

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

TRABAJO FINAL DE CARRERA

TÍTULO

**“EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS PRESENTES EN
LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (INDANO)”**

**TRABAJO FINAL DE CARRERA PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE**

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR LA BACHILLER

Viviana Olortegui Rios

ASESORADO POR:

Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo

**IQUITOS – PERÚ
2016**

AUTORIZACIÓN DEL ASESOR

Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, profesor principal del Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana:

INFORMA: Que la **Br. Viviana Olortegui Ríos**, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo contenido en la memoria titulada "**Evaluación de Antioxidantes Fenólicos presentes en la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano)**", y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el Jurado Calificador, a tal efecto para la obtención del título de Ingeniera en Industrias Alimentarias.

AUTORIZO: A la citada Bachiller a presentar el Trabajo Final de Carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula los Grados y Títulos de la Facultad de Industrias Alimentarias en la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.


Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo

MIEMBROS DEL JURADO

Tesis aprobada en la sustentación pública, que se llevó acabo en la ciudad de Iquitos, en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos perteneciente a la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, llevada a cabo el 11 de Febrero del 2016 a horas 19:00 horas; siendo miembro del jurado calificador los abajo firmantes:


LITTMAN GONZALEZ RIOS
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
CIP: 35163
Presidente


Wilson Guerra Sangama
ING. DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
CIP 32174
Miembro Titular


Fernando Tello Celis
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP 47488
Miembro Titular


Félix Humberto Cabrera Sánchez
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 33143
Miembro Suplente



UNAP

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Escuela de Formación Profesional de
Ingeniería en Industrias Alimentarias

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, siendo las 19:00 horas del día Jueves 11 de febrero 2016, en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNAP, ubicado en la calle Nauta cuadra 5 de esta ciudad, se dio inicio a la sustentación pública del Trabajo de Final de Carrera intitulado **"EVALUACION DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS PRESENTES EN LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (INDANO)"**, presentado por la bachiller: **VIVIANA OLORTEGUI RIOS**, con el asesoramiento de don **Alenguer Gerónimo Alva Arévalo**.



Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal N° 012-FIA-UNAP-2016, del 20 de Enero del 2016.

Ing. Littman Gonzales Ríos	-	Presidente
Ing. Wilson Guerra Sangama	-	Miembro
Ing. Fernando Tello Celis	-	Miembro
Ing. Félix Humberto Cabrera Sánchez	-	Miembro Suplente

Siendo las 20:00 horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido APROBADA con la nota de 15 y el calificativo de MUY BUENA, estando la bachiller apta para obtener el Título Profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

El Jurado Calificador alcanzará a la sustentante, si el caso lo requiere, las correcciones u observaciones presentadas.


LITTMAN GONZALES RÍOS
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
CIP: 35163
Presidente


Wilson Guerra Sangama
ING. DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
CIP: 32174
Miembro Titular


Fernando Tello Celis
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 47489
Miembro Titular


Félix Humberto Cabrera Sánchez
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 77142
Miembro Suplente



DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre ***Angela E. Rios***, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

A mis abuelos ***Natividad Laychi y Luis Rios***, por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mi padre ***Pablo Olortegui***. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos, ***Pedro Pablo Olortegui y Angela Olortegui*** por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

A mi familia, por darme todo su apoyo y quererme por sobre todas las cosas.

A la Oficina General de Investigación de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, por haber financiado el presente trabajo final de carrera mediante el proyecto titulado “**Evaluación de Antioxidantes Fenólicos presentes en la corteza de Byrsonima Crassifolia (Indano)**”

A mi asesor, Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, por sus constantes orientaciones, apoyos, consejos y paciencia incondicional, que hicieron posible la culminación satisfactoria del presente trabajo.

Al Ing. Rafael Segundo Vela Paredes por su apoyo en los análisis realizados y también por las recomendaciones ofrecidas para este proyecto.

A la Facultad de Industrias Alimentarias, a través de sus autoridades, docentes y personal administrativo, por haberme brindado los conocimientos necesarios en mi formación profesional y todas las facilidades para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A todos mis amigos y personas que de alguna u otra forma han contribuido para la culminación de este trabajo.

INDICE

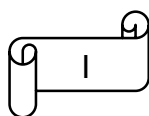
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ANEXOS	IV
	Pág.
RESUMEN	1
CAPÍTULO I	2
1. Introducción	3
CAPITULO II	5
2. Revisión de Literatura	6
2.1. <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano)	6
2.1.1. Características Generales	6
2.1.2. Sinonimia	6
2.1.3. Distribución y Producción	6
2.1.4. Fitoquímica	7
2.1.5. Farmacología	7
2.1.6. Usos del Indano	8
2.2. Radicales Libres	8
2.3. Antioxidantes	9
2.3.1. Compuestos Antioxidantes	11
2.3.1.1. Frutas como fuente de antioxidantes	11
2.3.1.2. Propiedades antioxidantes fenólicos en alimentos	13
2.4. Alimentos Nutracéutico	15
2.4.1. Los alimentos nutracéuticos se dividen en tres grupos	15
2.4.2. Criterios que deben cumplir los alimentos nutracéuticos	15
2.5. Compuestos Fenólicos	16
2.5.1. Compuestos fenólicos en alimentos	16
2.5.2. Cuantificación de compuestos fenólicos	17
2.5.2.1. Técnicas de separación	18
2.5.2.2. Técnicas de identificación	19
2.6. Fenoles totales	20
2.6.1. Origen	20
2.6.2. Clasificación	22
2.7. Flavonoides	24
2.7.1. Definición	24
2.7.2. Características Generales	25
2.7.3. Propiedades	25
2.7.4. Estructura Química	25
2.7.5. Clasificación de los Flavonoides	26

2.8. Taninos	28
2.8.1. Definición	28
2.8.2. Características	28
2.8.3. Funciones	28
2.8.4. Propiedades	29
2.8.5. Estructura Química	29
2.8.6. Clasificación	29
2.8.7. Extracción y Purificación	31
2.8.8. Proantocianidinas	31
2.8.9. Catquinas	32
2.9. Antocianinas	33
2.9.1. Extracción	34
2.9.2. Separación y Cuantificación	35
2.9.3. Detección e Identificación	36
2.9.4. Antocianinas como Ingredientes Alimentaciones	37
2.10. Análisis para Antioxidantes Fenólicos	40
2.10.1. Determinación de Fenoles Totales	40
2.10.2. Determinación de Flavonoides	41
2.10.3. Determinación de Antocianinas	42
2.10.4. Determinación de Taninos	43
2.10.5. Ensayo del DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZIL)	44
2.10.5.1. Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras	45
2.11. Espectrofotometría	46
2.11.1. Parámetro de Medición	47
2.11.1.1. La absorbancia	47
2.11.1.2. Índice de absorbancia	48
2.11.1.3. Longitud de Onda	48
2.11.1.4. Curva Espectra	49
CAPÍTULO III	51
3. Materiales y Método	52
3.1. Materiales	52
3.1.1. Corteza del <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO)	52
3.1.2. Equipos	52
3.1.3. Reactivos	53
3.2. Tipo y Diseño Muestral	54
3.3. Diseño Muestral	54
3.4. Población y Muestra	54
3.4.1. Población	54
3.4.2. Muestra	55
3.5. Procedimiento para la Recolección de la Información	55
3.5.1. Identificación de la muestra vegetal	55
3.6. Análisis de Antioxidantes	58

3.6.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método 2,2 – DIFENIL-1-PICRILHIRAZIL (DPPH)	58
3.6.2. Preparación del extracto etanólico	59
3.6.3. Determinación de fenoles totales	59
3.6.4. Determinación de flavonoides	60
3.6.5. Determinación de antocianinas por el método pH diferencial	60
3.6.6. Determinación de taninos	61
3.6.7. Análisis de los datos	62
CAPÍTULO IV	63
4. Resultados y Discusiones	64
4.1. Evaluación de la Actividad Antioxidante, Fenoles Totales, Antocianinas, Flavonoides y Taninos de la Corteza <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO)	64
4.1.1. Determinación de la actividad antioxidante con el método del DPPH	64
4.1.2. Determinación de la actividad antioxidante de la corteza <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO)	64
4.1.3. Evaluación de fenoles totales	67
4.1.4. Evaluación de flavonoides	69
4.1.5. Evaluación de antocianinas totales	71
4.1.6. Evaluación de taninos condensados	72
4.1.7. Resumen de Contenidos de Compuestos Fenólicos	74
CAPÍTULO V	76
5. Conclusiones	77
CAPÍTULO VI	78
6. Recomendaciones	79
CAPÍTULO VII	80
7. Referencias Bibliográficas	81
ANEXOS	94

LISTAS DE TABLAS

		Pág.
Tabla N° 01	Principales grupos polifenoles	22
Tabla N° 02	Clasificación de la radiación electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas	47
Tabla N° 03	Equipos y materiales usados en la tesis	53
Tabla N° 04	Reactivos usados en la tesis	54
Tabla N° 05	Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas de la corteza <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano)	65
Tabla N° 06	Porcentaje de inhibición de la corteza <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano).	65
Tabla N° 07	Contenido de Fenoles totales presentes en el extracto etanólico de la especie <i>Byrsonimia crassifolia</i> (Indano)	68
Tabla N° 08	Contenido de Flavonoides totales presentes en el extracto etanólico de la bespecie <i>Byrsonima crassifolia</i> (indano)	69
Tabla N° 09	Contenido de Antocianinas totales presentes en el extracto etanólico de la especie <i>Byrsonima crassifolia</i> (indano)	72
Tabla N° 10	Contenido de taninos condensados presentes en el extracto etanólico de la especie <i>Byrsonima crassifolia</i> (indano)	73
Tabla N° 11	Concentraciones de Antioxidantes Fenólicos presente en el extracto etanólico de la especie <i>Byrsonima crassifolia</i> (indano)	74



LISTAS DE FIGURAS

		Pág.
Figura N° 01	Estructura química de los principales grupos de polifenoles	23
Figura N° 02	Núcleo básico de un flavonoide	26
Figura N° 03	Estructura de flavonoide	26
Figura N° 04	Estructura de un isoflavonoide	27
Figura N° 05	Estructura de un neoflavonoide	27
Figura N° 06	Estructura de un tanino	29
Figura N° 07	Estructura ácido gálico	30
Figura N° 08	Estructura flavan-3,4-diol	30
Figura N° 09	Proantocianidinas más comunes	31
Figura N° 10	Catequina	32
Figura N° 11	Grupo Flavilio	33
Figura N° 12	Las antocianidinas más importante	34
Figura N° 13	Estructura de la quercetina	41
Figura N° 14	Estructura de antocianinas a diferentes pH's	42
Figura N° 15	Mecanismo de reacción de vainillina con tanino	43
Figura N° 16	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el Antioxidante	45
Figura N° 17	Obtención del extracto de la corteza <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano)	57
Figura N° 18	Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de la corteza <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano)	66

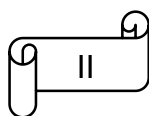
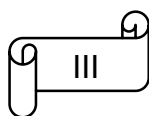


Figura N° 19	Curva padrón de ácido gálico para cálculo de fenoles Totales	67
Figura N° 20	Absorción del extracto etanólico de la corteza <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas	71
Figura N° 21	Absorción del extracto etanólico de la corteza <i>Byrsonima Crassifolia</i> (Indano) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas	71
Figura N° 22	Curva de Estándar de Taninos	73
Figura N° 23	Resumen de los Análisis de Compuestos Presentes en la Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO)	75



LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo N° 01	Ubicación geográfica del Distrito de Lamas, San Martín – Perú	95
Anexo N° 02	Obtención del extracto etanólico	96
Anexo N° 03	Análisis de antioxidantes	97
Anexo N° 04	Absorbancias del extracto de la corteza <i>byrsonima crassifolia</i> (Indano) con el método DPPH	98
Anexo N° 05	Absorbancias del extracto de la corteza <i>byrsonima crassifolia</i> (Indano) con el método DPPH	98
Anexo N° 06	Absorbancias del extracto de la corteza <i>byrsonima crassifolia</i> (Indano) con el método DPPH	99
Anexo N° 07	Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de la corteza <i>byrsonima crassifolia</i> (Indano)	100
Anexo N° 08	Absorbancias obtenidas entre 765 nm para la determinación de la curva patrón de fenoles totales	101
Anexo N° 09	Absorbancias obtenidas entre 500 nm para la determinación de la curva estándar de taninos	101
Anexo N° 10	Certificación de la corteza <i>byrsonima crassifolia</i> (Indano)	102

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar la evaluación de antioxidantes fenólicos presentes en la corteza de *Byrsonima crassifolia* (indano). La muestra fue recolectada en la ciudad de LAMAS – Provincia de Lamas, Departamento de San Martín, Perú, y se identificó taxonómicamente en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Del extracto etanólico al 1 % de ácido fórmico, se evaluó la concentración de fenoles totales, taninos condensados, flavonoides totales, antocianinas totales y su capacidad antioxidante (AA), la captación de radicales libres utilizando el método del 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) muestra una inhibición del 30% aproximadamente a 0.25mg/ml de extracto, así mismo muestra la presencia de fenoles totales ($45,16 \pm 1.267$ mg EAG/100 g muestra original), antocianinas (1.95 ± 0.06 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original), flavonoides (5.77 ± 0.01 g quercetina/100g muestra original), taninos (56.47 ± 0.117 mg (+)-catequina/100g de muestra original). La AA de la corteza se debería a la presencia de flavonoides.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Amazonía Peruana tiene una gran diversidad de especies que a la vez tienen gran demanda tanto en el mercado local como internacional, una de estas especies es el Indano (*Byrsonima crassifolia*) su producción se ha incrementado en estos últimos años en la provincia de Lamas, ya que es una planta cuya semilla es consumida directamente, pero con un potencial útil para el desarrollo de medicamentos, alimentos funcionales y cosméticos, lo cual se da un valor agregado y alternativas de otros usos a esta planta amazónica.

Byrsonima Crassifolia (BC) es un árbol tropical de la familia Malpighiaceae ampliamente distribuida en América Central y del Sur (Martínez-Vázquez *et al.*, 1999). Sus hojas y corteza se han utilizado en medicina tradicional para tratar la tos, trastornos gastrointestinales, infecciones ginecológicas y de la piel, (Heinrich *et al.*, 1992), y las mordeduras de serpiente (Rastrelli *et al.*, 1997). Los estudios experimentales con las hojas y la corteza de esta especie mostraron una alta capacidad antioxidante del extracto hidro-alcohólico (Silva *et al.*, 2007a), efectos espasmogénicos (Bejar y Malone 1993), la actividad antiprotozoario (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007) y antiinflamatorio (Maldini *et al.*, 2009)

Los metabolitos secundarios como los fenoles totales, flavonoides, antocianinas, taninos, son modelos naturales que pueden ser utilizados para mejorar la vida del ser humano, así mismo, la importancia de los conocimientos etnobotánicos y de la medicina tradicional se confirma cuando se han encontrado varios fármacos que fueron descubiertos como resultado de estudios químicos para el aislamiento de las sustancias activas que motivaron el empleo de las plantas de origen en la medicina tradicional (Farnsworth y Gonzales, 1989).

Los fenoles, especialmente los flavonoides (Heim *et al.*, 2002) y los antocianos (Heim *et al.*, 2002; Moyer *et al.*; 2002; Schauss *et al.*; 2006) muestran gran capacidad de capturar radicales libres que causan el estrés oxidativo, atribuyéndoles a su vez, un efecto benéfico en la prevención de enfermedades, tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Tsuda *et al.*, 1994; Kuskoski *et al.*, 2005).

La presente investigación se hizo a partir de la corteza del Indano (*Byrsonima crassifolia*), para evaluar el contenido de antioxidantes fenólicos presentes en el extracto etanólico.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Byrsonima Crassifolia* (Indano)

2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Arbusto o pequeño árbol de 2 a 10 m de altura, con el tronco tortuoso, muy ramificado, con las ramas tocando el suelo o creciendo casi horizontalmente, corteza gruesa y superficie escamosa, inflorescencia en racimos, flores hermafroditas pentámeras, el fruto es una pequeña drupa globosa, de 1 a 2 cm de diámetro, epicarpio o cáscara delgada, color verde (inmaduro) y amarillo (maduro); la parte comestible constituida por el mesocarpio de color amarillo, suave y pastoso, con cerca de 0,5 cm de espesor y olor y sabor característicos; endocarpio ovalado, leñoso, conteniendo una, dos o tres semillas viables (Pennington y Sarukhán, 2005)

2.1.2. SINONIMIA.

La sinonimia de *Byrsonima crassifolia* es amplia, los que más se emplean son:

Byrsonima cumingana Juss.; *Byrsonima fendleri* Turcz.; *Byrsonima panamensis* Beurl.; *Byrsonima pulcra* Sesé.; *Malpighia crassifolia* L.; *Malpighia pulcra* Sesé, *Byrsonima cotinifolia* Kunth, *Byrsonima cubensis* Juss; *Byrsonima Karwinskiana*; *Byrsonima lanceolata*, *Byrsonima rufescens* Bertol .*Byrsonima cynerea* Dec., y *Byrsonima ferruginea*, entre otros (Pennington y Sarukhán, 2005.)

2.1.3. DISTRIBUCIÓN Y PRODUCCIÓN

El género *Byrsonima*, se distribuye desde México hasta el Norte de Sudamérica debido a la tolerancia de los arboles a un amplio rango de condiciones ambientales. La especie se distribuye en altitudes comprendidas entre los cero y 1600 metros, pero preferentemente de los ceros a los 500 metros (Martínez *et al.*, 1999).

2.1.4. FITOQUÍMICA

En el árbol se han detectado los siguientes metabolitos secundarios: triterpenos, β -amirina y un acetato triterpénico, taninos, fenoles, alcaloides, flavonoides; otros compuestos: proantocianidina y galato de proantocianidina.

En la corteza se han aislado: taninos, ácidos: oxálico; sustancias colorantes; glucósidos cardíacos, cardenólidos, leucoantocianinas, polifenoles, saponinas, flavonoides, triterpenos, β -amirina, birsonimol

Las hojas se han aislado: β -sisterol, ácido maslínico y elágico, flavonoides (catequina, epicatequina, guayaverina, hiperina, quercetina, y galoilgalactosido), ésteres aromáticos (metil galato), amino ácidos (alanina, ácido aspártico, prolina, valina, ácido pipercolico y 5-hidroxipipercolico) y un sulfonoglicolípido. La raíz contiene flavonoides, glucósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos (Cárces, 1996; Glasby, 1991).

2.1.5. FARMACOLOGÍA

Según Moreno, (2000), la decocción de la corteza tiene actividad contra *Epidermo phytonflocosum*, *Microsporum Canis*, *Microsporum gipseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* cuya Concentración Mínima Inibitoria (CMI) de 200 mg/ml y actividad fungistática. La corteza es la más activa contra bacterias y el etanol es el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento (6.8%); las bacterias más sensibles son *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexceri* y *Streptococcus pyogenes*.

El extracto de la planta completo no tiene actividad insecticida. El extracto etanólico tiene buena actividad nematocida. Otros estudios demuestran que el extracto de hojas y corteza tienen efectos espasmogénicos dosis dependiente.

2.1.6. USOS DEL INDANO

La producción de Indano se ha incrementado en la provincia de Lamas, los meses de enero a abril es el periodo en el que se produce en abundancia los frutos. La especie *Byrsonima crassifolia* tiene un sabor agrídulce y aceitoso. Se consume en forma natural, como refrescos, helados, dulce en pastas o en macerados con alcohol. También se consume mezclado con harina de yuca, en sopas o como relleno de carnes. En algunos países de América Central y en Florida, se cultiva como ornamental por el efecto decorativo de sus flores (Estrella, 1995).

Estudios demuestran que la corteza es astringente y tiene entre 10 y 25% de taninos también como cauterizante y hemostática, mientras que en infusión es utilizada para curar diarrea por los nativos Lamas de la selva alta del Perú. Los frutos también son empleados para obtener manteca comestible y tintes. El jugo del fruto verde se vuelve negro cuando es expuesto al aire y se utiliza como tinte. De la corteza y de los frutos se extrae un tinte color marrón claro, empleado en Guatemala para teñir las telas de algodón. En Panamá preparan un líquido fermentado de los frutos que denominan "chicha" (Estrella, 1995); y en el Perú los nativos de la Amazonia utilizan infusiones o la cocción de la corteza, como producto febrífugo, broncodilatador, astringente, antiinflamatorio, expectorante y antidiarreico, lo cual puede estar relacionado a que contiene un alcaloide tipo fenantroindolizidina, varios derivados fenólicos, además de los taninos y almidones (Loaiza, 2004).

2.2. RADICALES LIBRES

Millones de radicales libres bombardean diariamente nuestras células. El hecho de que necesiten tantos años para causar daños considerables en nuestro organismo, se debe a la eficacia homeostática de los sistemas enzimáticos que para neutralizarlos. Nuestro sistema de protección inmunitaria está luchando contra los radicales libres en todo momento (Flores, 2000).

El problema para el organismo humano se produce cuando tiene que tolerar de forma continua un exceso de radicales libres, los cuales aparte de ser producidos por el metabolismo normal son generados por varios factores que actúan o penetran sobre nuestro cuerpo, como por ejemplo, Las tensiones sociales, las presiones políticas y emocionales, la contaminación ambiental, la polución industrial y acústica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas, el consumo de ciertas grasas, estrés, falta de sueño, falta de ejercicio, etc., son algunos de los factores que incrementan excesivamente la generación de radicales libres. Este exceso supera la resistencia metabólica (capacidad de reponer su homeostasis) y no puede ya ser eliminado por el cuerpo (Flores, 2000).

Existen cada vez más pruebas de la intervención de los radicales libres y de otras moléculas reactivas en los procesos patológicos. La principal evidencia proviene de estudios epidemiológicos que muestran correlaciones estadísticas entre la incidencia de patologías y la presencia insuficiente por concentraciones bajas de nutrientes antioxidantes en el plasma sanguíneo o alimentos (Murray, 1997).

2.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes ceden a los radicales libres sus propios electrones salvando así nuestras células de sufrir daño. Entre los antioxidantes por excelencia encontramos al β -caroteno, la vitamina C, la vitamina E, y el Selenio. Según, Starke-Reed (2003), la vitamina E es un antioxidante importante en el organismo y actúa en la fase lipídica de las membranas en todas las células.

En la industria química se habían estudiado los antioxidantes, un grupo de compuestos caracterizados por su capacidad de oxidarse en lugar de otras sustancias presentes en el medio de reacción. Su uso varió, pasando de aditivos en la vulcanización del caucho hasta conservantes de alimentos. Sin embargo, fue solo hasta los años 60 cuando algunos estudios revelaron la importancia de los

antioxidantes en la salud, con publicaciones acerca del efecto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo en el cáncer (Prihoda, 1991).

La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento. Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno–EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas (Braz-Filho, 1972).

La principal justificación para el uso de un antioxidante es para extender la vida útil de los productos alimenticios, reducir los desechos y las pérdidas nutricionales al inhibir y retrasar la oxidación. Sin embargo, los antioxidantes no pueden mejorar la calidad de un producto alimenticio ya oxidado (Sherwin, 1978.).

Las ERO, según su propio nombre, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo (Braz-Filho, 1971).

Los antioxidantes, por lo tanto, son un grupo amplio de compuestos: vitaminas, compuestos fenólicos, minerales, colorantes naturales y enzimas. Muchos de los antioxidantes se encuentran en alimentos vegetales, por lo que es recomendable incluir frutas, legumbres,

tubérculos, verduras y hortalizas o cereales integrales en nuestra dieta (Hayasida *et al.*, 2008).

2.3.1. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

2.3.1.1. FRUTAS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES

Las frutas en general, además de presentar importante fuente de vitaminas, minerales y fibras, poseen compuestos con actividad antioxidante (Melo *et al.*, 2008), dentro de los cuales se destacan los compuestos fenólicos. Actualmente el consumo de frutas viene aumentando en virtud de su valor nutritivo y de sus efectos biológicos a la salud (Kuskoski *et al.*, 2006;). Las frutas poseen compuestos como vitamina C y E, carotenoides, clorofila y fitoquímicos, como compuestos fenólicos, flavonoides, glucósidos y taninos (Pellegrini *et al.*, 2006), que poseen relación con la prevención de ciertas dolencias y enfermedades cardiovasculares y circulatorias (Stoclet *et al.*, 2004) debido a su efecto antioxidante. Dietas ricas en frutas y vegetales están asociadas a un reducido riesgo de dolencias crónicas (Hertog *et al.*, 1997; Hollman *et al.*, 1996).

Algunos componentes existentes en las frutas pueden actuar como estimuladores del sistema inmunológico, moduladores de síntesis de colesterol y de la reducción de la presión sanguínea (Lampe, 1999); la ingestión de frutos silvestres provoca un impacto positivo en la salud del corazón, además de auxiliar en el combate de ciertas dolencias cardiovasculares, neurodegenerativas, envejecimiento, obesidad y de ciertos tipos de cáncer, tales como del esófago y gastrointestinal (Seeram, 2008). Es fundamental tener conocimiento que el valor de los compuestos antioxidantes presentes en las frutas es influenciado por diversos factores como cultivar, factores genéticos, estadios de maduración, condiciones climáticas y por el suelo. Además de eso, los compuestos bioactivos también son muy susceptibles a las reacciones de oxidación que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Robards, 1999).

Los compuestos fenólicos presentes en las bayas, frutos y vegetales son importantes, no solo en términos de calidad, una vez que influyen en la apariencia y en el sabor, pero también sobre el punto de vista terapéutico (Borowska y Mazur, 2008).

Las frutas de coloración rojo/azul son consideradas las más importantes fuentes de compuestos fenólicos en dietas alimentarias, porque presentan cantidades significativas de derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico como las antocianinas, los flavonoides, las catequinas y los taninos (hidrolizables o condensados) haciendo que muchos de estos compuestos demuestren efectos biológicos como acción antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y vasodilatadora (Degáspari y Waszczynskyj, 2004). Según Schreckinger *et al.*, (2010) comprobado que las bayas poseen una vasta gama de polifenoles como antocianinas fenólicas y taninos, además de compuestos nutritivos como los carotenoides y vitamina C (Kähkönen *et al.*, 2001).

Paralelamente, la extracción y la purificación de antioxidantes de fuentes naturales, ha tomado esencial uso para la utilización de esas sustancias como aditivos en alimentos, fármacos y cosméticos (Ramírez, 2008). Está evidenciado que la selección de un proceso adecuado de extracción puede además aumentar la concentración de compuestos antioxidantes en el extracto, remover componentes indeseables antes de la adición del compuesto en el alimento (Schwarz *et al.*, 2001).

Diversas técnicas de extracción utilizan solventes con polaridades diferentes, como por ejemplo metanol, agua y etanol entre otros, entretanto se debe considerar que extractos producidos a partir de la misma fuente, pero por medio de técnicas diferentes, resultan con un contenido de compuestos fenólicos variados (Mata *et al.*, 2007).

2.3.1.2. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES FENÓLICOS EN ALIMENTOS

Las propiedades antioxidantes y cardioprotectoras de los polifenoles se deben principalmente a que sus propiedades oxido-reductoras les permiten actuar como agentes donadores de hidrógeno y estabilizadores de radicales libres como oxígeno reactivo, hidroxilo y superóxido, implicados en las cadena de peroxidación lipídica, además de sus propiedades de quelación de hierro y metales de transición (Lee *et al.*, 2004).

La función de los antioxidantes marcadamente, es retrasar o prevenir la oxidación del sustrato (Shahidi, 2000), cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable. Los fabricantes de alimentos han utilizado antioxidantes de calidad alimentaria, principalmente de naturaleza fenólica, para evitar el deterioro de la calidad de los productos y para mantener su valor nutricional. Los antioxidantes también han sido de interés para profesionales de la salud, ya que ayudan al cuerpo a protegerse contra los daños causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies de cloro reactivos (RCS) asociados con las enfermedades degenerativas. Los antioxidantes actúan a diferentes niveles en la secuencia oxidativa implica moléculas de lípidos. Pueden disminuir la concentración de oxígeno, interceptar oxígeno atómico, prevenir la iniciación primera cadena al eliminar los radicales iniciales como los radicales hidroxilo, catalizadores de iones se unen metales, descomponer los productos primarios de la oxidación de las especies no radicales y romper las cadenas para evitar continua abstracción de hidrógeno a partir de sustratos (Shahidi, 2000, 2002).

Los antioxidantes naturales procedentes de fuentes dietéticas incluyen compuestos fenólicos y polifenólicos, entre otros. El mecanismo por el cual estos antioxidantes ejercen sus efectos puede variar dependiendo de las características de composición de los alimentos, incluyendo sus componentes menores. Además, los efectos beneficiosos para la salud de los alimentos vegetales que consume se han atribuido, en parte, a la presencia de compuestos fenólicos, que se asocian con contrarrestar el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas, así como un número de otras enfermedades degenerativas. Esto se logra mediante la prevención de la oxidación de lípidos, la mutación de unión y el ADN cruz de proteínas y, en etapas posteriores, el daño tisular. Aunque los compuestos fenólicos y algunos de sus derivados son muy eficientes en la prevención de la autooxidación, sólo unos pocos compuestos fenólicos se permite actualmente como antioxidantes alimentarios. Las principales consideraciones para la aceptabilidad de estos antioxidantes son su actividad y la toxicidad y / o carcinogenicidad potencial (Shahidi, 2000, 2002).

El proceso de autooxidación de los lípidos poliinsaturados en los alimentos implica una reacción en cadena de radicales libres que se inicia generalmente por la exposición de los lípidos a la luz, calor, radiación ionizante, iones de metal o catalizadores de metaloproteínas. La enzima lipoxigenasa también puede iniciar la oxidación. La ruta clásica de autooxidación incluye iniciación (producción de radicales libres de lípidos), propagación y terminación (producción de productos no radicales). Algunos compuestos fenólicos vegetales han sido recientemente considerados como antioxidantes. Los flavonoides, los compuestos antioxidantes más potentes de fenólicos vegetales, necesitan más investigaciones con el fin de explorar la viabilidad de su uso en alimentos y determinar sus consecuencias toxicológicas (Shahidi, 2000, 2002).

2.4. ALIMENTO NUTRACEUTICO

Es aquel que contiene compuestos que se ha demostrado que tienen efectos positivos en nuestra salud y que incrementan nuestra calidad de vida. Es cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o la parte de un alimento que provee un beneficio para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedad. Son productos de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida. Los alimentos nutraceuticos previenen las principales enfermedades crónicas degenerativas que son los infartos, embolias, hipertensión, diabetes, cánceres hormona dependientes (glándulas mamarias, próstata, tiroides, etc.) (Delgado y Paredes, 2003).

2.4.1. LOS ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS SE DIVIDEN EN TRES GRUPOS

1. **NUTRIENTES:** Estos son los azúcares y las grasas.
2. **COMPUESTOS QUÍMICOS:** Fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos (Omega3).
3. **PROBIÓTICOS :** microorganismos benéficos (lácteos) (Delgado y Paredes, 2003)

2.4.2. CRITERIOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

- Ser productos de origen natural.
- Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes
 - Que aporten efectos beneficiosos para la salud:
 - a. Mejora de una o más funciones fisiológicas.
 - b. Acción preventiva y/o curativa.
 - c. Mejora de la calidad de vida.
 - Que aporte estabilidad temporal.
 - Con análisis de estabilidad y toxicología.
 - Análisis químicos.

Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas (Serena, 2000).

2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glucósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua. Dada la naturaleza aromática de este compuesto fenólico, ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo (Lock, 1994).

2.5.1. COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

Los compuestos fenólicos en los alimentos y productos nutracéuticos se originan a partir de la fenilalanina y, en menor medida en algunas plantas, también a partir de tirosina (Van Sumere, 1989; Shahidi, 2000, 2002). Químicamente, los compuestos fenólicos pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Su presencia en los tejidos animales y otros materiales es generalmente debido a la ingestión de alimentos de origen vegetal. Los compuestos fenólicos sintéticos también pueden entrar en el sistema alimentario a través de su incorporación intencional con el fin de evitar la oxidación de sus componentes lipídicos.

Plantas y alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos como fenoles simples, incluyendo fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas. Junto con ácidos carboxílicos de cadena larga, compuestos fenólicos son también componentes de suberina y cutina. Estas sustancias más variadas son esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas y también actúan como antialimentaria y antipatógeno (Butler, 1992). La

contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de alimentos de origen vegetal también es bien reconocida.

Además, los compuestos fenólicos funcionan como antibióticos, pesticidas naturales, sustancias de la señal para el establecimiento de simbiosis con rizobios, atrayentes para los polinizadores, agentes de protección contra la radiación ultravioleta (UV), materiales para hacer las paredes celulares impermeables al gas y agua aislante y como materiales estructurales para dar a las plantas estabilidad.

Muchas de las propiedades de los productos vegetales se asocian con la presencia, tipo y contenido de sus compuestos fenólicos. La astringencia de los alimentos, los efectos beneficiosos para la salud de ciertos compuestos fenólicos o sus posibles propiedades antinutricionales cuando está presente en grandes cantidades son significativos a los productores y consumidores de alimentos. Por otra parte, las antocianinas se distribuyen ampliamente en los alimentos, especialmente en frutas, y también en los tejidos florales (Harborne y Williams, 2001). También pueden ser utilizados como nutracéuticos en la forma seca y pulverizada de determinadas frutas o frutos fuentes de subproductos. Estas antocianinas son responsables de los colores rojo, azul, violeta y colores púrpura de la mayoría de las especies de plantas y sus frutos y productos. Por ejemplo, después de su extracción, colorantes producidos a partir de la piel de uvas pueden ser utilizados por la industria alimentaria (Francis, 1993). Métodos de análisis de diferentes clases de compuestos fenólicos y polifenólicos (Hurst, 2002).

2.5.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos en la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil

fenólico de los alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Existen varias técnicas analíticas para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos que incluyen técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC) (Escarpa y González, 2001), y también se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez- Valverde *et al.*, 2000).

2.5.2.1. Técnicas de separación

a) Extracción

Los solventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol para glucósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como el éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden lipofílico; ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua, aunque en este último caso se presenta la desventaja de su alto punto de ebullición y presión de vapor que dificultan luego el ser removido rápida y completamente de extracto (Lock, 1994).

b) Cromatográficas

Las técnicas cromatográficas usadas para la separación de flavonoides o su detección son muy variadas en cuanto a las técnicas mismas; así como las condiciones en las cuales ellas puedan realizarse; la cromatografía en papel (CP), es la técnica más antigua, en la cromatografía de capa delgada (CCD), se utiliza adsorbentes como: celulosa, poliamida y

silicagel. La detección de flavonoides en ambas cromatografías (CP y CCD) puede hacerse por el color que desarrollan en el VIS o en el UV, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras las cuales se intensifica o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco. La cromatografía en columna (CC), es una técnica muy usual para purificaciones preliminares y para separaciones a escala preparativa de grandes cantidades de flavonoides, se utilizan los mismos adsorbentes que de la CCD (Lock, 1994).

2.5.2.2. Técnicas de identificación

a) Espectrofotométricas

Esta técnica es muy usada tanto para identificar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación, los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste en dos máximos de absorción en los rangos a 240-285 nm (Banda II, BII) y 300-550 nm (Banda BI) (Lock, 1994).

Los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez- Valverde *et al.*, 2000) y el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, esta técnica llegó a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.

Swain y Goldstein (1964), utilizaron diversos métodos espectrofométricos, y en base a la utilización, recomendaron

el ensayo de Folin-Ciocalteu como el reactivo más conveniente para la determinación espectrofotométrica de polifenoles totales (Escarpa y González, 2001).

2.6. FENOLES TOTALES

Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en frutas como las uvas, manzanas o peras, contienen hasta 200-300 mg de polifenoles por 100 g de fruta fresca. Los productos elaborados a partir de estas frutas también contienen polifenoles en cantidades significativas.

Los polifenoles incluyen un grupo de estructuras químicas que se caracterizan por presentar el núcleo aromático de benceno, clasificadas según el número de anillos de fenol que contengan y los elementos estructurales que actúen como sustituyentes. En general, los fenoles vegetales presentan estructuras complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera y pigmentos de flores y frutos (Pandey y Rizvi, 2009).

2.6.1. Origen

Los polifenoles son productos secundarios del metabolismo de las plantas y generalmente participan en mecanismos de defensa frente a la radiación ultravioleta o agresión de agentes patógenos. En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al amargor, astringencia, color, aroma, olor y estabilidad oxidativa. Se encuentran ampliamente distribuidos, habiéndose identificado más de 8000 estructuras químicas en varias especies vegetales (Pandey y Rizvi, 2009).

Todos los compuestos fenólicos derivan de un intermediario común, la fenilalanina, o de un precursor cercano, el ácido sikímico. En un principio se encuentran en forma conjugada, pudiendo llevar uno o más residuos azucarados unidos a los

grupos hidroxilo, aunque también aparecen uniones directas del azúcar a un carbono aromático.

Según, Formica y Regelson, (1995), en la formación de polifenoles participan dos rutas metabólicas:

1. Vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores.
2. Vía del ácido sikímico, dependiente de luz; se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa 4-P y el fosfoenolpiruvato (PEP). Mediante diversas modificaciones se obtiene el ácido sikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales.

Esta vía del ácido sikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaril CoA, precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

Ambas rutas metabólicas derivan del metabolismo de la glucosa. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos discurre de un modo similar a la de los ácidos grasos; sobre una molécula de acetil CoA se van adicionando sucesivamente unidades de malonilCoA, con pérdida de un átomo de carbono, de modo que por cada malonil utilizado se integran dos átomos de carbono.

Los enzimas que participan se hallan asociados, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos policétidos íntegramente formados. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno, son muy inestables y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

2.6.2. Clasificación

Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contengan y de sus sustituyentes. Así, pueden ser divididos en más de 10 clases diferentes (Wollgast y Anklam, 2000), aunque los principales grupos corresponden a ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. (Pandey y Rizvi, 2009).

Tabla N°1: Principales grupos de polifenoles

Clase	Esqueleto Básico
Fenoles simples	C_6
Benzoquinonas	C_6
Ácidos fenólicos	C_6-C_1
Acetofenonas	C_6-C_2
Ácidos hidrocínámico	C_6-C_3
Fenilpropanos	C_6-C_3
Cumarinas, isocumarinas	C_6-C_3
Cromonas	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Lignanos, neolignanos	$(C_6-C_3)_2$
Lignanos	$(C_6-C_3)_n$

Fuente: Pandey y Rizvi, (2009)

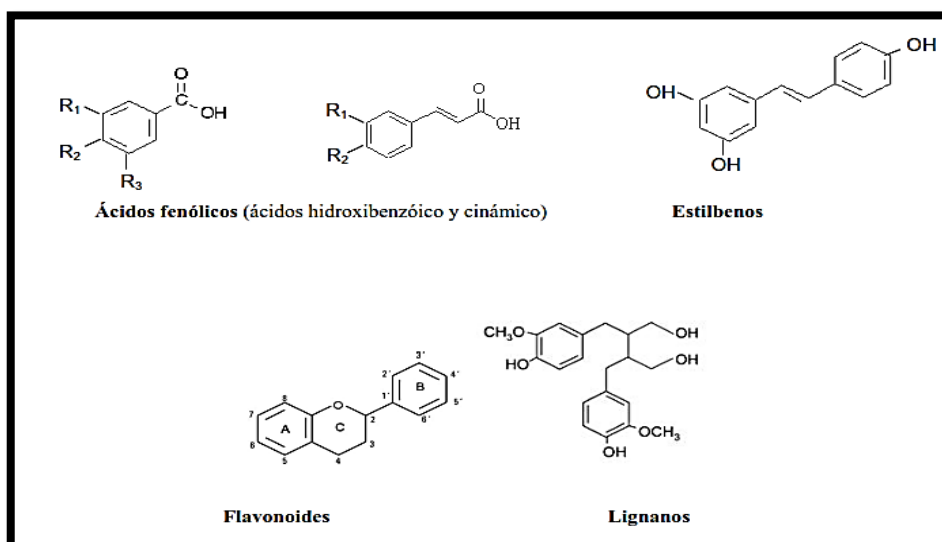


Figura 1: Estructura química de los principales grupos de polifenoles.

Fuente: Pandey y Rizvi, (2009)

En la tabla 1 y figura 1, se muestra que los fenoles se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico; así, podemos encontrar compuestos de tipo C₆-C₁ derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables.

De menor significación son los compuestos de tipo C₆-C₂, derivados del ácido fenilacético, como el ácido homogentísico. El grupo de fenoles simples más extenso es el C₆-C₃ que constituye los derivados de cinamoilo. Estos compuestos, junto con los de tipo C₆-C₁ y C₆-C₂, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales. Dentro del grupo C₆-C₃ se encuentran también las cumarinas compuestos bicíclicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes.

La distribución de los polifenoles en el vegetal a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme. Los compuestos insolubles se localizan en las paredes celulares, mientras que los polifenoles solubles se acumulan en las vacuolas. Algunos de ellos, como la quercetina, se encuentran en las plantas y en los productos derivados de las mismas como zumos, infusiones, vino, etc. mientras que las flavanonas y las isoflavonas se encuentran más restringidas. En la mayoría de los casos, los vegetales contienen mezclas complejas de polifenoles. Las capas más superficiales de las plantas contienen mayor cantidad de estos compuestos que las capas más internas.

Existen numerosos factores que afectan al contenido en polifenoles de los vegetales, como el grado de maduración en el momento de la cosecha y factores medioambientales y edáficos (exposición solar, pluviometría...), de procesado y almacenamiento. En general, se ha observado que el contenido en ácidos fenólicos disminuye durante la maduración, mientras que aumenta la concentración de antocianos (Pandey y Rizvi, 2009).

2.7. FLAVONOIDES

2.7.1. DEFINICIÓN

Los flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antoxantinas, aparecen frecuentemente revisados bajo diferentes aspectos en la literatura científica.

La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándares o con la literatura (Lock, 1997).

2.7.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las características generales de estos compuestos son:

- ✓ Solubilidad en agua y etanol
- ✓ Carácter fenólico.

Intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistema aromático y conjugado. (Lock, 1997).

2.7.3. PROPIEDADES

Se han descubierto más de 600 flavonoides y todos ellos tienen un papel muy importante en la alimentación humana, porque presentan propiedades medicinales muy interesantes.

Las propiedades más resaltantes son: actúan como antioxidantes, anticancerosas y cardiotónicas, poseen fragilidad capilar, son antitrombóticas, disminución del colesterol, protegen al hígado y al estómago, actúan también como antiinflamatorias y analgésicas antimicrobianas (Botanical, 1999).

2.7.4. ESTRUCTURA QUÍMICA

Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. (Lock, 1997).

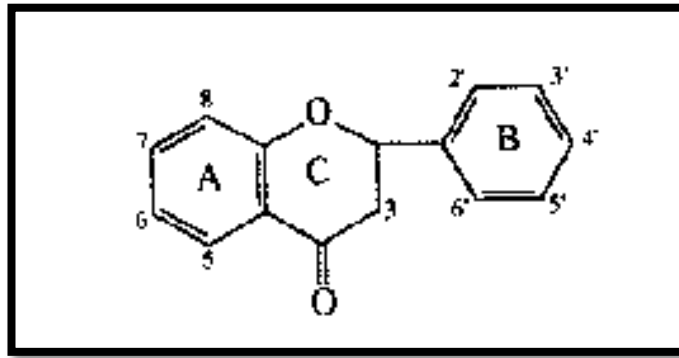


Figura N° 02: Núcleo básico de un flavonoide

Fuente: Lock, (1997)

2.7.5. CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, pueden clasificarse, según su esqueleto y vía metabólica, en:

- a) **Flavonoides**, derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4- benzopirona).

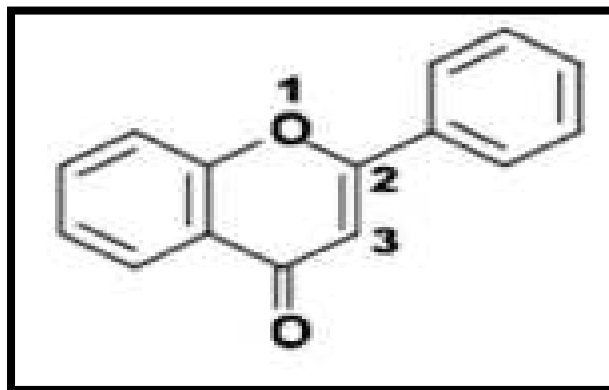


Figura N° 03: Estructura de flavonoide

Fuente: IUPAC, (1997)

- b) **Isoflavonoides**, derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4- benzopirona).

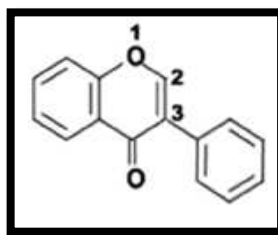


Figura N° 04: Estructura de un isoflavonoide

Fuente: IUPAC, (1997).

- c) **Neoflavonoides**, derivados de la estructura 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2- benzopirona).

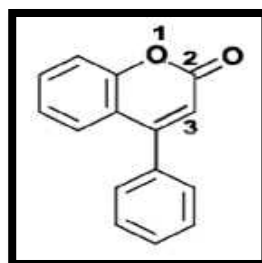


Figura N° 05: Estructura de un neoflavonoide

Fuente: IUPAC, (1997)

Dentro de los flavonoides, se reconocen 6 y quizás 7 clases principales, según los grupos funcionales que posean: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, los taninos condensados, y algunos autores consideran también a las auronas, que otros integran a las chalconas (Williams, 2004).

Los flavonoides se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y los flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y las auronas (Lock, 1997).

2.8. TANINOS

2.8.1. Definición

Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos. Se extraen de las plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, que luego se decanta y se deja evaporar a baja temperatura hasta obtener el producto final. Los taninos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro (Fenema, 1993).

2.8.2. Características

Compuestos químicos no cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y sabor astringente, se precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución. Dan coloraciones negro azuladas o verdosas con sales férricas y producen un color rojo intenso con ferrocianuro de potasio y amoníaco. Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas, ésta propiedad se denominada astringencia (Badui, 1993).

2.8.3. Funciones

Los taninos pueden inactivar las enzimas digestivas de los herbívoros y crear complejos agregados de taninos y proteínas de plantas que son difíciles de digerir. La alta cantidad de residuos de prolina le otorga a estas proteínas una conformación muy flexible y abierta, y un alto grado de hidrofobia que facilita su unión con los taninos (Corder *et al.*, 2001).

Los taninos de las plantas también funcionan como defensas contra los microorganismos. Por ejemplo, el corazón de madera muerta de muchos árboles contiene altas concentraciones de taninos que ayudan a prevenir el desmoronamiento por ataques de hongos y bacterias patógenos. (Corder *et al.*, 2001).

2.8.4. Propiedades

Los taninos tienen las propiedades de curación de heridas y cuidado de la piel, detención de la diarrea, actúan como antioxidantes y antibacterianas, son antídotos contra los venenos y reducen el colesterol (Fenema, 1993).

2.8.5. Estructura química.

En la figura 6 muestra la estructura de un tanino:

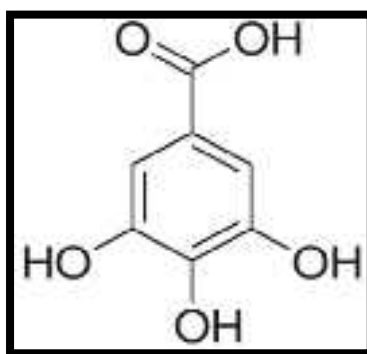


Figura N° 06: Estructura de un tanino

Fuente: Fenema, (1993)

2.8.6. Clasificación

Los taninos se han dividido en dos grupos: los hidrolizables y los no hidrolizables:

a) Los taninos hidrolizables o hidrosolubles:

Son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad, sólo basta ácido diluido para lograrlo. Los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno y dan coloración azul con FeCl_3 , no precipitan con soluciones de bromo (Badui, 1993).

En la figura 7 muestra la estructura del ácido gálico que es un tanino hidrolizable.

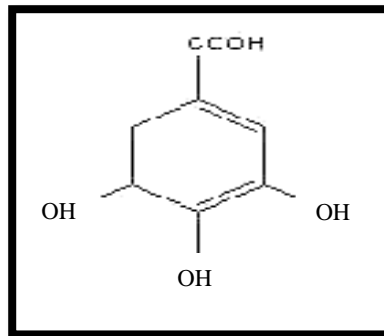


Figura N° 07: Estructura ácido gálico

Fuente: Badui,
(1993).

b) **Los taninos no hidrolizables o condensados:**

Son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina. Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas. Dan coloración verde con FeCl_3 y se precipitan con soluciones de bromo.

En la figura 8 muestra la estructura de un tanino no hidrolizable.

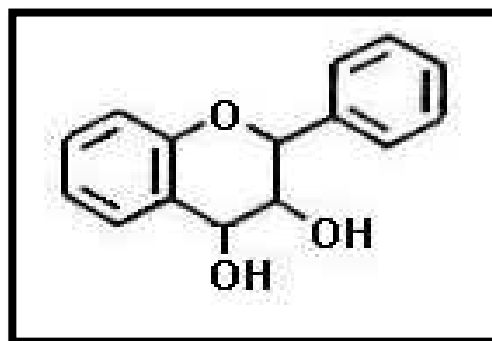


Figura N° 08: Estructura flavan-3,4-diol

Fuente: Badui, (1993).

2.8.7. Extracción y purificación

El tanino es un compuesto que se oxida al contacto con el aire, es inodoro y de sabor agrio, soluble en agua, alcohol y acetona; reacciona con el cloruro férrico y otras sales. Se pueden utilizar también técnicas cromatográficas dentro de ellas cromatografías; CCDP y CC y para la identificación las UV del espectrofotómetro, (Fenema, 1993).

2.8.8. PROANTOCIANIDINAS

Estos compuestos son incoloros, pero por medio de una modificación química ligera se transforman en su correspondiente antocianina coloreada. Las que se encuentran en la frutas son generalmente dímeros o trímeros del flavan-3,4-diol.a que la diferencia (Badui, 1999).

Las que se muestran en la figura 9 son algunas de las más comunes; se observa que la diferencia básica entre estas y sus correspondientes antocianidinas estriba en el hidroxilo del carbono y en las dobles ligaduras del grupo benzopirilo.

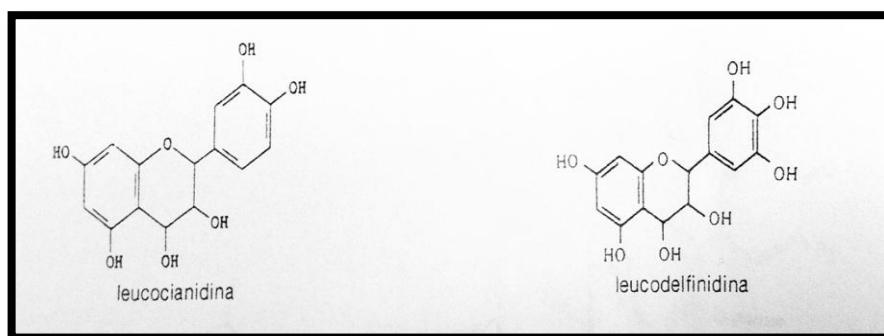


Figura N° 09: Proantocianidinas más comunes

Fuente: Badui, (1999).

Algunos tipos de peras provenientes de tierras con un pH bajo y un contenido alto de taninos desarrollan un color rosado durante sus tratamientos térmicos; esto es provocado por la modificación de la proantocianidina. Lo mismo ocurre en otros productos vegetales, como plátanos, vinos, etc., en donde además

contribuyen a la astringencia y sirven de sustrato en las reacciones de oscurecimiento enzimático (Badui, 1999).

2.8.9. CATEQUINAS

Las catequinas son bioflavonoides, teniendo como estructura básica un núcleo de flavón unido mediante un enlace β -glucosídico a un azúcar. Son moléculas que poseen un alto poder antioxidante, logrando proteger a nuestras células de los radicales libres y el estrés oxidativo. Las catequinas, entre otros flavonoides, son generadas por las plantas en su formación, como protección contra factores ambientales dañinos, como por ejemplo los insectos, los hongos, la radiación, la luz ultravioleta e incluso predadores herbívoros. Algunos de estos factores de protección están constituidos por auténticas fitotoxinas, mientras que otros son antioxidantes que en recientes investigaciones han demostrado que son 100 veces más efectivas que la vitamina C y 25 veces más potentes que la vitamina E (en cuanto a su poder antioxidante) (Montana, 2012).

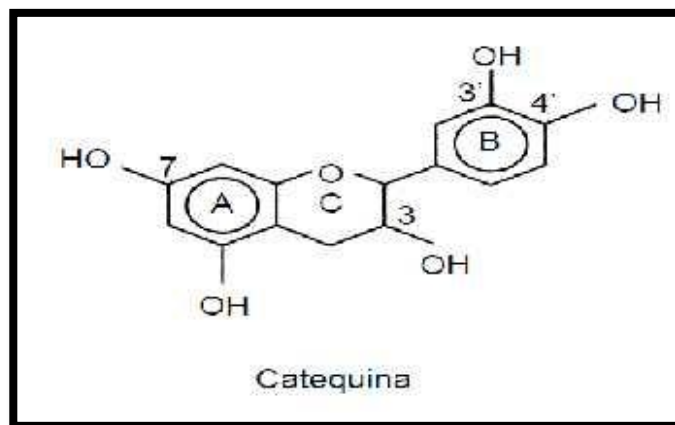


Figura N° 10: Catequina.

Fuente: Martínez-Flores *et al.*, (2002).

2.9. ANTOCIANINAS

Estos compuestos, al igual que los flavonoides y las betalaínas, son pigmentos hidrosolubles con características de glucósidos; están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglucona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace B – glucosídico. La estructura química básica de estas agluconas es el ion flavilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); por su posición trivalente del oxígeno, el alivio normalmente funciona como catión. Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa,, la xilosa y la arabinosa y, ocasionalmente, la gentiobiosa, la rutinosa y la soforosa; todo ellos se unen a la antocianidina principalmente por medio del hidroxilo de la posición 3, y en segundo término, de la 5 o de la 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, estos se localizan en los hidroxilos 3 y 5, producción una estructura que generalmente es más estable que cuando solo contienen un solo monosacárido (Badui, 1999).

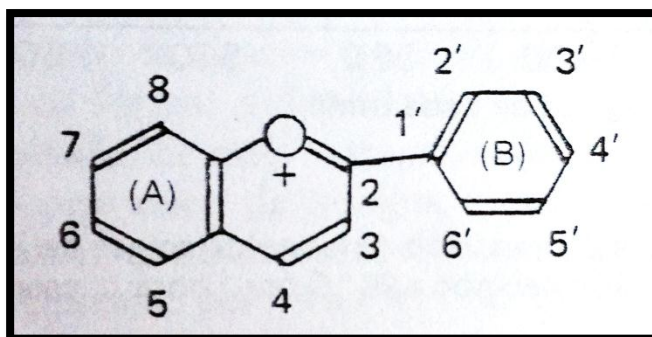


Figura N° 11: Grupo Flavilio

Fuente: Badui, (1993)

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen ,las más importante son la pelargonidina, la delphinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de esas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas que abundan en la naturaleza. Es muy común que una misma antocianidinas interaccione con más de un hidrato de

carbono para formar diferentes antocianinas. Son responsables de los colores rojos, anaranjado, azul y purpura de las uvas, manzanas, rosa, fresa y muchos otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores, pero también se pueden localizar en la parte carnosa, como en las fresas y ciruelas.

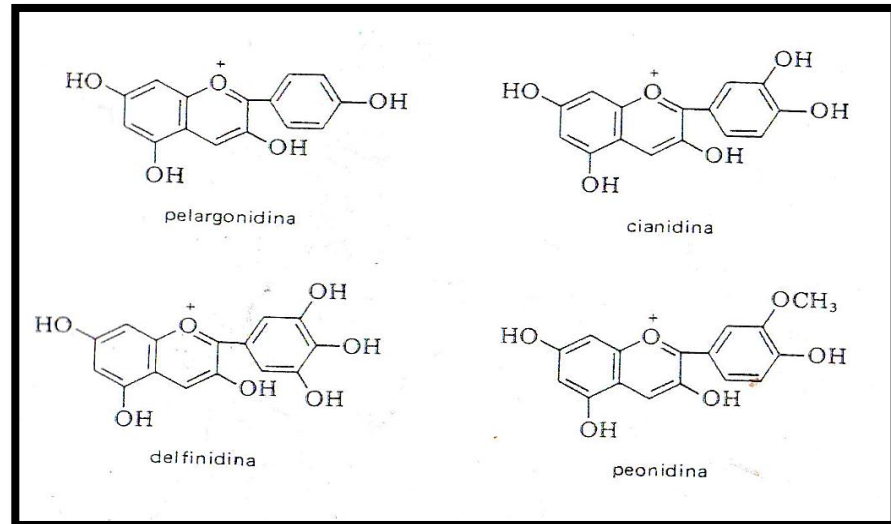


Figura N° 12: Las Antocianidinas más importante

Fuente: Badui, (1993)

Debido a que las antocianidinas no existen en estado libre en los alimentos, su presencia es indicio de una posible hidrólisis química o enzimática del enlace glicosídico del pigmento; esta reacción no necesariamente causa la pérdida del color, pero la aglucosa se vuelve más sensible a muchos factores externos, e incluso puede precipitar, en ambos casos el color se ve fuertemente afectado después de algún tiempo (Badui, 1999).

2.9.1. EXTRACCIÓN.

Según Ortiz- Aguikera *et al.*, (2011), la extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (HCL 1M al 15%) con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido. No hay diferencia significativa en lecturas de absorbancia o eficiencia de extracción entre el etanol y metanol (Abdel-Aal y Hucl, 1999). Es

preferible usar etanol ya que es menos tóxico, particularmente en usos alimenticios y ensayos clínicos. Adicionalmente, si los extractos contienen materiales lipídicos, la adición de un solvente orgánico tal como hexano al extracto puede eliminar algunas sustancias que contenga dichos materiales. El HCL puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acil en antocianinas aciladas, especialmente en aquellas con ácidos dicarboxílicos tales como ácido malónico, por lo que el uso de ácidos débiles es deseable, tal como ácido tartárico o cítrico para mantener los sustituyentes dicarboxílicos intactos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009; Escribano-Bailon *et al.*, 2004). El pH también ha mostrado que tiene una influencia significativa sobre el color de los extractos de antocianinas, las lecturas de absorbancia y la recuperación del extracto. A valores de pH más bajos (pH < 2), los extractos de trigo azul y morados exhibieron un cambio de color rojo a rojo oscuro después de la extracción, mientras a pH más alto (pH > 4), los extractos presentaron un color amarillo (Abdel- Aal y Hucl, 1999).

2.9.2. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Según Ortiz- Aguilera *et al.*, (2011), la técnica empleada comúnmente es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que esta permite la separación simultánea, la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailon *et al.*, 2004). Las columnas (diámetro interno 4.6 mm y largo 100-300 mm) son usualmente mantenidas a temperatura ambiente, y los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo (Zhang *et al.*, 2004; Horbowicz *et al.*, 2008).

Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm y la identificación de antocianinas está basada en

los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta- visibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros tales como delphinidina-3-glucósido, delphinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles. El contenido total de antocianinas es calculado en $\mu\text{g/g}$ usando una curva estándar para cianidina-3-glucósido o delphinidina-3-glucósido (las antocianinas más comunes en granos) (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina puede proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación (Costa *et al.*, 2000).

Las antocianinas tienen un rango de absorción amplio al final del azul del espectro visible con una absorción máxima observada en las regiones de 500-535 nm (Abdel-Aal *et al.*, 2006). En adición, la electroforesis capilar (CE) ha sido usada para separar los compuestos iónicos de antocianinas por su carga (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). El uso de la CE en la separación de antocianinas es bastante nueva, pero promisoria debido a la alta hidrosolubilidad de estos compuestos. La CE ha sido empleada para la determinación cuantitativa de antocianinas en vino como una alternativa de la RP-HPLC (Saenz-Lopez *et al.*, 2003).

2.9.3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.

Según Ortiz- Aguikera *et al.*, (2011), las propiedades espectrales son a menudo usadas para la caracterización de antocianinas, especialmente para identificar el tipo de antocianina. El análisis espectrométrico UV es la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas. El espectro de absorción de las antocianinas depende del pH. La absorción máxima a 520-540 nm en la región visible

es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas (Horbowicz *et al.*, 2008). La espectrometría de masas (MS) es una técnica usada comúnmente que permite la identificación de antocianinas determinando la masa de los iones moleculares en la muestra y los fragmentos de la separación de estos compuestos a través de la aplicación de energías ionizantes más altas (Escribano-Bailon *et al.*, 2004). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es usada para confirmar la identidad de los compuestos de antocianinas en plantas y fluidos biológicos. La LC-MS combina la separación sobre el sistema LC con la selectividad y sensibilidad del detector MS permitiendo la identificación de componentes individuales de una mezcla de compuestos tales como extractos de plantas o fluidos biológicos (Costa *et al.*, 2000). Otras técnicas las cuales han sido usadas para la identificación de antocianinas incluyen la técnica de espectrometría de masas de ionización electrospray (ESI-MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) (Escribano-Bailon *et al.*, 2004). La ESI-MS es usada para la caracterización de antocianinas en matrices alimenticias complejas y es especialmente útil para la detección de metabolitos de antocianinas de nivel bajo en plasma humano (Horbowicz *et al.*, 2008). La NMR es un método poderoso usado para la elucidación estructural de antocianinas tales como las antocianinas aciladas con derivados ramnósidos encontrados en algunas frutas como bayas negras y compuestos menores en análisis de vinos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009; Kosir y Kidric, 2002).

2.9.4. ANTOCIANINAS COMO INGREDIENTES ALIMENTICIOS

Según Ortiz- Aguikera *et al.*, (2011), las antocianinas se acumulan en mayor concentración en flores y frutas, pero también están presentes en hojas, tallos, órganos de almacenamiento y granos. Varias bayas y grosellas negras son las fuentes más ricas en antocianinas, aunque la berenjena y los granos pigmentados morados y azules también contienen altas cantidades de

antocianinas. La enorme presencia de antocianinas en frutas, vegetales y vinos rojos resulta en una ingesta alta para los humanos. Dependiendo del país y de los hábitos nutricionales de los individuos, la ingesta diaria de antocianinas ha sido estimada en el rango de varios miligramos a cientos de miligramos por persona (Horbowicz *et al.*, 2008). La ingesta de antocianinas se está incrementando de manera significativa debido a que los extractos y jugos de frutas y vegetales con alto contenido de antocianinas están llegando a ser mucho más disponibles comercialmente hoy en día, y los beneficios a la salud de las antocianinas han llegado a ser evidentes. Las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio. Por ejemplo, las antocianinas del trigo azul, del grano entero o en forma aislada son térmicamente más estables a pH 1 y su degradación no es significativa más baja a pH 2 que comparada a pH 5 (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Esto podría explicar el principal uso de extractos de antocianinas, tales como pigmentos de uva en bebidas y bebidas no alcohólicas, donde aproximadamente 3 kg de extracto de antocianina al 1% añadido a 1000 L de bebida puede impartir un color rojo profundo. Actualmente, la mayoría del maíz pigmentado es usado para ornato debido a su apariencia colorida donde solamente una pequeña cantidad está siendo utilizada en la producción de tortillas coloreadas azul y rosa. El trigo morado es resquebrajado en grandes piezas, las cuales son distribuidas sobre el exterior del pan multigrano (Bezar, 1982).

Adicionalmente (Abdel-Aal *et al.*, 2006) reportaron que los granos de maíz pigmentado tales como azul, rosa y morado tienen cantidades relativamente altas de antocianinas, especialmente el maíz morado (1277 $\mu\text{g/g}$) proyectando una promesa para el desarrollo de alimentos funcionales y/o colorantes naturales. Similar a otros compuestos bioactivos, el

medio ambiente en el cual ellos son cultivados es determinante para tener una influencia sobre la composición y concentración de antocianinas. Por lo tanto, durante la producción del cultivo se deben hacer esfuerzos para aumentar al máximo el contenido de antocianinas para frutas y cereales (Awika *et al.*, 2004). Extractos alimenticios ricos en antocianinas han sido incorporados y desarrollados dentro de suplementos alimenticios dietéticos. Por ejemplo, extractos de antocianinas de maíz morado han sido incorporados como un suplemento dietético antioxidante con recomendaciones para promover la salud, apariencia más joven y una piel más radiante (Shipp y Abdel-Aal, 2010).

Las antocianinas también están siendo vendidas como un suplemento llamado Medox, el cual incorpora una cantidad concentrada de cianidin-3-glucósido y delphinidin-3-glucósido extraídos de bayas noruegas (*Vaccinium myrtillus*) y grosellas negras (*Ribes nigrum*) (Biolink Group, 2009). El arroz rojo también está siendo fermentado y comercializado como un suplemento dietético y comercializado como Cholestin para ayudar a reducir los niveles de colesterol (Pharmanex, 2009). Adicionalmente, el pan de trigo azul puede ser procesado para producir un polvo de trigo azul rico en antocianinas como un suplemento dietético (Abdel-Aal *et al.*, 2006). Por todo lo anterior, las antocianinas gradualmente están siendo incorporadas dentro de productos alimenticios y bebidas como colorantes, alimentos funcionales o suplementos alimenticios. El aumento en el contenido de antocianinas con mayor estabilidad y vida de anaquel prolongada incrementará las aplicaciones alimenticias, el consumo total y con ello incrementar su efecto benéfico en la salud humana (Shipp y Abdel- Aal, 2010).

2.10. ANÁLISIS PARA ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

2.10.1. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El método Folin-Ciocalteu desarrollado por (Folin y Ciocalteu, 1927 y Sellappan *et al.*, 2002) y modificado por (Singleton y Rossi 1965), para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de muestra.

Folin: Mo (VI) (amarillo) + e- (de AH) → Mo (V) (azul)

$$\lambda_{\max} = 765 \text{ nm}$$

Reactivo de Folin, en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con una e- donada por un antioxidante.

Una de las modificaciones al método propuesta por (Singleton y Rossi 1965), implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EAG). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecuico y ácido ferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura. (Prior, Wu y Schaich, 2005)

Pese a esto, el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el

valor de EAG para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas (Brat, 2006); por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados.

2.10.2. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.

La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés debido a que se ha encontrado que poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anti cancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes ya que retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de estos. Todos estos efectos en la salud atraen la atención de incorporar éstos compuestos a los productos alimenticios. (Carrol *et al.*, 1999; Maeda-Yamamoto *et al.*, 1999 ; Kang *et al.*, 2006). Una manera sencilla de cuantificar la concentración de flavonoides en especies vegetales se basa el método espectrofotométrico UV-Vis. Indicado por Sotero y García, (2009) donde se realiza lecturas a 474 nm del extracto etanólico previamente diluido usando agua destilada como blanco, usando quercetina como patrón de flavonoides y expresando los resultados en mg de quercetina/100 g de muestra.

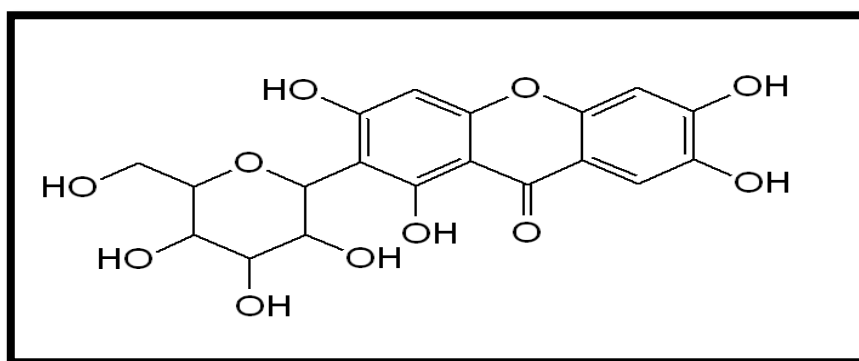


Figura N°13: Estructura de la quercetina

Fuente: Sotero y García (2009).

2.10.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentra (Wrolstad, 2000); (Delgado y Paredes, 2003). Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración de las antocianinas, y la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales.

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas está o no polimerizadas (Giusti y Wrolstad, 2001). La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Estas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm). Los resultados se expresan como cianidina-3-glucósido.

El método de pH-diferencial propuesto por Giusti y Wrolstad, (2001), permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias.

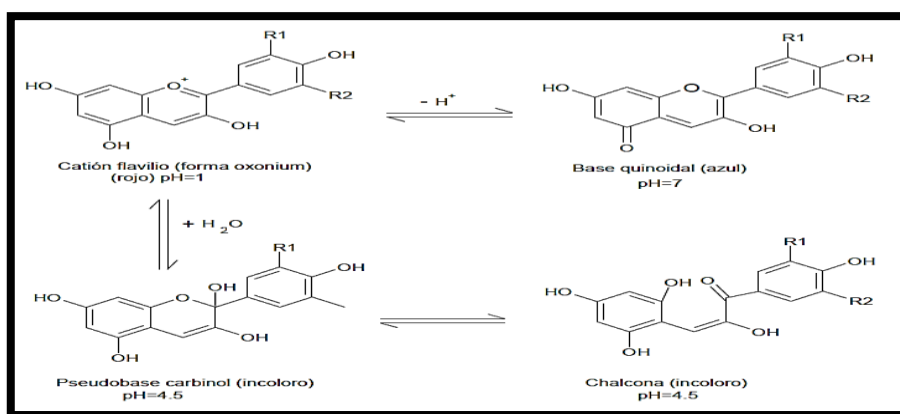


Figura N° 14: Estructura de antocianinas a diferentes pH's

Fuente: Giusti y Wrolstad (2001).

2.10.4. DETERMINACIÓN DE TANINOS.

El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición *meta* del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina. El metanol, disolvente usado para el ensayo de la vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente.

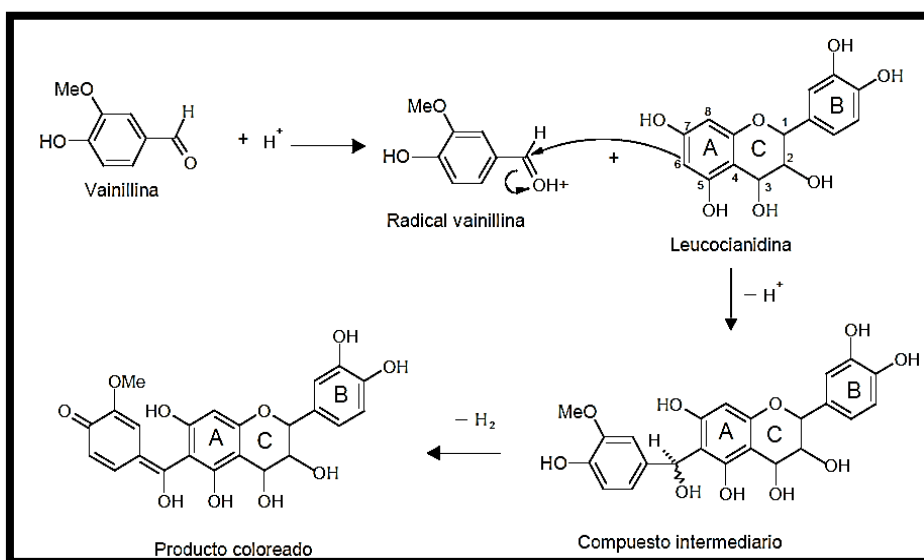


Figura N° 15: Mecanismo de reacción de vainillina con taninos.

Fuente: Shahidi y Naczk (1995).

El ensayo de la vainillina en metanol es más sensible para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 μg con precisión y exactitud mayores a 1 μg cuando la concentración

óptima de reactantes y disolventes son elegidos (Shahidi y Naczk, 1995).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza figura 15. La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles (Shahidi y Naczk, 1995).

2.10.5. ENSAYO DEL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2- picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 16, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH• ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la 16 literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están

basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha *et al.*,2012).

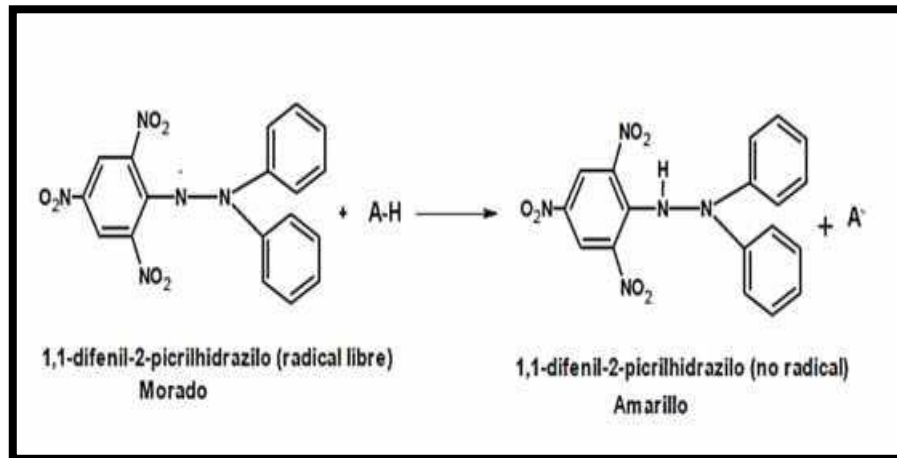


FIGURA N° 16: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el Antioxidante (Alam *et al.*, 2012).

2.10.5.1. LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DPPH• SE HAN PRESENTADO DE DIFERENTES MANERAS

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC50), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC50 cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado (Deng *et al.*, 2011). El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.

DPPH: es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos

antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC50 que van en un rango de 1.15 min (Ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).

La reacción cinética entre el DPPH: y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC50.

La reacción de DPPH: con eugenol fue reversible, lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

2.11. ESPECTROFOTOMETRIA

La radiación electromagnética puede clasificarse según la longitud de onda o de frecuencia. La frecuencia y longitud de onda están relacionadas por la siguiente fórmula:

$$\lambda \nu = c$$

Donde λ es la longitud de onda (cm), ν es la frecuencia y c es la velocidad de luz (3×10^{10} cm/s). Las unidades de la longitud de onda son generalmente nanómetros, pero también pueden utilizarse Angstroms, milimicra o centímetros. Muestras los intervalos de longitudes de onda para las diversas categorías de radiaciones electromagnéticas

$$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \text{ } \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ cm} = 10^{-2} \text{ m}$$

TABLA N° 02. Clasificación de la radiación Electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas. (Miller, 2003).

Región	Ratos x	Ultravioleta	Visible	Infrarrojo	Microondas
Longitud de onda, nm	0.1-100	100-400	400-800	800-100000	10^5 - 10^3
Efecto sobre la molécula	Excitación de los electrones de sub.	Excitación de los electrones de	Excitación de los electrones de	Aumento de las vibraciones moleculares.	Aumento de las rotaciones moleculares.

Las especies químicas interactúan electromagnéticamente en formas que reducen la intensidad de la radiación. Los efectos de la interacción varían con la longitud de onda de la radiación y la naturaleza de las especies químicas, e incluyen transiciones en las vibraciones moleculares, las rotaciones moleculares y en los niveles de energía.

2.11.1. PARÁMETROS DE MEDICIÓN

2.11.1.1. LA ABSORBANCIA (A)

Es el logaritmo en base diez del recíproco de la transmitancia (T), en el que el disolvente puro es el material de referencia; esto es, $A = \log_{10} 1/T = -\log_{10} T$. Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorción o emisión de energía EMR a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlaces, rotaciones moleculares y transición de electrones entre orbitales de átomos y moléculas.

La espectrofotometría de absorción de infrarrojos es adecuada para análisis orgánicos, pues los enlaces en alquenos, ésteres, alcoholes y otros grupos funcionales tienen fuerzas muy diferentes y absorben la radiación de infrarrojos en una gran variedad de frecuencias o energías. Esta absorción se refleja en el espectrógrafo en forma de picos. No se deben tomar medidas de absorbancias muy bajas o muy altas puesto que disminuye la

exactitud del método. La absorbancia es adimensional y generalmente se presenta con mínimo tres decimales, algunos instrumentos permiten obtenerla con cuatro decimales (Manfred, 1999).

2.11.1.2. ÍNDICE DE ABSORBANCIA

Es el cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en gramos por litro, y la longitud de la trayectoria de la energía luminosa (b) expresada en centímetros. No debe confundirse con los términos extinción específica o con el coeficiente de extinción. En otro medio distinto al vacío la velocidad de propagación es menor y la relación de la velocidad de propagación en el vacío a la velocidad en cualquier otro medio, v_i , es lo que se conoce como índice de refracción (Manfred, 1999).

2.11.1.3. LONGITUD DE ONDA

La distancia entre dos puntos consecutivos de una onda que tienen el mismo estado de vibración. La longitud de onda representa un concepto fundamental en la resolución de cualquier tipo de movimiento ondulatorio, y puede variar de valores muy grandes por ejemplo, cientos de metros para radio ondas largas a valores muy pequeños por ejemplo, de millonésimas de millón (10^{-12}) para los rayos gamma. Las crestas y los valles son aquellos lugares en los que el movimiento transversal es máximo. La longitud de onda es la distancia entre dos compresiones o enrarecimientos consecutivos.

Las longitudes de onda más cortas del espectro visible corresponden a la luz violeta y las más largas a la luz roja y entre estos extremos se encuentran todos los colores del arco iris.

Longitud de onda: Se escoge mediante el registro y/o la observación de la curva espectral o espectro de la sustancia que indicará si es adecuado tomar la longitud de onda de máxima absorción u otra banda característica de la sustancia como longitud de onda para realizar las medidas, la longitud de onda escogida se conoce como longitud de onda analítica (Manfred, 1999).

2.11.1.4. CURVA ESPECTRAL

Curva espectral de una sustancia química indica las características de absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda. En muchas ocasiones la curva espectral se presenta como Absorbancia vs longitud de onda y el espectro se denomina espectro de absorción, o en función de la transmitancia, denominándose el espectro, espectro de transmisión (Manfred, 1999).

Resulta de la retención de cantidades discretas de energía radiante por la capa de material interpuesta en la trayectoria de la radiación, aunque la energía absorbida corresponde a una misma longitud de onda se observa una banda de absorción y no líneas, así la curva del espectro está constituida por las lecturas que realiza el aparato para reproducir un gráfico en función de una longitud de onda específica, con el fin de apreciar los trazos que capta el espectrofotómetro. Así La determinación cuantitativa de una especie, con base en observaciones que dependan de la cantidad de radiación absorbida dependen de la comparación entre el valor de la absorción de un patrón de referencia y la absorción de la muestra (Manfred, 1999).

Los espectrofotómetros deben permitir efectuar la comparación entre la señal obtenida por una mezcla que no contiene el analito y otra que si lo tiene para poder tener la señal de esa diferencia. Así el registro de la variación del coeficiente de absorción molar, de la absorbancia A , o de la transmitancia T , en función

de la longitud de onda origina el "espectro" o curva espectral de una sustancia química que indica las características de absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda. Generalmente la curva espectral se presenta como "Absorbancia vs longitud de onda" y el espectro se denomina espectro de absorción, o en función de la transmitancia, denominándose espectro de transmisión (Manfred, 1999).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de ingeniería de alimentos de la Planta Piloto, Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicada en la Av. Augusto Freyre N° 610, Provincia de Maynas, distrito de Iquitos.

3.1. MATERIALES

3.1.1. Corteza del *Byrsonima crassifolia* (INDANO)

La corteza del *Byrsonima crassifolia* (INDANO) se obtuvo de la comunidad de LAMAS - Distrito de Lamas – Provincia de Lamas - Departamento de San Martín, PERÚ, ubicada GPS 6°25'27.513 " S 76°30'30.082" O.

3.1.2. EQUIPOS

Los equipos utilizados en la tesis se consignan en la tabla 3

Tabla N° 03: Equipos y Materiales usados en la tesis

N°	EQUIPOS/MATERIALES	MARCA	MODELO	PROCEDENCIA
01	BALANZA ANALITICA Max= 320 g	SARTORIUS	CP324S	ALEMANIA
02	ESPECTOFOTÓMETRO UV- VISIBLE	THERMOSPECTRONIC	Génesis 6, 100-240 v, 50/60 Hz	USA
03	VORTEX	MCR	VM - 1000	-
04	MICROPIPETAS 2 - 20 µl	1112356 ^a	DragonLab	EEUU
05	MICROPIPETAS 10 - 100 µl	11120618	DragonLab	EEUU
06	MICROPIPETAS 200 - 1000 µl	1112358 ^a	DragonLab	EEUU
07	MICROPIPETAS 10 - 100 µl	11120618	DragonLab	EEUU
08	CELDA DE CUARZO UV-VISIBLE	-	-	-
09	ROTAVAPOR	BÜCHI	R - 205	ALEMANA
10	REFRIGERADOR	-	-	-

11	BALANZA DE PLATILLOS CAP. 1 KG	-		-
12	PROBETAS 10 ML	-	-	-
13	PROBETAS 100 ML			
14	PROBETAS 250 ML	-	-	-
15	PIPETA VOLUMETRICAS 1 ML			
16	EMBUDOS	-	-	-
17	BURETA 25 ML			
18	BURETA 50 ML	-	-	-
19	MATRAZ ERLLENMEYER			
20	MORTERO Y PILON			
21	FIOLAS 10 ML COLOR AMBAR			
22	MATRAZ AFORADO 50 ML			
23	CRISOLES			
24	PIPETA GRADUADA 50 ML	-	-	-

3.1.3. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en la tesis se consignan en la tabla 4

Tabla N°04: Insumos usados en la tesis

N°	REACTIVO	% PUREZA	MARCA
01	HIDRÓXIDO DE SODIO A.C.S.	97	SPECTRUM
02	NITRATO DE ALUMINIO	-	SPECTRUM
03	ÁCIDO FORMICO	95-97	MERCK
04	FOLIN CIOCALTEU	-	MERCK
05	ACIDO GALICO	99.9	MERCK
06	VAINILLINA	99	SIGMA ®
07	CARBONATO DE SODIO ANHIDRO A.C.S.	99.87	QUIMICA MEYER ®
08	ALCOHOL PURO	95%	D&R
09	METANOL ABSOLUTO	≥ 99.7	MERCK
10	ACIDO FORMICO	98-100	MERCK
11	ACIDO CLORHIDRICO	37	SIGMA ®
12	CLORURO DE POTASIO	99.5	SIGMA ®

13	ACETATO DE SODIO	99.5	MERCK
14	ACETATO DE POTASIO	99	LOBACHEMIE
15	DPPH	93	MERCK

3.2. TIPO Y DISEÑO MUESTRAL

Para el análisis de estudio el método a emplearse es descriptivo experimental, se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado con un factor de estudio:

F = Tipo de extracción.

A = Etanol

F = Metabolito secundario

A = Fenoles totales

B = Antocianinas

C = flavonoides

D = Taninos condensados

Por lo tanto se tendrá lo siguiente:

4 x 1 = 4 Tratamientos

4 x 3 = 12 Experimentos por cada muestra (corteza)

3.3. DISEÑO MUESTRAL

TIPO DE EXTRACCION	METABOLITO SECUNDARIO			
	Fenoles totales	Antocianinas	Flavonoides	Taninos condensados
ETANOL	4	8	10	14

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.4.1. Población

La corteza del *Byrsonima crassifolia* (INDANO) se obtuvo de la comunidad de LAMAS - Distrito de Lamas – Provincia de Lamas - Departamento de San Martín, PERÚ.

3.4.2. Muestra

La muestra que se tomaron en cuenta para la investigación fue del extracto obtenido del solvente con la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

3.5. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

3.5.1. Identificación de la muestra vegetal:

La identificación de la muestra vegetal se realizó en el “Herbarium Amazonense” por el profesional responsable (ver anexo 10) posteriormente fue depositado en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos Facultad de Ingeniería Alimentaria de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) , ubicado en la Planta Piloto, Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

La figura 17 muestra el flujograma para la obtención de los extractos y posterior análisis:

- **Materia prima.-** Se utilizó la corteza de la especie *Byrsonima crassifolia* (Indano).
- **Pesado.-** Se realizó el pesado de corteza (265 g) para obtener datos exactos de rendimiento.
- **Maceración.-** Se realizó la maceración por un tiempo de 7 días con 3 repeticiones consecutivas colocando la materia prima en un frasco grande, utilizando para ello 3.5 litros de etanol 95%.
- **Extracción con disolventes.-** Se utilizó como disolvente en la extracción: etanol
- **Concentración.-** El disolvente fue removido a 60°C, -700 mbar de presión reducida en un rotavapor a 60 rpm, se completó la eliminación del disolvente residual secado a temperatura ambiente y exenta de luz.
- **Molido.** El extracto seco fue molido en un mortero con pilón obteniéndose 19 g en forma de polvo.

- **Envasado.** El producto fue envasado en recipientes opacos y fueron selladas herméticamente para evitar ganancias de humedad u otros efectos determinantes, y así mantener la calidad para los análisis respectivos.
- **Almacenado.** El producto terminado fue almacenado en un ambiente fresco (18°C a 24°C), y oscuro para que los rayos de luz no afecten la composición química del producto.

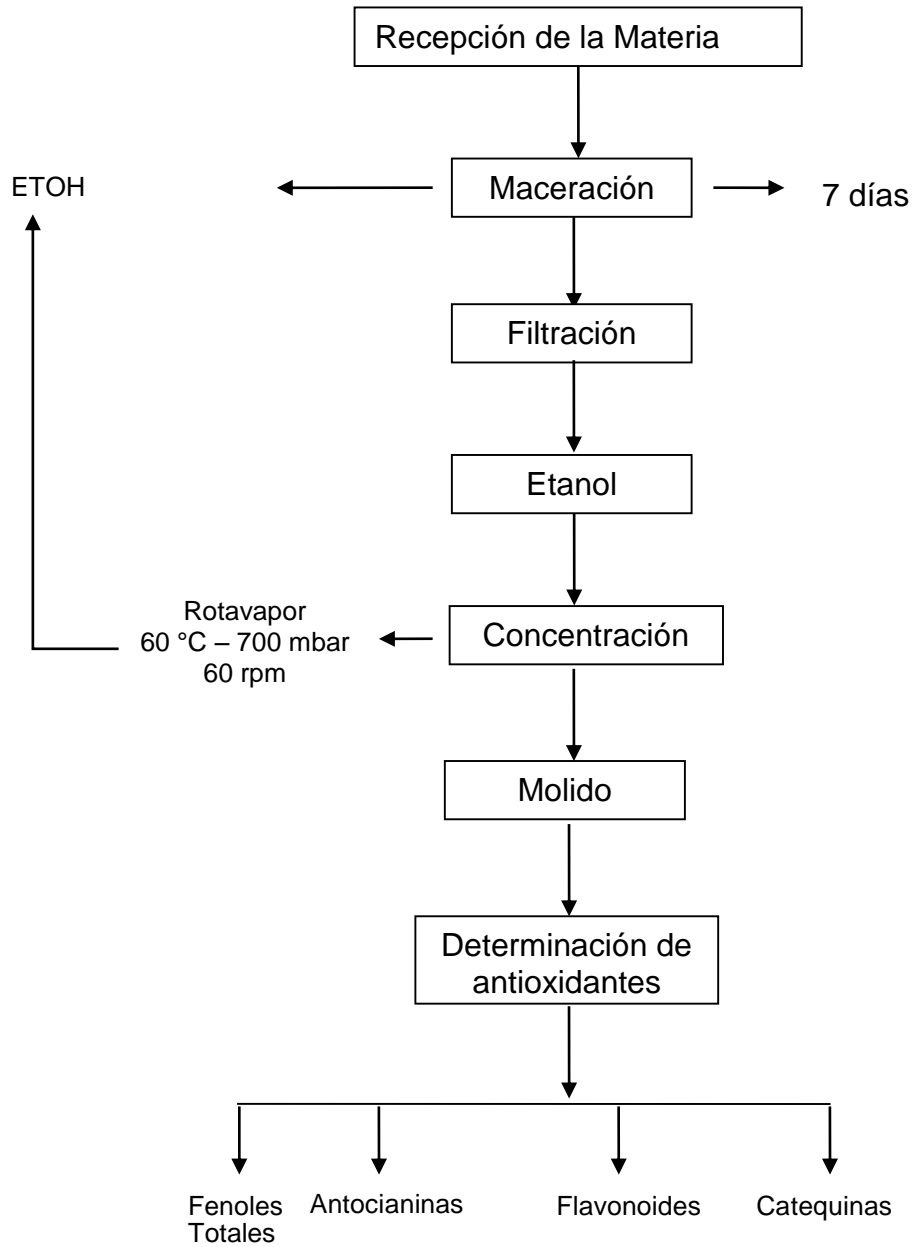


FIGURA N° 17: Obtención del extractos de la corteza *Byrsonima crassifolia* (Indano)

3.6. ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES

Posteriormente fue determinada la actividad antioxidante y la presencia de fenoles totales, antocianinas, flavonoides, taninos.

3.6.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTES POR EL METODO 2,2 – DIFENIL-1-PICRILHIRAZIL (DPPH)

La determinación de Actividad Antioxidante (AA) fue siguiendo el método de (Brand-Williams et al, 1995):

Preparación de la muestra: 50 mg del extracto etanólico seco, se diluyo y aforo a 10 ml con metanol consiguiendo una concentración de 5mg/ml, constituyéndose la solución patrón, a partir de esta dilución se prepararon concentraciones a 0.5; 0. 25; 0.1; 0.05 y 0.01 mg/ml, tomando alícuotas de 1ml (0.5 mg/ml); 0.5 ml (0.25 mg/ml); 0.2 ml (0.1 mg/ml)) 0.1 ml (0.05 mg/ml; 0.02 ml (0.01mg/ml) y aforando a 10 ml con metanol, dejar reposar durante 30 minutos protegido de la luz.

Preparación de la solución de DPPH: Se preparó la solución stock de 1mMol de DPPH en metanol al 95%, a partir de la esta se preparó la solución de trabajo de 0.1 mMoles de DPPH (también usado como blanco). Se agregó a una cubeta de poliestireno de 1 ml 0.025 μ l de cada una de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y se agregó 0.975 μ l de 0.1 mMol de DPPH. Posteriormente fueron realizadas las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda (λ) de 517 nm, leídas a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos y realizadas por triplicado. La inhibición del secuestro del radical DPPH por soluciones crecientes de los extractos, fue determinada por la expresión siguiente:

$$\text{Inhibición de DPPH, \%} = \frac{[(Ac - Am) / Ac] \times 100}{}$$

Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control 0.1 mM de DPPH),

Am, es la absorbancia de la muestra (solución creciente de los extractos) en tiempo n.

3.6.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El extracto etanólico se reconstituyó con metanol absoluto al 50% acidificado al 1% con ácido fórmico, para las respectivas diluciones y los ensayos subsiguientes.

3.6.3. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

La metodología empleada fue de (Singleton y Rossi, 1965), modificada por (Vela y Cuzcano, 2015), para la cual se preparó una solución patrón de 0.1 mg/ml de ácido gálico. Se prepararon las diluciones para obtener la curva patrón (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml).

A 200 µl del extracto etanólico (p/v) reconstituido de la corteza por triplicado, se le agregaron 1.5 ml de agua destilada, 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 minutos se agregaron 200 µl de solución de carbonato de sodio al 20%, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo pero sustituyendo la solución del extracto etanólico por metanol acidificado.

Posteriormente se midió la absorbancia a $\lambda = 765$ nm. La concentración de fenoles se calcula con base en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/ml.

3.6.4. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

La metodología empleada fue la de (Sotero y García, 2009) con algunas modificaciones, realizándose mediante la lectura de la absorbancia a $\lambda = 374 \text{ nm}$, del extracto etanólico reconstituido. A 3ml del extracto etanólico, por triplicado, y utilizando agua destilada como blanco. Para realizar los cálculos del contenido de flavonoides totales, se utiliza el coeficiente de extinción molar de la quercetina como patrón ($\epsilon = 78,66 \text{ g/mol*cm}$).

$$\text{Flavonoides totales (mg/ 100 g)} = (\text{Abs} * \text{FD} * 100) / (\epsilon * \text{W})$$

En donde:

Abs = absorbancia

FD = Factor de dilución

ϵ = coeficiente de extinción molar

W = Peso de la muestra

En algunos casos la presencia de flavonoides es tan alta que se mide en g/100 g de muestra.

3.6.5. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, POR EL MÉTODO pH- DIFERENCIAL

La metodología empleada fue la de (Sotero y García, 2009): La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en la presencia de pigmentos degradables polimerizados y de otros compuestos interferentes.

PROCEDIMIENTO

Se prepararon dos diluciones de las muestras, una con el Buffer de cloruro de potasio pH 1 y otra con el Buffer de acetato de sodio pH 4.5, llevándolas a un volumen de 3 ml, se esperó 15 minutos a que

las diluciones se equilibraron y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de $\lambda = 400$ a 700 nm, esperando una absorbancia de la muestra entre 0.1 y 1.2 y utilizando como blanco agua destilada.

Para la obtención de la concentración de antocianina se utiliza la fórmula de pH diferencial:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 1}} - (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 4.5}}$$

En donde $A_{\lambda \text{ vis-máx.}}$ es la lectura del pico más alto a pH 1 y pH 4.5 , y $A_{\lambda 700}$, es la lectura a $\lambda = 700$ nm, tanto para pH 1 como pH 4.5 para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente formula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/ 100 g)} = (A * PM * FD * 100) / (\epsilon * L)$$

Donde:

A = absorbancia

PM = Peso molecular, 449.2 g/mol

FD = Factor de dilución

ϵ = Coeficiente de extinción molar, 26900 g/mol*cm

L = Longitud de la celda.

3.6.6. DETERMINACIÓN DE TANINOS

La metodología empleada fue la de (Valls *et al.*, 2000), mezclar 1 ml del extracto con 5 ml de mezcla de vainillina (50 ml de 1 g de vainillina en 100 ml de metanol y 50 ml de ácido fórmico 8% en MeOH). El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo el extracto por ácido fórmico 8% en MeOH. Se efectúa la lectura de absorbancia a $\lambda=500$ nm, homogenizar y dejar en reposo 30 minutos protegidos de la luz. El calibrado se realiza con soluciones de (+)-catequina ($20, 40, 60, 80, 100$ $\mu\text{g/ml}$).

3.6.7. ANALISIS DE LOS DATOS

Los espectrogramas y los datos obtenidos de los UV-Vis, fueron interpretados de acuerdo a la teoría de la actividad antioxidante, fenoles totales, antocianinas, flavonoides, taninos (catequinas y proantocianidinas), y procesado con el software Neolite versión 2.1.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

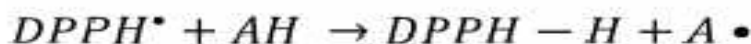
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La figura 17 se muestra el flujograma para la obtención del extracto etanólico de la corteza del *Byrsonima crassifolia* (Indano)

4.1. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES Y TANINOS DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO)

4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH

Se acondicionó el espectrofotómetro UV-VIS para determinar la actividad antioxidante por el ensayo DPPH⁺, el rango de longitudes de onda varía entre los 515 y 540 nm); para la determinación se midió a 517 nm donde presenta su máxima absorción. La solución de DPPH⁺ se preparaba minutos antes de realizar el análisis ya que tiende a degradarse rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Molyneux, 2004), La reducción del DPPH se muestra en la siguiente reacción: (Brand-Williams *et al.*, 1995, Brand-Williams y Berset, 1997)



4.1.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTES DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO)

En la tabla 5 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano), y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexos 4, 5 y 6).

TABLA N°05. Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano)

Número de Lecturas	Promedio Solución DPPH (1mM)	Extracto etanólico de la corteza <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO) (muestra-seca)												
		Concentraciones												
		5 mg/ml	DS	0.5 mg/ml	DS	0.25 mg/ml	DS	0.1 mg/ml	DS	0.05 mg/ml	DS	0.01 mg/ml	DS	
1	0.161	0.011		0.179		0.148		0.220		0.281		0.249		
2	0.161	0.007		0.134		0.152		0.226		0.276		0.249		
3	0.160	0.008		0.103		0.138		0.219		0.273		0.247		
4	0.160	0.007		0.089		0.119		0.216		0.272		0.245		
5	0.160	0.007		0.078		0.112		0.212		0.269		0.245		
6	0.160	0.007		0.064		0.103		0.210		0.267		0.245		
7	0.160	0.007		0.058		0.096		0.209		0.264		0.243		
8	0.160	0.007		0.053		0.091		0.206		0.263		0.243		
9	0.160	0.007		0.049		0.086		0.205		0.261		0.243		
10	0.160	0.007		0.047		0.082		0.205		0.260		0.242		
Promedio	0.160	0.007	0.001	0.085	0.043	0.113	0.026	0.213	0.007	0.269	0.007	0.245	0.002	
Porcentaje de Inhibición %				95.36		46.76		29.66		-32.82		-67.64		-52.91

De acuerdo a los resultados frente al radical DPPH en la tabla 6, se observa que a diferentes concentraciones pequeñas entre (0.01 – 5 mg/ml) el porcentaje de inhibición (% inh.) con el método del radical DPPH, a partir de 0.25 mg/ml presento aproximadamente actividad antioxidantes superior al 29.66 %; según (Granados *et al.*, 2012) los valores de inhibición tienen que ser superiores al 30 %, valor que se tomó como referencia para evaluar la actividad antioxidantes.

TABLA N°06. Porcentaje de inhibición de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano)

Muestra de la corteza <i>Byrsonima crassifolia</i> (INDANO)						
CONCENTRACIONES [mg/ml]	5	0.5	0.25	0.1	0.05	0.01
PROMEDIO DE ABSORCIÓN [A°]	0.007 ± 0.001	0.085 ± 0.043	0.113 ± 0.026	0.213 ± 0.007	0.269 ± 0.007	0.245 ± 0.002
% DE INHIBICIÓN	95.36	46.76	29.66	-32.82	-67.64	-52.91

En un reciente trabajo se determinó la actividad antioxidante de la madera y hoja del *Brosimum rubscens* (Palisangre); en donde la hoja resultó ser más activa frente al radical DPPH, aquel que

muestra un porcentaje de actividad antioxidante superior al 45,03 % en una concentración del extracto de 0.5 mg/ml, en cambio el comportamiento mínimo de la actividad antioxidante de la madera es de 28.56% en una concentración del extracto de 0.25 mg/ml y la máxima concentración es a 0.5 mg/ml con un porcentaje de actividad de 75.69%, sin embargo al aumentar la concentración del extracto la actividad sufre un descenso considerable (Zurita y Zambrano, 2015), esto se debe a la alta presencia de taninos, quinonas, en cantidad media de flavonoides, alcaloides, triterpenos, cumarinas fijas y lactonas; y una pequeña cantidad de cumarinas volátiles, relatado por (Arzubiales, 2009), a veces los antioxidantes fenólicos pierden su actividad a mayores concentraciones y comportarse como prooxidantes (Gorden, 1990)

En la figura 18 se muestra el comportamiento de la actividad antioxidante de la corteza, a medida que aumenta la concentración del extracto la actividad antioxidante es superior al 29.66 % de inhibición.

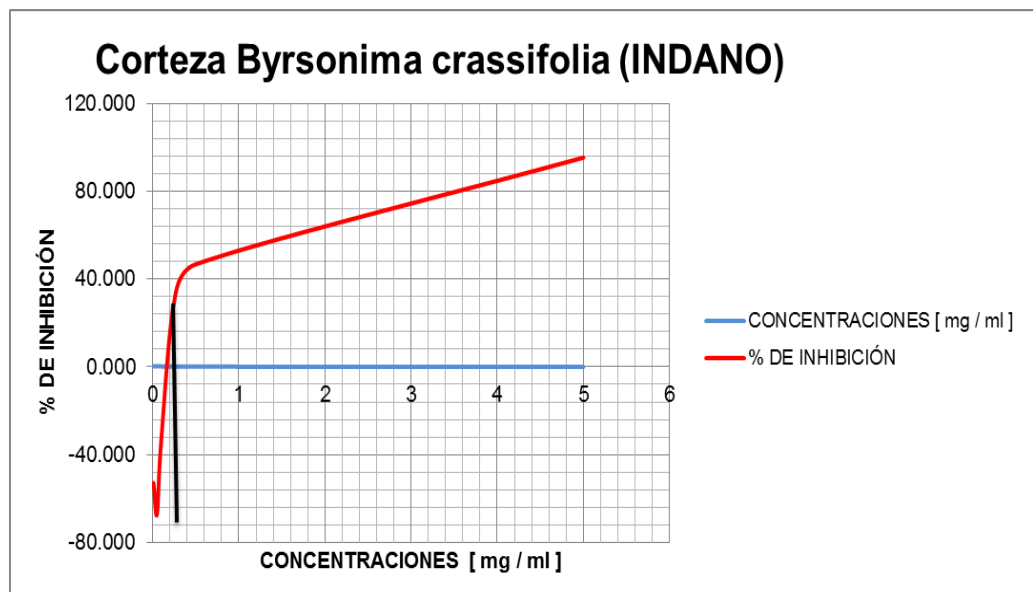


FIGURA N°18. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano)

4.1.3. EVALUACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se midió las absorbancias de las soluciones de ácido gálico patrón (ver anexo 8), con estos datos se elaboró la curva patrón como se muestra en la figura 19, empleando la fórmula ($y = 10.315x + 0.0221$; $R^2 = 0.9967$).

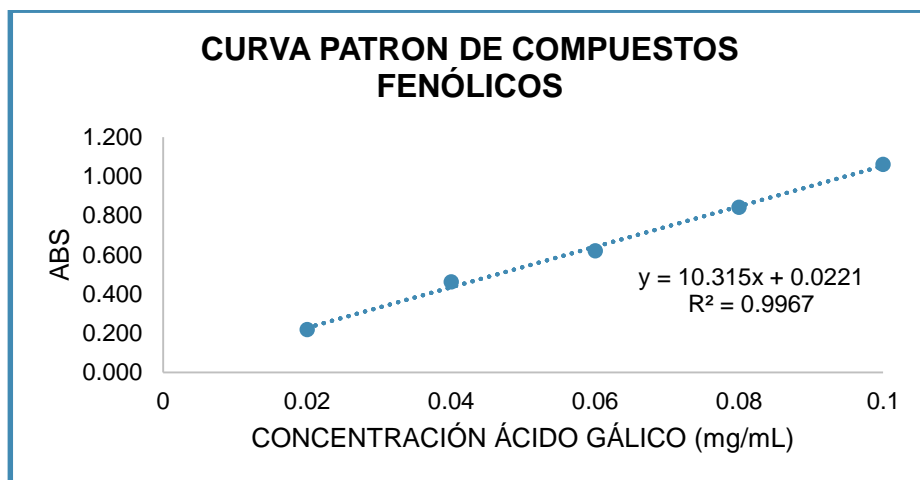


FIGURA N° 19. Curva patrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales.

A partir de la curva patrón de ácido gálico, se determinó la concentración de fenoles totales presente en la corteza como se muestra en la tabla 7, donde se obtuvo la cantidad promedio de $45,160 \pm 1,267$ mg EAG/100 g de muestra original.

TABLA N° 07: Contenido de Fenoles totales presentes en el extracto etanólico de la especie *Byrsonimia crassifolia* (Indano)

Repetición	Peso de la Alícuota de extracto seco	Peso de la Alícuota de extracto seco	Volumen Acertado 1	Factor de dilución	Alícuota en el tubo	Lectura en el Equipo	Concentración FT	Concentración FT	Concentración FT	Concentración FT	MEDIA FT	DS
	(g)	(mg)	(ml)		(mL)	Abs.765 nm	mgEAG/mL	mgEAG	mgEAG/mg Alícuota extrato seco	mgEAG/100 g Muestra Original	mgEAG/100 g Muestra Original	
	a	b = a*1000	c		f	g	h	i= @	j = i* c	k= j / a	j = h/a	
R1	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.231	0.020	0.608	6.076	43.561	43.561	1.685
R2	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.231	0.020	0.608	6.076	43.561		
R3	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.245	0.022	0.648	6.483	46.480		
R1	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.244	0.022	0.645	6.454	46.272	46.272	2.116
R2	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.251	0.022	0.666	6.657	47.732		
R3	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.231	0.020	0.608	6.076	43.561		
R1	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.241	0.021	0.637	6.366	45.646	45.646	0.000
R2	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.241	0.021	0.637	6.366	45.646		
R3	0.1000	100.00	30.00	1.000	0.200	0.241	0.021	0.637	6.366	45.646		
Promedio Total											45.160	1.267

No existen trabajos anteriores para esta especie, sin embargo se encontraron presencia de fenoles totales en la corteza de *Brosimum rubescens* (Palisangre) un valor de $106,024 \pm 0,392$ mg EAG/100 g muestra original, relatado por (Zurita y Zambrano, 2015) y en la corteza *Tpripolaris americana* L. (Tangarana colorada) de 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de muestra original,relatado por (Inocente, 2009).

4.1.4. EVALUACIÓN DE FLAVONOIDES

La determinación de flavonoides totales se muestra en la tabla 8, donde se aplicó la fórmula descrita en la metodología, efectuando la lectura de la absorbancia a 374 nm. La cantidad promedio fue 5.77 ± 0.01 g quercetina/100g muestra original.

TABLA N° 08: Contenido de Flavonoides totales presentes en el extracto etanólico de la especie *Byrsonima crassifolia* (indano).

Tipo de muestra	Código	Repeticiones	ABSORBANCIA	PM	FD	ϵ	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	DS
				g/mol		L/cm ² *mol	cm	g quercetina/100 g Muestra original	g quercetina/100 g Muestra original	
INDANO	Extracto 1	R1	0.696	302.236	10.00	78.66	1.00	5.75	5.74	0.00
		R2	0.695	302.236	10.00	78.66	1.00	5.74		
		R3	0.695	302.236	10.00	78.66	1.00	5.74		
INDANO	Extracto 2	R4	0.696	302.236	10.00	78.66	1.00	5.75	5.77	0.01
		R5	0.698	302.236	10.00	78.66	1.00	5.77		
		R6	0.699	302.236	10.00	78.66	1.00	5.78		
INDANO	Extracto 3	R7	0.701	302.236	10.00	78.66	1.00	5.79	5.79	0.01
		R8	0.698	302.236	10.00	78.66	1.00	5.77		
		R9	0.700	302.236	10.00	78.66	1.00	5.79		
								Promedio Total	5.77	0.01

No existen trabajos anteriores para esta especie, sin embargo, se encontraron presencia de flavonoides totales en la corteza de *Brosimum rubescens* (Palisangre) un valor de 24.48 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original, relatado por (Zurita y Zambrano, 2015); y en la corteza *Tpripolaris americana* L (Tangarana Colorada) de 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de muestra original, relatado por (Inocente, 2009).

Según investigaciones del Departamento de Fisiología de la Universidad de León y del Hospital de León, la contribución de los flavonoides al potencial antioxidante de la dieta humana es importante. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima en unos 23 miligramos al día, teniendo en cuenta que el consumo medio de sustancias antioxidantes tan valoradas como la vitamina C es de entre 70-100 miligramos al día y el de la vitamina E, de

entre 7-10 miligramos diarios, se puede considerar como relevante la contribución de los flavonoides como antioxidantes a la dieta (Eroski, 2014).

Los flavonoides ejercen su efecto antioxidante por neutralización de todo tipo de radicales por oxidación incluyendo peróxidos y radicales hidroxilos por quelación. La potente actividad antioxidante de flavonoides, su habilidad para capturar radicales hidroxilos puede ser la función más importante de los flavonoides y ser la verdadera razón de la acción en el cuerpo (Merfot *et al.*, 1996).

Los flavonoides por acción de la captura del radical libre ejercen un efecto protector en los daños del tejido esquémico por perfusión, y por acción como antioxidante exhibiendo varios efectos benéficos como antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y con actividad anticáncer. También se ha sugerido un rol protector en enfermedades del hígado, cataratas y enfermedades cardiovasculares (Lin *et al.*, 2008).

4.1.5. EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES

En las figuras 20 y 21 se muestra el espectro de absorción a pH 1.0 y pH 4.5 del extracto etanólico de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano), realizado por un barrido de absorción a una lectura de 400 a 700 nm, en ella se muestran las absorciones en forma de hombro entre las lecturas de 490 a 510 nm y 530 a 560 nm, indicativos claro de presencia de antocianinas.

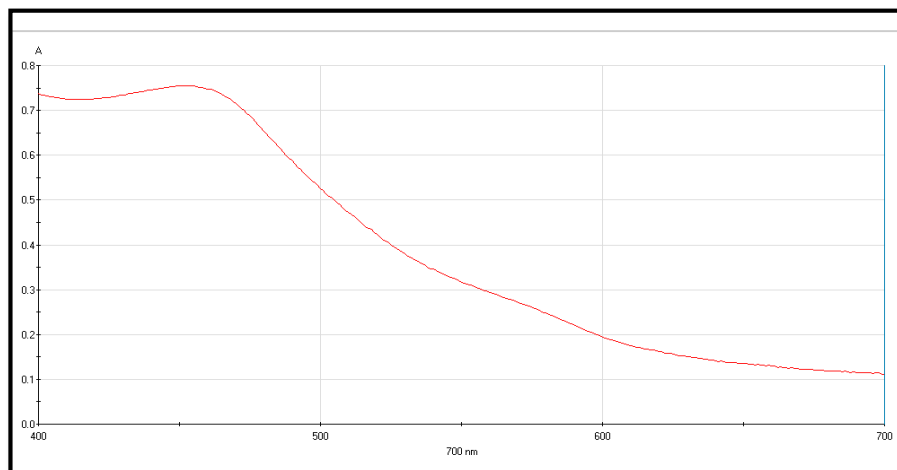


FIGURA Nº 20. Absorción del extracto etanólico de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

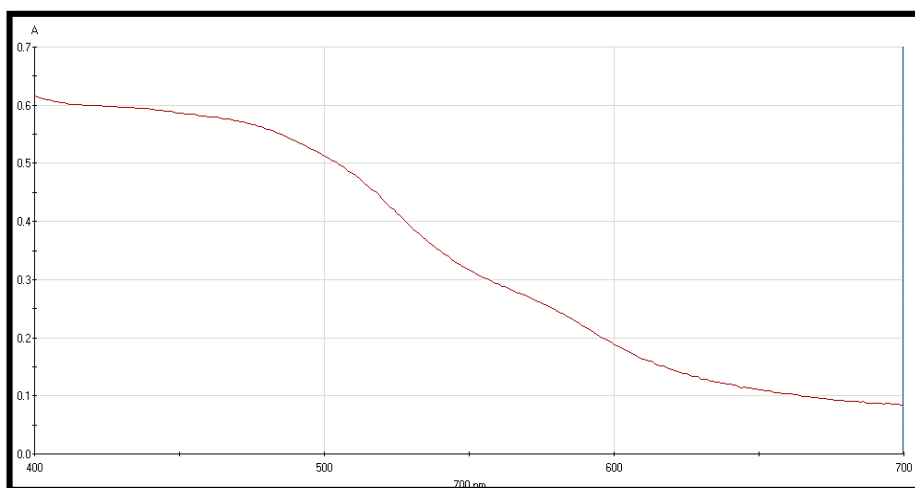


FIGURA Nº 20. Absorción del extracto etanólico de la corteza *Byrsonima Crassifolia* (Indano) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.

En la tabla 9, se muestra la cantidad promedio de antocianinas, aplicando la fórmula descrita en la metodología, se obtuvo 1.9504 ± 0.0597 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original.

Tabla N° 09: Contenido de Antocianinas totales presentes en el extracto etanólico de la especie *Byrsonima crassifolia* (indano).

Tipo de Muestra	Código	Repetición	ABS = λ Vis- máx. pH 1	ABS = λ Vis- máx. nm pH 4.5	ABS = 700 nm pH 1	ABS = 700 nm pH 4.5	A = (a-c)-(b- d)	PM	FD	ϵ	L	Concentración de Antocianinas	Media Antocianinas	DS
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol	L/cm ² mol	cm	mgCianidina-3- glucosido/100 g Muestra original	mgCianidina-3- glucosido/100 g Muestra original		
INDANO	extracto 1	R1	0.7560	0.5380	0.1230	0.0990	0.1940	449.2	3.0	26,900.0	1.0	2.0904	2.0904	0.0871
		R2	0.7620	0.5500	0.1230	0.0990	0.1880	449.2	3.0	26,900.0	1.0	2.0258		
		R3	0.7670	0.5400	0.1230	0.1000	0.2040	449.2	3.0	26,900.0	1.0	2.1982		
INDANO	extracto 2	R4	0.7700	0.5750	0.1230	0.0990	0.1710	449.2	3.0	26,900.0	1.0	1.8426	1.8103	0.0323
		R5	0.7680	0.5790	0.1230	0.0990	0.1650	449.2	3.0	26,900.0	1.0	1.7780		
		R6	0.7690	0.5760	0.1230	0.0980	0.1680	449.2	3.0	26,900.0	1.0	1.8103		
Promedio Total												1.9504	0.0597	

No existen trabajos anteriores para esta especie, sin embargo, se encontraron presencia de antocianinas totales en la corteza de *Brosimum rubescens* (Palisangre) de un valor 34.367 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original, relatado por (Zurita y Zambrano, 2015).

4.1.6. EVALUACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS

Se midió las absorbancias de las soluciones (+)-catequina (ver anexo 9), con estos datos se elaboró la curva patrón como se muestra en la figura 22, empleando la fórmula ($y = 0.01063x + 0.00961$; $R^2 = 0.9964$)

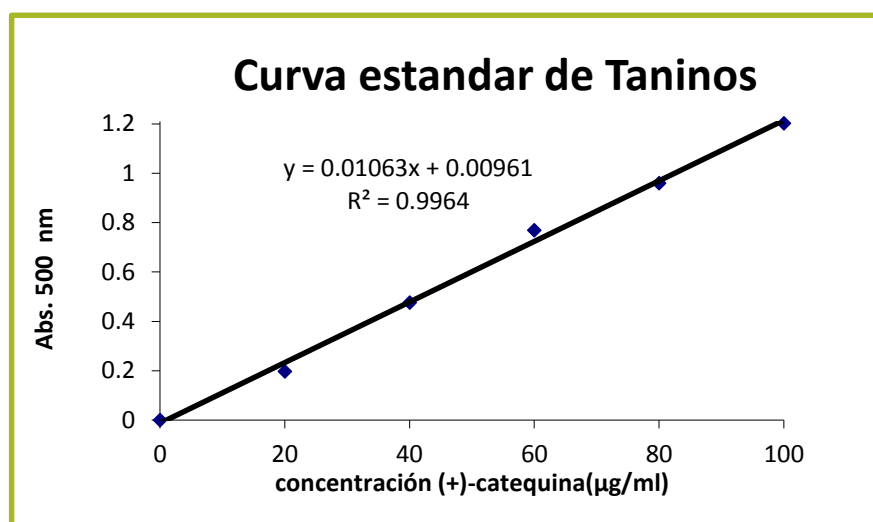


Figura N° 22: Curva de Estándar de Taninos

A partir de la curva patrón, se determinó la presencia de taninos como se muestra en el tabla 10, obteniendo la cantidad promedio de 56.47 ± 0.12 mg (+)-catequina/100g de muestra original.

Tabla N°10. Contenido de taninos condensados presentes en el extracto etanólico de la especie *Byrsonima crassifolia* (indano).

Código	Repetición	Peso de la Alicuota de extracto seco	Peso de la Alicuota de extracto seco	Volumen Acertado 1	Alicuota en el tubo	Lectura en el Equipo	Concentración de taninos	Concentración de taninos	Concentración de taninos	Concentración de taninos	Concentración de taninos	MEDIA concentración taninos	DS
		(g)	(mg)	(ml)	(mL)	Abs.765 nm	µg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alicuota extrato seco	mg (+)-catequina/ 100 g Muestra original	mg (+)-catequina/ 100 g Muestra original	
		a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g*c	i = h / b	j = h/a		
Extrato 1	R1	0.1000	100.00	30.00	0.200	0.288	26.189	0.026	0.786	7.857	56.331	56.466	0.117
	R2	0.1000	100.00	30.00	0.200	0.289	26.283	0.026	0.788	7.885	56.534		
	R3	0.1000	100.00	30.00	0.200	0.289	26.283	0.026	0.788	7.885	56.534		

No existe trabajos similares de este especie, sin embargo, se encontraron presencia de taninos en la corteza de *Brosimum rubescens* (Palisangre) valor obtenido de 160 mg (+)-catequina/100g de muestra original, relatado por (Zurita y Zambrano, 2015) y en la corteza de *Tpripalis americana L* (Tangarana Colorada) 1.62368 ± 0.0784 de ácido tánico /100 g de muestra original, (Inocente, 2009).

Las protoantocianidinas tienen gran interés en la nutrición y la medicina por su capacidad antioxidante y posibles efectos protectores en la salud humana (Al-Jaber *et al*, 2015), (Santos-Belga y Scalbert, 2000). Existe una relación entre la propiedad antioxidante y capacidad atrapadora del radical libre (Da Silva *et. al.*, 1991), esta propiedad ha sido usada contra enfermedades del corazón reduciendo la oxidación lipídica; existe la hipótesis que los radicales libres de las proantocianinas reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y coagulación de la sangre; y ciertos tipos triméricos de protoantocianinas pueden proteger contra infecciones del tracto urinario. (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

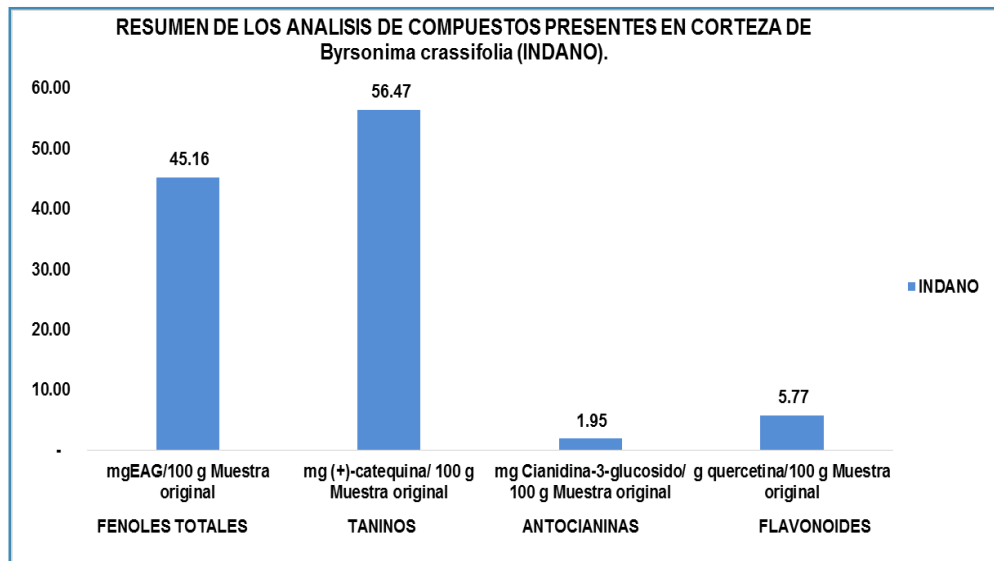
4.1.7. RESUMEN DE CONTENIDOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

En la tabla 11 y figura 23 se muestran el resumen de los compuestos fenólicos presentes en la corteza del *Byrsonima crassifolia* (indano), en ella se puede destacar que es una planta con un alto valor de contenidos de antioxidantes.

Tabla N° 11: Concentraciones de Antioxidantes Fenólicos presente en el extracto etanólico de la especie *Byrsonima crassifolia* (indano).

Muestra <i>Byrsonima crassifolia</i>	Concentración FT		Concentración de taninos		Concentración de Antocianinas		Concentración de Flavonoides	
	mgEAG/100 g Muestra original	±	mg (+)- catequina/ 100 g Muestra original	±	mg Cianidina- 3-glucosido/ 100 g Muestra original	±	g quercetina/100 g Muestra original	±
INDANO	45.16	1.267	56.466	0.117	1.95	0.06	5.77	0.01

Figura N° 23: Resumen de los Análisis de Compuestos Presentes en Corteza de *Byrsonima crassifolia* (INDANO)



CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La corteza *Byrsonima crassifolia* (indano), muestra altos niveles de Actividad Antioxidante según lo demostrado por la captura de radicales por el DPPH.
2. Los responsables de la Actividad Antioxidante se encuentra mayormente en compuestos fenólicos como flavonoides (5.78 ± 0.01 g de quercetina/100g muestra original), taninos (56.47 ± 0.12 mg (+)-catequina/100g de muestra original) y fenoles totales (45.85 ± 2.12 mg EAG/100 g muestra original), y en concentraciones pequeñas las antocianinas (1.81 ± 0.03 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original).
3. A mayor concentración del extracto etanólico de la corteza *Byrsonima crassifolia* (indano), la actividad antioxidante va en aumento, siendo la mínima cantidad a 0.25 mg de extracto y muestra un aproximado de 30% de inhibición.
4. El uso en pequeñas cantidades del extracto etanólico de la corteza *Byrsonima crassifolia* (indano) en polvo podría ser usado como alimento funcional ya que muestra un alto poder antioxidante, beneficioso para la salud humana.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (IC_{50}), para determinar la cantidad a ser usado para su consumo directo del extracto de la madera.
- ✓ Debido a la variedad de especies utilizadas en la etnomedicina por el poblador amazónico se debe continuar con las investigaciones en otras especies de plantas.

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-AAL E-S. y HUCL P. 1999. A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry*, 76:350-354.

ABDEL-AAL E-S. y HUCL P. 2003. Composition and Stability of Anthocyanins in Blue grained Wheat. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51:2174-2180.

ABDEL-AAL E-S., YOUNG C. y RABALSKI I. 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple and Red Cereal Grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54:4696-4704.

ALAM M.D. N., BRISTI N.J., RAFIQUZZAMAN M.D. 2012. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*;

ALBA, S.; CUCA, S. Identificación de Metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* (Moraceae). 2007. Determinación de Actividad Antimalárica. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Colombia.. 129-131 p.

AL-JABER N. A., AWAAD A. S., MOSES J. E. 2011. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 293-307.

ARZUBIALDES G.K. 2009. Obtención y caracterización de colorantes naturales a partir de la especie *brosimum rubescens* taubert (palisangre). Trabajo Final de Carrera. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Industrias Alimentarias AWIKA J. M., ROONEY L. W. Y WANISKA R. D. 2004. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90:293-301.

BADUI D. 1999. Química de alimentos. 3^{RA} Edición. México. Editorial Addison Wesley Longman. 388-395 p.

BADUI D. Química de alimentos. 2^a Reimpresión. México. Editorial Alhambra. 1993. 226 p.

BAUTISTA F., GONZALEZ, E Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos de *Byrsonima crassifolia* (nance), *Pithecollobium dulce* (Mongollano) y de *Punica granatum* (Granado). 2007 DISPONIBLE EN: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3144> .

BEJAR, E. AND M. H. MALONE.1993. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, and medical tree of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 39(2): 141 – 158,

BEZAR H. J. KONINI.1982, speciality bread wheat. *N.Z. Wheat Rev*, 15:62-63.

BIOLINK GROUP [homepage on the internet]. Sandnes, NO: Biolink Group, AS.; [cited 2009 Oct 15] Available from: <http://www.biolink.no/products/profesional-dietary-supplement/article86-111.html>

BLOIS, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199- 1200.

BOROWSKA, E. J.; MAZUR, B. 2008. Changes in selected componentes and antioxidant propieties of cowberry during processing to puree. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna. Poznan*, v. 41, p. 303-307.

BOTANICAL ON LINE. 1999. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalesflavonoides.htm>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. AND BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*. 28. 25-30.

BRAND-WILLIAMS B., BERSET W. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH•free radical method. *LWT - Food Science and Technology*; 30: 609-615.

BRAT, PIERRE. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. En: *The Journal of nutrition*. September 2006. Vol. 136. p. 2368-2373.

BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, A.F.; GOTTLIEB, R. Coumarins

from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*. 1972. v. 11(11): 3307-3310 pp.
BUTLER, L.G. 1992. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins, in *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties and Significance*, Hemigway, R.W. and Laks, P.E., Eds., Plenum Press, New York, 693–698.

CÁCERES, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Colección Monografías. Guatemala. Ed. Universitaria.

CARROL, K.K., KUROWSKA, E.M., GUTHRIE, N. 1999. Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer, en International Patent WO 9916167.

CARROL, K.K., KUROWSKA, E.M., GUTHRIE, N. 1999. Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer, en International Patent WO 9916167.

CASTANEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNÁNDEZ L., PAEZ-HERNÁNDEZ E., RODRÍGUEZ J. A. Y GALÁN-VIDAL C. A. 2009. Chemical Studies of Anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113:859-871

CASTANEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNÁNDEZ L., PAEZ-HERNÁNDEZ E., RODRÍGUEZ J. A. Y GALÁN-VIDAL C. A. 2009. Chemical Studies of Anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113:859-871.

CORDER, J. DOUTHWAITE, DM Lees. 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tanino>.

COSTA C. T., HORTON D. Y MARGOLIS S. A. 2000. Analysis of Anthocyanins in Foods by Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis. *Journal Chromatography*, 881:403-410.

DA SILVA R., J.M., DARMON, N., FERNANDEZ, Y. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1549–1552.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, Nina. 2004. Propriedades Antioxidantes de compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun.

DELGADO, V.F.; PAREDES, L. O. 2003. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical uses*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

DENG J., CHENG W., YANG G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*; 125: 1430–1435.

ESCARPA A, GONZALEZ M.C. 2001. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds in food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 57–139.

ESCRIBANO-BAILON M. T., BEULGA-SANTOS C. Y RIVAS GONZALO J. C. 2004. Anthocyanins in Cereals. *Journal Chromatography*, 1054:129-141.

ESTRELLA, E. 1995. *Plantas medicinales Amazónicas: Realidades y Perspectivas*.

FARNSWORTH, E. J. y GONZALES. 1989. *Guide to the Visitor's Natural History Trail, La Selva*. Organization for Tropical Studies (OTS), San Jose, Costa Rica.

FENEMA O. *Química de los Alimentos*. 2^a Ed. España. Editorial Acribia S.A. 1993. 918 p.

FLORES, J. 2000. *Farmacología humana*. 3era edición. Masson. Barcelona. España. sp.

FOLIN, C; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Typtophan. 1927. Determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-650.

FORMICA, J.; REGELSON, W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*.

FRANCIS, F.J. 1993. Polyphenols as natural colorants, in *Polyphenolic Phenomena*, Scalbert, A., Ed., Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 209–220.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R. E. 2001. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Anal.Chem.*, Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York.

GLASBY JS. 1991. Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites. London, Tayler y Francis p (57, 264, 314).

GORDEN, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 1-18). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

GORINSTEIN S., CVIKROVA M., MACHACKOVA I., HARUENKIT R., PARK Y.-S., JUNG S.-T., YAMAMOTO K., MARTINEZ A. L., KATRICH E., TRAKHTENBERG, S. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits *Food Chemistry*. 84: pp. 503-510.

GRANADOS, C., X. YÁÑEZ, Y G. 2012. Santafé, Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpusmoritzianus* y *Minthostachysmollis*, de Norte de Santander, Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas: 10(1), 12-23.

GUTIÉRREZ GAITÉN. Y. I., MIRANDA MARTINEZ M., VARONA TORRES N., RODRIGUEZ A. P. 2000. Validacion de 2 metodos espectrofotométricos para la cuantificacion de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba, L.Revista Cubana de Farmacia, v. 34, n. 1, p. 50-55.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. 2001. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 52,481-504.

HAYASIDA W, SOUSA S, LIMA P, NASCIMENTO C, FERREIRA G. Proposta de Aproveitamiento em Resíduos de Paurinha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo sector Madeireiro. *Acta Amazónica*. v. 38 (4). Manaus-Brasil. 2008. 749-752pp

HEIM, K.E.;Tagliaferro, A.R.;Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem, 13, 572-584.

HEINRICH, M., RIMPLER, H AND ANTONIO B., N. (1992b) Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a Mixe lowland community. Joournal of Ethnopharmacology, 36, 63-80.

HERTOG, M.G.L.; HOLLOMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. 1997.Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 40, p.2379-2383.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. 2010. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. Food chemistry, 118 (2): 208-214.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOG, M.G.L.; KATAN, M.B. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. J. Agric. Food Chem, Barking, v. 97, n.1, p. 43-46.

HORBOWICZ M. KOSSON R., GRZESIUK A. Y DEBSKI H. 2008. Anthocyanins of Fruits and Vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. Vegetables Crops Research Bulletin, 68:5-22.

HURST, W.J. 2002. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.

INOCENTE M. 2009. Actividad antioxidante y Anticrobiama de los compuestos Fenólicos y del extracto hidroalcohólico de la corteza de Triplaris americana. L. (tangarana Colorada). Universidad Nacinal Mayor de San Marcos. Lima – Perú. Pág 62 -83.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2^a Ed. 1997.Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide>.

JUÁREZ D.J.C. 1998. La Familia Malpighiaceae en el estado de Morelos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos. Pág. 90.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. 2001, Journal of Medicinal Food chemistry, Easton, v. 49, p.4076-4082.

KANG, H.J., CHAWLA, S. P., JO,C., KWON, J.H., BYUN, M.W. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel, Bioresource Technology 97: 614-620.

KOSIR I. J. Y KIDRIC J. 2002. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. Analytica Chimica Acta, 458:77-84.

KUSKOSKI, E.A.; ASUERO, A. G.; MORALES, M.T.; FETT, R. 2006. Frutos tropicais silvestres e polpa de frutas congeladas: actividade, polifenóis e antocianinas. Ciencia Rural, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1285-1286.

KUSKOSKI, E.A.; ASUERO, A. G.; MORALES, M.T.; FETT, R. 2006. Frutos tropicais silvestres e polpa de frutas congeladas: actividade, polifenóis e antocianinas. Ciencia Rural, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1285-1286.

LAMPE, J. W. 1999. Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanisms of action in human experimental studies. The American Journal of Clinical Nutrition, Philadelphia, v. 70, p. 475S-490S.

LEE J. N., KOO D.B. 2004. Reactive oxygen species, ageing, and antioxidants nutraceuticals. Comprehensive reviews in food science and food safety 3: 21-33.

LIN, YONG, SHI, RANXIN, WANG, XIA, SHEN, HAN-MING. 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Curr. Cancer Drug Targets 8, 634–646.

LOAIZA R. Estimulación de la germinación del nance (*Byrsonima crassifolia*) con giberelinas y agua caliente. 2004 Disponible en: <http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0132/f01647/g008174/s024783.htm>.

LOCK S O. 1997. Colorantes Naturales. Fondo Editorial de PUC. Lima-Perú. 274 p.

LOCK S O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da.ed. Lima- Peru. 300 p.

MAEDA-YAMAMOTO, M., KAWAHARA, H., TAHARhA, N., TSUJI, K., HARA, Y., ISEMURA, M. 1999. Effect of tea polyphenols on the invasión and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. Journal of Agricultural Food Chemistry 47: 2350-2354.

Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza C. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. 70: 641-649.

MANFRED H., HERBERT M., BERND Z. 1999. Métodos espectroscópicos en química orgánica. 2^a Ed. Madrid-España. Editorial Síntesis S.A. 369 p.

MARTÍNEZ-VALVERDE I., PERIAGO M.J., ROS G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50,5-18

MARTÍNEZ-VALVERDE I., PERIAGO M.J., ROS G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50, 5-18.

MARTINEZ-VAZQUEZ, M., GONZALEZ, A.R., CAZARES, L., MORENO, M.N., GARCÍA-ARGÁEZ, A.N. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crasifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharm* 66, 79-82.

MATA, A. T.; PROENCA, T.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAUJO, M. E. M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spice. *. Food Chemistry, Barking*, v. 102, n. 3 p. 778-786.

MERFORT I., HEILMANN J., WEISS M., PITTI P., GADANA C. 1996. Radical scavenger activity of three flavonoids metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNS. *Planta Med.* 62, 289.

MILLER D. 2003. *Química de los alimentos: Manual de Laboratorio.* 1ª Ed. México. Editorial Limusa Wiley, S.A. pp. 157-158.

MOLYNEUX P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for stimating antioxidant activity. *Journal of science and technology;* 26: 211-219.

MORENO G.M.N. 2000. El nance [(*Byrsonima crassifolia* L) H.B.K.] como recurso natural antimicrobiano en enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Universidad de Ciencias y Artes del estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pág. 74.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525.

MURRAY, R. MAYES, P. GRANNER, D. Y RODWELL, V. 1997. *Bioquímica de Harper. Manual moderno.* 14^{ava} edición. México, D.F. p 678.

OJHA H., MISHRA K., CHAUDHURY N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry;* 130: 1036–1043.21:143-152.

Ortíz M.A., Reza V.M., Rodolfo G. CHEW M. R. y MEZA V. J. 2011. *Propiedades Funcionales de las antocianinas,* 16 – 22.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. 200). *Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev* 2, 270-278.

PELLEGRINI N., SERAFIN M., SALVATORE S., DEL RIO, D., BIANCHI M., BRIGHENTI, F. 2006. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, must, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assay. *Molecular Nutrition and Food Research,* Weinheim, v. 50, n. 11, p. 1030-1038.

PENNINGTON T. D. y SARUKHÁN J. 2005. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp: 304 -305.

PERAZA-SÁNCHEZ, S.R., CEN, F., NOH, A., MAY, F., SIMÁ, P., DUMONTEIL, E., GARCIA, M.R., MUT, M. 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán península. *Phytoterapy* 78, 315-318.

PRIHODA A. Las plantas y la Salud. E.D. Susatta. 1ra. Ed. España.1991. pp 10- 11

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem.*; 53(10):4290-302.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem.*; 53(10):4290-302.

RAMIREZ, M. R. 2008. Análise química e avaliacao das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (mirtilo e Amora-Preta). 2008. 243 p. Tese (Doutor em ciencias Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

RASTRELLI L, DE TOMMASI N, BERGER I, CACERES A, SARAVIA A, DE SIMONA F. 1997. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry.* ; 45:647–650.

ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKE, G., SWATSITANG P. AND GLOVER W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401–436.

SAENZ-LOPEZ R., FERNANDEZ-ZURBANO P. Y TENA M. T. 2003. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanin in wine. *Journal of Chromatography*, 990:247-258.

SANTOS-BUELGA, C., SCALBERT, A. 2000. Proantocyanidins and tanninlike compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1094–1117.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWEN, J.; Agarwal, A.; JENSEN, D. S.; HART, A. N.; Shambrom, E. 2006b. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *J. Agric. Food Chem.* Published on Web 10/07/06.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L. R.; GARDNER, P. T.; HEINONEN, M.I.; HOPIA, A; HUYNH-BA, Y.; LAMBELET, P.; MACPHAIL, D.; SKIBSTED, L. H.; TIJBURG, L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. *European Food research and Technology*, Berlin, v. 212, n. 3, p. 319-328.

SEERAM, N. P. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Easton, v. 56, p. 627-629.

SEERAM, N. P. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Easton, v. 56, p. 627-629.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2432-2438.

SHAHIDI, F. 2000. Los antioxidantes en los alimentos y los antioxidantes. *Nahrung*, 44: 158-163.

SHAHIDI, F. 2002. Los antioxidantes en las plantas y las semillas oleaginosas, en los radicales libres en los alimentos: Química, Nutrición y Efectos en la salud. Morello, MJ, Shahidi, F., y Ho, CT., Eds., ACS Symposium Series 807. American Chemical Society, Washington, DC, 162-175.

SHAHIDI, F. NACZK, M. 1995. Food phenolics: Sources, chemistry, effects and Applications. Technomic publishing. Inc p. 247-260.

SHERWIN, E.R. 1978. La oxidación y antioxidantes en el tratamiento de la grasa y el aceite. J. Am. Chem Oil. Soc., 55: 809 a 814.

SHIPP J. Y ABDEL-AAL S. M. 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. The Open Food Science Journal, 4:7-22.

SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S, ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. 2007a. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food Chem 101, 1012-1018.

SINGLETON, V. and ROSSI, J. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. Vo. 16. p. 144-158.

SOCIEDAD ESPAÑOLA de NUTRACÉUTICA MÉDICA (SENM)
Comentario: Dr. Sergio Serna Saldivar. Alimentos nutracéuticos futuro de nuestra alimentación

SOTERO S. V. E., GARCIA DE SOTERO D. E. 2009; Manual de análisis Químico de Alimentos, 1º Edición, Edit, CONCYTEC, Iquitos-Perú, Pág. 7-8,

STARKE-REED, P., 2003. Antioxidantes. nutrición del instituto nacional de estudios sobre el envejecimiento. Maryland, Estados Unidos.

STOCLET, J. C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M. H.; EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M; SHINI-KERTH, V.B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. European Journal of Pharmacology, Amsterdam, v. 500, p. 299-313.

SWAIN T.; GOLDSTEIN J.L. 1964. Methods in Polyphenol Chemistry. Pergamon Press, Oxford, 131-146.

TSUDA, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Noriobu, S.; Choi, S.W.; Kawakishi, S., Osawa. 1994. T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D glucoside and cyanidin. J. Agric. Food Chem., 42, 2407-2410.

VALLS J., LAMPREAVE M., NADAL M., AROLA L. 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Alimentación equipos y tecnología, v. 19, n. 2, p. 119-124.

VAN SUMERE, C.F. 1989. Phenols and phenolic acids, in *Methods in Plant Biochemistry, Volume 1, Plant Phenolics*. Harborne, J.B., Ed., Academic Press, London, 29–74.

VELA P, R. S.; CUZCANO P. J. M. 2015. Evaluación Bromatológica y de Antioxidantes fenólicos presentes en la pulpa de *Euterpe precatoria Mart.* y *Euterpe oleracea Mart.* (Huasaí). Trabajo Final de Carrera, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos-Perú. Pág. 47-48.

WILLIAMS CA, GRAYER RJ. Anthocyanins and other flavonoids. 2004. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide>.

WOLLGAST, J., ANKLAM, E.E. 2000. Review on polyphenols in theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res 33, 423-447.

WROLSTAD R. E. 2000.. Antocyanins. In F. J. Francis, & G. J. Lauro (Eds.), Natural Food Colorants , p. 237-252) New York: Marcel Dekker. Cap 11.

ZHANG Y., JAYAPRAKASAM B., SEERAM N. P., OLSON L. K., DEWITT D. Y NAIR M. G. 2004. Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. Journal Agricultural and Food Chemistry, 52:228-233.

ZURITA C.; ZAMBRANO. 2015.. Evaluación de Antioxidantes Fenólicos presente en la madera y hojas de *Brosimum rubescens* (Palisangre). Trabajo Final de Carrera, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos-Perú. Pág. 69-85.

ANEXOS

ANEXO N° 01

IMAGEN SATELITAL DE LA UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL DISTRITO DE LAMAS, SAN MARTIN - PERÚ



Ubicación geográfica del distrito de Lamas, San Martín-Perú
Fuente: <http://www.coordenadas-gps.com/>

ANEXO N° 02.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

A



B



C



D



E



F



A: Proceso de maceración de la materia prima. **B:** Proceso de filtración del extracto. **C:** Proceso de concentración en el rotavapor. **D:** Secado a temperatura ambiente del extracto concentrado. **E:** Molido. **F:** Extracto seco obtenido de todo el proceso.

ANEXO 3

ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES



Elaboración de DPPH



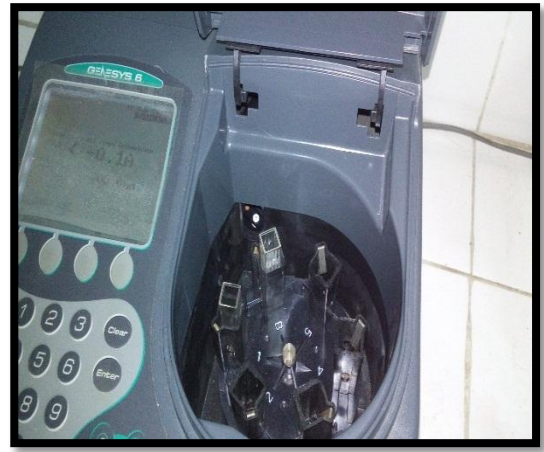
Elaboración de Flavonoides



Elaboración de Antocianinas



Elaboración de Fenoles Totales



Equipo Espectrofotómetro UV-Visible

ANEXO 04

ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO) CON EL MÉTODO DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (1 mM)	Extracto etanólico INDANO (muestra-seca) primera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.012	0.178	0.149	0.230	0.281	0.178
2	0.161	0.008	0.135	0.154	0.225	0.276	0.135
3	0.160	0.008	0.105	0.140	0.218	0.273	0.105
4	0.160	0.007	0.090	0.120	0.216	0.272	0.090
5	0.160	0.007	0.085	0.113	0.212	0.269	0.085
6	0.160	0.007	0.065	0.104	0.211	0.268	0.065
7	0.160	0.007	0.058	0.096	0.209	0.265	0.058
8	0.160	0.007	0.053	0.091	0.207	0.264	0.053
9	0.160	0.007	0.049	0.086	0.205	0.262	0.049
10	0.160	0.006	0.047	0.082	0.205	0.261	0.047
Promedio	0.160	0.008	0.087	0.114	0.214	0.269	0.087
Porcentaje de Inhibición, %		95.25	45.94	29.06	-33.63	-68.19	45.94

ANEXO N° 05.

ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO) CON EL MÉTODO DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (100uM)	Extracto etanólico INDANO (muestra-seca) segunda lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.011	0.180	0.148	0.227	0.281	0.180
2	0.161	0.007	0.136	0.152	0.227	0.276	0.136
3	0.161	0.008	0.102	0.139	0.219	0.273	0.102
4	0.160	0.007	0.089	0.119	0.216	0.272	0.089
5	0.160	0.007	0.075	0.112	0.212	0.269	0.075
6	0.160	0.007	0.064	0.103	0.210	0.268	0.064
7	0.160	0.006	0.058	0.096	0.209	0.264	0.058
8	0.160	0.007	0.053	0.091	0.206	0.263	0.053
9	0.160	0.007	0.049	0.086	0.205	0.261	0.049
10	0.160	0.007	0.047	0.082	0.205	0.260	0.047
Promedio	0.160	0.007	0.085	0.113	0.214	0.269	0.085
Porcentaje de Inhibición, %		95.38	46.79	29.63	-33.25	-67.62	46.79

ANEXO 06

ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO) CON EL MÉTODO DPPH

Número de lecturas	Solución DPPH (100uM)	Extracto etanólico INDANO (muestra-seca) tercera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.011	0.178	0.147	0.202	0.282	0.178
2	0.161	0.007	0.131	0.150	0.227	0.275	0.131
3	0.160	0.007	0.101	0.136	0.220	0.273	0.101
4	0.160	0.007	0.087	0.118	0.216	0.272	0.087
5	0.161	0.007	0.075	0.111	0.212	0.268	0.075
6	0.160	0.007	0.064	0.102	0.210	0.265	0.064
7	0.160	0.007	0.057	0.096	0.209	0.264	0.057
8	0.160	0.006	0.053	0.091	0.206	0.262	0.053
9	0.160	0.007	0.049	0.086	0.205	0.261	0.049
10	0.160	0.007	0.047	0.082	0.205	0.260	0.047
Promedio	0.160	0.007	0.084	0.112	0.211	0.268	0.084
Porcentaje de Inhibición, %		95.45	47.47	30.19	-31.75	-67.31	47.47

ANEXO N° 07

ABSORBANCIAS OBTENIDAS ENTRE 400-700 NM PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LA CORTEZA *Byrsonima crassifolia* (INDANO)

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	A°	λ (nm)	A°
504 nm	0.502 A	455 nm	0.755 A
493 nm	0.538 A	454 nm	0.756 A
490 nm	0.550 A	454 nm	0.762 A
493 nm	0.540 A	455 nm	0.767 A
476 nm	0.575 A	453 nm	0.770 A
478 nm	0.579 A	453 nm	0.768 A
490 nm	0.558 A	453 nm	0.769 A
490 nm	0.558 A	454 nm	0.774 A
480 nm	0.563 A	453 nm	0.776 A

ANEXO N° 08

ABSORBANCIAS OBTENIDAS ENTRE 765 NM PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRON DE FENOLES TOTALES

Absorbancia	
λ (765nm)	A°
0.000	0
0.219	0.02
0.463	0.04
0.620	0.06
0.842	0.08
1.061	0.1

Solución patrón de ácido gálico

ANEXO N° 09.

ABSORBANCIAS OBTENIDAS ENTRE 500 NM PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR DE TANINOS

Absorbancia	
λ (500nm)	A°
20.00	0.1971
40.00	0.4765
60.00	0.7690
80.00	0.9594
100.00	1.2018
20.00	0.1971

Solución patrón de ácido gálico

ANEXO N° 10.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HEKSAMUSUM AMAZONENSE (AMAZ)

Esquina Pevas/Nanay -
E-mail: cgrandezii@hotmail.com.
Iquitos-Perú

CERTIFICACION

Consta por el presente que el suscrito Blgo. César A. Grández Rios, con Número de colegiatura 3052, consultor Botánico del Ministerio de Agricultura (Dirección Forestal y Fauna) que, la especie presentado a la vista por el Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, corresponde a la especie de *Byrsonima crassifolia* (L) Kunth, se expide el presente a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente.

IQUITOS 04 DE JUNIO DEL 2014



BLGO. CESAR A. GRANDEZ RIOS
CBP N° 3052