en las inflamaciones crónicas; pudiendo afectar los mecanismos normales de protección. Además, aproximadamente el 1 al 3 % de oxígeno que respiramos es usado para producir superóxido. Como los seres humanos consumimos una gran cantidad de oxígeno, podemos producir más de dos kilos de superóxido cada año; las personas con infecciones crónicas pueden producir más. Otro radical libre fisiológico es el óxido nítrico (NO) que es producido por el endotelio vascular como factor relajante del endotelio vascular (EVRF) y también por los fagocitos y el cerebro. El óxido nítrico, tiene muchas funciones fisiológicas útiles pero un exceso puede ser tóxico.

En nuestro organismo, la producción de los radicales libres que se dan constantemente “in vivo”, ha permitido desarrollar diversos mecanismos de defensa antioxidante, como medios de protección. La enzima superóxido dismutasa remueve el O_2° convirtiéndolo en H_2O_2 , el cual es transformado por la enzimas catalasa y Glutación peroxidasa, en agua (H_2O).

El sistema antioxidante de defensa está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutación peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, Beta-caroteno, vitamina C, Glutation reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros.

El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación del equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, de modo tal que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y a modificaciones funcionales, en lugares donde se encuentren en un momento dado ²⁴.

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria ²⁵.

2.1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes ²⁶.

EXÓGENOS	ENDÓGENOS	COFACTORES
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Compuestos Fenólicos	Enzimas: Superóxido dismutasa (SOD) Catalasa Glutación peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

2.1.2.3. RADICALES LIBRES.

Las especies reactivas de oxígeno tienen la propiedad de reaccionar con proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos ²⁷.

Los radicales libres (RL), son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital más externo, lo que produce una gran reactividad en dicha estructura. De hecho esto da lugar a que estos radicales libres intervengan con gran eficacia y rapidez en un sin número de procesos bioquímicos a nivel celular. Su gran reactividad es la causante de su toxicidad ²⁸.

En la generación endógena de radicales libres, los procesos fisiológicos del organismo generan cierta tasa de estas sustancias oxidantes:

- Respiración mitocondrial.
- Sistemas de defensa.
- Retículo endoplasmático.
- Enzima xantina DHS-a.

Y en la generación exógena de radicales libres se generan:

- Radiaciones.
- Contaminantes.
- Actividad física intensa.
- Humo del tabaco.
- Dietas.
- Metabolización de fármacos.

Los tipos de radicales libres se clasifican en Radicales y No Radicales (Tabla. 2), que normalmente son generadas por nuestro organismo.

Tabla 2. Tipos de Radicales Libres

RADICALES		NO RADICALES	
Alcoxilo	RO.	Ac. Hipobromoso	HBrO
Carbonato	CO ₃ -	Ac. Hipocloroso	HClO
Dióxido Nitrógeno	NO ₂ .	Ac. Nitroso	HNO ₂
Hidroperoxilo	HOO.	Ac. Peroxinitroso	ONOOH
Hidroxilo	OH.	Alquilperoxinitritos	ROONO
Óxido Nítrico	NO.	Catión nitrilo	NO ₂ ⁺
Peroxilo	ROO.	Oxígeno singlete	O ₂
Superóxido	O ₂ -	Ozono	O ₃
		Peróxido hidrógeno	H ₂ O ₂
		Peróxidos orgánicos	ROOH
		Peroxinitrilo	ONOO

Las moléculas diana de los radicales libres son:

- Lípidos.
- ADN.
- Proteínas.
- Carbohidratos.

2.1.2.4. REACCIÓN CON DPPH.

El fundamento del método, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (Fig. 1); la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm³. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

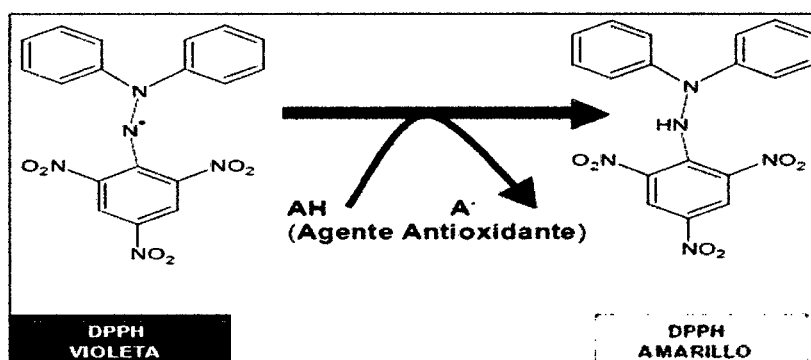


Figura 1. Reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)²⁹.

2.1.2.5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.

Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas están constituidos por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT)³⁰ (Tabla 3). La enzima SOD cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En plantas se han identificado tres isoenzimas SOD que difieren entre sí en el grupo prostético metálico ligado a la enzima. Una clase contiene cobre y zinc (CuZnSOD) y las otras dos restantes contienen hierro (FeSODs) y manganeso (MnSODs),

respectivamente. En cuanto a su localización, las FeSODs se encuentran únicamente en el cloroplasto, las MnSODs se localizan principalmente en las mitocondrias y las CuZnSODs se encuentran en el cloroplasto, citosol, apoplasto y peroxisomas. El H_2O_2 generado por la SOD es eliminado por las enzimas CAT y APX.

La CAT cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 . A nivel celular se encuentra en los peroxisomas y, al menos en el maíz, también se encuentra en mitocondrias³¹. El número de recambio de esta enzima es muy elevado (200.000 ciclos catalíticos "s⁻¹" subunidad), pero su afinidad por el H_2O_2 es muy baja y, en consecuencia ciertos niveles de H_2O_2 permanecen en la célula.

La APX es capaz de eliminar bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su elevada afinidad por éste. La APX es una hemoperoxidasa que utiliza el ascorbato como dador de electrones para llevar a cabo la reducción del H_2O_2 . A nivel celular se encuentra, fundamentalmente, en cloroplastos, citosol y peroxisomas aunque también se ha localizado en algunas especies en el apoplasto³².

Junto con las actividades de las enzimas CAT y APX, el ciclo ascorbato/glutación (también denominado ciclo de Halliwell-Asada) participa, asimismo, en la eliminación de H_2O_2 en células vegetales³³. Este ciclo consiste en una serie de reacciones redox acopladas en las que intervienen cuatro actividades enzimáticas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR)^{33; 34}. En este ciclo, el peróxido es eliminado por la actividad APX utilizando el ascorbato como donador de electrones. El monodehidro ascorbato (MDHA) formado, y a partir de éste el dehidroascorbato (DHA) resultante por dismutación espontánea, se utilizan para reciclar el ascorbato mediante las actividades enzimáticas MDHAR y DHAR, respectivamente. La actividad MDHAR utiliza el NAD(P)H como donador de electrones mientras que la actividad DHAR regenera el ascorbato utilizando el poder reductor suministrado por el glutación reducido (GSH). A su vez, el glutación oxidado (GSSG) formado, es de nuevo reciclado

hasta GSH por la acción de GR en una reacción dependiente de NADPH. El balance global del ciclo es la eliminación del H₂O₂ a expensas del NAD(P)H. El ciclo ascorbato/glutación se ha identificado en el estroma del cloroplasto “donde se considera que constituye el principal sistema detoxificador de H₂O₂” en el citosol, los peroxisomas y en la matriz mitocondrial³⁰.

Tabla 3. Principales sistemas antioxidantes enzimáticos presentes en plantas³⁰.

Sistema antioxidante	Localización	Principal EAO
Superóxido dismutasa ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	$O_2^{\cdot -}$
Ascorbato peroxidasa ($2AA + H_2O_2 \rightarrow 2MDA + 2H_2O$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	H ₂ O ₂
Catalasa	Peroxisoma	H ₂ O ₂
Peroxidasa	Pared celular. Vacuola	H ₂ O ₂
Monodehidroascorbato reductasa [MDA+NAD(P)H→AA+NAD(P)]	Cloroplasto. Mitocondria	
Dehidroascorbato reductasa (DHAR) (DHA +2GSH→ AA + GSSG)	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutación reductasa (GR) GSSG+NAD(P)H→2GSH+NAD(P)	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutation Peroxidasa ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$)	Citosol	H ₂ O ₂ , ROOH
Ferritina (Fe+ P → P-Fe)	Citosol. Cloroplasto	
NADPH oxidasa. Oxidasa alternativa (AOX) ($2 e^- + 2 H + O_2 \rightarrow H_2O$)	Mitocondria	
Peroxirredoxina (PrxR) ($2P-SH + H_2O_2 \rightarrow P-S-SP + 2 H_2O$)	Cloroplasto	
Tiorredoxina (Trx) ($P-S-S-P + 2H^+ \rightarrow 2P-SH$)	Cloroplasto	
Glutarredoxina (GLR) (DHA +2 GSH → AA + GSSG)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria A	

2.1.2.6. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.

La célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa que causan las EROs y otros agentes oxidantes. Estos compuestos neutralizan los radicales libres cediéndoles un electrón y dando lugar a la formación de especies no reactivas. Muchos compuestos podrían servir para este fin teniendo en cuenta que las EROs son extremadamente reactivas, y por tanto son capaces de extraer un electrón de prácticamente cualquier molécula disponible. Sin embargo, un antioxidante biológico eficaz debe hacer algo más que reaccionar con los radicales libres, debe: a) estar presente y tener una concentración adecuada en la célula, b) reaccionar con una gran variedad de radicales libres y, c) ser capaz de regenerarse ³⁵. En las células vegetales existen varios compuestos tanto de naturaleza hidrosoluble como liposoluble- que cumplen estas propiedades. Los principales antioxidantes de naturaleza hidrosoluble que controlan la homeostasis redox son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, los liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides.

Sin embargo, las EROs, en determinadas circunstancias, juegan un papel esencial en la ruta de transducción de señales y en los mecanismos de activación enzimática. Esto indica que la función de los antioxidantes no es la de eliminar por completo las EROs sino la de regular de forma muy precisa los niveles de estas especies. Por tanto, para elucidar la función de estos antioxidantes es esencial identificar los factores que modifican sus niveles, su distribución espacial y el estado redox en la célula ³⁶.

Ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico (AA) o vitamina C es el antioxidante más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración es del orden de milimolar, aunque hay que tener en cuenta que el contenido de AA varía en función del tipo de tejido, del estado fisiológico de la planta, así como de las condiciones medio

ambientales. Los mayores niveles de AA se encuentran en tejidos fotosintéticos, frutos y órganos de almacenamiento y su contenido es mayor en tejidos jóvenes que en adultos ³⁷.

A nivel celular, el AA se encuentra en el citosol, cloroplasto, vacuola, mitocondria y apoplasto. Sus niveles son especialmente elevados en el citosol y en los cloroplastos y su concentración oscila entre 10 y 20 mM³⁸.

Glutación

Otro componente clave de los sistemas antioxidantes es el glutatión (-Glu-Cys-Gly) (Ver Fig. 2). El glutatión es un tiol no proteico que se sintetiza a partir de los aminoácidos L-glutámico, L-cisteína y glicina en una ruta dependiente de ATP y catalizada por las enzimas γ -glutamil cisteína sintetasa y glutatión sintetasa, respectivamente ³⁹.

La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por dos moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG). En plantas, el glutatión es el principal compuesto de almacenamiento y transporte de azufre orgánico, participa en la señalización celular y desempeña una importante función de defensa frente a metales pesados y frente a diversos xenobióticos ³⁶.

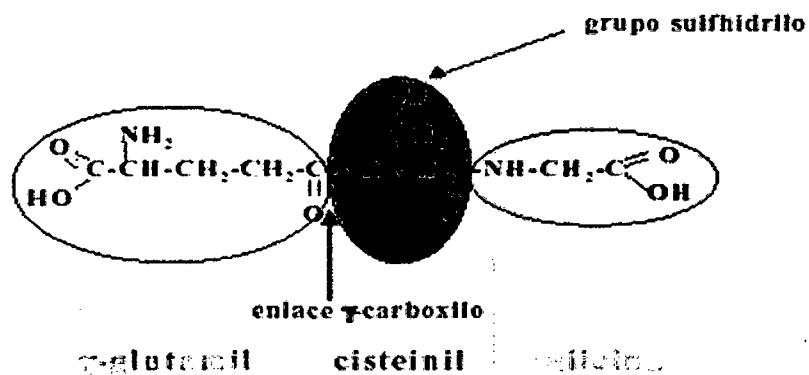


Figura 2.- Estructura del glutatión, γ - glutamil-cisteinil- glicina. La fuerte naturaleza nucleofílica de la cisteína hace que el glutatión sea un potente agente reductor.

Tocoferoles

Los tocoferoles (vitamina E) son antioxidantes lipófilos que se localizan exclusivamente en los plastos y su biosíntesis se ha observado sólo en plantas, y en algunas algas y cianobacterias. Los cuatro tipos de tocoferoles sintetizados (α , β , γ y δ) difieren únicamente en la posición de los sustituyentes metilados del anillo cromanol (Fig. 3). Todos los tocoferoles son moléculas anfipáticas, con una cola hidrofóbica asociada a las membranas y una cabeza polar que permanece en la superficie de éstas.

En plantas, los tocoferoles se sintetizan y acumulan en los plastos⁴⁰.

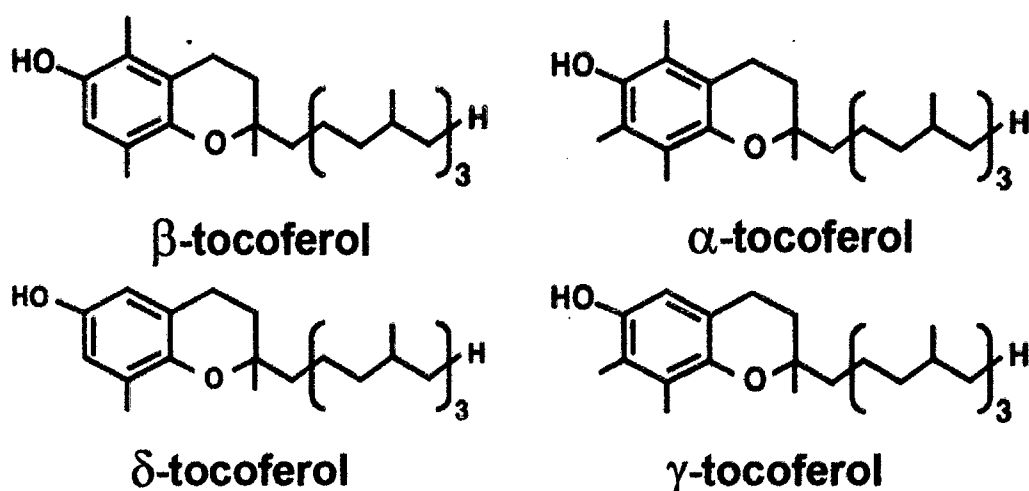


Figura 3. Estructura del α -, β -, γ -, y δ - tocoferol.

Estos compuestos constan de un anillo hercíclico cromanol con uno (δ -tocoferol), dos (β -tocoferol o el γ -tocoferol) otros grupos metilos (α -tocoferol).

Carotenoides

Los carotenoides son isoprenoides de 40 átomos de carbono que tienen una estructura lineal con grupos metilos laterales cada 4 carbonos y pueden llegar a tener hasta 15 sistemas de dobles enlaces conjugados (Fig. 4). Los carotenoides se sintetizan y acumulan en los plastos. Por sus propiedades bioquímicas, los carotenoides son esenciales en la fotosíntesis. En todos los organismos

fotosintéticos, los carotenoides desempeñan dos funciones principales. Por una parte, actúan de antenas alternativas absorbiendo luz no accesible a la clorofila (la comprendida entre 420–500 nm). Por otra, impiden la foto-oxidación del aparato fotosintético mediante la extinción (*quenching*) del estado triplete de las moléculas de clorofila y la eliminación de ERO_s que se generan en el cloroplasto como consecuencia de las reacciones primarias de la fotosíntesis ⁴¹.

Además, las xantofilas permiten la disipación térmica del exceso de energía mediante un proceso que no se canaliza a través de procesos fotoquímicos conocido como *quenching* no fotoquímico. Esta capacidad fotoprotectora parece estar relacionada con la interconversión cíclica de violaxantina en zeaxantina mediante un proceso de desepoxidación dependiente de ascorbato ⁴².

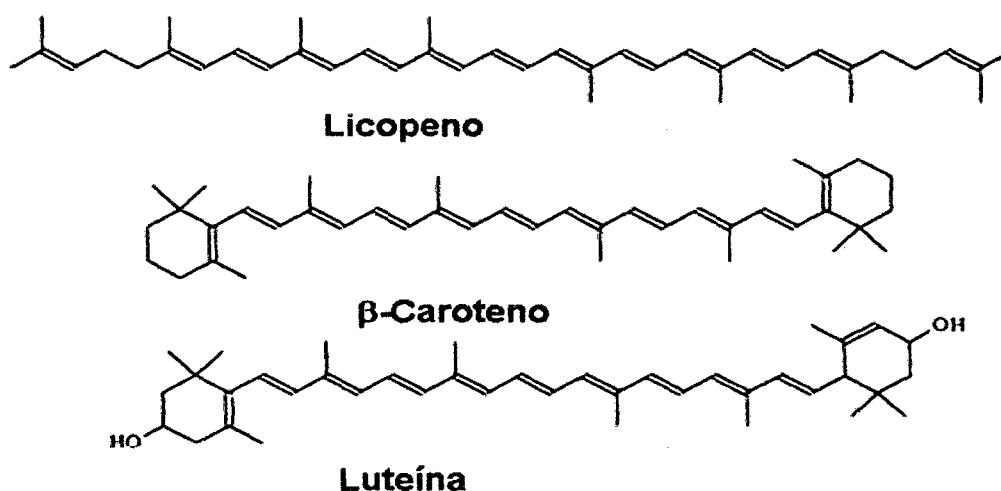


Figura 4. Estructura química de algunos carotenoides.

En la figura 4, los extremos de la molécula de un carotenoide pueden formar anillos o llevar sustituyentes oxigenados. Los carotenoides con algún grupo oxigenado se denominan xantofilas (ej., luteína), mientras que los hidrocarburos puros son los carotenos (ej., β-caroteno). Poseen en su estructura sistemas de dobles enlaces conjugados (es decir, dobles enlaces alternados con sencillos) que se extienden por gran parte de la molécula.

Compuestos fenólicos

2.1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los fenoles son compuestos químicos que se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático sustituido con uno, o varios, grupos hidroxilo.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente ⁴³.

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 ⁴⁴.

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Fig.5)⁴⁵.

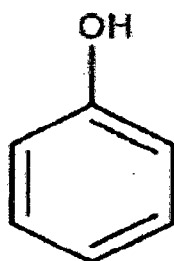


Figura 5. Fenol

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, 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 oxidasa⁴⁶.

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora.

Los flavonoides provenientes de verduras y frutas consumidos en la dieta están inversamente relacionados con la mortalidad causada por la enfermedad coronaria⁴⁷.

Los flavonoides (Fig. 6) son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos⁴⁴.

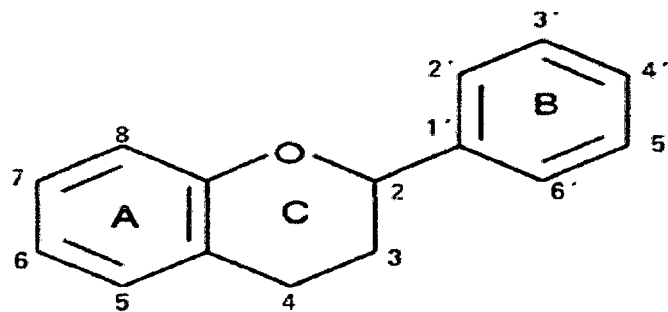


Figura 6. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenilbenzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano.

Estos compuestos poseen actividad antioxidante (Fig. 7) y capacidad para capturar radicales libres²⁵.

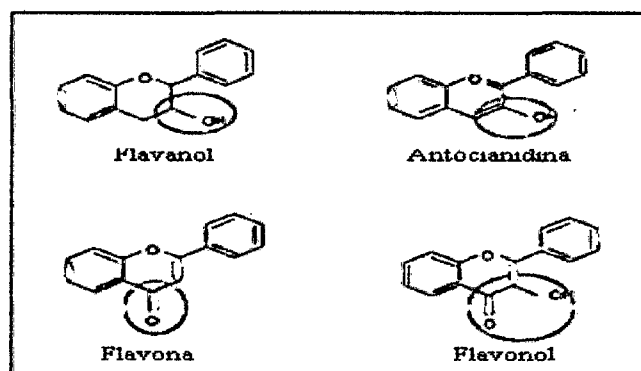


Figura 7. Flavonoides con actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 – oxo en los anillos A y C.

Los taninos o polifenol espolímericos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples (Fig. 8) ⁴⁶.

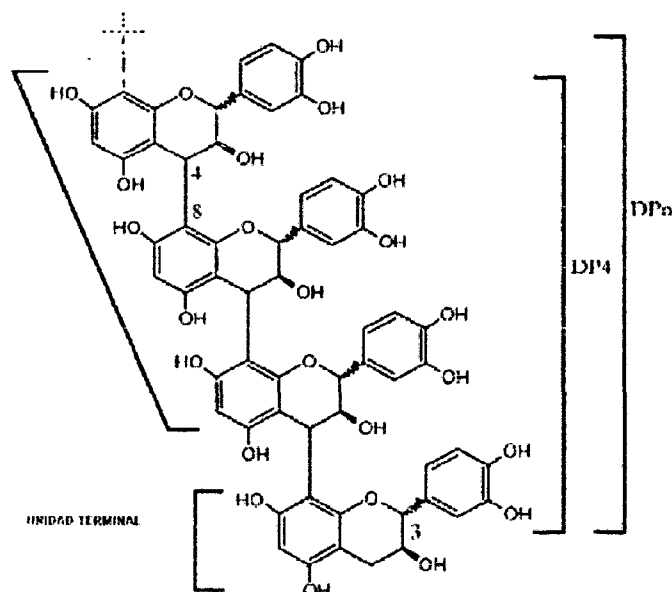


Figura 8. Taninos (Polímeros de catequina)

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta ⁴⁸. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

- Captadores de radicales libres. Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo dado que se estabiliza por resonancia con los electrones “p” del anillo aromático.

- Quelantes de metales. Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los *o*-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton ⁴⁹.

Los componentes fenólicos de la pared celular primaria son principalmente el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico, los cuales se encuentran generalmente esterificados a la arabinosa y la galactosa de los polisacáridos pécticos. Al parecer tienen como función limitar la extensión de la pared celular y podrían desempeñar un papel importante en la resistencia a patógenos fúngicos ⁵⁰.

Existe numerosos compuestos fenólicos simples en las paredes celulares, de los cuales su función es casi desconocida. Además, tampoco se puede olvidar la presencia de taninos condensados, unidos a la pared celular⁵¹.

2.1.3.1. CLASIFICACIÓN QUÍMICA.

En base a su esqueleto químico se clasifican ⁵²:

a) Compuestos Fenólicos Simples:

- Fenilpropanoides simples, tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Ejemplos: ácido trans-cinámico, ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico.
- Lactonas fenilpropanoides (o "ésteres cíclicos"), también llamadas **cumarinas**. También poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Ejemplos: la umbeliferona (una cumarina simple), el "psolaren" (una furano cumarina: cumarina a la que se adicionó un anillo furano).
- Derivados del **ácido benzoico** (el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono). Son formados a partir de fenilpropanoides a los que se les quita dos carbonos de la cadena propánica. Ejemplos: la vainillina, el ácido salicílico.

b) Compuestos Fenólicos Complejos:

- Flavonoides: Chalconas y auronas
Flavonoles y flavona
Antocianinas
Flavanonas
Flavonoles.
- Isoflavonoides isoflavonas: isoflavanonas, rotenoides, isoflavanos e isoflavenos.
- Quinonas benzoquinona, naftoquinona, antraquinona, bis-antraquinona.
- Xantonas.
- Lignoides.
- Dépsidos.
- Otros policéticos aromáticos.

2.1.3.2. POLARIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

La polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles ⁵³.

2.1.3.3. BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

A la hora de definir los compuestos fenólicos, es preferible atender a consideraciones de origen biosintético, definiéndose estas sustancias como aquellas derivadas de dos rutas principales: La ruta del ácido shikímico, que da lugar a la formación de fenilalanina y, a través del metabolismo fenilpropanoide general, de fenilpropanos y derivados (Fig. 9), y la del acetato-malonato (Fig. 10), que puede originar fenoles simples y quinonas ⁵⁴.

La combinación de ambas rutas principales da lugar a la formación de los flavonoides, que es el subgrupo de compuestos fenólicos que presenta mayor diversidad y una distribución más amplia en el reino vegetal.

Dentro de los compuestos fenólicos se pueden establecer varios subgrupos atendiendo al número de átomos de carbono y a la estructura del esqueleto fenólico básico. Así, por ejemplo, la estructura de los flavonoides está basada en un esqueleto tipo flavona C₆-C₃-C₆ y la de los ácidos hidroxicinámicos forma parte de la clase de compuestos C₆-C₃, denominados fenilpropanoides. La química de los compuestos fenólicos se ve complicada aun más por el hecho de que la mayoría de éstos compuestos se presentan en forma conjugada, principalmente con una o varias moléculas de azúcar unidas a través de los grupos hidroxilo, lo que añade mayor complejidad a la hora de caracterizar químicamente estos compuestos ⁵⁴.

La síntesis y la acumulación de los compuestos fenólicos están condicionadas por el estado de desarrollo general de la planta o de los órganos,

tejidos y células considerados. El control de estos procesos, que determinan en última instancia la distribución de estos metabolitos secundarios, viene determinado por factores de tipo endógeno relacionados con los procesos de diferenciación dependientes del desarrollo y/o por factores externos tales como la luz, la temperatura o los ataques de agentes bióticos o abióticos ⁵⁵.

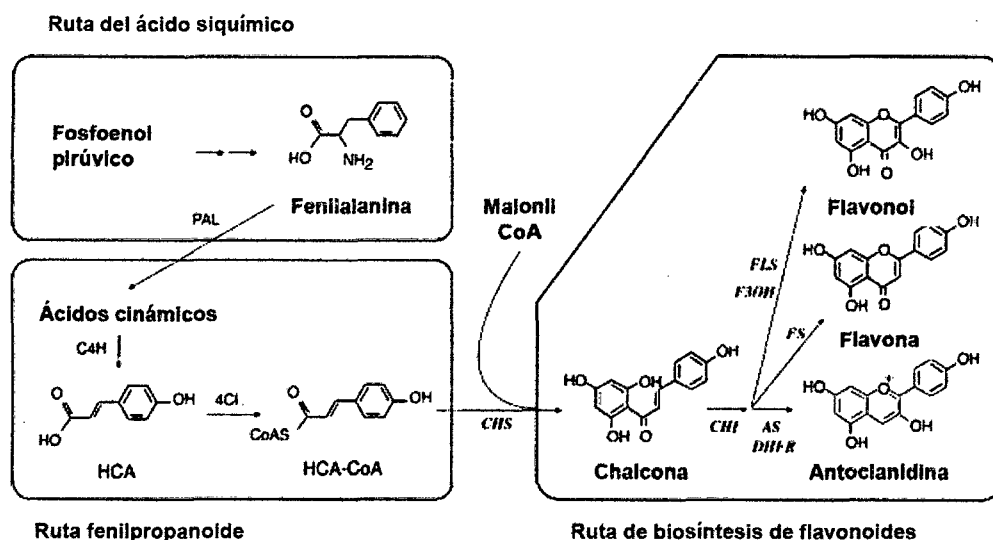


Figura 9. Ruta biosintética de compuestos fenólicos.

En la figura 9, los ácidos hidroxicinámicos (HCAs) y los flavonoides derivan de los ácidos cinámicos, que se forman a partir de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Los ácidos cinámicos son transformados en HCA por la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C_4H) y por la *o*-metil transferasa. La enzima 4-cumarato CoA ligasa (4CL) cataliza la formación de hidroxicinamoil CoA (HCA-CoA) y este intermediario activado se emplea en la biosíntesis de flavonoides y ligninas. La síntesis de flavonoides comienza con la condensación de HCA-CoA con 3 moléculas de malonil CoA catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). La chalcona formada puede ser convertida en diversos productos finales como flavona, flavonol y antocianina por diversas enzimas como chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F_3OH), isoflavona sintasa (ISF), flavona sintasa (FS), flavonolsintasa (FLS), dihidroxiflavonol reductasa (DHFR) y antocianina sintasa (AS) ⁵⁶.

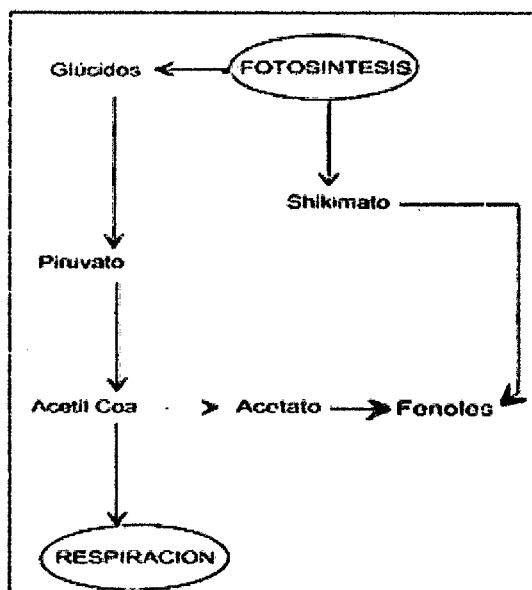


Figura 10. Ruta de biosíntesis de fenoles.

2.1.3.4. COMPUESTOS FENÓLICOS- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos y, dado el carácter antioxidante de éstos, se ha sugerido que los fenoles desempeñan un papel protector celular clave en estas circunstancias ⁵⁷. Así, los derivados de hidroxicinamatos y los flavonoides han sido implicados en la protección frente a la peroxidación de los lípidos, proceso que conllevaría la rotura de membranas y la pérdida de compartimentación, y por tanto la funcionalidad de la célula ⁵⁸.

El mecanismo de protección de lípidos por los polifenoles ocurre en el estado inicial y, más efectivamente, durante el estado de propagación de la oxidación lipídica por captura de los radicales libres (R), inhibiendo de esta manera la reacción en cadena. La transferencia de electrones desde el radical libre (R) determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa y este radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. A su vez, el radical formado puede ser recuperado por otras sustancias antioxidantes, como el ascorbato. En este

sentido, se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían participar, en conjunción con el ácido ascórbico y, posiblemente otros reductores, y junto con la enzima peroxidasa, en un sistema encargado de regular el estado redox de la célula ⁵⁹.

Otros mecanismos por los que los compuestos fenólicos expresan su carácter antioxidante serían la quelatación de metales de transición (en el caso de aquellos fenoles que poseen en su estructura grupos carboxilo u o-dihidroxilo) e, incluso, también ha sido descrita su acción antioxidante como consecuencia de la inhibición de enzimas pro-oxidantes, como la lipooxigenasa ⁶⁰.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su bajo potencial redox ($0.23 < E_7 < 0.75V$). Por ello, son termodinámicamente capaces de inactivar de forma efectiva las EROs, como el anión superóxido y los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, cuyo potencial de reducción se encuentre en el rango de 2.13-1.0 V, mediante la donación de un protón:



donde R[•] representa al anión superóxido y los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo ³⁶.

La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento ⁶¹.

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer y de la enfermedad coronaria.

Los compuestos fenólicos capturan las EROs, tales como radicales anión superóxido y radicales lípidos peroxi ⁶².

2.1.3.5. CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

Los compuestos fenólicos del vino son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce por oxidación de los fenoles del vino, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul.

La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el vino, y posee una absorción máxima a 765 nm.

El procedimiento emplea el ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración.

El reactivo de Folin Ciocalteu también se combina con los fenoles monohidroxilados y otras sustancias fácilmente oxidables, incluyendo el ácido ascórbico, el dióxido de azufre y las aminas aromáticas⁶³.

2.1.3.6. RELACIÓN CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PODER REDUCTOR.

El poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador importante de su potencial actividad antioxidante⁶⁴. Estos autores trabajaron sobre hojas y semillas de *Rumex crispus* L., verificando que el poder reductor de los extractos aumenta con la concentración de los mismos, presentando una correlación estadísticamente significativa ($r = 0,99$) entre los compuestos fenólicos totales y el poder reductor. También establecieron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de capturar radicales libres por DPPH, así como entre el poder reductor y capacidad de capturar radicales libres por DPPH⁶³. En conclusión: dado que a medida que el contenido de fenoles totales aumenta, el poder reductor

disminuye; que el poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto; por lo tanto, el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante ⁶⁵.

Otra conclusión es que el poder reductor y la capacidad de capturar radicales de una sustancia pueden ser indicadores de su actividad antioxidante ⁶⁶.

2.1.4. FAMILIA MALVACEAE.

Es reconocida en el Perú con 38 géneros y 264 especies, mayormente arbustos y hierbas.

Recientes estudios moleculares reunidos en un sistema de clasificación por el Angiosperm Phylogeny Group han ampliado la familia hasta unos 240-250 géneros, en la familia ampliada se incluyeron los géneros anteriormente pertenecientes a las antiguas familias Bombacaceae, Sterculiaceae y Tiliaceae, por lo que quedaron como pertenecientes a esta familia géneros bien conocidos tales como *Tilia*, *Ceiba*, *Adansonia* y *Ochroma* ⁶⁷.

2.1.5. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Theobroma*.

El origen es probablemente la región amazónica (cuenca alta del río Amazonas) y comprende países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. En esta región es donde se presenta la mayor variación de la especie. Se extendió de Sudamérica hasta México, pero no se sabe si su dispersión ocurrió naturalmente o con la ayuda del hombre. Sigue siendo un misterio el cómo llegó a Centro América, donde se ha cultivado por lo menos durante 3,000 años ⁶⁸.

El género *Theobroma* se encuentra en estado natural en los pisos inferiores de las selvas húmedas de América tropical y prospera mejor entre los 18° N y 15° S del Ecuador a una altitud inferior a 1,250 m ⁶⁹.

El contenido de alcaloides tales como teobromina (1.5 a 3 %) y cafeína, le confiere propiedades estimulantes.

Las semillas, hojas y raíces contienen los alcaloides teobromina y cafeína que tiene propiedades diuréticas y vasodilatadoras. Se ha encontrado actividad antitumoral en la raíz y en la corteza. La grasa que contienen las semillas (manteca de cacao) se utilizan en farmacia como emoliente y para fabricar ungüentos y pomadas. Resequedad en la piel, quemaduras, caspa, disentería, sarampión, mordedura de serpiente. La teobromina es tóxica para los caballos⁷⁰.

2.1.6. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *Theobroma obovatum*.

Es un árbol que al estado natural en el bosque puede alcanzar hasta 25 a 30 m de altura y 20 a 30 cm de diámetro (Fig. 11). Cultivado puede tener menores dimensiones, copa oblonga e irregular, conformada por escasos verticilos de tres ramas pendulares que pueden llegar a tocar el suelo. Corteza externa agrietada color beige gris.

Hojas simples, alternas, con estípulas nerviación palmeada con 5 a 7 nervios conspicuos en el envés; haz blanquecino. Láminas dimorfas en el tronco, ampliamente ovado cordadas, de 12 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho, en las ramas laterales de forma oblonga a elíptico-ovadas.

En general las láminas son cactáceas, palminervadas, enteras de ápice acuminado y base cordada, envés tomentoso, gris plateado y con nerviación conspicua. Pecíolo de 1,2 a 2,5 cm o de 10 a 38 cm de largo^{71; 72}.



Figura 11. (1) *Árbol de Theobroma obovatum.* (2) *Fruto maduro de Theobroma obovatum.* (3) *Pulpa del fruto de Theobroma obovatum.*

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES.

2.2.1. Variable Independiente.

- Fracciones alcohólicas, de la corteza de *Theobroma obovatum*.

Indicadores:

- Cantidad de fracciones alcohólicas de la corteza de *Theobroma obovatum*.

2.2.2. Variable Dependiente.

- Actividad antioxidante de la fracción alcohólica del *Theobroma obovatum*.
- Presencia de compuestos fenólicos de la fracción alcohólica del *Theobroma obovatum*.

Indicadores:

- Decoloración del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- Concentraciones de las fracciones en relación al estándar fenólico.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Fraciones alcohólicas de la corteza de <i>Theobroma obovatum</i>.	Sistema fisico-químico que nos facilita analizar la magnitud entre el soluto (muestra corteza) y el disolvente (metanol), obtenidos por cromatografías de columna abierta y capa fina.	Los extractos son pesados y luego es pasado a la columna cromatográfica con metanol, posterior a ello se realiza la cromatografía de capa fina.	Cantidad de fracciones alcohólicas de la corteza de <i>Theobroma</i> <i>obovatum</i> .	Intervalo: - Cualitativo - Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Actividad antioxidante de la fracción alcohólica del <i>Theobroma obovatum</i>.	Demostración que implica la oxidación directa o no, utilizando el reactivo de radical libre.	Realizado el tiempo del ensayo (5 min/fracción con 3 repeticiones), se observan las coloraciones de las cubetas (fracción vs reactivo) y se toman las absorbancias, y se realizan los cálculos de % de reducción y % de capacidad antioxidante.	Decoloración del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	Intervalo - Cualitativo
Presencia de compuestos fenólicos de la fracción alcohólica del <i>Theobroma obovatum</i>.	Compuestos químicos sintetizados por las plantas que pueden ser de gran aporte farmacológico.	Identificados con análisis como: Método de Folin-Ciocalteu por Espectrofotometría UV/Vis; HPLC y GC-Ms/Ms.	Concentraciones de las fracciones en relación al estándar fenólico.	Intervalo - Cuantitativo

2.3. HIPÓTESIS

- La fracción alcohólica de la Corteza de *Theobroma obovatum*, posee actividad antioxidante y presenta compuestos fenólicos que le dan dicha actividad.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] **CAPITULO III**

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA.

La población fue la especie de *Theobroma obovatum*, con una muestra recolectada de 1000 g de corteza fresca, obtenidas en el Jardín Botánico del Centro de Investigaciones Allpahuayo (CIA) del IIAP, ubicado en el km 26.7 de la carretera Iquitos - Nauta, en el ámbito de la Reserva Nacional Allpahuayo - Mishana, en el Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Región Loreto.

Criterios de Selección:

Se trabajó con la parte de corteza en buenas condiciones cuya especie amazónica haya alcanzado la madurez vegetativa, debido a que según la etnobotánica, se pueden encontrar los principios activos.

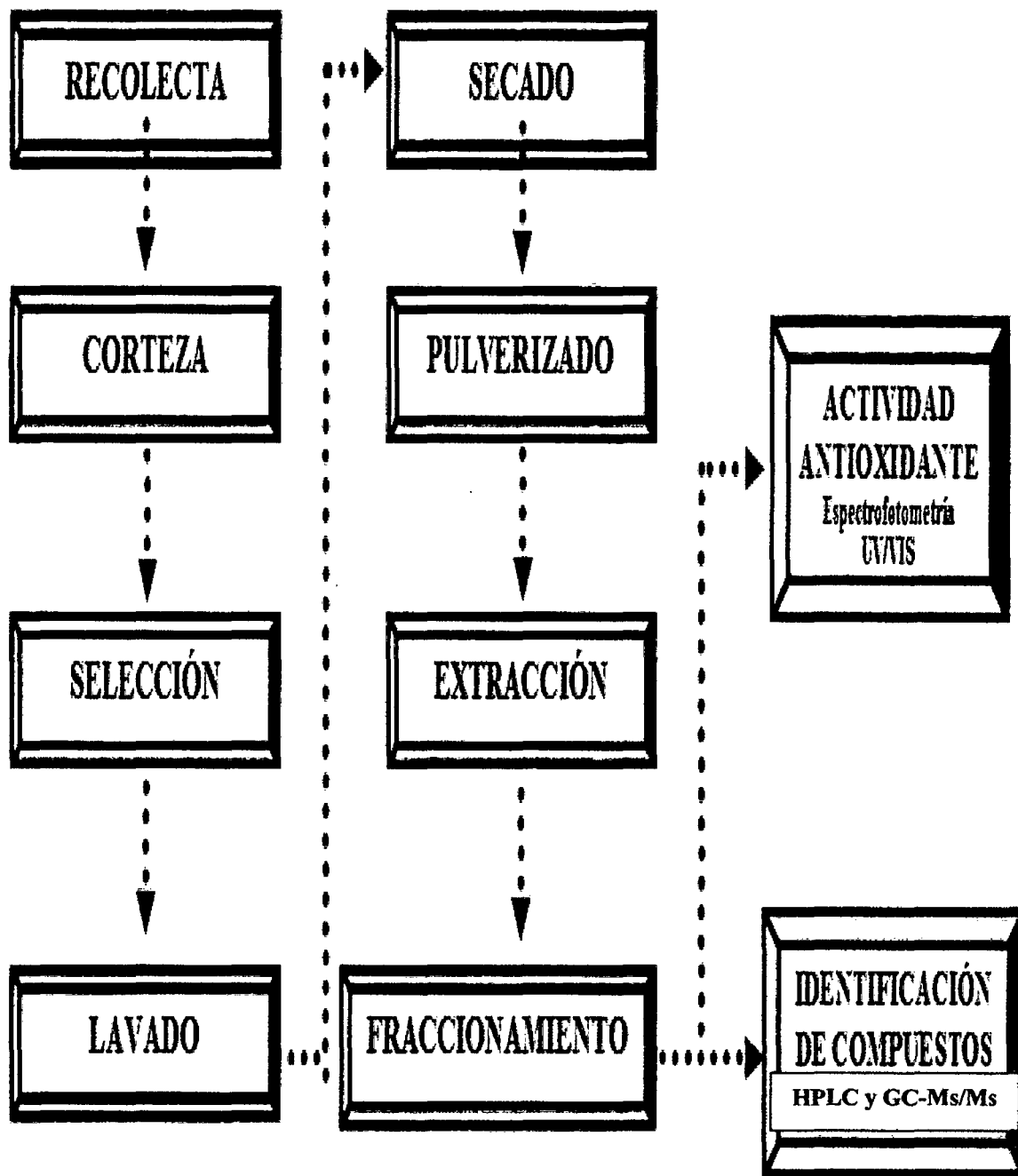
Lavado de la materia prima:

Las cortezas fueron sometidas a lavado en chorro de agua, limpiando y eliminando rastros de tierra y hongos.

Secado y pulverizado de la materia prima:

Se sometió a secado por estufa a 33° C por 14 días, y posteriormente pulverizado.

3.2. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.



Esquema 1. Flujoograma general para la realización del estudio.

3.2.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

- Se pesó 20 g de corteza de *Theobroma obovatum*.
- Se adicionó 180 ml de etanol 96%.
- Se llevó a reflujo por 90 minutos.
- Se dejó reposar y enfriar en oscuridad hasta el día siguiente.
- Se filtró la muestra (papel filtro y embudo).
- Se lavó el residuo del papel filtro con 100 ml (Repetir 2 veces).
- Se concentró en Rotavapor.
- Se extrajo del balón la muestra seca y concentrada llamado **Extracto Alcohólico**, guardando en un frasco a -20° C, hasta el fraccionamiento.

3.2.2. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO:

• **Cromatografía de Columna Abierta.**

- Se preparó la columna con 150g de sílica gel 100 previamente activada a 105° C.
- Se empacó a la columna cromatográfica
- Se diluyó con metanol de 96%.
- Se Colocó la muestra concentrada del extracto alcohólico.
- Se diluyó con metanol 96% constantemente.
- Se recolectó en tubos de ensayos 10 ml, recogidos por goteo constante.
- La columna fue monitoreada por cromatografía en capa fina.

• **Cromatografía de Capa Fina.**

- Se empleó placas de sílica gel de 10 cm x 5 cm.
- Se activó las láminas de sílica gel a 80° C.
- En la placa de sílica gel, se trazó una línea de referencia o de partida, indicando la muestra de extracto concentrado y las fracciones rotuladas.

- Se depositó el extracto y las muestras sustraídas de la columna con un capilar en diversas láminas.
- Luego se procedió a revelar, l rastro de sustancias orgánicas, por medio de una mezcla de agua destilada, ácido sulfúrico 97% y ácido acético glacial 100% (1:4:20).
- Se agrupa y forma las fracciones, por similitud de las bandas o manchas.

3.2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES.

Se realizó la actividad antioxidante siguiendo una adaptación de la metodología del Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), para captura de radicales libres ³⁴.

• Preparación de la solución de DPPH:

- Se preparó una solución patrón de 2000 ppm del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en metanol.
- Se almacenó a 0°C en recipiente ámbar y recubierto con papel aluminio para mayor protección contra la luz.
- A partir de ésta se preparó una solución de trabajo de DPPH de 1.19 a 1.20 unidades de absorbancia en 517 nm.

• Medida de la actividad captadora de radicales libres:

- Se midió en el espectrofotómetro la absorbancia y la concentración del DPPH, a tiempo cero a 517 nm.
- Se utilizó como blanco, metanol.
- Se tomó 2 ml de la solución de DPPH y 20 µl de cada una de las fracciones obtenidas en la extracción alcohólica.
- Se midió al instante la absorbancia y concentración a 517 nm.
- Cada medida de actividad antioxidante se realizó por triplicado.

3.2.4.DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES DE LAS FRACCIONES.

Se realizó la evaluación por medio del método de Folin-Ciocalteu (con el reactivo de Folin-Ciocalteu), para determinar polifenoles totales³³.

Realización de curva de calibración, con estándar de catequina Q.P. mediante el siguiente procedimiento.

Cód.	Catequina (mg/ml)	Vol. MeOH (μl)	Vol. Catequina (μl)	Vol. Final (μl)	Conc. (μM)	Conc. (mM)
STD ₀	0	1000	0	1000	0	0
STD ₁	0.1	667	333	1000	344	0.344
STD ₂	0.3	700	300	1000	1033	1.033
STD ₃	1	667	333	1000	3445	3.445
STD ₄	3	793	207	1000	1033	10.33

Seguidamente se adicionó 20 μl del extracto en tubos de 2.5 ml, adicionando 1.58 ml de agua ultrapura, posteriormente se adicionó tanto a estándares como a extractos 100 μl de la solución de Folin-ciocalteu.

Se homogenizó en el vortex e incubó al ambiente por 1 min, adicionando 300 μl de la solución de NaCO₃ al 20%, incubar al ambiente por 2 horas.

Para determinar la cantidad de compuestos polifenólicos producidos durante la reacción, se colocó 1 ml de la muestra en cubetas de poliestireno de 1 cm x 1 cm x 4.5 cm, leyéndose la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 700 nm. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.2.5. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FRACCIÓN:

Se realizó mediante el HPLC.

Se pesó 0,4 g y se diluyó en 1 ml de Agua/metanol (2:8) y 2 mM de fluoruro de sodio, posteriormente se homogenizó con ayuda del vortex y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm x 45 min y de 2-5°C; posteriormente los extractos fueron filtrados e inyectados al HPLC.

Se preparó las siguientes soluciones estándares de compuestos fenólicos (Catequina hidratada, Epicatequina, Epigallocatequina, quercetina dihidratada, ácido clorogénico hemihidratado) a concentraciones de 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2; 4 mg/ml; diluidas en Agua/metanol (2:8).

Condiciones de trabajo:

Columna : LiChroCART®250-4 LiChrospher® RP-18

Flujo : 1 ml/min.

Detector : Arreglo de diodos UV/VIS

Temperatura : 30°C

Vol. de inyección : 20 µl

Tiempo de análisis : 35 minutos

Presión : 400 bar

λ_{\min} - λ_{\max} : 280 nm – 400 nm

Catequina hidratada	Epicatequina	Epigallocatequina	Quercetina dihidratada	Ácido clorogénico hemihidratado
Fase móvil: Agua/ metanol (88:12) Tiempo de retención: 25 min Detección: 280 nm	Fase móvil: Agua/ metanol (88:12) Tiempo de retención: 58 min Detección: 280 nm	Fase móvil: Agua/ metanol (88:12) Tiempo de retención: 45 min Detección: 280 nm	Fase móvil: Agua/ metanol (50:50) Tiempo de retención: 10 min Detección: 355 y 254 nm	Fase móvil: Agua/ metanol (88:12) Tiempo de retención: 10 min Detección: 280 nm

3.2.6. ELUCIDACIÓN POR GC-MS/MS.

Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico.

Columna	: BR-5ms FS 15 m. x 0.25 mm x 0.25 μ m Max T°: 350
Gas de arrastre	: Helio
Tipo	: Full Scan
T°del horno	: 200 °C
T° de inyección	: 300 °C
Modo de inyección	: Split
Flujo de la columna	: 1 ml/min
Split	: 50
T° de la fuente de iones	: 230 °C
T° de la interfase	: 280 °C
Tiempo de inicio	: 5.00 min
Tiempo de finalización	: 35.00 min
Intervalo	: 0.30 s
Inicio m/z	: 35
Finalización m/z	: 500

3.2.7. MATERIALES E INSTRUMENTOS:

MATERIALES DE LABORATORIO	
<ul style="list-style-type: none">• Bagueta• Balón 500 mL.• Balón para rotavapor 1000 mL.• Barra Magnética• Bolsa de papel• Columna de fase inversa• Cubeta Espectrofotómetro 3mL. Silicona• Desecadores de vidrio• Embudo de vidrio 70/150 mm.• Espátula acero• Filtro de membrana Nylon 0.45 μm. x 47 mm.• Fiola de 100 mL con tapa.• Frascos de vidrio con tapa 100 mL.• Guantes de exploración talla M• Marcador Indeleble punta fina• Matraz Erlenmeyer 250 mL.	<ul style="list-style-type: none">• Micropipeta de 100 μL - 1000 μL.• Micropipeta de 20 μL - 200 μL.• Papel Absorbente Elite• Papel de aluminio• Papel filtro• Papel filtro ADVANTEC grado 1 / 27 mm.• Papel parafilm• Placa petri de 250 mm.• Probeta 100 mL.• Puntas para Micropipetas de 100 μL - 1000 μL.• Puntas para Micropipetas de 20 μL - 200 μL.• Tijera de acero quirúrgico• Tubos de ensayo 20 mL• Vaso de Precipitado 10 mL• Vaso de Precipitado 100 mL• Vial 2 mL.

REACTIVOS DE LABORATORIO	
<ul style="list-style-type: none">• Ácido Acético glacial 100%• Agua destilada• Agua millipore• Ácido sulfúrico 97%• Etanol 96%• Metanol grado HPLC	<ul style="list-style-type: none">• Metanol industrial• Reactivo de Folin- Ciocalteu• Reactivo de DPPH• Carbonato de Sodio anhidro (Na_2CO_3)• Sílica gel 100%• Sílica desecador

MUESTRA BIOLÓGICA

Corteza de la especie en estudio.

EQUIPOS DE LABORATORIO

Agitador Magnético
Balanza Analítica
Bomba de vacío
Centrifuga
Equipo de agua ultrapura
Espectrofotómetro UV-Vis
Estufa
GC-Ms/Ms
HPLC
Rotavapor
Sonificador

3.3. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

3.3.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL.

La muestra vegetal fue recolectada del:

3.3.1.1. Jardín Botánico del Centro de Investigaciones Allpahuayo (CIA).

Ubicado en el Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región Loreto.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS.

3.4.1. Actividad antioxidante.

Se utilizó las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de la Capacidad Antioxidante} = \frac{[1 - (\text{Abs. de la Muestra} - \text{Abs. Blanco muestra})] \times 100}{\text{Abs. DPPH}}$$

$$\% \text{ de reducción} = \left(1 - \frac{\text{Abs. de la muestra}}{\text{Abs. DPPH}} \right) 100$$

3.4.2. Determinación de Compuestos Fenólicos.

El valor de la absorbancia obtenida para cada uno de las muestras, se reemplazó en la ecuación de la curva estándar de catequina que se muestra en la figura 12; en donde “y” es igual a la absorbancia y “x” a la concentración.

El contenido de compuestos fenólicos se expresó como gramos equivalentes de catequina en 100 gramos de muestra.

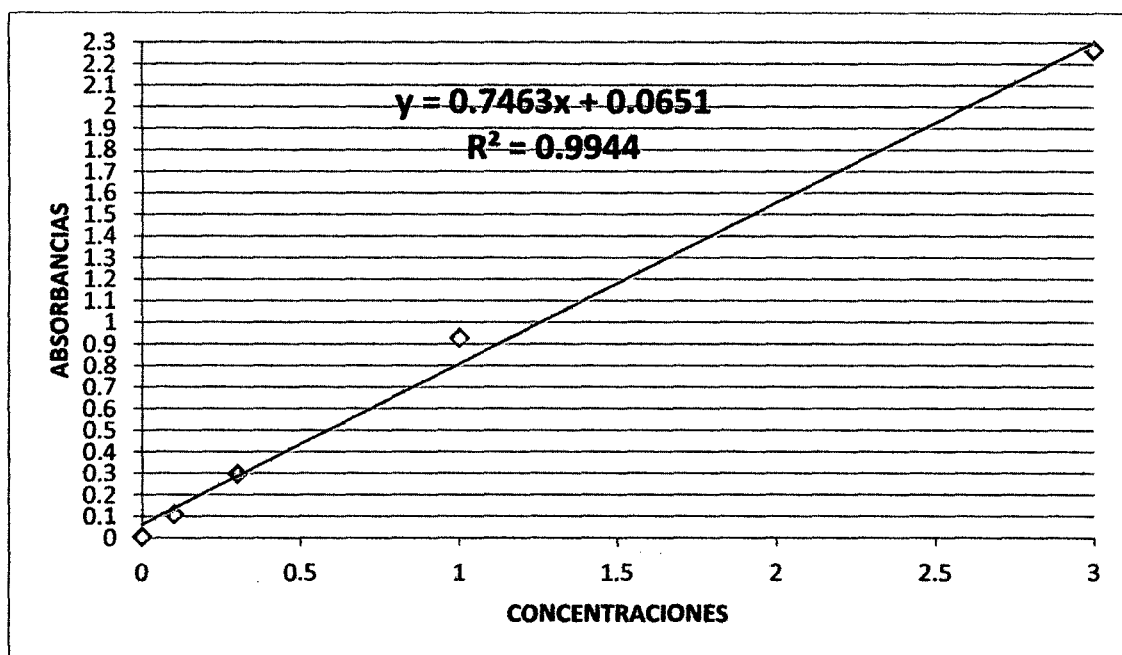


Figura 12. Curva estándar de catequina, por Espectrofotometría UV/Vis.

3.4.3. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos.

El valor del área obtenido para cada uno de los espectrogramas, se reemplazó en la ecuación de la curva estándar de ácido clorogénico que se muestra en la figura 10; en donde “y” es igual a la absorbancia y “x” a la concentración.

La cuantificación de compuestos fenólicos se expresó como gramos equivalentes de ácido clorogénico en 100 gramos de muestra.

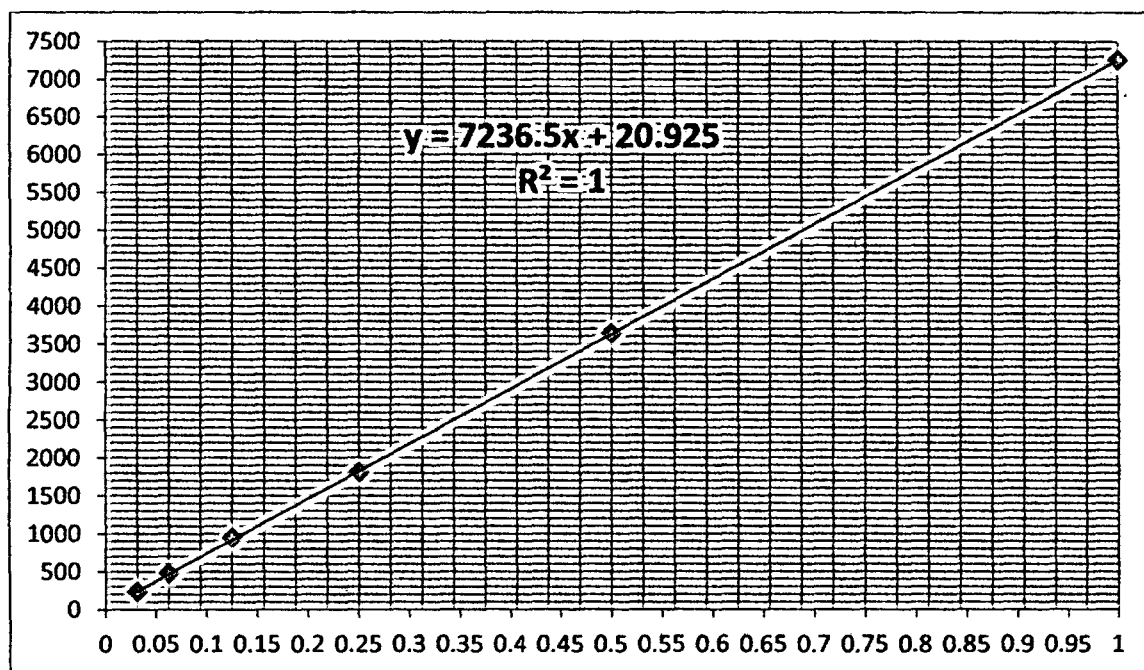


Figura 13. Curva estándar de ácido clorogénico, por HPLC.

Los cálculos se realizaron a través de Microsoft Excel 2010.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] **CAPITULO IV**

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

4.1. RESULTADOS.

4.1.1.FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LA ESPECIE *T. obovatum*:

Se recolectó una cantidad total de 114 tubos, obteniendo al final 19 fracciones, así como se muestra en la tabla 4 y figura 21 del anexo.

Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto alcohólico.

FRACCIONES	<i>Theobroma obovatum</i>	
	TUBOS	TIEMPO DE RETENCIÓN
F-1	1-8	1 hor. 20 min.
F-2	9	1 hor.30 min.
F-3	10	1 hor. 40 min.
F-4	11	1 hor. 50 min.
F-5	12	2 hor. 00 min.
F-6	13	2 hor. 10 min.
F-7	14-15	2 hor. 30 min.
F-8	16	2 hor. 40 min.
F-9	17-19	3 hor. 10 min.
F-10	20-28	4 hor. 40 min.
F-11	29-30	5 hor. 00 min.
F-12	31	5 hor. 10 min.
F-13	32	5 hor. 20 min.
F-14	33-35	5 hor. 50 min.
F-15	36-39	6 hor. 30 min.
F-16	40-45	7 hor. 30 min.
F-17	46-71	11 hor. 50 min.
F-18	72-100	16 hor. 40 min.
F-19	100-114	19 hor. 00 min.

4.1.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES – ENSAYO DE DPPH.

La actividad antioxidante de la especie vegetal estudiada, se muestra en la figura 14; y se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de *T. obovatum*.

MUESTRAS	PROM. ABS.	% REDUCCIÓN	% CAPAC. ANTIOXIDANTE
DPPH	1.1653	100	0
FRACCIÓN 1	1.1487	99	1
FRACCIÓN 2	1.1274	97	3
FRACCIÓN 3	0.9865	85	15
FRACCIÓN 4	0.7712	66	34
FRACCIÓN 5	0.5885	51	49
FRACCIÓN 6	0.4216	36	64
FRACCIÓN 7	0.2608	22	78
FRACCIÓN 8	0.1475	13	87
FRACCIÓN 9	0.1401	12	88
FRACCIÓN 10	0.1207	10	90
FRACCIÓN 11	0.5009	43	57
FRACCIÓN 12	0.6893	55	45
FRACCIÓN 13	0.7704	66	34
FRACCIÓN 14	0.8697	75	25
FRACCIÓN 15	0.9484	81	19
FRACCIÓN 16	1.0109	87	13
FRACCIÓN 17	1.0771	92	8
FRACCIÓN 18	1.0987	94	6
FRACCIÓN 19	1.0986	94	6

En la tabla 5, se destaca lo siguiente:

- Las fracciones 6, 7, 8, 9, 10 y 11, presentó más del 50% de capacidad antioxidante (actividad media) y menos del 50% de poder reductor.
- La fracción 10, presentó mayor porcentaje de capacidad antioxidante (90%) y el menor porcentaje de poder reductor (10%), a consideración de las demás fracciones, siendo así la fracción de mayor interés para el análisis e identificación de los compuestos químicos.

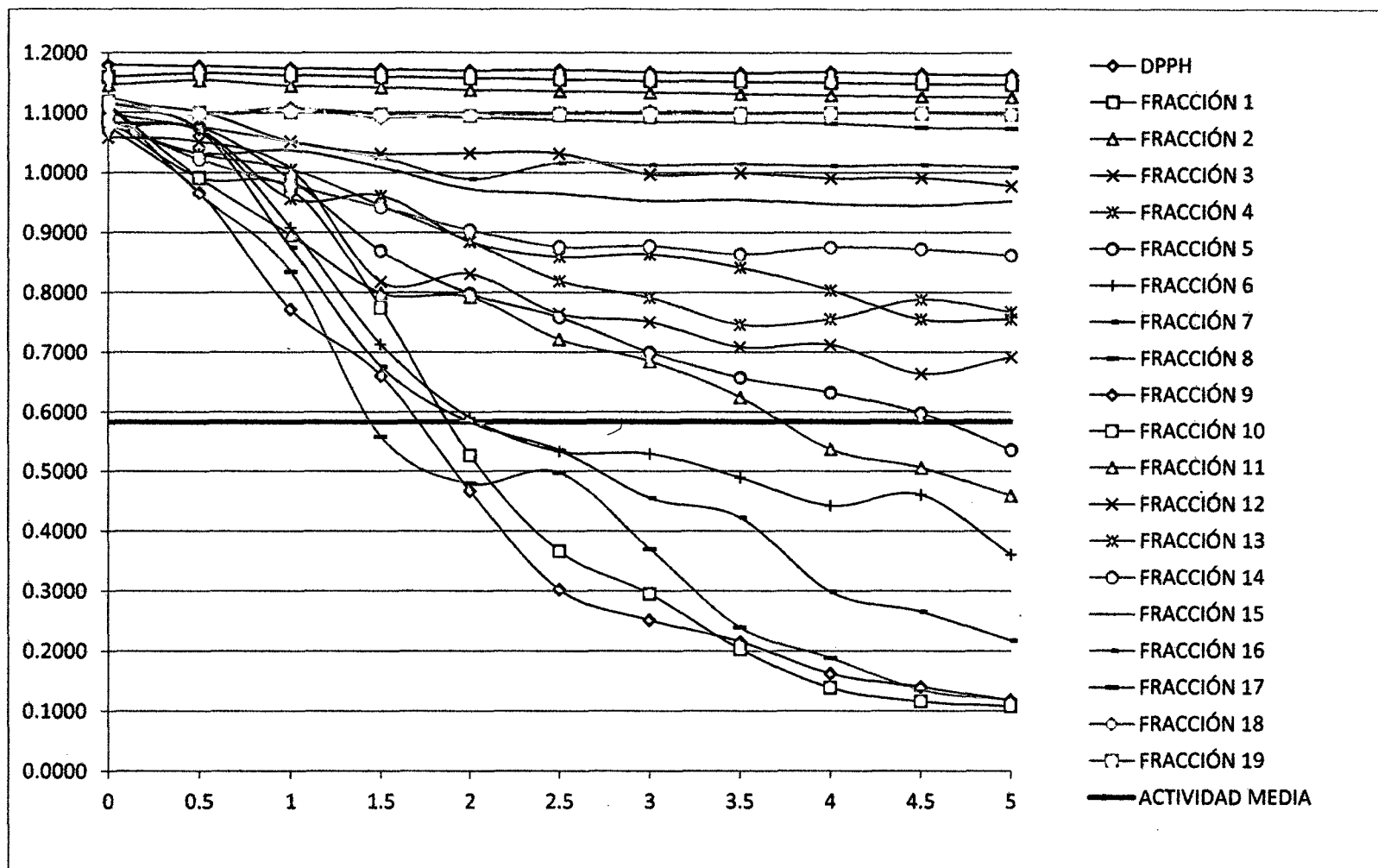


Figura 14. Actividad antioxidante de las fracciones alcohólicas de la corteza de *T. obovatum* (Absorbancia vs Tiempo).

En la figura 14, se observa que la fracción 8, en el tiempo de 1,5 minutos, logró exceder un poco más de la actividad media alcanzando así a una absorbancia promedio de 0,1475 dentro de los 5 minutos, a diferencia de la fracción 10, que logra exceder la actividad media en el minuto 2 y consiguiendo una absorbancia promedio de 0,1207 en el ciclo de los 5 minutos.

En la tabla 5 y en figura 23 y 24 del anexo, se muestra de manera más detallada, los resultados en promedios de absorbancias, porcentajes de poder reductor y capacidad antioxidante, de cada una de las fracciones obtenidas y analizadas.

4.1.3.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES DE LAS FRACCIONES – MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

La concentración de polifenoles totales de las fracciones alcohólicas de la corteza de *T. obovatum.*, se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de polifenoles totales de las fracciones alcohólicas de la corteza de *T. obovatum.*

FRACCIONES	Conc. mg/ml	Media Lecturas	DE	Factor de Dilución	Conc. (mg/g)	Conc. (g/100g)
F6	1.33	1.0341	0.0005	80	106.40	10.64
F7	2.40	1.8578	0.0004	80	192.00	19.20
F8	3.05	2.3796	0.0009	80	244.00	24.40
F9	3.56	2.7855	0.0420	80	284.80	28.48
F10	3.86	2.9957	0.0478	80	308.80	30.88
F11	1.30	1.0056	0.0004	80	104.00	10.40

En estos resultados, destaca la alta concentración de polifenoles totales en la fracción 10 con un valor expresado en g/100g CE de 30.88 ± 0.0478 .

4.1.4. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FRACCIÓN ALCOHÓLICA POR HPLC.

El análisis de la fracción 10 de la corteza de *T. obovatum*., se describe en la figura 15, donde se observó la cantidad de 5 picos con sus respectivos tiempos de retención, áreas y prolongaciones.

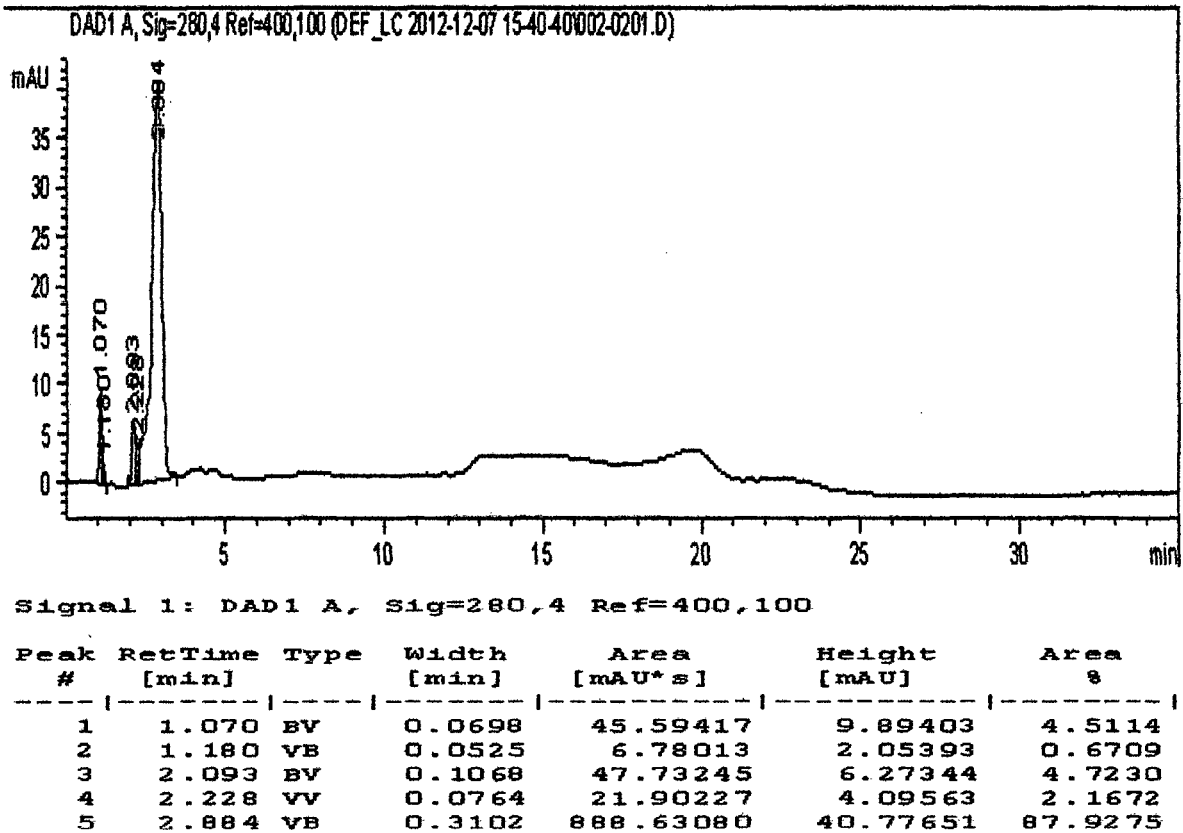


Figura 15. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la corteza de *T. obovatum* por HPLC.

En los análisis con los estándares, se demuestra que no existe la presencia de los compuestos de catequina hidratada, epicatequina, epigallocatequina, quercetina dihidratada, pero sí de ácido clorogénico, que se observa en la tabla 7 y en la figura 25 del anexo.

Tabla 7. Concentración de ácido clorogénico de la fracción 10 de la corteza de *T. obovatum*.

FRACCIÓN	# Pico	Tiempo Retención	Área	Factor Dilución	Conc. (mg/g)	Conc. (g/100g)
10	5	2.884	888.6308	3,5	0.4197	41.97×10^{-3}

En la tabla 7, se identifica que el pico 5, corresponde al ácido clorogénico, con una concentración de 41.97×10^{-3} g/100g.

4.1.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FRACCIÓN ALCOHÓLICA POR GC-MS/MS.

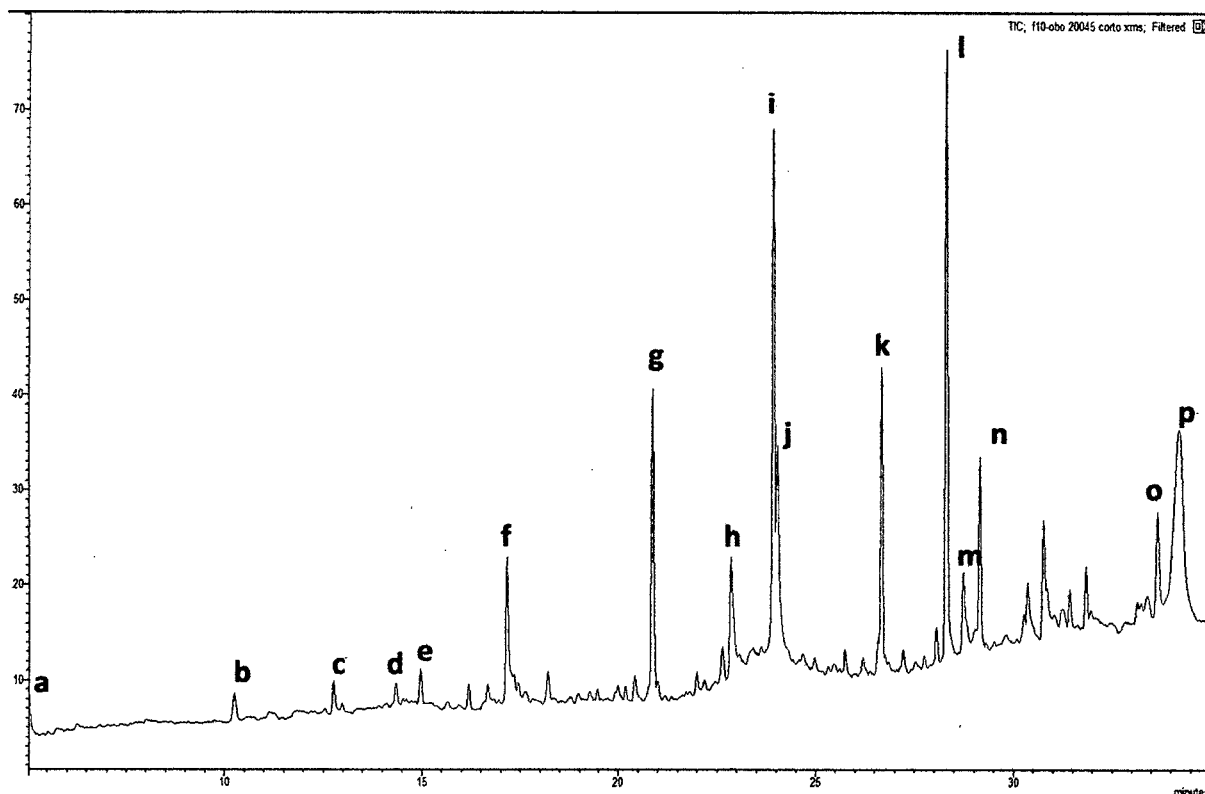


Figura 16. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la corteza de *T. obovatum* por GC-
Ms/Ms.

En la figura 16, se describe el cromatograma de la fracción 10, donde se seleccionaron 16 picos por su mayor resolución, de los cuales se identificamos los posibles compuestos por análisis de espectrometría de masa/masa modo full scan y por comparación de éstos con la librería Mainlab (Edición 2010).

A continuación se presenta el análisis espectral de los compuestos de esta especie.

4.1.5.1. Compuesto "b".- *Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-*

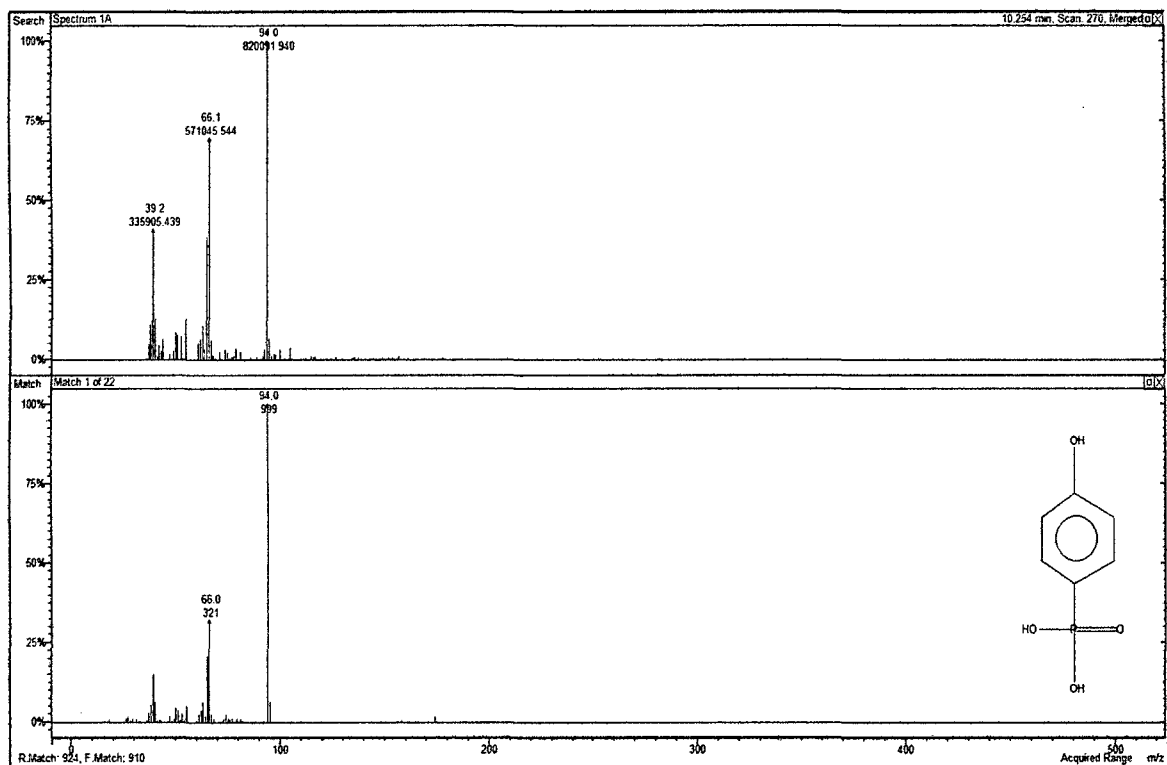


Figura 17. Espectro de masas del compuesto "b"

El espectro de masas del pico "b" (t_R 10.254 min.) del cromatograma (Figura 17) se identificó por comparación con la librería Mainlab como **Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-** con un 92.4% de similitud y fórmula molecular $C_6H_7O_4P$, consistente con el pico del ión molecular observado a m/z : 94.

4.1.5.2. Compuesto "d".- Mequinol

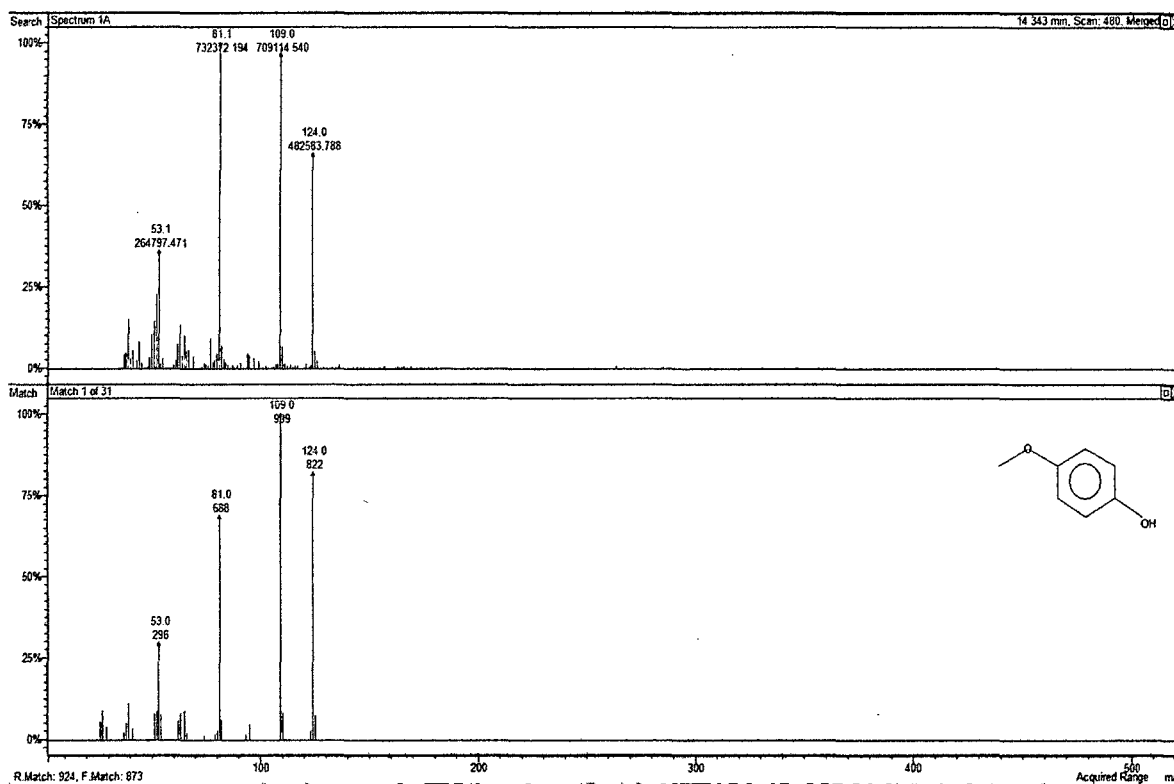


Figura 18. Espectro de masas del compuesto "d"

El espectro de masas del pico "d" (t_R 14.343 min.) del cromatograma (Figura 18) se identificó por comparación con la librería Mainlab como **Mequinol** con un 92.4% de similitud y fórmula molecular $C_7H_8O_2$, consistente con el pico del ión molecular observado a m/z : 124.

4.1.5.3. Compuesto "h".- Homovanillyl alcohol

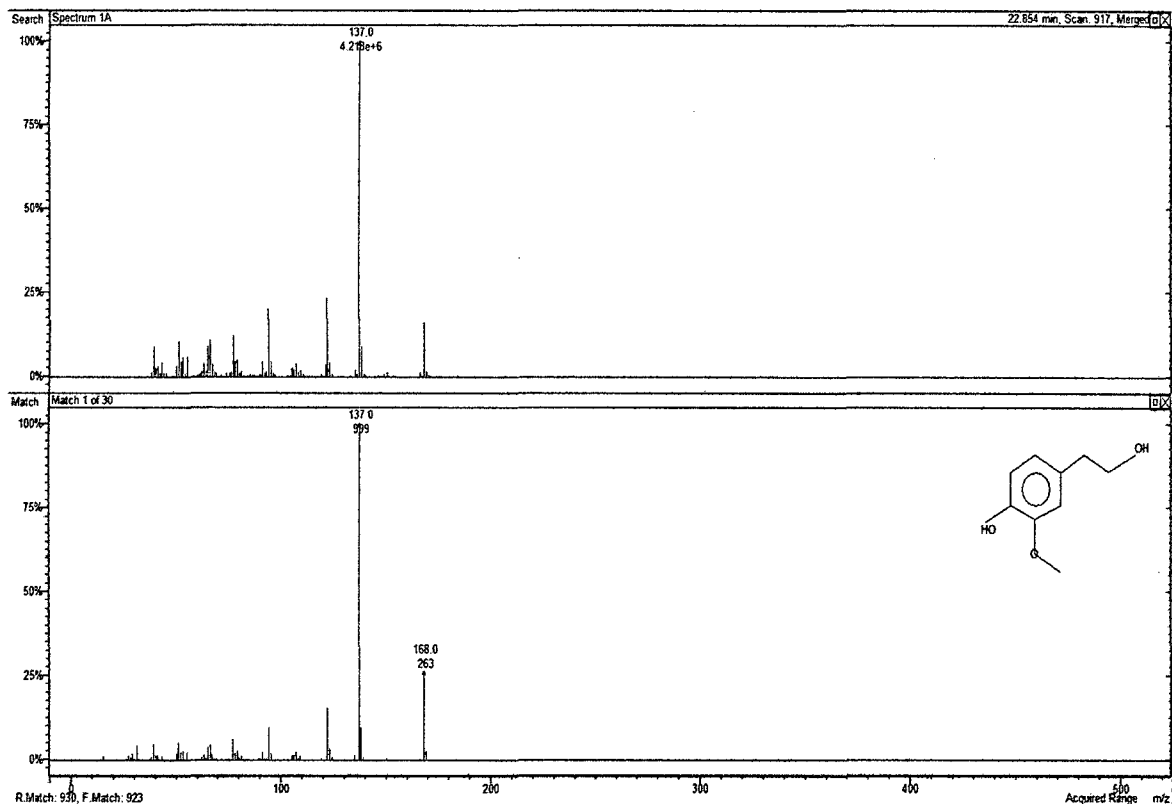


Figura 19. Espectro de masas del compuesto "h"

El espectro de masas del pico "h" (t_R 22.854 min.) del cromatograma (Figura 19) se identificó por comparación con la librería Mainlab como **Homovanillyl alcohol** con un 93.0% de similitud y fórmula molecular $C_9H_{12}O_3$, consistente con el pico del ión molecular observado a m/z : 168.

4.1.5.4. Compuesto "j".- Phenol, 3,4,5-trimethoxy-

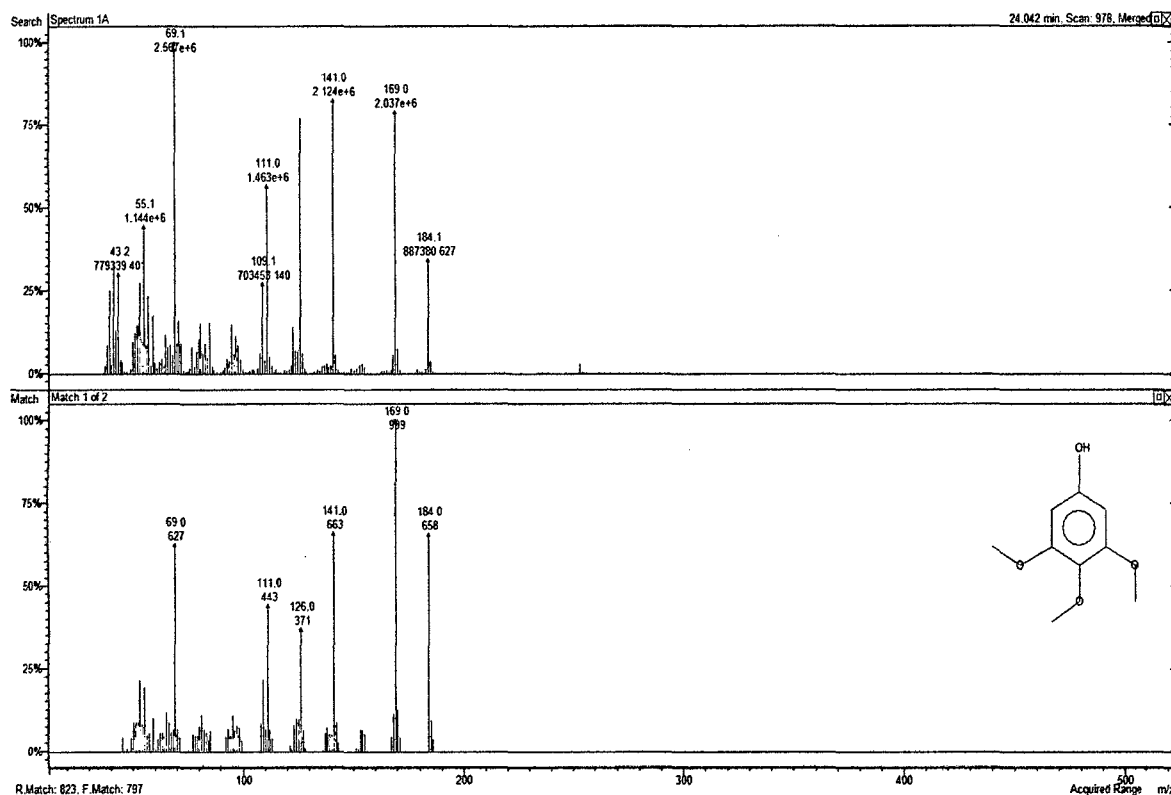
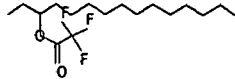
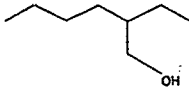


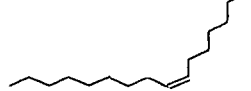

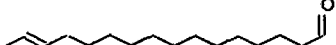
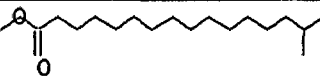
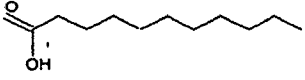

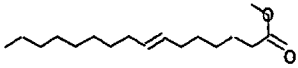
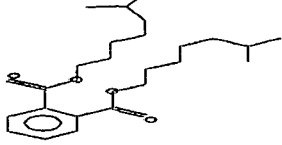


Figura 20. Espectro de masas del compuesto "j"

El espectro de masas del pico "j" (t_R 24.042 min.) del cromatograma (Figura 20) se identificó por comparación con la librería Mainlab como **Phenol, 3,4,5-trimethoxy-** con un 82.3% de similitud y fórmula molecular $C_9H_{12}O_4$, consistente con el pico del ión molecular observado a m/z : 184.

Tabla 8. Fitocomponentes no fenólicos identificados en la fracción 10 de la corteza *T. obovatum* por GC-Ms/Ms.

TIEMPO DE RETENCIÓN (t _R)	PICO	NOMBRE DE COMPUESTO	ESTRUCTURA
5.034 min	"a"	3-Trifluoroacetoxypentadecane	
12.766 min	"c"	1-hexanol, 2-ethyl-	
14.967 min	"e"	Decane	
17.167 min	"f"	3-Dodecene, (Z)-	
17.167 min	"g"	7-Hexadecene, (Z)-	
23.925 min	"i"	7-Tetradecene	
26.672 min	"k"	E-14-Hexadecenal	
28.327 min	"l"	Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester	
28.756 min	"m"	Undecanoic acid	
29.164 min	"n"	5-Eicosene, (E)-	
33.664 min	"o"	7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	
34.190 min	"p"	Diisooctyl phthalate	

4.2. DISCUSIÓN.

Del extracto alcohólico de la corteza de *Theobroma obovatum* realizado en la presente tesis (esquema 2), se obtuvo las 19 fracciones, donde destaca la fracción 10 con alta capacidad antioxidante; como lo menciona García Bacallao (2001) ¹⁹, que nos proporcionan información científica y medicina popular de plantas antioxidantes, como *Theobroma cacao* L.

Sotero *et al.*, en el 2011 ²³, determinó la concentración de fenoles totales del extracto del *Theobroma cacao* L. con un valor (g/100g GAE) de $12,1015 \pm 0,0218$, en comparación con la fracción alcohólica de la corteza de *T. obovatum*, que nos presentó una alta concentración de polifenoles totales (g/100g CE) de $30,88 \pm 0.0478$, lo que demuestra que éste brinda una concentración mucha mayor que la información bibliográfica.

En el presente trabajo damos a conocer que la especie de *Theobroma obovatum*, poseen compuestos fenólicos como ácido clorogénico; y los posibles, ácido fosfónico (p-hidroxifenil); mequinol; alcohol homovanililo; 3, 4, 5 trimetoxifenol. Y en el estudio de Bayer *et al*, en 1999 ⁷⁰, demuestra que el género *Theobroma*, contienen los alcaloides como teobromina y cafeína que tiene propiedades antioxidantes, diuréticas, vasodilatadoras y antitumoral.

En la elucidación estructural con el GC-Ms/Ms, se reconoció 16 posibles compuestos con los picos más altos del perfil cromatográfico (figura 16), donde distinguimos 4

compuestos fenólicos y 12 compuesto ajenos a los fenólicos que según Praveen Kumar (2010) ⁷³, poseen actividad antioxidantes como los derivados del ácido palmítico.

Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl), es un agente quelante efectivo que se une fuertemente a iones metálicos, asimismo Shahidi y Naczk (1995) ⁴⁸ afirmó que tienen uso en la medicina para tratar desórdenes asociados a la formación de huesos y metabolismo de calcio. Más aún, sirven como portadores de radionúclidos en tratamientos de cáncer a los huesos, por lo que demuestra el estudio su presencia.

En la especie de *Theobroma obovatum*, existe la presencia de Mequinol, que según Decker (1995) ⁶⁰, llamada también *Tretinoína*, es una combinación de una forma de vitamina A natural y un agente utilizado para decolorar la piel. Se aplica sobre la piel para tratar las manchas marrones de la vejez.

Hernández (2008) ²⁴, homovanililo alcohol, conocido como alcohol vainílico, es un compuesto de aroma producido por la levadura durante la fermentación. Se produce por la reducción de la vainillina por la deshidrogenasa de alcohol de levadura.

La bibliografía descrita por Alma (2003) ⁶⁶, menciona que 3,4,5-trimetoxifenol, es efectivo contra el virus sincitial respiratorio. La actividad viral contra los dos tipos de virus herpes simple, se debe a que impide la penetración del virus en la célula. Lo que la especie en estudio contiene este compuesto.

4.3. CONCLUSIONES.

En el presente estudio concluimos lo siguiente:

- De 1.00 g de extracto concentrado de la corteza pulverizada de *Theobroma obovatum*, se obtuvo 19 fracciones alcohólicas recolectados en 114 tubos por cromatografía de columna abierta y agrupados por cromatografía de capa fina.
- La fracción con mayor actividad antioxidante fue la 10, con porcentajes de capacidad antioxidante y de reducción de 90% y 10% respectivamente.
- En la fracción 10, se calculó una concentración de polifenoles totales en g/100g CE (Método de Folin-Ciocalteu) de 30.88 ± 0.0478 .
- En la fracción 10, mediante el equipo de HPLC, se identificó el compuesto de ácido clorogénico, con una concentración de 41.97×10^{-3} g/100g.
- En la fracción 10, mediante el equipo de GC-Ms/Ms, se reportó la posibilidad de compuestos fenólicos como *Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-*; *Mequinol*; *Homovanillyl alcohol*; *Phenol, 3,4,5-trimethoxy-*, que son compuestos fenólicos

4.4. RECOMENDACIONES.

- Realizar los análisis de elucidación estructural de la fracción, por GC-Ms/Ms, con columnas apolar, semipolar y polar.
- Seguir los estudios de identificación de la fracción, por medio del equipo de Resonancia Magnética Nuclear.
- Realizar la purificación de estos compuestos presentes en la fracción, y ejecutar la evaluación de la actividad antioxidante de cada molécula pura.
- Realizar los estudios de las moléculas purificadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.5. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Zahradnikova L., Schmidt Š., Sekelyova Z., Sekretar S. (2008).** Fractionation and identification of some phenolics extracted from evening primrose seed meal. *Czech J. Food Sci.*, 26: 58–64.
2. **Association of Official Analytical Chemists. 1990.** 15th edn. *AOAC*, Washington, DC, pp 152-169.
3. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22, 25-30.
4. **Gil M, Tomás-Barberán F. 2001.** High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography.* (643), 41-46.
5. **Alessandrini González, R. 2000.** Nutrición, Estrés Oxidativo y Envejecimiento. Avances Médicos de Cuba, Centro Internacional de Restauración Neurológica, C. Habana, Cuba, p38-41.
6. **Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. 1994.** Antioxidants in nutrition, health and disease. *Oxford. New York: Oxford Universit.* 143p.
7. **Gurib-Fakim A. 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular AspectsMed.* 27:1-93.
8. **Martínez C, Galán P, Preziosi P, Ribas L, Serra LL, HercbergSerge. 1998.** Estudio suvimax (Francia): El papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer y la enfermedad cardiovascular. *Rev. Esp. Salud Pública*, 72, 3 Madrid Mayo/Junio. ISSN 1135-5727.
9. **Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA. 2002.** Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia.* 73:69-91.
10. **Visioli F., Poli A., Gall C. 2009.** Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal ResearchReviews.* Issue 1, 22: 65–75.
11. **Caillet S., Salmiéri S., Lacroix M. 2006.** Evaluation of free radicalscavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric methoD. *Foodchemistry.* Issue 1. 95: 1-8.

12. **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Lundberg, W.O. 1952.** The antioxidant properties of natural spices. *Food Res., Champaign.* 17: 46-55.
13. **Inatani, R., Nakatani, N., Seto, H. 1982.** Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem., Tokyo.* 46: 1661.
14. **Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. 1983.** Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) And their derivatives. *Agric. Biol. Chem., Tokyo.* 47: 521.
15. **Houlihan, C.M., Ho, C.T., Chang, S.S. 1984.** Elucidation of a chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosmary. *J. Am. OilChem. Soc., Champaign.* 61: 1036.
16. **Nakatani, N., Inatani, R. 1984.** Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Revised structure for rosmanol. *Agric. Biol. Chem., Tokyo.* 48: 2081.
17. **Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. 1994.** Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *J. Am. OilChem. Soc. Champaign.* 71: 427-447.
18. **Johnson, L.E. 1995.** Food technology of the antioxidants nutrients. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr., Fort Lauderdale.* 35: 149-153.
19. **García Bacallao, L. 2001.** Información científica y de medicina popular acerca de las plantas antioxidantes, como *Musa paradisiaca* l (plátano burro), *Arachishypogea* (cacahuate), *Theobroma cacao* L. (cacao).
20. **García, D.E. 2002.** Tesis de doctorado "caracterización química y validación de la actividad antioxidante de frutos de la amazonía: chopé (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Griasneuberthii* macbr.) Y macambo (*Theobroma bicolor*)".
21. **Padilla, F.C. 2008.** Estudio de productos de origen vegetal del *Theobroma cacao*, *Campsiandracomosa* benth (chiga), *Sorghum bicolor*, l. Moench (sorgo), *Melicoccus bijugatus* (mamón), el contenido de polifenoles totales y su relación con la actividad antioxidante.

22. **Leandro, C. 2010.** Extracción de antocianinas y polifenoles asistido por ultrasonido en cascarilla de cacao orgánico (*Theobroma cacao L.*).
23. **Sotero, V., Maco, M., Vela, J., Merino, C., Dávila, E., García, D. 2011.** Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Rev. Soc. Química del Perú.* 77.
24. **Lima Hernández L. 2008.** Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. *Universidad De La Habana. Cuba.* Pag. 2-3.
25. **Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. And B.D. Oomah. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. FoodChem.* 46: 4113-4117.
26. **Criado C., Moya M. 2009.** Actualizaciones el medico: Vitaminas y antioxidantesservicios de Medicina Interna y Urgencias. Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Madrid. *Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.* Pag. 11
27. **Cheeseman, K.H.Y. y Slater, T.F. 1993.** Free radicals in medicine. Churchill Livingstone. London.
28. **Robbins, R. 2003.** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. FoodChem.* 51: 2866-2887.
29. **Molyneux P. 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
30. **Mittler R, Vanderauwera S, Van Breusegem F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *TrendsPlantSci.* 10: 490-498
31. **Prasad TK. 1996.** Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10:1017-1026.

32. **Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. 2002.** Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319
33. **Asada K. 1984.** Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* 105: 422-429
34. **Foyer CH, Halliwell B. 1976.** The presence of glutathione and glutathione reductase: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
35. **Arrigoni O, De Tullio MC. 2002.** Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta.* 15(69): 1-9
36. **Proyecto de investigación de los antioxidantes del tomillo. 2007.** *Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica.* 8-19
37. **Noctor G, Foyer CH. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *AnnuRevPlantPhysiolPlant Mol Biol.* 49: 249-2.
38. **Smirnoff N. 2000.** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *CurrOpinPlantBiol.* 3: 229-235
39. **Noctor G, Gómez L, Vanacker H, Foyer CH. 2000.** Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283–1304
40. **Arango Y, Heise KP. 1998.** Localization of alpha-tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. Fruits. *J. Exp. Bot.* 49: 1259–1262
41. **Woodall AA, Lee SW, Weesie RJ, Jackson MJ, Britton G. 1997.** Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity. *Biochem Biophys Acta.* 13(36): 33–42
42. **Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW. (1996).** *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: 403–412
43. **Robbins, R. 2003.** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.
44. **Kähkönen M., Anu I. 2001.** Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4076 – 4082.

45. **Vinson, J. And B. Hontz. 1995.** Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. FoodChem.* 43(2): 401-403.
46. **Hagerman, A., Riedl, K., Alexander Jones, G., Sovik, K., Ritchard, N., Hartzfeld, P., T. Riechel. 1998.** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1887-1892.
47. **Ruidavets, J. B.; Teissedre, P.L.; Ferrières, J.; Carando, S.; Bougard, G. Y J. J Ca-banis. 2000.** Catechin in the mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis.* 153: 107-117.
48. **Shahidi F., Naczki M. 1995.** Food phenolics: Sources, chemistry, effects and applications. *Technomic Publishing.* 247-260.
49. **García A. 2005.** Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. *Tesis doctoral Europea, Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Murcia, España.*
50. **Mcneil, M.; Darvill, A. G.; Fry, S. C.; Albersheim, P. 1984.** Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry,* 53: 625-663.
51. **Parr, A. J.; Ng, A.; Waldron, K. W. 1997.** Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *Journal of Agriculture and FoodChemistry,* 45: 2468-2471.
52. **Harborne J.; Mabry T.; Mabry H. 1975.** "The Flavonoids", *Chapman and Hall, London.* 52-57.
53. **Caillet, S.; Salmieri, S.; M. Lacroix. 2006.** Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by fast colorimetric method. *Food Chemistry.* 95: 1-8.
54. **Harborne JB. 1989.** General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in Plant Biochemistry.* 1: 1-28.
55. **Wiermann R. 1981.** Secondary plant products and cell and tissue differentiation. *The Biochemistry of Plants.* 7: 85-116

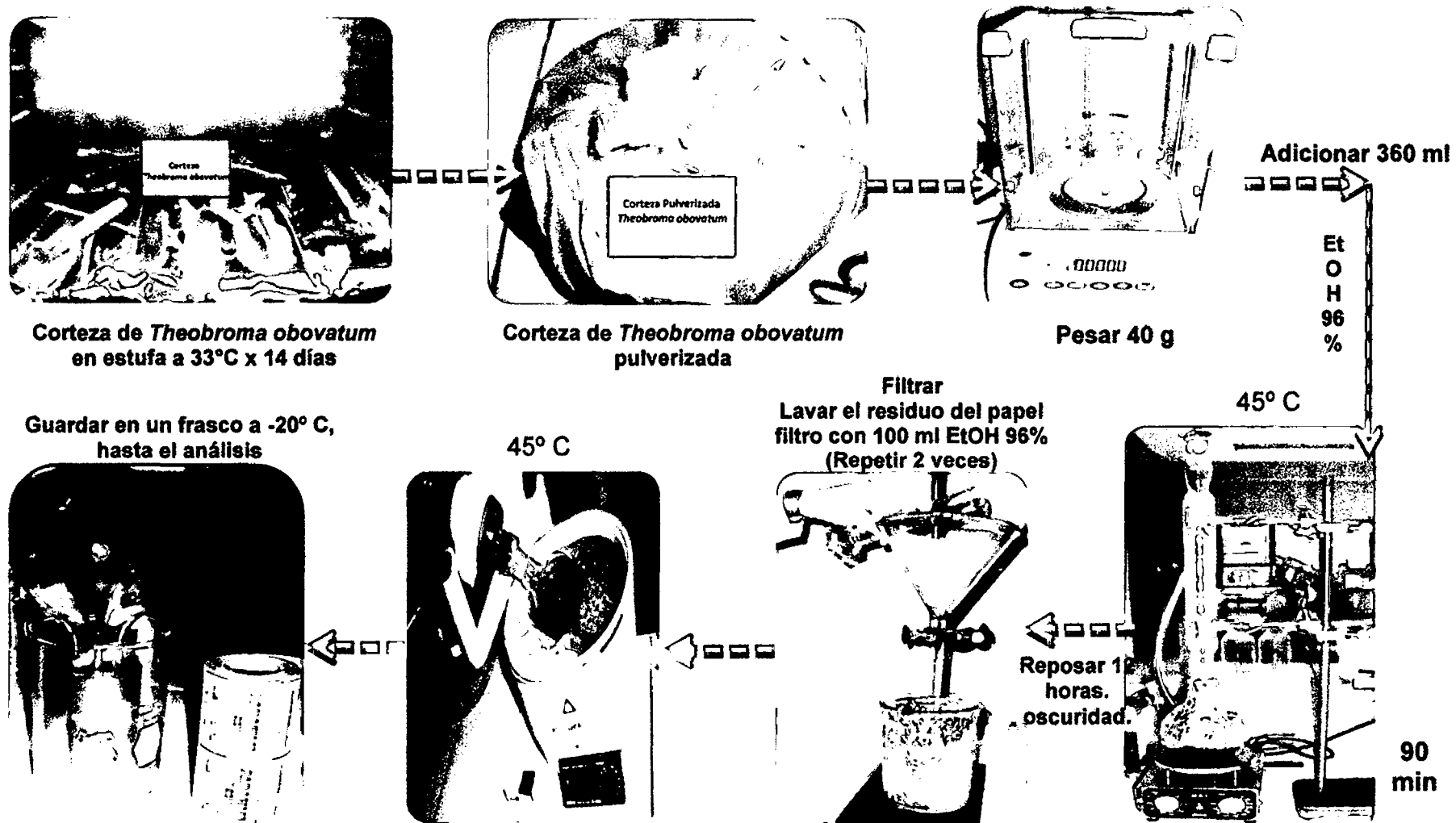
56. **Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. 2002.** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 177: 67-80.
57. **Dixon RA, Paiva NL. 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *PlantCell*, 7: 1085-1097
58. **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 2: 152–159
59. **Takahama U. 1998.** Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotianatabacum*L. *Plant Cell Physiol*. 39: 681-689.
60. **Decker EA. 1995.** The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr. Rev.* 53:49-58
61. **Siddhuraju, P., Becker K. 2003.** Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringaoleifera Lam.*) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2144 -2156.
62. **De Freitas, V.; Glories, Y.; Laguerre, M. 1998.** Incidente of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. *J. Agric. FoodChem.* 46: 376- 382.
63. **Paladino S. 2008.** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera L.*). *Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias – Uncuyo.* 33-34.
64. **Meir,S.; Kanner, J.; Akiri, B.; Hadas, S.P. 1995.** Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. FoodChem.* 43: 1813-1819.
65. **Yildirim, A.; Mavi A., Kara A. 2001.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4083-4089.
66. **Alma, M., Mavi, A.; Yildirim, A.; Digrak, M., Hirata T. 2003.** Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of

- the essential oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.* 26(12): 1725-1729.
67. **León B. 2006.** El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. peru. biol.* 13(2): 413 – 425.
68. **Borthomirth A. 1986.** Informe sobre gira efectuada al T.F. Amazonas del 23-02-86 al 07-03-86.
69. **Lugo, E. 1988.** Uso de las zonas bosquosas de América Latina tropical. Caracas. *Interciencia (Ven.)*. 13: 16.
70. **Bayer, C., J. R. Hoppe, K. Kubitzki, M. F. Fay, A. Y. De Bruijn, V. Savolainen, C. M. Morton, K. Kubitzki, W. S. Alverson, and M. W. 1999.** Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid ATP B and RBCL DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 129: 267–303.
71. **Flores S. 1997.** Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos. Tratado de Cooperación Amazónica. Lima. 307.
72. **Ruiz, J. 1993.** Alimentos del bosque amazónico: Una alternativa para la protección de los bosques tropicales. *UNESCO/ORCYT*. Montevideo. 226.
73. **Praveen Kumar. 2010.** Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negund.* *African Journal of Biochemistry Research.* India. 4(7): 191-195.

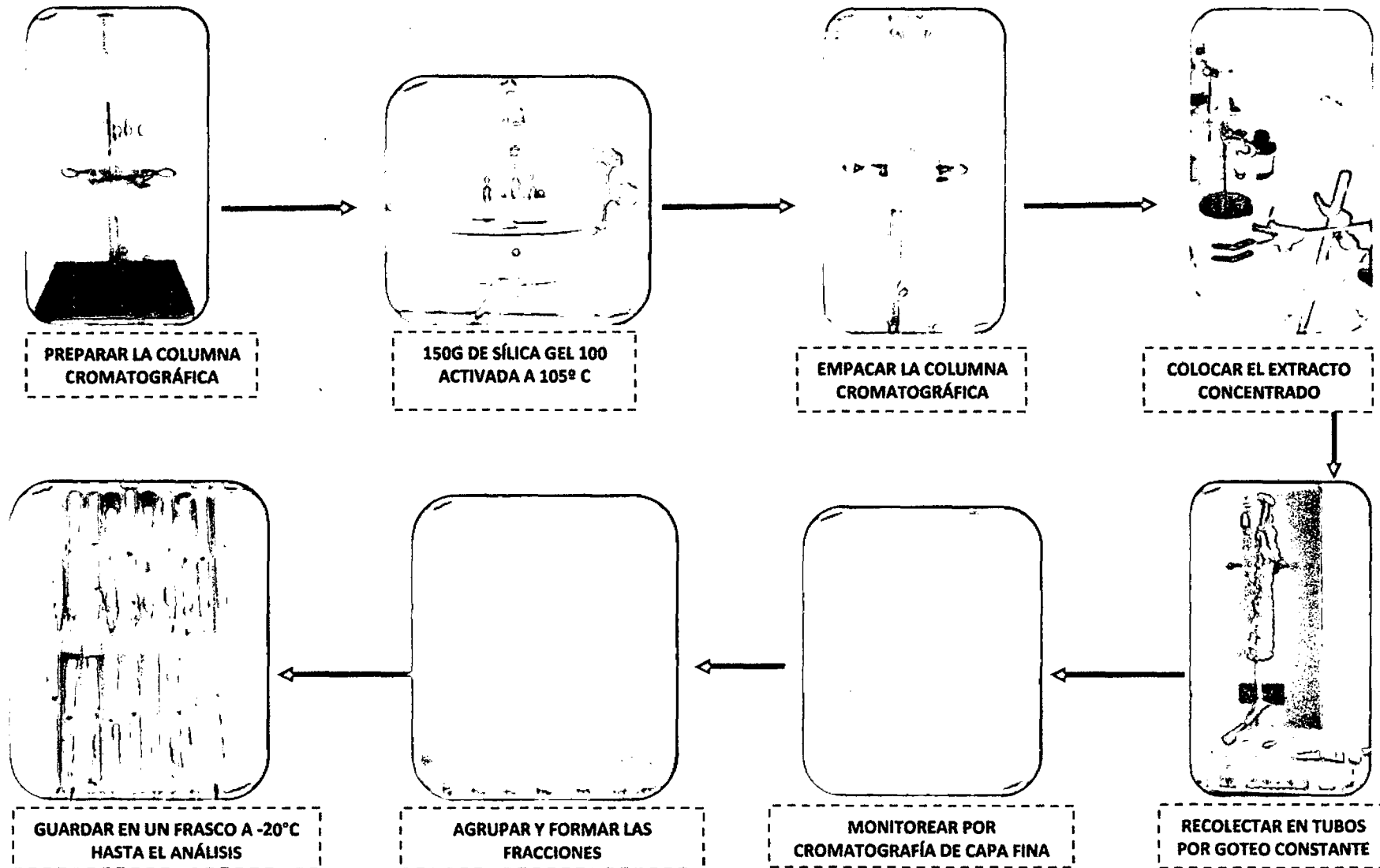
4.6. ANEXOS.

Tabla 9. Matriz de consistencia.

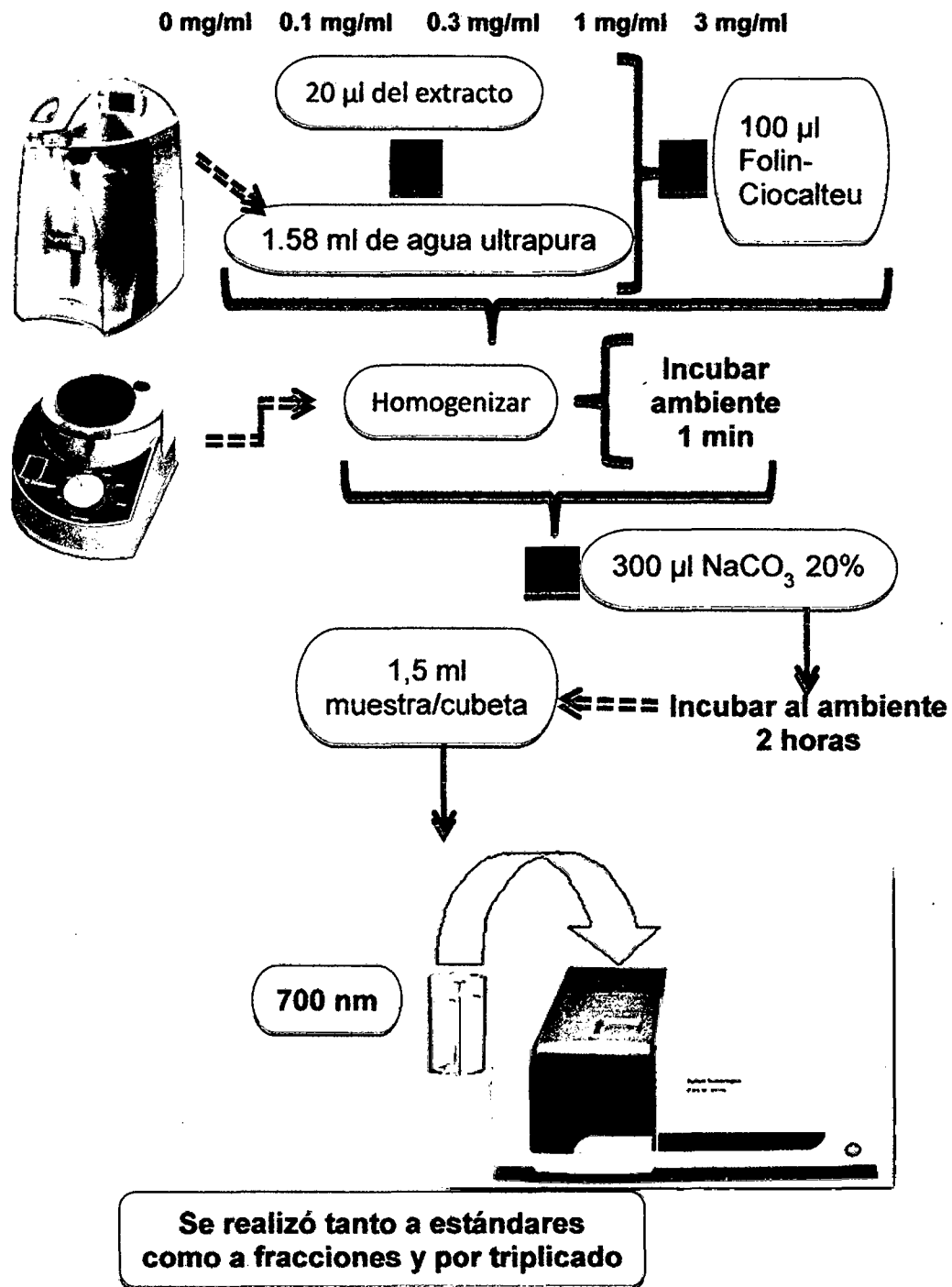
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	MESES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Componente 01.- COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE <i>Theobroma obovatum</i>.	X						
• Colecta de la especie de <i>Theobroma obovatum</i> .	X						
• Identificación botánica de la especie de <i>Theobroma obovatum</i> .	X						
Componente 02.- EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA DE LA CORTEZA DE <i>Theobroma obovatum</i>.		X					
• Tratamiento de la muestra.		x					
• Preparación del extracto a evaluar.		x					
Componente 03.- FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE <i>Theobroma obovatum</i>.			X				
• Fraccionamiento del extracto a través de cromatografía de columna.			x				
• Agrupación de las fracciones obtenidas a cromatografía de capa fina.			x				
Componente 04.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS FRACCIONES DE <i>Theobroma obovatum</i>.				X	X		
• Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones a través de ensayo <i>in vitro</i> (DPPH).				x			
• Determinación de los compuestos polifenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu) de las fracciones.					x		
Componente 05.- CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.						X	
• Cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante a través de HPLC.						x	
• Identificación de los compuestos con actividad antioxidante a través de GC- <i>Ms/Ms</i> .						x	
Componente 06.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y SUSTENTACIÓN DE TESIS.							X
• Revisión bibliográfica.							x
• Redacción final y sustentación de tesis.							x



Esquema 2. Procedimiento de la obtención del extracto alcohólico de la corteza de *Theobroma obovatum*.



Esquema 3. Procedimiento del fraccionamiento del extracto alcohólico de la corteza de *Theobroma obovatum*.



Esquema 4. Determinación de la Concentración de polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu) de la fracción 10 del extracto alcohólico de la corteza de *Theobroma obovatum*.

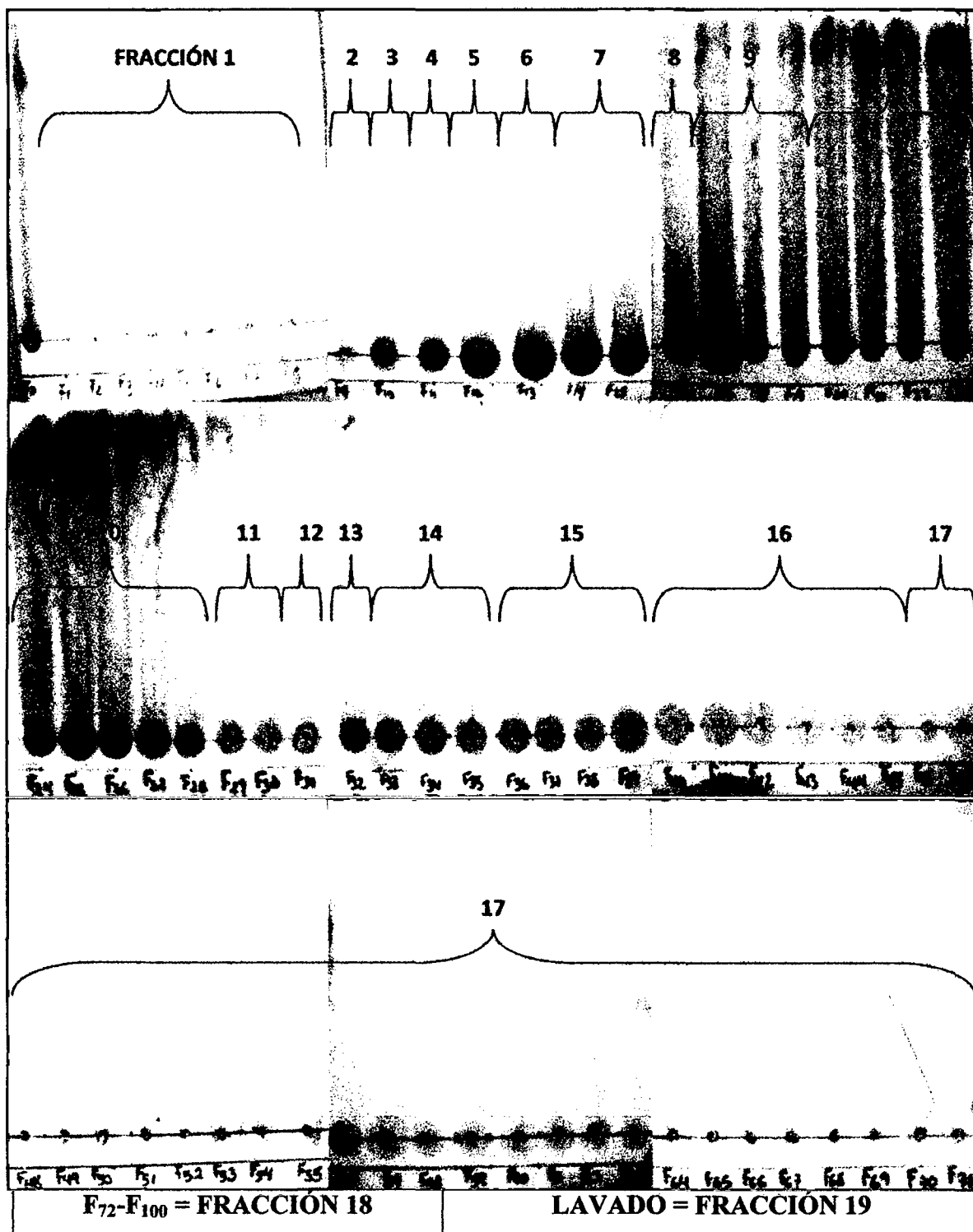


Figura 21. Agrupamiento de las fracciones por cromatografía de capa fina.

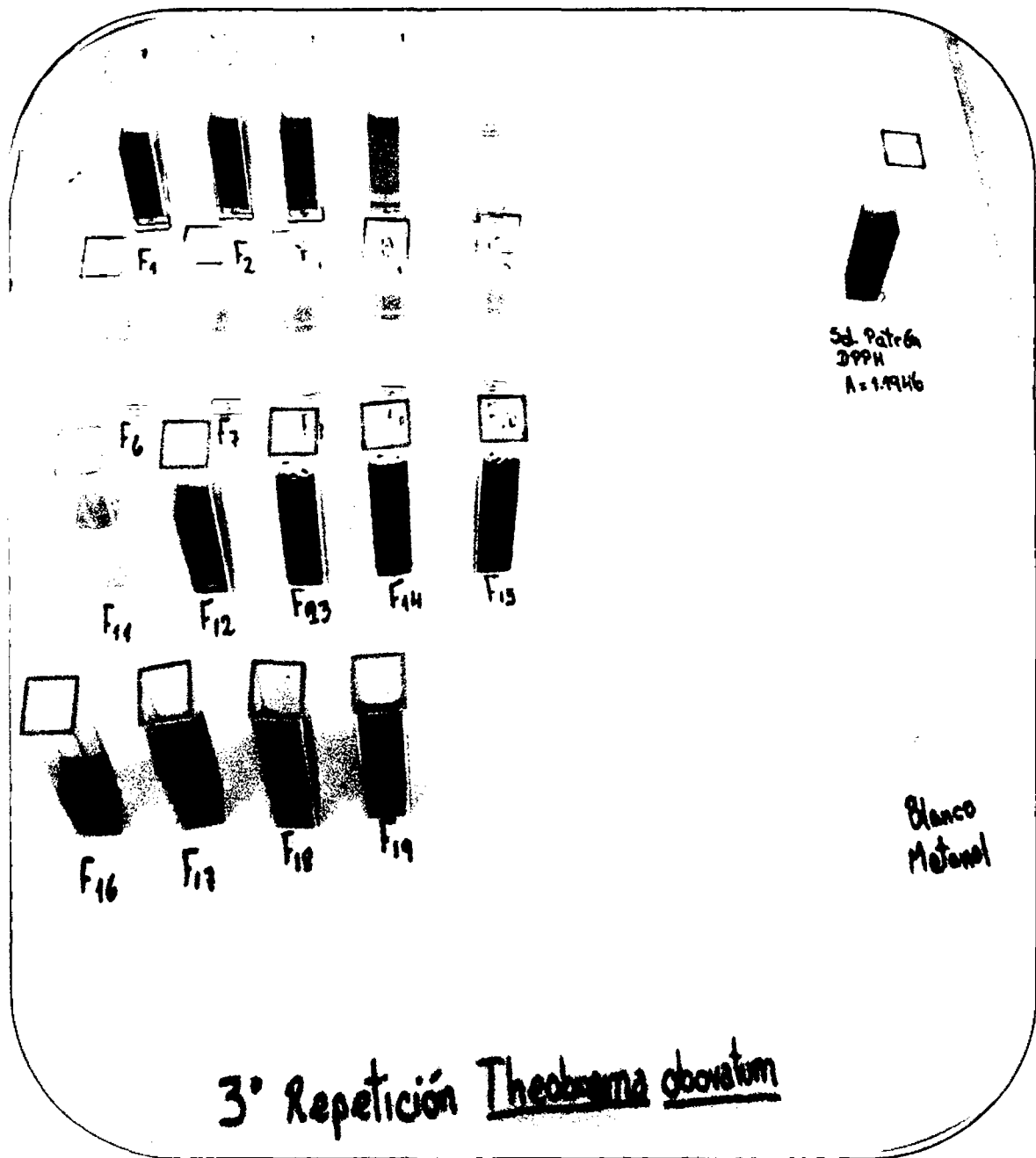


Figura 22. Repetición 3, del ensayo de DPPH.

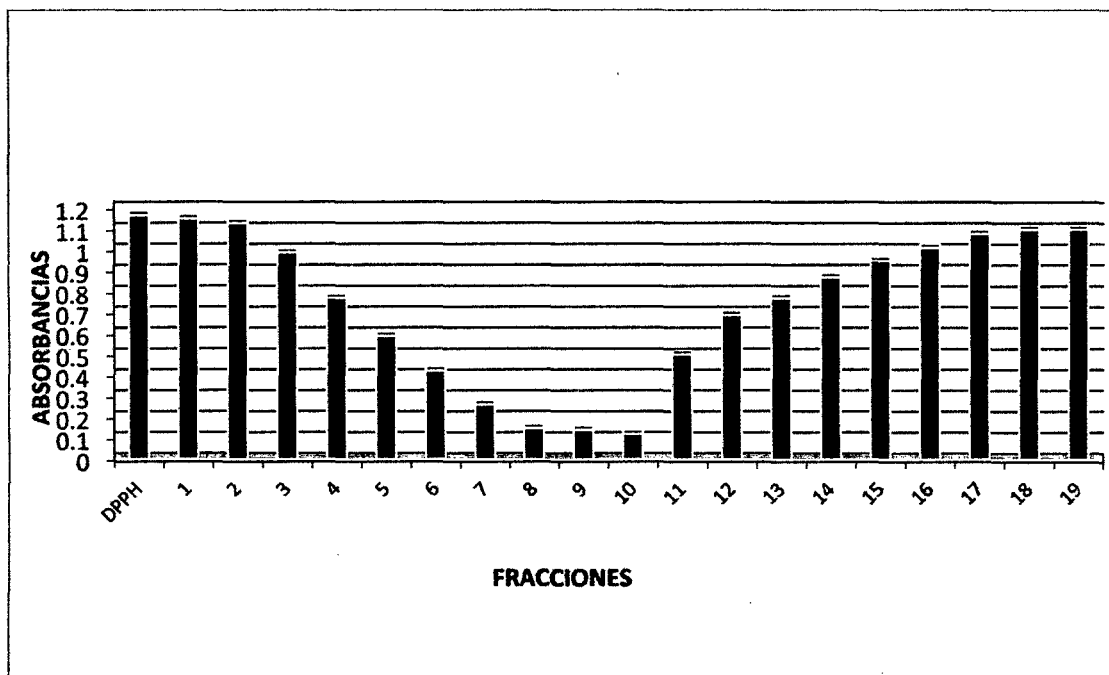


Figura 23. Ensayo de DPPH - Promedio de absorbancias de las fracciones alcohólicas de la corteza de *T. obovatum*.

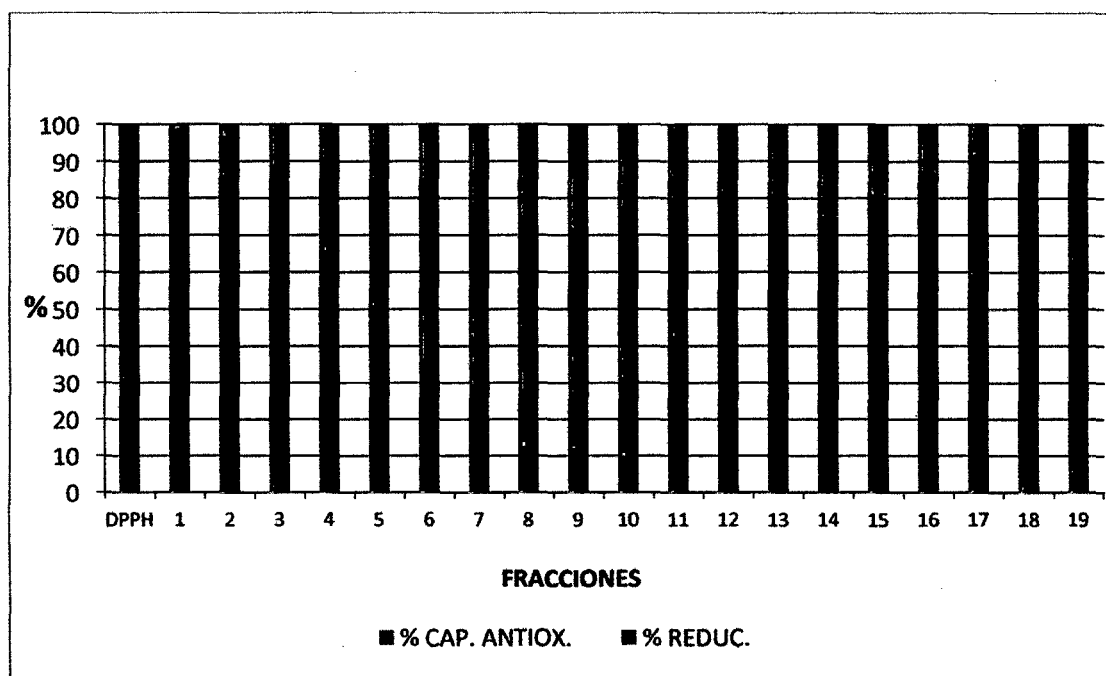


Figura 24. Porcentajes de Capacidad antioxidante y Poder reductor.

Tabla 10. Valores del Estándar de catequina en diferentes concentraciones.

ESTÁNDARES DE CATEQUINA	Conc mg/ml	Media Lecturas	DE
PATRÓN 1	0.0	0.0068	0.00000
PATRÓN 2	0.1	0.1107	0.00006
PATRÓN 3	0.3	0.2981	0.00012
PATRÓN 4	1.0	0.9286	0.00030
PATRÓN 5	3.0	2.2650	0.01071

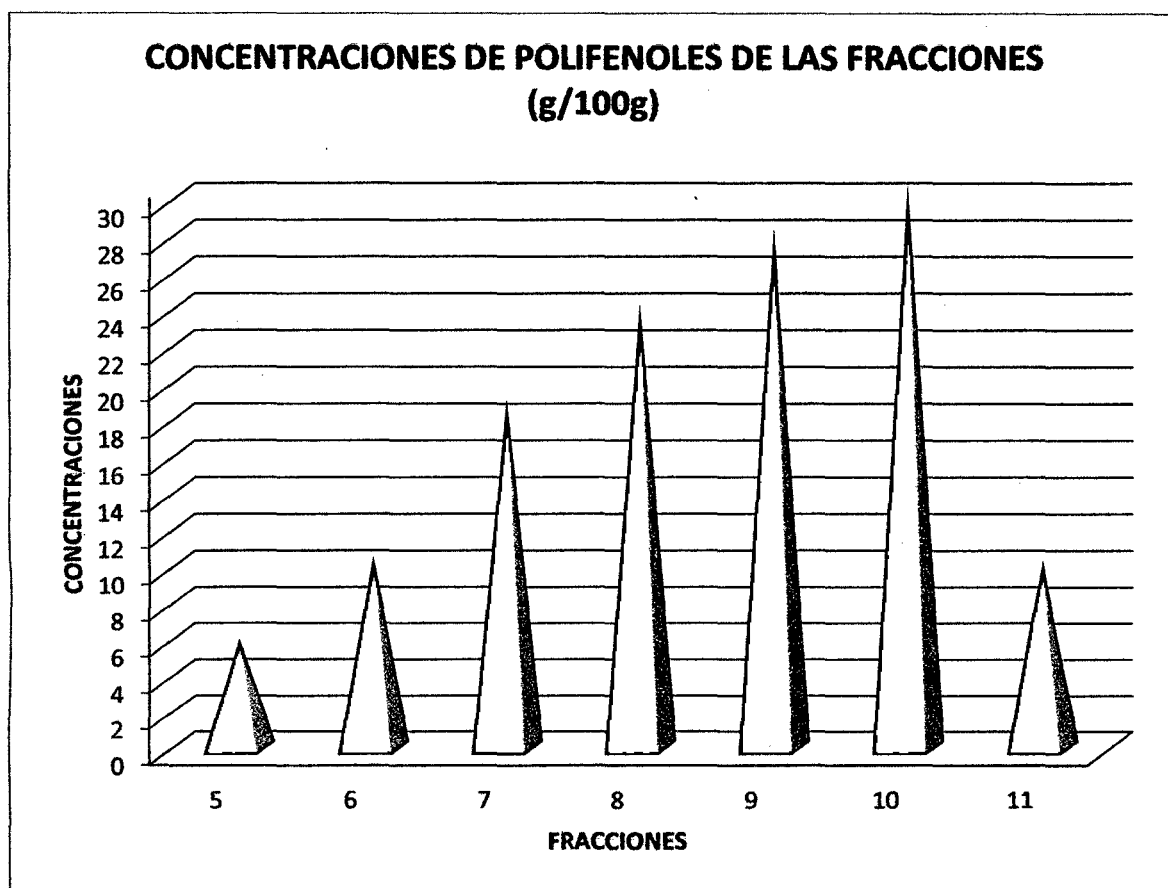
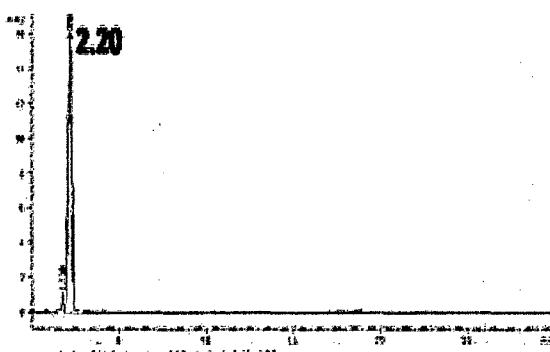


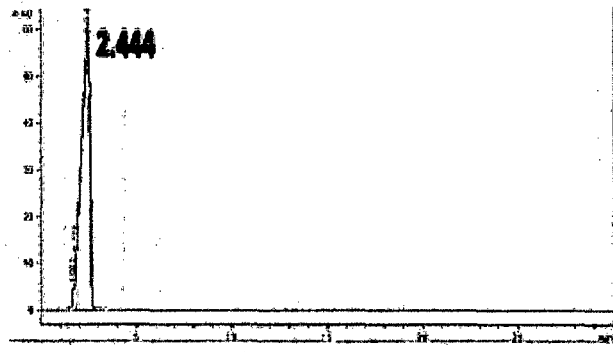
Figura 25. Concentración de polifenoles totales (g/100g EC) de las fracciones con actividad antioxidante.



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.20	UV	0.0772	1.03879	1.03877	1.4176
2	2.209	VR	0.1184	132.19718	16.14531	97.5214

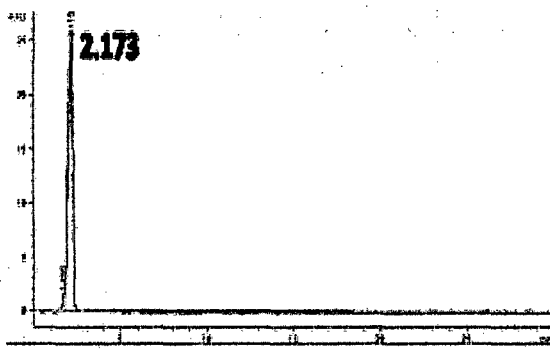
0.00125 mg/ml



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.444	UV	0.0837	10.71118	0.18531	1.0816
2	2.444	VR	0.0838	99.28882	12.22210	1.0783
3	2.444	VR	0.1159	111.08277	13.81587	97.8399

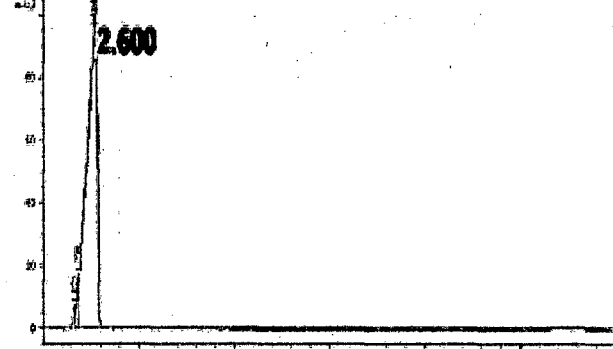
0.25 mg/ml



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.173	UV	0.0918	0.81991	1.79106	2.0173
2	2.173	VR	0.1092	172.05817	18.74322	97.9827

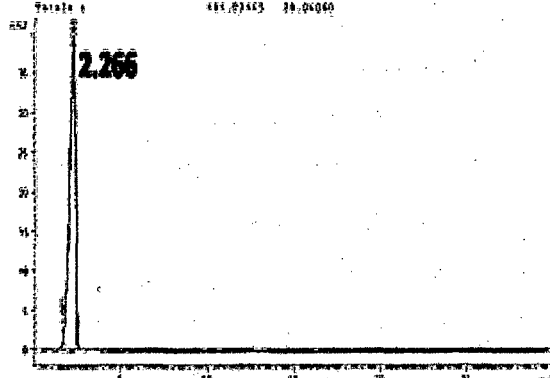
0.0625 mg/ml



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.600	UV	0.0870	47.17132	9.42730	0.2172
2	2.600	VR	0.0870	118.73768	19.41063	2.0487
3	2.600	VR	0.1051	114.09269	100.00109	97.7340

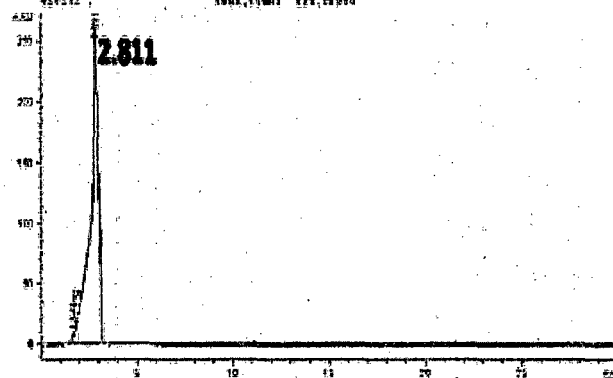
0.5 mg/ml



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.266	UV	0.0750	15.02189	0.08425	1.4441
2	2.266	VR	0.1020	919.01478	10.01274	97.5523

0.125 mg/ml



Signal is 0201 A, Sig=140, S Ref=140,100

Peak	Retention Time (min)	Type	Width (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)	Area (%)
1	2.811	UV	0.1010	11.01118	0.20083	0.0078
2	2.811	VR	0.0974	140.24488	10.44154	1.0241
3	2.811	VR	0.1117	127.07370	161.19259	97.9681

1 mg/ml

Figura 26. Espectrogramas por HPLC a diferentes concentraciones de ácido clorogénico.