

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y
NUTRICIÓN HUMANA

TESIS

“Evaluación de antioxidantes a partir de las hojas, flores y tallos de la especie
Lippia dulcis Trev. (MENTA DULCE)”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Licenciado en Bromatología y Nutrición Humana

PRESENTADO POR:

Br. ALEXIS NOVOA CÁRDENAS
Br. ANTHONY PINEDO MERA

ASESORES:

Ing. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO. Dr.
Ing. JORSE ISAAC VILLACRES VALLEJO. Dr.
Ing. ROGER RUÍZ PAREDES. Mg.
Qf. EDGAR NOVOA CÁRDENAS.

IQUITOS - PERÚ

2016


AUTORIZACIÓN DEL ASESOR

Doctor Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, MSc. Roger Ruiz Paredes, docentes principales del Departamento de Ingeniería de alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Amazonía Peruana, Doctor Jorge Isaac Villacres Vallejo, docente principal de la Facultad Agronomía de la Universidad Nacional de Amazonía Peruana y Químico Farmacéutico Edgar Novoa Cárdenas, Responsable del almacén especializado de medicamentos - DIREMID - DIRESA LORETO.

INFORMAMOS

Que los bachilleres ALEXIS NOVOA CÁRDENAS Y ANTHONY PINEDO MERA, han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo contenido en la memoria intitulada: "EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LAS HOJAS, FLORES Y TALLO DE LA ESPECIE *LIPPIA DULCIS* (MENTA DULCE)"; y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el Jurado Calificador, a tal efecto damos pase para su sustentación y posterior obtención del título de LICENCIADO EN BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA.

AUTORIZAMOS: A los citados bachilleres a presentar el Trabajo Final de Carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo, así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.



Dr. Alenguer G. Alva Arévalo



Dr. Jorge I. Villacres Vallejo



MSc. Roger Ruiz Paredes



Qf. Edgar Novoa Cárdenas

MIEMBROS DE JURADO

Tesis aprobada en sustentación pública en la ciudad de Iquitos en las instalaciones del Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Amazonía Peruana, llevado a cabo el día **viernes 05 de agosto del 2016**, siendo los miembros del jurado calificador los abajo firmantes:



Segundo Arzola del Apudta
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP. 2000

Presidente



Jorge
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP. 2000

Miembro



Emilio Díaz Sotomayor
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP. 2000

Miembro



Carlos
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP. 2000

Miembro Suplente

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Escuela de Formación Profesional de
Bromatología y Nutrición Humana

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, siendo las 11:00 am horas del día Viernes 05 de agosto de 2016, en las instalaciones del Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas 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 "EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LAS HOJAS, FLORES Y TALLO DE LA ESPECIE *Lippia dulcis* (MENTA DULCE)", presentado por los bachilleres: ALEXIS NOVOA CARDENAS y ANTHONY PINEDO MERA, con el asesoramiento de don Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, Roger Ruiz Paredes, Jorge Villacres Vallejo y Edgar Novoa Cárdenas.

Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal N° 048-FIA-UNAP-2015, del 11 de Abril del 2016.

Ing. Segundo Arévalo del Aguila	-	Presidente
Ing. Jorge Augusto Torres Luperdi	-	Miembro
Ing. Emilio Diaz Sangama	-	Miembro
Ing. Carlos Antonio Li Loo Kung	-	Miembro Suplente

Siendo las 12:30 m horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido APROBADO con la nota de 14 y el calificativo de BUENA, estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Licenciados en Bromatología y Nutrición Humana.

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


Segundo Arévalo del Aguila
Ingeniero en Industrias Alimentarias
Presidente


Emilio Diaz Sangama
Ingeniero en Industrias Alimentarias
Miembro Titular


Miembro Titular
Jorge Augusto Torres Luperdi
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 23850


Carlos Antonio Li Loo Kung
Ingeniero en Industrias Alimentarias
Miembro Suplente

DEDICATORIA

ALEXIS NOVOA CARDENAS.

A DIOS, por darme la vida y buena salud, a mis hijos por ser fuente de mi inspiración, motivación y deseo de superación, a mis padres, doña Silvia Inés Cárdenas Meléndez y don Robin Novoa Chávez por darme el apoyo y consejos incondicional. A mi hermano, Edgar Novoa Cárdenas, por brindarme su apoyo, sus conocimientos y consejos, para la culminación del presente trabajo.

ANTHONY PINEDO MERA.

A DIOS por las bendiciones y la protección que me brinda cada día. A mi hija Camila Belmira Pinedo Aricara por ser el motivo de superación por bien de ella. A mis padres Belmira Mera de Pinedo y Absalón Santiago Pinedo Serna por sus apoyo y consejos incondicional.

A mis hermanos por sus apoyo y acompañamiento a lo largo del desarrollo de este trabajo

AGRADECIMIENTO

A nuestra casa de estudios, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, facultad de Industrias Alimentarias, Escuela de formación profesional de Bromatología y Nutrición Humana.

A nuestros padres y hermanos, por darnos sus apoyo incondicional y paciencia durante el desarrollo del presente trabajo investigación.

A nuestros asesores, Ing. Alenguer G. Alva Arévalo, Dr., Ing. Jorge I. Villacres Vallejo, Dr., Ing. Roger Ruíz Paredes, Mg., Qf. Edgar Novoa Cárdenas, por sus apoyo incondicional y paciencia, así mismo por facilitarnos sus conocimientos y experiencias para la realización de este trabajo de investigación.

Al Instituto de Medicina Tradicional y a las plantas pilotos de la UNAP, por las facilidades otorgadas y el uso de sus instalaciones para la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

Y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo de investigación.

RESUMEN

La presente investigación se ejecutó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de la especie *Lippia dulcis* Trev. (Menta dulce) en los extractos de hojas, flores y tallo. La determinación de la actividad antioxidante, se realizó por el método DPPH, para la determinación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología de Singleton y Rosii (1965), para la determinación de taninos se empleó la metodología de Valls (2000), para antocianinas fue determinada por el método de pH diferencial, con la metodología de Sotero y García (2009), para la determinación de flavonoides se utilizó la metodología de Gutiérrez (2000), obteniendo, para el extracto de hojas/flores de la *Lippia dulcis* (menta dulce), una actividad antioxidante del 25%, a partir de una concentración mínima de 1,3 mg/ml aproximadamente a su vez, flavonoides ($45,68 \pm 0,04$ g quercetina/100 g muestra original), fenoles totales ($112,22 \pm 0,0$ mgGAE/ 100 g muestra original), taninos ($14,21 \pm 0,10$ mg (+)- catequina/100 g muestra original), y en el extracto de tallo de *Lippia dulcis* (Menta dulce), una actividad antioxidante del 25%, a partir de una concentración mínima de 0,09 mg/ml aproximadamente, fenoles totales ($96,10 \pm 0,0$ mgGAE/ 100 g muestra original), taninos ($6,33 \pm 0,09$ mg (+)-catequina/100 g muestra original), flavonoides ($0,20 \pm 0,0$ g quercetina/100 g muestra original) y antocianinas ($0,56 \pm 0,50$ mg cianidina-3-glucosido/100 g muestra original).

Palabras claves: Nombre científico, Compuestos Antioxidantes, Hojas, Flores, Tallo, Compuestos Fenólicos

INDICE

Autorización de asesor	ii
Miembros del jurado	iii
Acta de sustentación	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Resumen	vii
	Página.
CAPITULO I:	01
1. Introducción	02
CAPITULO II:	04
2. Revisión de literatura	05
2.1 Lippia dulcis. (Menta dulce)	05
2.1.1 Descripción taxonómica de la especie	05
2.1.2 Nombres comunes de la especie	06
2.1.3 sinónimos de la especie	06
2.1.4 descripción general de la especie	06
2.1.5 distribución geográfica y ecológica	07
2.1.5.1 fitogeografía	07
2.1.5.2 hábitat	07
2.1.6 uso y potencial económico	07
2.1.6.1. propiedades y aplicaciones.	07
2.1.6.2. usos y prácticas medicinales tradicionales y locales.	08
2.1.6.3. usos y prácticas comerciales tradicionales y locales	08
2.1.7. Cosecha y recolección	08
2.1.8. Rendimiento	08
2.1.9. Procesado de la cosecha	09
2.1.10. Estudios realizados a la <i>Lippia dulcis trev.</i>	09
2.2. Antioxidante	11
2.2.1. radicales libres y especies reactivas de oxígeno	11

2.2.2. Estrés oxidante.	11
2.2.3. Anión superóxido	12
2.2.4. Peróxido de hidrogeno	12
2.2.5. Radical hidroxilo	13
2.2.6. Definición de antioxidante	13
2.2.7. Función de los antioxidantes	16
2.2.8. Actividad antioxidante	16
2.2.8.1. Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)	17
2.2.9. Clasificación de los Antioxidantes	19
2.2.9.1. Enzimáticos	20
2.2.9.1.1. Las Superóxido dismutasas (SOD)	20
2.2.9.1.2. Las Glutación peroxidasas (GPx)	20
2.2.9.1.3. La catalasa	21
2.2.9.2. No Enzimáticos	21
2.2.9.2.1. Glutación	21
2.2.9.2.2. Ubiquinonas	22
2.2.9.3. Exógenos	23
2.2.9.3.1. Vitaminas	23
2.2.9.3.1.1. Vitamina "C"	23
2.2.9.3.1.2. Vitamina "E"	23
2.2.9.4. Otros	24
2.2.9.4.1. Polifenoles	24
2.2.9.4.1.1. Compuestos fenólicos en las Plantas	24
2.2.9.4.1.2. Compuestos Fenólicos	24
2.2.9.4.1.3. Clasificación de los compuestos fenólicos	25
2.2.9.4.1.4. Cuantificación de Compuestos Fenólicos	28
a. Técnicas espectrofotométricas	29
b. Ensayo ultravioleta	29
2.2.9.4.2. Carotenoides	30
2.2.9.4.3. Retinol	31

2.2.10. Análisis para Antioxidantes Fenólicos	31
2.2.10.1. Determinación de Fenoles Totales	31
2.2.10.2. Determinación de Flavonoides	32
2.2.10.3. Determinación de Antocianinas	33
2.2.10.4. Determinación de Taninos	34
2.3. Los Nutraceuticos	36
2.3.1. Definición	36
2.4. Alimentos Funcionales o Alimentos Enriquecidos	38
CAPITULO III	40
3. Materiales, Equipos y Métodos	41
3.1. Materiales	41
3.1.1. Hojas, flores y tallo de la menta dulce (<i>Lippia dulcis trev.</i>)	41
3.1.2. Equipos	42
3.1.3. Reactivos	43
3.2. Métodos	44
3.2.1. Metodología	44
3.2.1.1. Tipo y Diseño de Estudio	44
3.2.1.2. Diseño Maestral	44
3.2.1.3. Población y muestra	45
3.2.1.3.1. Población	45
3.2.1.3.2. Muestra	45
3.2.2. Procedimiento para la recolección de información	45
3.2.2.1. Materia prima	45
3.2.2.2. Pesado	45
3.2.2.3. Triturado	46
3.2.2.4. Maceración	46
3.2.2.5. Filtración	46
3.2.2.6. Concentración	46
3.2.2.7. Molido	46
3.2.2.8. Determinación de antioxidantes	46
3.2.3. Análisis de antioxidantes fenólicos	48
3.2.3.1. Preparación del extracto etanólico	48
3.2.3.2. Determinación de fenoles totales	48
3.2.3.3. Determinación de flavonoides	49
3.2.3.3.1. Determinación de flavonoides	50

3.2.3.4. Determinación de antocianinas, por el método pH diferencial	50
3.2.3.4.1. Procedimiento	50
3.2.3.5. Determinación taninos	51
3.2.3.6. Análisis de los datos	51
3.2.4. tamizaje fitoquímica	52
3.2.4.1. Método	52
3.2.4.2. Fundamento	52
3.2.4.3. Procedimiento	52
Reacciones de Identificación	53
3.2.4.4. Ensayo para alcaloides	53
3.2.4.5. Ensayo para triterpenos y esteroides	54
3.2.4.6. Ensayo para quinonas	54
3.2.4.7. Ensayo para Lactonas y Cumarinas	54
3.2.4.8. Ensayo para β -carotenos y retinol	55
3.2.4.9. Ensayo para saponinas	55
3.2.4.10. Ensayo para aminoácidos y aminas	56
3.2.4.11. Ensayo para fenoles y/o taninos	56
3.2.4.12. Ensayo para flavonoides	56
3.2.5. evaluación de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH ⁺ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	56
CAPITULO IV	58
4. Resultados	59
4.1. Tamizaje fitoquímico	59
4.2. Determinación de β - Caroteno y Retinol	60

4.3.	Evaluación de la Actividad Antioxidante, Fenoles Totales, Antocianinas, Flavonoides y Taninos de las hojas y flores de la especie <i>Lippia dulcis</i>	61
4.3.1.	Determinación de la actividad antioxidante con el método del DPPH	61
4.3.2.	Determinación de la actividad antioxidantes de las Hojas y Flores de <i>Lippia dulcis</i> (<i>Menta dulce</i>)	61
4.3.3.	Evaluación de Fenoles Totales de las Hojas y Flores de <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	63
4.3.4.	Evaluación Flavonoides de las Hojas y Flores <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	65
4.3.5.	Evaluación antocianinas de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	66
4.3.6.	Evaluación taninos de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	68
4.3.7.	Comparación de los compuestos fenólicos de flores y hojas de <i>Lippia dulcis</i>	70
4.4.	Evaluación de la actividad antioxidante, fenoles totales, antocianinas, flavonoides y taninos del tallo de la especie <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	71
4.4.1.	Determinación de la actividad antioxidantes del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	71
4.4.2.	Evaluación de fenoles totales del tallo de la <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	73
4.4.3.	Evaluación de antocianinas del tallo de la <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	73
4.4.5.	Evaluación de flavonoides del tallo de <i>Lippia dulcis</i> . (<i>menta dulce</i>).	75
4.4.6.	Evaluación de taninos del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (<i>menta dulce</i>)	76

4.4.7.	Resumen de compuestos fenólicos en tallo de <i>Lippia dulcis</i> .	77
4.4.8.	comparación entre las hojas/flores y en el tallo de la especie <i>Lippia dulcis</i> . (<i>menta dulce</i>)	79
CAPITULO V		81
5.	Conclusiones y recomendaciones	82
5.1.	Conclusiones	82
5.2.	Recomendaciones	83
CAPITULO VI		84
6.	Referências bibliográficas	85
ANEXO		97

LISTA DE TABLAS

	Página.
Tabla N°01: Clasificación taxonómica de la especie <i>Lippia dulcis</i> .	05
Tabla N°02: Clasificación de antioxidantes	19
Tabla N°03: Concentración de fenoles y antocianos en diversas frutas	28
Tabla N°04: Insumos usados en la tesis	43
Tabla N°05: Resultados del tamizaje fitoquímico	59
Tabla N°06: Contenido de β - Caroteno de la <i>Lippia dulcis</i>	60
Tabla N°07: Contenido de Retinol de la <i>Lippia dulcis</i>	60
Tabla N°08: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a la hoja y flor de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	62
Tabla N°09: Porcentaje de inhibición de las Hojas y Flores de la <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	62
Tabla N°10: Contenido de fenoles totales de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	64
Tabla N°11: Determinación de flavonoides de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i>	65
Tabla N°12: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de flores y hoja de <i>Lippia dulcis</i> (MENTA DULCE)	66
Tabla N°13: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en las hojas y flores de la menta dulce	68
Tabla N°14: Contenido de taninos condensados de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i>	69
Tabla N°15: Resumen de los contenidos de compuestos fenólicos presentes en las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i>	70
Tabla N°16: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas al tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	71

Tabla N°17: Porcentaje de inhibición del tallo de la <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	72
Tabla N°18: Tabla de contenido de fenoles totales en el tallo de <i>Lippia dulcis</i>	73
Tabla N°19: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	74
Tabla N°20: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes del tallo de la <i>Lippia dulcis</i> . (menta dulce)	75
Tabla N°21: Determinación de flavonoides del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	76
Tabla N°22: Contenido de taninos de tallo de <i>Lippia dulcis</i> (MENTA DULCE)	77
Tabla N°23: Resumen del contenido de compuestos fenólicos presentes en el tallo de la <i>Lippia dulcis</i>	77
Tabla N°24: Comparación del contenido de Compuestos Fenólicos entre el tallo y las hojas/Flores de <i>Lippia dulcis</i>	79

LISTA DE FIGURAS

	Página.
Figura N°01: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	18
Figura N°02: Estructura química del Glutati6n y la Coenzima Q	22
Figura N° 03: Reacci6n del tocoferol para formar el radical peroxil	23
Figura N°04: Estructura Química de la Vitamina C y E respectivamente	24
Figura N°05: Anillo fen6lico	26
Figura N°06: Estructura química del esqueleto b6sico de los flavonoides	26
FiguraN°07: Estructura de la quercetina	33
Figura N°08: Estrutura de antocianinas a diferentes pH's	34
Figura N°09: Mecanismo de reacci6n de vainillina con taninos	36
Figura N°10: Hojas, Flores y Tallos de <i>Lippia dulcis</i>	42
Figura N°11: Obtenci6n de los extractos de hojas, flores y tallo de la Menta dulce (<i>Lippia dulcis</i>)	47
Figura N°12: Porcentaje de inhibici6n a las diferentes concentraciones de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	63
Figura N°13: Curva padr6n de 6cido g6lico para c6lculo de fenoles totales	64
Figura N°14: Absorci6n del extracto etan6lico de flores y hoja <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinaci6n de antocianinas	67
Figura N°15: Absorci6n del extracto etan6lico de flores y hoja <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinaci6n de antocianinas	67
FiguraN°16: Curva est6ndar de taninos para c6lculo de Catequinas y Proantocianidoles	69

Figura N°17: Comparación de los compuestos fenólicos presentes en las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> .	70
Figura N°18: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce)	72
Figura N°19: Absorción del extracto etanólico del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas	74
Figura N°20: Absorción del extracto etanólico del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (menta dulce). De 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas	75
Figura N°21: Resumen de los compuestos fenólicos presentes en el tallo de <i>Lippia dulcis</i>	78
Figura N°22: Comparación del contenido de Compuestos Fenólicos entre el tallo y las hojas/Flores de <i>Lippia dulcis</i>	80

LISTA DE ANEXOS

	Página.
Anexo N°1: Absorbancias del extracto de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH	98
Anexo N°2: Absorbancias del extracto de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH	98
Anexo N°3: Absorbancias del extracto de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH.	99
Anexo N°4: Absorbancias del extracto del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH	99
Anexo N°5: Absorbancias del extracto del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH	100
Anexo N°6: Absorbancias del extracto del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce), con el método DPPH	100
Anexo N°7: Determinación de Fenoles Totales Hojas y Flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	101
Anexo N°8: Determinación de Taninos de hojas y flores de <i>Lippia</i> <i>dulcis</i> (Menta dulce)	101
Anexo N°9: Determinación de Antocianinas de hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	102
Anexo N°10: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de Antocianinas de hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	102
Anexo N°11: Determinación de Flavonoides de las hojas y flores de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	103

Anexo N°12: Determinación de Fenoles Totales del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	103
Anexo N°13: Determinación de Taninos del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	104
Anexo N°14: Determinación de Antocianinas del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	104
Anexo N°15: Absorbancias Obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de Antocianinas del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	105
Anexo N°16: Determinación de Flavonoides del tallo de <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	105
Anexo N°17: Comparación de Fenoles Totales de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	106
Anexo N°18: Comparación de Taninos de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	106
Anexo N°19: Comparación de Antocianinas de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	107
Anexo N°20: Comparación de Flavonoides. de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	107
Anexo N°21: Imagen satelital de la ubicación geográfica del Huerto “PLANTAS MEDICINALES” del cual se obtuvo la materia prima para este estudio	108
Anexo N°22: Determinación de β - Caroteno de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	108
Anexo N°23: Determinación de Retinol de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	109
Anexo N°24: Tamizaje Fitoquímico de la <i>Lippia dulcis</i> (Menta dulce)	109

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La República del Perú se caracteriza por la gran biodiversidad de flora y fauna que se encuentran dentro de su amazonia, los cuales son utilizadas con fines medicinales y sociales; es por ello, que aquellas plantas al ser estudiadas por el hombre podrían ser una fuente de nuevos compuestos químicos que aporten soluciones a varios inconvenientes medicinales y nutricionales.

Así también los alimentos además de aportar energía y nutrientes, contiene una serie de sustancias no nutritivas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales; sustancias colorantes (pigmentos), aromáticas, reguladores del crecimiento, protectores naturales, que no tienen una función nutricional clásicamente definida, o no son considerados esenciales para la salud humana, pero que pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad.

Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células, estos ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E (PINEDA, 2005).

Los antioxidantes son compuestos fenólicos que inhiben o retrasan el proceso oxidativo de otras moléculas. La mayoría de antioxidantes naturales se obtienen a partir de plantas y son mayoritariamente compuestos fenólicos o polifenólicos (Llobera, 2004).

Está demostrado el efecto protector de los antioxidantes biológicos contra el cáncer y sobre enfermedades coronarias, arterioesclerosis, diabetes, artritis

reumática, Parkinson, Alzheimer, entre otros. Igualmente retardan el proceso de envejecimiento celular (Rupasinghe & Clegg, 2007).

Así pues, el uso de antioxidantes naturales ha sido promovido debido a los efectos positivos que tienen sobre la salud, pero también debido a la creciente preocupación de que algunos antioxidantes sintéticos pueden tener efectos secundarios no deseables sobre la salud (Majo et al., 2008).

En los últimos años se ha despertado el interés en buscar alternativas naturales, como por ejemplo los biofenoles de plantas, que tengan una actividad antioxidante similar o incluso superior a los antioxidantes sintéticos. Este es el motivo por el cual, el estudio de antioxidantes naturales ha aumentado de forma considerable (Beutner, 2001).

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).

CAPÍTULO II:

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Lippia dulcis*. (menta dulce).

La menta dulce, es una hierba perenne, erecta, raramente arriba de 40 cm de alto. Usualmente más o menos fruticosa cerca de la base, fuertemente aromática. (Orellana Polanco. 2000).

2.1.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE

Tabla N°01: Clasificación taxonómica de la especie *Lippia dulcis*.

Clasificación Científica	
Reino	Plantae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Metachlamydeae
Orden	Tubiflorae
Familia	Verbenaceae

Fuente: Mostacero Lion J, Mejía Coico F, Gamarra Torres O. 2002

2.1.2 NOMBRES COMUNES DE LA ESPECIE

La menta dulce (*Lippia dulcis* o *Phyla dulcis*), se puede conocer por diversos nombres de acuerdo o dependiendo del lugar donde se encuentre.

Guatemala: Orozús, orozul, Hierba dulce; **México:** Hierba dulce; **Panamá:** Hierba dulce, Salvia santa; **Perú:** Menta dulce. (Orellana Polanco. 2000).

2.1.3 SINÓNIMOS DE LA ESPECIE

- *Lippia scaberrima* Sonder.
- *Phyla dulcis* Moldenke.
- *Phyla scaberrima* Moldenke.
- *Zapania scaberrima* Jussieu ex Persoon.

Fuente: Orellana Polanco.2000

2.1.4 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE

La menta dulce, a menudo los tallos producen raíces en los nudos basales, estrigoso a casi glabro; hoja con peciolos de 0,5-1,5 cm de largo, la lámina rómbica a ovada, 1-6 cm de largo, aguda o algunas veces acuminada, ampliamente cuneada en la base, los márgenes crenado-serrado , la superficie superior estrigosa, áspera al tacto, esparcida a densamente estrigosa en la parte inferior y obscuramente glandular; pedúnculos solitarios en la axila de la hoja, 1-5 cm de largo; espigas ovoide-globosas al inicio, después cilíndricas, cerca de 6 mm de grosor, las cabezas ocasionalmente elongadas hasta cerca de 3 cm de longitud en la madurez pero usualmente cortas; brácteas cuneado-obovadas, obtusas y abruptamente acuminadas; cáliz diminuto, viloso; corola blanca, 1-1,5 mm de largo. (Orellana Polanco.2000).

2.1.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ECOLÓGICA

2.1.5.1 FITOGEOGRAFÍA

Originaria de América. Se distribuye del sur de México a Panamá. (Orellana Polanco.2000).

2.1.5.2 HÁBITAT

Crece en matorrales húmedos, riberas de ríos arboledos, bordes de estanques, o en claros abiertos de pasturas siempre que exista suficiente humedad. (Orellana Polanco.2000)

2.1.6 USO Y POTENCIAL ECONÓMICO.

2.1.6.1. PROPIEDADES Y APLICACIONES.

A las hojas se les atribuyen propiedades antitusiva, aromática, balsámica, diaforética, diurética, emenagoga, emoliente, espasmolítica, estimulante, expectorante, febrífuga, pectoral, sedante, sudorífica y tónica. (Orellana Polanco.2000)

La *Lippia dulcis* ha sido empleada en medicina tradicional. En Guatemala, el cocimiento de las hojas se usa para el tratamiento de afecciones digestivas, *e.g.* diarrea, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis, parásitos intestinales y vómitos, enfermedades respiratorias, *e.g.* asma, bronquitis, gripe, tos y desórdenes menstruales. A las hojas y tallos se les atribuyen propiedades diaforéticas, diuréticas, espasmolítica, estimulantes, expectorantes, sedantes, sudoríficas, tónicas y edulcorantes. (Gupta. 1995).

En México, se usa como emenagogo, en forma de baños vaginales, se le atribuyen propiedades abortivas y calmantes y ha sido reconocida como una planta con propiedades edulcorantes. (Compadre C.M. 1986).

2.1.6.2. USOS Y PRÁCTICAS MEDICINALES TRADICIONALES Y LOCALES.

El cocimiento, infusión o jugo de hojas frescas o secas se usan por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis, inflamación intestinal, parásitos intestinales, vómitos) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, gripe, resfrío, tos, tosferina), edema, fiebre, nefropatía, paludismo, cólico y desordenes menstruales. (Orellana Polanco.2000)

2.1.6.3. USOS Y PRÁCTICAS COMERCIALES TRADICIONALES Y LOCALES.

En Guatemala, las hojas y las flores de la planta se venden en seco en bolsas, es componentes de varios medicamentos con base en plantas medicinales, como saborizante y en otras como componente principal del elixires y jarabes. (Orellana Polanco. 2000)

2.1.7. COSECHA Y RECOLECCIÓN

La cosecha se lleva a cabo cuando las plantas empiezan a florecer, cortando los tallos rastreros dejando tacones de unos 30 cm de altura. La primera cosecha se puede efectuar a los 60-80 días después del trasplante, luego de esto se puede seguir efectuando cosechas periódicas para evitar que el follaje crezca muy exuberante. (Orellana Polanco.2000)

2.1.8. RENDIMIENTO

Rendimiento de hojas y flores secas de 2290 kg/ha, (2,29 tn/ha), la relación peso fresco: peso seco es 6:1. (Orellana Polanco.2000).

2.1.9. PROCESADO DE LA COSECHA

Después de la cosecha, la materia prima se debe lavar en recipientes de plástico con agua potable, con esto se elimina en especial la tierra que pueda traer del campo a causa del hábito rastrero de la planta; luego se desinfecta con agua clorada, agregando 2 gotas de cloro comercial por litro de agua. (Orellana Polanco.2000).

2.1.10. ESTUDIOS REALIZADOS A LA *LIPPIA DULCIS* TREV.

De los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Lippia dulcis*, fueron aislados e identificados 9 nuevos sesquiterpenos, a saber: (+)-4 β -hidroxihernandulcin (Kaneda, N. 1992), lippidulcin A, *epi*-lippidulcines A-C (Ono, M. 2005 - Ono, M. 2006), peroxilippidulcines A-C y peroxi-*epi* lippidulcin B (Ono, M. 2006); además, se identificaron cinco flavonoides: cirsimaritin, salvigenin, eupatorin, 5-hidroxi-6,7,3-4-tetrametoxiflavona y 5,3-dihidroxi-6,7,4,5-tetrametoxiflavona, y tres glucósidos feniletanoides. Algunos de estos compuestos mostraron actividad antioxidante (Ono, M. 2005).

En plantas colectadas de *Lippia dulcis* en Puerto Rico, se encontró una alta proporción de sesquiterpenoides (79%). Entre los principales compuestos se encontraron: el sesquiterpenoide intensamente dulce (+)-hernandulcina (36%) y (-)-*epi*-hernandulcina (22%). Alcanfor no fue determinado (<<0.01%). En un trabajo previo en México, *L. Dulcis*, presentó solamente cantidades traza de hernandulcina (40 ppm peso/peso, peso seco), mientras que el aceite esencial extraído por destilación por arrastre con vapor, presentó principalmente monoterpenoides (86%), alcanfor (53%). De acuerdo con esto se tendrían dos quimiotipos, tipo hernandulcina y tipo alcanfor. (Souto-Bachiller et al, 1997)

Se identificó un nuevo sesquiterpeno dulce, de las flores y hojas de *Lippia dulcis* colectada en Panamá, (+)-4-beta-hidroxihernandulcina, que fue

aislado con (+)-hernandulcina, (-)-epi hernandulcin, y 6-metil-5-hepten-2-ona. Acteoside (verbascoside), un glicósido fenilpropanoide fue aislado de las flores de *L. dulcis*. La estructura de la (+)-4-beta-hidroxihernandulcina se estableció por la interpretación de los datos espectrales. (Kaneda, N. 1992)

Mediante experimentos realizados por Extracción Supercrítica de Fluidos (SFE) en una unidad piloto a escala de laboratorio, indicaron mayor rendimiento del extracto total en el proceso SFE (de 1.7 a 3,4%), para todos los parámetros de la prueba en comparación con hidrodestilación (0,6%). El porcentaje de hernandulcina en los extractos obtenidos por SFE (12 MPa/ 35°C, 2,6 ± 0,1% de rendimiento total) era 41,9 ± 0,01% (masa de hernandulcina respecto a la masa inicial del extracto de la muestra). (Francisco de Oliveira. 2012)

En un análisis del aceite esencial de *Lippia dulcis*, de una población de Guatemala, colectada en tres meses de 2006, mostró resultados donde los componentes principales fueron 6metil-5-hepten-2-ona (18.8-21.4%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (9.6-11.1%) y abisabolol (8.0-14.6%), no siendo encontrada la hernandulcina. El rendimiento de extracción del aceite por hidrodestilación fue de 0.54% (abril), 0.50% (junio) y 0.60% (octubre). Las cetonas 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1ona, son los fragmentos térmicos de la hernandulcina, por lo cual es interesante aislar y cuantificar la hernandulcina en plantas de Guatemala. La hernandulcina fue detectada en la primera fase de este proyecto, en análisis efectuados por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases con detector de masas. (Jayes et al., 2008).

La marcha fitoquímica es la primera detección preliminar de los constituyentes químicos en las plantas, para determinar la metodología y la forma de extracción a utilizar. Los flavonoides son extraídos por solventes muy variados que van desde muy polares como agua y etanol

para los glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas (Lock, 1994).

2.2. ANTIOXIDANTE.

2.2.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) capaces de existir independientemente, y que contienen uno o más electrones desapareados en su último orbital, hecho que les confiere una elevada capacidad de reacción (Halliwell, 1989; Fang *et al.*, 2002); estos pueden ser de distintos tipos, según los átomos integrantes, pero destacan por su importancia en los sistemas biológicos los radicales libres derivados del oxígeno (Halliwell, 1989). Los radicales de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan por procesos endógenos como subproductos del metabolismo aeróbico que incluye a las mitocondrias, los peroxisomas, NADPH oxidasa, el citocromo P450 y la activación de las células inflamatorias (Ames *et al.*, 1993; Finkel y Holbrook, 2000). También pueden ser causados por factores exógenos como la contaminación ambiental, la exposición a diversos agentes químicos, por una dieta rica en ácidos grasos o como resultado de la exposición a radiación UV o a radiación ionizante (Davies, 2000; Finkel y Holbrook, 2000; Venkatachalam y Chattopadhyay, 2005), la vida media biológica de estos radicales libres es de microsegundos, pero tienen la capacidad de reaccionar con casi cualquier átomo o molécula que esté a su alrededor provocando estrés oxidante y provocar daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Finkel y Holbrook, 2000).

2.2.2. Estrés oxidante.

El estrés oxidante se define como el desequilibrio homeostático entre la generación de moléculas de alto potencial oxidante (ERO) originados de manera endógena y exógena y la insuficiencia de sistemas antioxidante biológicos (Sohal y Allen, 1990; Ferguson, 1999), las adiciones de

antioxidantes exógenos son particularmente importantes en la disminución del daño oxidativo acumulativo, ayudándonos a restablecer el equilibrio (Halliwell, 1994; Le Bourg, 2001).

El estrés oxidante contribuye al desarrollo de una amplia gama de enfermedades que incluyen Alzheimer, Parkinson, patologías causadas por la diabetes, artritis reumatoide, cáncer entre otros (Dreher y Junod, 1996; Rahman, 2007; Mayor-Oxilia, 2010).

2.2.3. Anión superóxido

El anión superóxido es un subproducto de las reacciones enzimáticas y no enzimáticas implicadas en los procesos metabólicos, tales como la fosforilación oxidativa (Raimondi *et al.*, 2008). La mayor parte del oxígeno consumido por los organismos se reduce a H₂O por la enzima citocromo c oxidasa en la reacción terminal de la cadena respiratoria mitocondrial. Una proporción de las moléculas de oxígeno (1-2%) se convierten en el radical anión superóxido (Turrens, 1997). El anión superóxido puede ser utilizado en el estallido respiratorio o explosión respiratoria de las células fagocíticas que incluye neutrófilos y macrófagos, con el fin de destruir las células extrañas, tales como las bacterias invasoras (Halliwell y Gutteridge, 1984; Josephy y Mannervik, 2006).

2.2.4. Peróxido de hidrógeno.

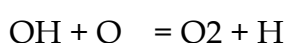
Es generado como un subproducto del metabolismo aeróbico, la radiación ionizante y la dismutación de radicales superóxido (Bewley *et al.*, 1986). El H₂O₂ no es un radical libre, pero cae en la categoría de especies reactivas del oxígeno (Boveris *et al.*, 1972). Esta especie puede traspasar y difundir por la membrana y tener efectos deletéreos por su capacidad de generar el radical hidroxilo (HO[•]) en presencia de metales de transición, a través de la reacción de Fenton (Costa y Imlay, 2001).

2.2.5. Radical hidroxilo.

El radical hidroxilo (OH^\bullet) es indiscriminadamente reactivo y genera numerosos a ductos de radicales y sus derivados (Woodruff *et al.*, 2004).

El radical OH^\bullet puede ser generado a través de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Devlin, 2004):

El radical hidroxilo puede interaccionar con otros radicales, formando productos más estables (Dorfman, 1973):



Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, los organismos aerobios utilizan una serie de defensas antioxidantes o "Scavengers" (captador) (Davies, 2000).

2.2.6. Definición de un Antioxidante.

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Cadenas y Parker, 2002; Youngson, 2003). Ejercen su efecto mediante la donación de electrones a las especies inestables generados a partir de procesos endógenos o exógenos (Kohlmeier *et al.*, 1995).

Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos, los primeros son sintetizados por el organismo por un sofisticado sistema de defensa antioxidante que contrarresta y regula los niveles de ERO en un intento por mantener la homeostasis celular (Bronzetti, 1994; Davies, 2000; Finkel y Holbrook, 2000). Por otra parte, los exógenos son aportados principalmente por la dieta, y son generalmente eficaces contra una amplia gama de mutágenos y sustancias carcinogénicas (Ver Tabla 1)

(Bronzetti, 1994; Kohlmeier *et al.*, 1995; Davies, 2000; Park *et al.*, 2003; Zbigniew *et al.*, 2004).

Los antioxidantes son sustancias que actúan como mecanismos de defensa en el organismo. En concentraciones normales poseen una afinidad mayor que cualquiera otra molécula para interactuar y neutralizar radicales libres. Los antioxidantes ceden electrones RL, transformándolos en débiles y no tóxicos. (Ester MOLINA, 2012). Los antioxidantes son conocidas como moléculas que actúan antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos (Cardoso *et al.*, 2005). Por otro lado, los pro-oxidantes son especies altamente reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes (Carocho *et al.*, 2013).

Un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes en el organismo genera el fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual es clave en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, algunas formas de anemia, diabetes, entre otras (Tapia *et al.*, 2004; Celik S., 2010).

Los antioxidantes juegan un papel importante previniendo o aliviando afecciones crónicas, incluyendo cáncer, alteraciones cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis, diabetes, asma, hepatitis, artritis e inmunodeficiencia (Siddhuraju *et al.*, 2007). En los alimentos el proceso de auto-oxidación y generación de la rancidez es causado por radicales libres como consecuencia de la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, produciendo muchas enfermedades degenerativas (Suja *et al.*, 2004).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas,

xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah et al., 2007).

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 hidroxilos, catalizadores de iones se unen metales, descomponer los productos primarios de la oxidación de las especies no radicales y romper las cadenas para evitar continúa abstracción de hidrógeno a partir de sustratos (Shahidi 2000, Shahidi 2002).

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado dramáticamente, debido principalmente a tres razones:

1. La baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos.
2. La eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos.
3. La idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados (Dorman et al., 2004).

2.2.7. Función de los antioxidantes.

La función de los antioxidantes marcadamente es retrasar o prevenir la oxidación del sustrato (Halliwell, 1999; Shahidi, 2000), cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable.

2.2.8. Actividad antioxidante.

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. (KUKOSKI, 2005).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo. (KUKOSKI, 2005).

Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Poseen actividades anti-inflamatorias, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (KUKOSKI, 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes in vitro utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH⁺ es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS⁺ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam et al., 2012).

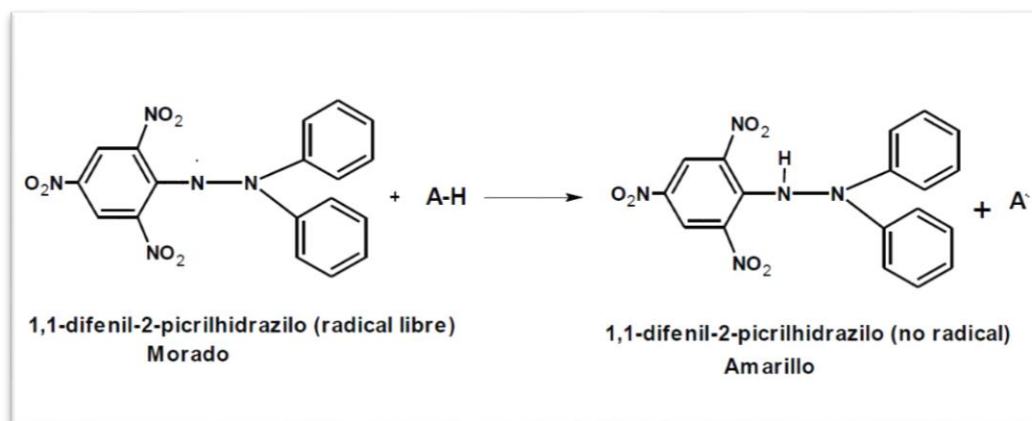
2.2.8.1. Ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

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 $\lambda = 517$ nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura N°19, 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 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°01. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.



Fuente: (Alam et al., 2012).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran: (Deng et al., 2011).

- 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.

2.2.9. Clasificación de los Antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden clasificar de una manera simple en endógenas y exógenas. Entre los primeros tenemos a tres (03) enzimas que son fundamentales la catalasa, la superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa y entre las exógenas podemos citar a la vit. E y C, los carotenoides, los flavonoides y los licopenos, los cuales se incorporan al organismo mediante los alimentos, mostrado en la Tabla N°02. (Ester Molina 2012).

Tabla N° 02 Clasificación de Antioxidantes.

ENDÓGENOS	EXÓGENOS
Enzimáticos. <ul style="list-style-type: none"> • Superóxido Dismutasa (SOD) • Catalasa (CAT) • Glutatión Peroxidasa 	Vitaminas. <ul style="list-style-type: none"> • Vit. "A" • Vit. "E"
	Minerales. <ul style="list-style-type: none"> • Cu, Zn, Mg, Fe, Se
No Enzimáticos <ul style="list-style-type: none"> • Glutatión • Coenzima "Q" • Ácido Tiótico 	Otros <ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides • Carotenos • Licopenos

Fuente: (Ester MOLINA, 2012)

2.2.9.1. Enzimáticos.

También llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las siguientes enzimas (Katalinic et al., 2005).

2.2.9.1.1. Las Superóxido dismutasas (SOD).

Las SOD constituyen un grupo de metaloenzimas que pueden dividirse en 2 familias filogenéticas diferentes: cobre-zinc superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD), y hierro-manganeso superóxido dismutasas (Fe/Mn-SOD). Todos los tipos de SOD catalizan la conversión del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Estas proteínas constituyen las únicas enzimas conocidas que actúan sobre un radical y todas las isoformas catalizan la reacción de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ con similar eficiencia. Aunque el $O_2^{\cdot-}$ puede dismutar espontáneamente a O_2 y H_2O_2 a una velocidad de aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$, la enzima cataliza la dismutación a una velocidad de $7 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$, lo que garantiza la eliminación de este radical, siendo una de las enzimas más eficientes conocida. (Yaisa Castillo, 2014).

2.2.9.1.2. Las Glutación peroxidadas (GPx). Son dos enzimas de selenio dependientes puesto que este las mantiene activas (Cemeli et al., 2009). Para que ejerzan su acción destoxicante por la reducción del H_2O_2 o los ROOH. El glutatión peroxidasa (GPx) está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida glutatióna (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontrados en el tejido humano.

2.2.9.1.3. La catalasa. Participa en el metabolismo del H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo. Aunque su afinidad por el H_2O_2 es inferior a la que muestra la GPx, bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del H_2O_2 , ésta cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O . A altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo la reducción; por el contrario, a bajas concentraciones de H_2O_2 decrece su eficiencia (Cemeli et al., 2009).

Este grupo de antioxidantes primarios se completa con: el sistema de las tiorredoxinas, que incluye las tiorredoxinas y la tiorredoxina reductasa, las cuales soportan muchos procesos cruciales para la función celular, proliferación celular, defensa antioxidante y regulación redox (Arnér, 2009), las transferrinas, regulan la producción extracelular de hierro y así previene la oxidación de los tejidos (Kim et al., 2008), la lactoferrina, la cual tiene la capacidad de capturar iones de hierro libre lo cual le confiere muchas propiedades de antioxidante (Mulder et al., 2008). La ferritina, proteína que funciona capturando el hierro libre intracelular que puede convertirse en tóxico para las células (Mackenzie et al., 2008), la ceruloplasmina y las albúminas representan el antioxidante más predominante presente en el plasma, el cual está expuesto a estrés oxidativo continuo (Roche et al., 2008).

2.2.9.2. No Enzimáticos.

2.2.9.2.1. Glutación. (Pastore et al., 2003).

Es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina), que se encuentra en todas las células en concentraciones relativamente altas (0.4-12 mM) y es el compuesto con grupos SH más abundante en los tejidos (SH no proteicos), sus funciones son:

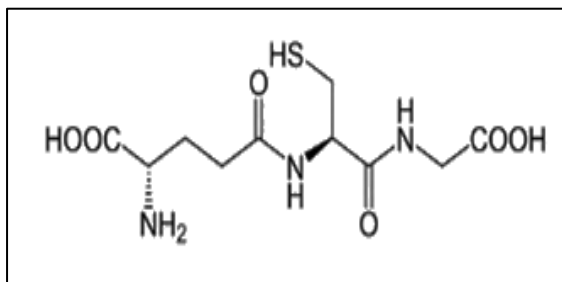
- a) Destoxificación de compuestos electrofílicos

- b) Captura de radicales libres
- c) Co-factor de GPx
- d) Mantenimiento de los grupos SH en proteínas al prevenir su oxidación
- e) Reservorio de cisteína (Cys)

2.2.9.2.2. Ubiquinonas (coenzima Q). (Bentiger et al., 2007).

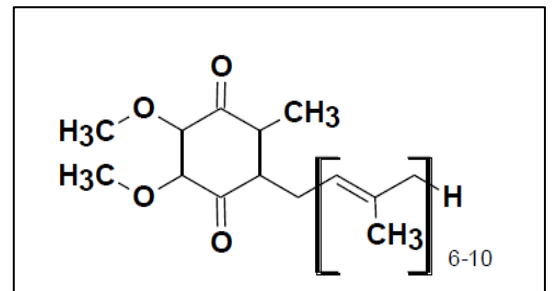
Las ubiquinonas son derivados de las quinonas que contienen una cola de isopreno. La forma reducida de las ubiquinonas, los ubiquinoles, son liposolubles y actúan como antioxidantes eficientes y tienen mayor capacidad antioxidante que las ubiquinonas.

Fig. N° 02 Estructura química del Glutatión y la Coenzima Q (Ubiquinona)



Glutatión.

(Doria et al., 2012).



Ubiquinona.

2.2.9.3. Exógenos.

2.2.9.3.1. Vitaminas.

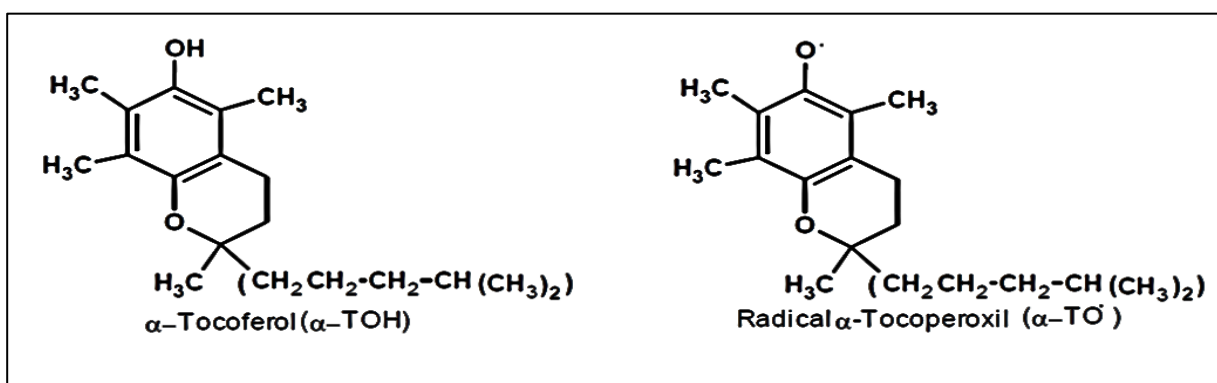
2.2.9.3.1.1. Vitamina "C".

La vitamina C, presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que esta puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación y posiblemente un anunciador de enfermedades del corazón (Podsdek, 2007).

2.3.9.3.1.2. Vitamina "E".

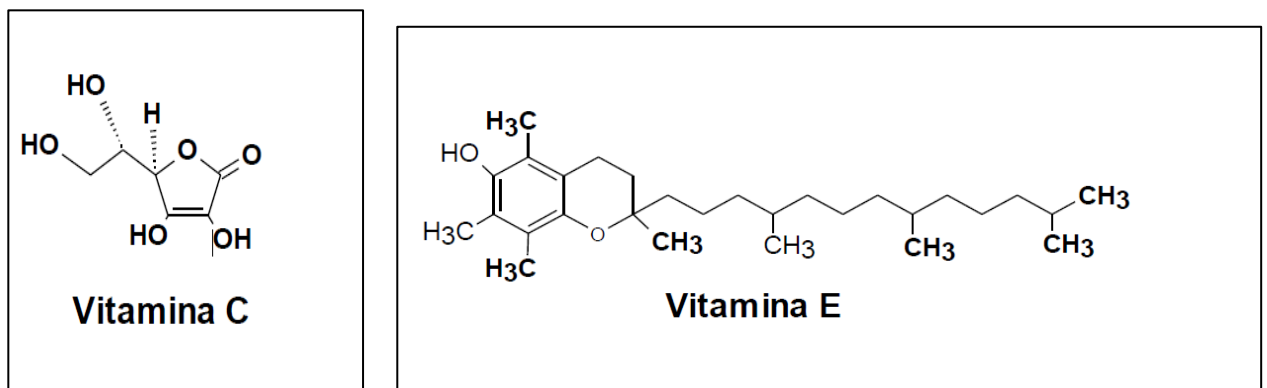
La vitamina E pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles, tocotrienoles, especialmente α -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperoxil, como se muestra en la figura N°03 (Podsdek, 2007).

Figura N° 03. Reacción del tocoferol para formar el radical peroxil



Fuente: (Webster, 1999).

Figura N°04 Estructura Química de la Vitamina C y E respectivamente.



Fuente: (Doria et al., 2012).

2.2.9.4. Otros.

2.2.9.4.1. Polifenoles.

2.2.9.4.1.1. Compuestos fenólicos en las Plantas

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins 2003).

2.2.9.4.1.2. Compuestos Fenólicos.

Son un conjunto heterogéneo de molécula que comparte la característica de poseer en su estructura varios grupos fenólicos y de tener una potente actividad antioxidante. Estos pigmentos naturales están presentes en los vegetales, mejoran la disfunción endotelial y disminuyen la

susceptibilidad de las LDL a ser oxidada, protegen el organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas, la contaminación, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. (Martinez- flores S. 2002- Hernández. 2000).

Podemos encontrar a los polifenoles en algunos productos como el ginseng, ginkgo, uva, eucalipto, mandarina, toronja, limón, naranja, romero, agrimonia, avena. (KUKOSKI. 2005).

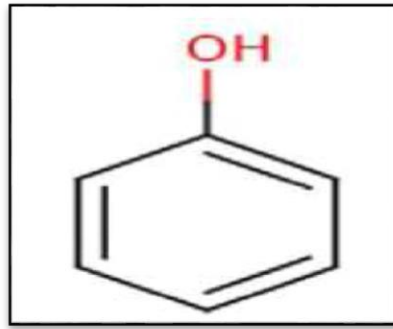
Las propiedades antioxidantes y cardioprotectoras de los polifenoles se deben principalmente a que sus propiedades oxido-reductoras les permiten actuar como agentes donadores de hidrogeno y estabilizadores de radicales libres como oxigeno reactivo, hidróxilo y superóxido, implicados en las cadenas de peroxidación lipídica, además de sus propiedades de quelacion de hierro y metales de transición (Lee., 2004).

2.2.9.4.1.3. Clasificación de los compuestos fenólicos.

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. Los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles. (Bravo, L. 1994).

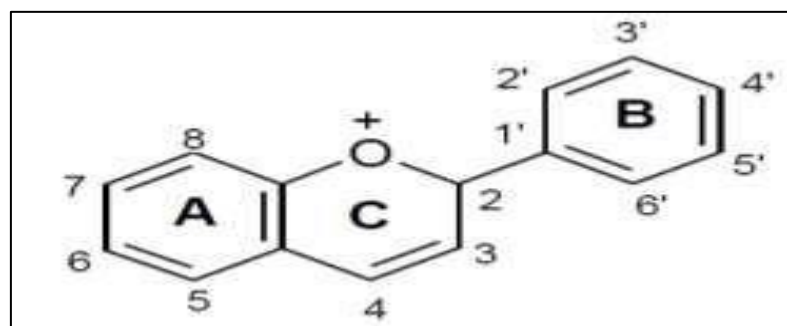
Los extraíbles son compuestos de pesos moleculares bajos o medios que se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos. Los no extraíbles son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones (Bravo, L. 1994).

Figura N° 05 Anillo fenólico.



Por lo que se refiere a *los polifenoles extraíbles*, se pueden clasificar, en función de su estructura química, en ácidos fenólicos, estructuras simples (y que pueden aparecer libres, como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, o esterificados, como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) y flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc. Los flavonoides se forman a partir de fenilalanina, tirosina y grupos acetato. (Bravo, L. 1994).

Figura N°06: Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides.



Fuente: Shahidi y Naczk (1995).

Los grupos de flavonoides más extendidos son las flavonas y los flavonoles. Los flavonoles forman O-glucósidos, pero las flavonas pueden formar O-glucósidos y C-glucósidos, que no se pueden romper por hidrólisis ácida, a diferencia de los O-glucósidos. Lo mismo ocurre con las flavanonas (Bravo, L. 1994).

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica. Los taninos hidrolizables son estructuras poliméricas que pueden derivar del ácido gálico o de su producto dimérico de condensación, el ácido hexahidroxidifénico. (Santos-Buelga and Scalbert 2000)

Los taninos condensados o proantocianidinas, por su parte, son estructuras poliméricas, formadas por la unión de flavan-3-oles, y pueden ser: procianidinas, con una sustitución 3,4-dihidroxi en el anillo B (sólo están formadas por unidades de epicatequina); prodelfinidinas, con una sustitución 3,4,5-trihidroxi en el anillo B; propelargonidinas, con una sustitución 4-hidroxi en el anillo B, aunque éstas últimas son mucho menos frecuentes en alimentos. Los carbonos 2,3 y 4 del anillo B son asimétricos y pueden aparecer con diferentes configuraciones. Generalmente, las uniones se producen entre el C4 de la unidad superior y el C6 o el C8 de la unidad inferior, aunque en ocasiones puede aparecer otro enlace entre el C2 de la unidad superior y el C5 o el C7 de la inferior. Además, las unidades de flavanoles pueden llevar sustituyentes acilos o glucosilos, y uno de los más frecuentes sustituyentes acilo es el ácido gálico, que forma un enlace éster con el grupo hidroxilo en la posición C3. (Santos-Buelga and Scalbert 2000)

En cuanto al modo de acción de los polifenoles, los grupos OH del anillo B pueden donar un hidrógeno y un electrón a radical hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose el flavonoide en una molécula radicálica relativamente estable. También son capaces de quelar

metales, formando complejos que, aun así, mantienen la capacidad antioxidante. En cualquier caso, éste sería un efecto adverso en personas con deficiencias crónicas de algunos metales (Heim, Tagliaferro et al. 2002)

Finalmente, algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes, como la genisteína, una isoflavona que potencia la catalasa, el glutatión peroxidasa, el glutatión reductasa y la SOD (Donma and Donma 2005).

Tabla N°03 Concentración de fenoles y antocianos en diversas frutas.

Alimentos	Fenoles Totales (mg/100gr)	Antocianos Totales (mg/100gr)
Mora	118.9 + -2.1	41.8 + -1.8
Uva	117.1 + -0.6	30.9 + -0.1
Guayaba	83.0 + -1.3	2.7 + - 0.2
Fresa	132.1 + -3.8	23.7 + 2.3
Piña	21.7 + -4.5	No detectado
Mango	544.9 + -7.3	No detectado
Maracuyá	20.0 + 2.6	No detectado

Fuente: Ester MOLINA, 2012.

2.2.9.4.1.4. 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).

a. TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.

Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y hasta hoy en día son usados frecuentemente para la determinación de polifenoles (Escarpa y González, 2001). Entre este tipo de técnicas, 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. (Swainy 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).

b. ENSAYO ULTRAVIOLETA.

Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbencias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro

ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbencia máxima entre 220 y 280nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbencia máxima (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

2.2.9.4.2. CAROTENOIDES

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo, el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo, el licopeno).

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo, los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo, tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo, la zanahoria).

Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo, los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina. (Martínez, 2003).

2.2.9.4.3. RETINOL

Los Retinoides son una serie de compuestos derivados de la vitamina A que se han revelado muy importantes para numerosos procesos biológicos tales como el crecimiento, la regulación de la proliferación y diferenciación de los tejidos epiteliales, el mantenimiento de las funciones visuales y en la reproducción.

Los retinoides son una familia de moléculas de bajo peso molecular, derivadas de moléculas hidrofóbicas de la vitamina A estos compuestos exhiben sus efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tejidos celulares y su empleo ha mostrado ser relevante clínicamente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y de enfermedades dermatológicas. (Allende, 1997).

2.2.10. Análisis para Antioxidantes Fenólicos.

2.2.10.1. Determinación de Fenoles Totales

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau (1927) (Sellappan, Akohy, Krewer, 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 un donador 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 condición es críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura. (Prior, Wu y Schaich, 2005)

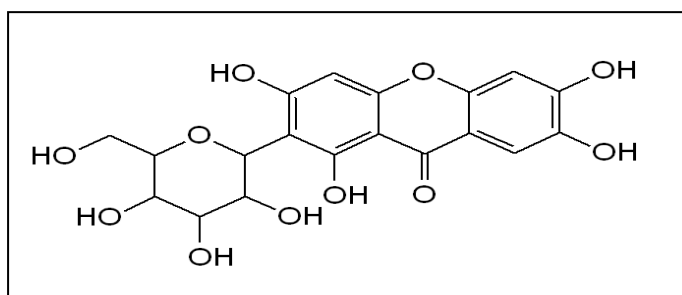
Pese a esto, actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el valor de EAG para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas (Brat, 2006); por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados.

2.2.10.2. 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 y a 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; 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 474nm del extracto etanólico previamente diluido usando agua destilada como blanco, usando quercetina como patrón de flavonoides y expresando los resultados en mg de quercetina/100gdemuestra.

FiguraN°07: Estructura de la quercetina



Fuente: Sotero y García (2009).

2.2.10.3. Determinación de Antocianinas.

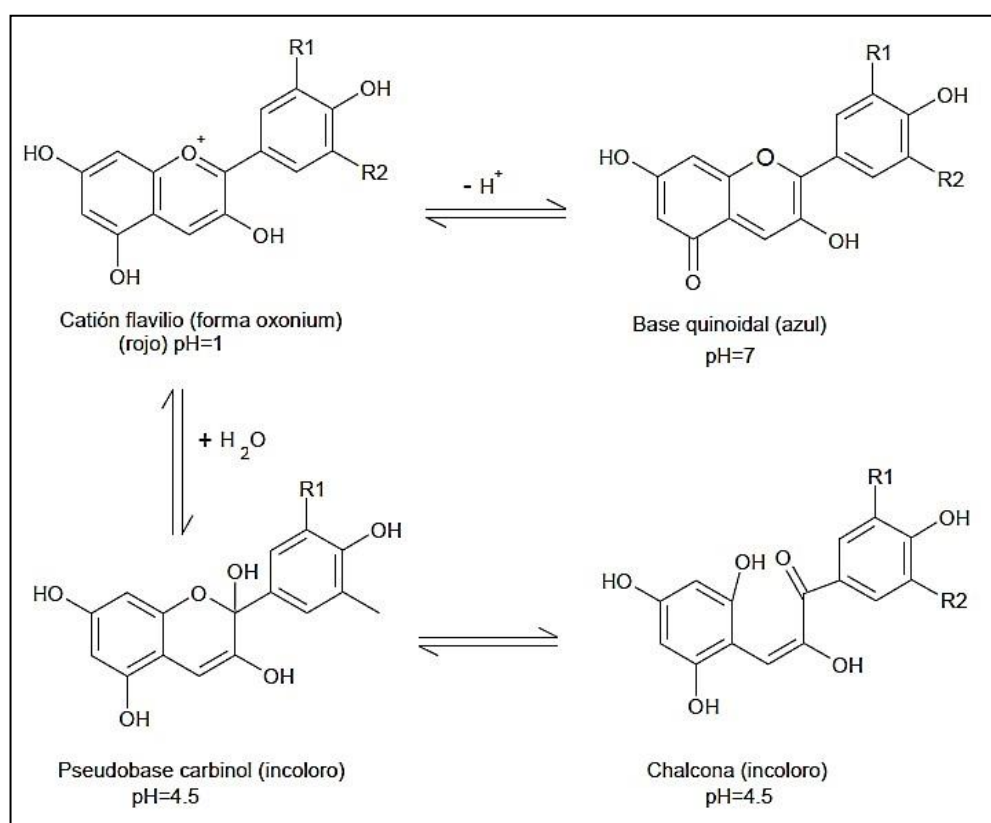
Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentra (Delgado y Paredes, 2003). Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura 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-Visa diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si la antocianina 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 (260-280nm) y la región visible (490-550nm). 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°08: Estructura de antocianinas a diferentes pH's



Fuente: Giusti y Wrolstad (2001).

2.2.10.4. Determinación de Taninos.

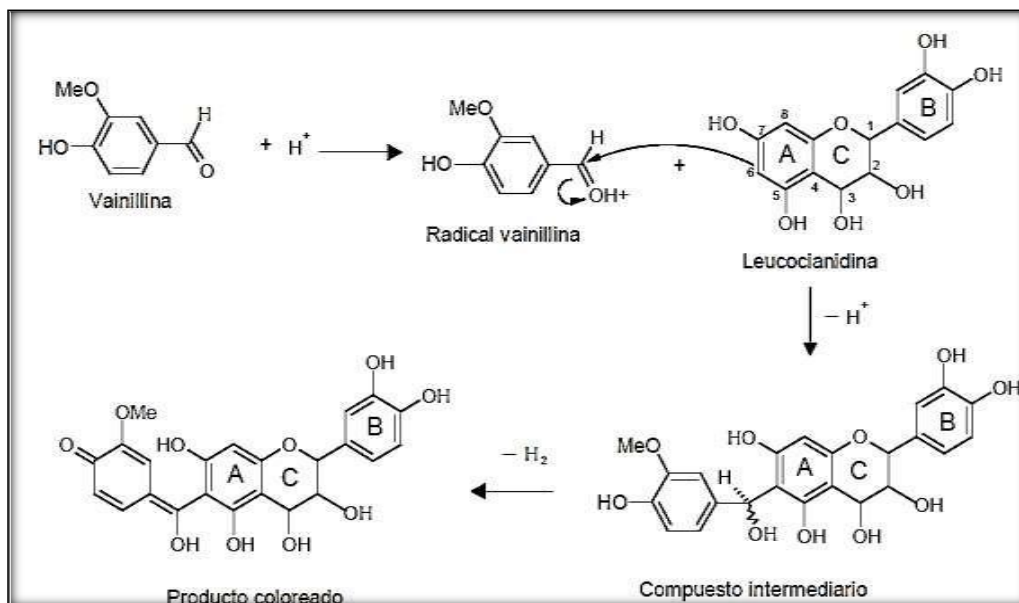
El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y

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.

El ensayo de la vainillina en metanoles 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 μ g con precisión y exactitud mayores a 1 μ g 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. La estabilidad del color del ducto 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).

Figura N°09: Mecanismo de reacción de vainillina con taninos.



Fuente: Shahidi y Naczk (1995).

2.3. Los Nutraceuticos.

Durante los últimos años la población en general, ha reconocido la importancia de mantener la salud. En el año 1989 surgió el término Nutraceutico por el Dr. Stephen de Felice, Director de la Fundación de Medicina Innovativa. Planteó que sería cualquier sustancia que pueda ser considerada como alimento o como parte de éste y que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad. Este concepto ha continuado evolucionando hasta llegar a una definición más completa. (Pérez Leonard, Heidy. 2006)

2.3.1. Definición.

Sustancia químicas o biológicas activas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos. Se presentan en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), y

que, administrada en dosis superior al existente en esos alimentos, presume un efecto favorable sobre la salud, mayor al que posee el alimento natural o normal. Por ende, los productos Nutraceuticos tienen la capacidad de fortalecer las condiciones saludables, sirviendo como auxiliar en el cuidado y mantenimiento de la salud, así como en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo. (Sloan, E. 1996).

Los Nutraceuticos se diferencian de los medicamentos en que estos últimos no tienen un origen biológico natural, difieren de los extractos e infusiones de hierba y similares en las concentraciones de sus componentes y no tienen por qué tener una acción terapéutica. (Pérez Leonard, Heidy. 2006).

Los alimentos nutraceuticos previenen las enfermedades crónicas degenerativas que son los infartos, embolias, hipertensión, diabetes, cánceres hormonodependientes (glándulas mamarias, próstata, tiroides, etc.). (Pérez Leonard, Heidy. 2006).

El futuro de la industria química se basa en los agentes nutraceuticos, los cuales son utilizados en la composición de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos debida a la creciente demanda internacional de productos que ayuden a la sociedad a buscar una nueva vida con más salud y calidad. (Pérez Leonard, Heidy. 2006).

Según se reporta (Neff, J. y Holmam, J.R., 1997), los alimentos nutraceuticos se dividen en tres grupos:

- Nutrientes: Azúcares y Grasas.
- Compuestos Químicos: Fibras, Antioxidantes, Carotenos, Ácidos grasos Omega 3.
- Probióticos: Microorganismos benéficos (Lácteos).

2.4. Alimentos Funcionales o Alimentos Enriquecidos.

El término “alimento funcional” propuesto en Japón en el año 1980 para su reglamentación, define a los “alimentos para uso específico de salud”. Dentro de las muchas definiciones existentes, alimento funcional es, según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) “todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas”. (Serrano Ríos M. 2005).

La base de estos componentes es eminentemente de origen vegetal o fitoquímica, aunque como excepción también están incluidos los suplementos. La compañía Kellogg ha establecido la división de alimentos funcionales; Kraft Foods, Nestlé y otras grandes compañías se aprestan con cierta reticencia a la investigación y desarrollo de esta área, mientras que la compañía Nabisco introdujo "Nutrajoint" su primer producto funcional (Brizuela, M. A. 2003).

Los alimentos funcionales aportan al organismo determinadas cantidades de vitaminas, grasas, proteínas, hidratos de carbono y otros elementos necesarios, pero cuando un alimento funcional ayuda a la calidad y mantenimiento de la vida y salud o a la prevención de enfermedades, entonces se puede llamar Nutracéutico. Desde este ángulo los alimentos funcionales son parte de la nutracéutica. (Pérez Leonard, Heidi. 2006).

La marcha fitoquímica es la primera detección preliminar de los constituyentes químicos en las plantas, para determinar la metodología y la forma de extracción a utilizar. Los flavonoides son extraídos por

solventes muy variados que van desde muy polares como agua y etanol para los glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas (Lock, 1994).

CAPÍTULO III:

MATERIALES, ESQUIPOS Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

3. MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- Probetas graduadas de 10 ml, 100 ml, 250 ml
- Pipet volumétrica 1 ml,
- Embudos
- Bureta 25 ml, 50 ml
- Matraz de Erlenmeyer
- Fiola
- Matraz aforado de 50 ml
- Crisol
- Mortero
- Papel filtro
- Mortero
- Pilon
- Soporte universal
- Embudos
-

3.1.1 HOJAS, FLORES y TALLO DE LA MENTA DULCE (*Lippia dulcis* Trev.)

Las hojas y flores en estado adulto de la planta, fueron obtenidas en el huerto “Plantas Medicinales” de la Facultad de Agronomía, perteneciente a la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicado en la carretera Iquitos - Nauta, Distrito de San Juan Bautista; Provincia de Maynas; Departamento Loreto, con ubicación geodésica de *Latitud: -3.8306631* y *Longitud: -73.371215*. Posteriormente de la adquisición de la materia prima a estudiar, fueron seleccionados, lavados en agua potable e hipoclorito de sodio, enjuagados con agua tratada, seguidamente fueron trasladadas al laboratorio para ser procesados y analizados.

Fig. N° 10. Hojas, Flores y Tallos de *Lippia dulcis*.



3.1.2 EQUIPOS.

Los equipos se utilizaron son:

- Rotavapor. Marca Büchi, de fabricación alemana, consta de un condensador diagonal, controlador electrónico que a su vez tiene un motor que revela constantemente un esfuerzo de rotación de 5 a 240 rpm, el cual tiene alrededor un baño de agua digital que lleva a una temperatura de 100°C en incremento de 10°C. también consta de un balón de un litro que está protegida de una capa plástica donde se receptiona el solvente recuperado.
- Bomba al vacío. De marca Thermo Scientific, modelo 420-1902, de fabricación alemana.
- Thermohigrometro. De marca Boeco, de fabricación alemana, usado con la finalidad de medir la humedad relativa y la temperatura con gran precisión.
- Espectrofotómetro. De marca Thermospectronic, modelo génesis 6, 100-240v, 50/60 Hz. Diseño óptico de doble detector con un ancho de banda espectral de 1.8 nm, utilizando como fuente luminosa el xenón, con longitud de rango de 190-1100nm \pm 1.0 nm, la lectura es

en absorbancia, transmitancia y concentración, con intervalos de medición de 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0 nm y con portaceldas automático de 6 posiciones.

3.1.3 REACTIVOS.

Los insumos utilizados en la tesis se consignan en la siguiente tabla

Tabla N° 04: Insumos usados en la tesis

N°	INSUMO	% PUREZA	MARCA
01	HIDRÓXIDO DE SODIO A.C.S.	97	SPECTRUM
02	NITRATO DE ALUMINIO	-	SPECTRUM
02	ÁCIDO FÓRMICO	95-97	MERCK
05	FOLIN CIOCALTEU	-	MERCK
06	ACIDO GÁLICO	-	MERCK
07	VANILLINA	99	SIGMA ®
08	CARBONATO DE SODIO ANHIDRO A.C.S.	99.87	QUIMICA MEYER ®
09	ETANOL AR	99.7 - 100	LOBACHEMIE
10	METANOL ABSOLUTO	≥ 99.7	MERCK
11	ACIDO FÓRMICO	98-100	MERCK
12	ACIDO CLORHÍDRICO	37	SIGMA ®
13	DICLOROMETANO	99.8	MERCK
14	HEXANO	96.0	MERCK
15	ACETONA	99.5	MERCK
16	CLORURO DE POTASIO	99.5	SIGMA ®
17	ACETATO DE SODIO	99.5	MERCK
18	ACETATO DE POTASIO	99	LOBACHEMIE

3.2 MÉTODOS

3.2.1. METODOLOGÍA.

3.2.1.1. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Para el análisis de estudio el método a emplearse es descriptivo experimental, se utilizó un diseño por conveniencia tanto para la hojas y flores como para el tallo.

F1 = Tipo de extracción.

A = Etanol

F2 = Metabolito secundario.

1 = Fenoles totales.

2 = Antocianinas.

3 = Flavonoides.

4 = taninos.

Por lo tanto, se tendrá lo siguiente:

$4 \times 1 = 4$ **tratamientos**

$4 \times 3 = 12$ **experimentos.**

3.2.1.2. DISEÑO MUESTRAL

TIPO DE EXTRACCIÓN	METABOLITO SECUNDARIO			
	Fenoles totales	Antocianinas	Flavonoides	taninos
ETANOL	1	2	3	4

3.2.1.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1.3.1. Población.

La población será todos los ejemplares de *Lippia dulcis Trev.*, existentes en el huerto del Proyecto Plantas Medicinales de la Facultad de Agronomía - UNAP en Zungarococha; Iquitos-Perú.

3.2.1.3.2. Muestra.

Hojas, flores y el tallo de la especie *Lippia dulcis Trev.*, existentes en las parcelas del proyecto "Plantas Medicinales" de la Facultad de Agronomía en la ciudad universitaria de la UNAP en Zungarococha; Iquitos-Perú.

3.2.2. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.

3.2.2.1. Materia Prima.

Se utilizó hojas, flores y tallo de la especie *Lippia dulcis Trev.* (menta dulce), recolectadas de las parcelas del Proyecto "Plantas Medicinales" de la Facultad de Agronomía. se seleccionó teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, posteriormente se pesó obteniendo un peso de 6.500 kg (peso fresco), se dejó secar en un cuarto de desecación a 33°C alrededor de 18 días hasta que el peso de la muestra sea constante, al retirar la muestra del cuarto de desecación se obtuvo 2.885 Kg de muestra seca.

3.2.2.2. Pesado.

Se pesó hojas y flores juntas (200 g) y tallo (100 g) debidamente pulverizadas para poder obtener datos exactos de rendimiento.

3.2.2.3. Triturado

Las hojas, flores y el tallo de *Lippia dulcis Trev.*, fueron triturados en un molino mecánico, por separado.

3.2.2.4. Maceración.

A las hojas, flores y tallo micropulverizados se le adicionó etanol absoluto (99.7°) al 50 % con 1% ácido clorhídrico hasta enrazar en un recipiente de vidrio, dejando macerar por 4 días protegido de luz, para evitar la descomposición de los antioxidantes presentes por acción radical de los electrones libres presentes en la luz.

3.2.2.5. Filtración.

Se filtró el extracto de hojas, flores y tallo con papel filtro en dos repeticiones.

3.2.2.6. Concentración.

Se concentró la muestra ya macerada con el objetivo de eliminar el disolvente a 60°C, -700 mbar de presión reducida en un rotavapor a 65 rpm, posteriormente se completó la eliminación del disolvente residual dejando reposar la solución a temperatura ambiente exenta de luz.

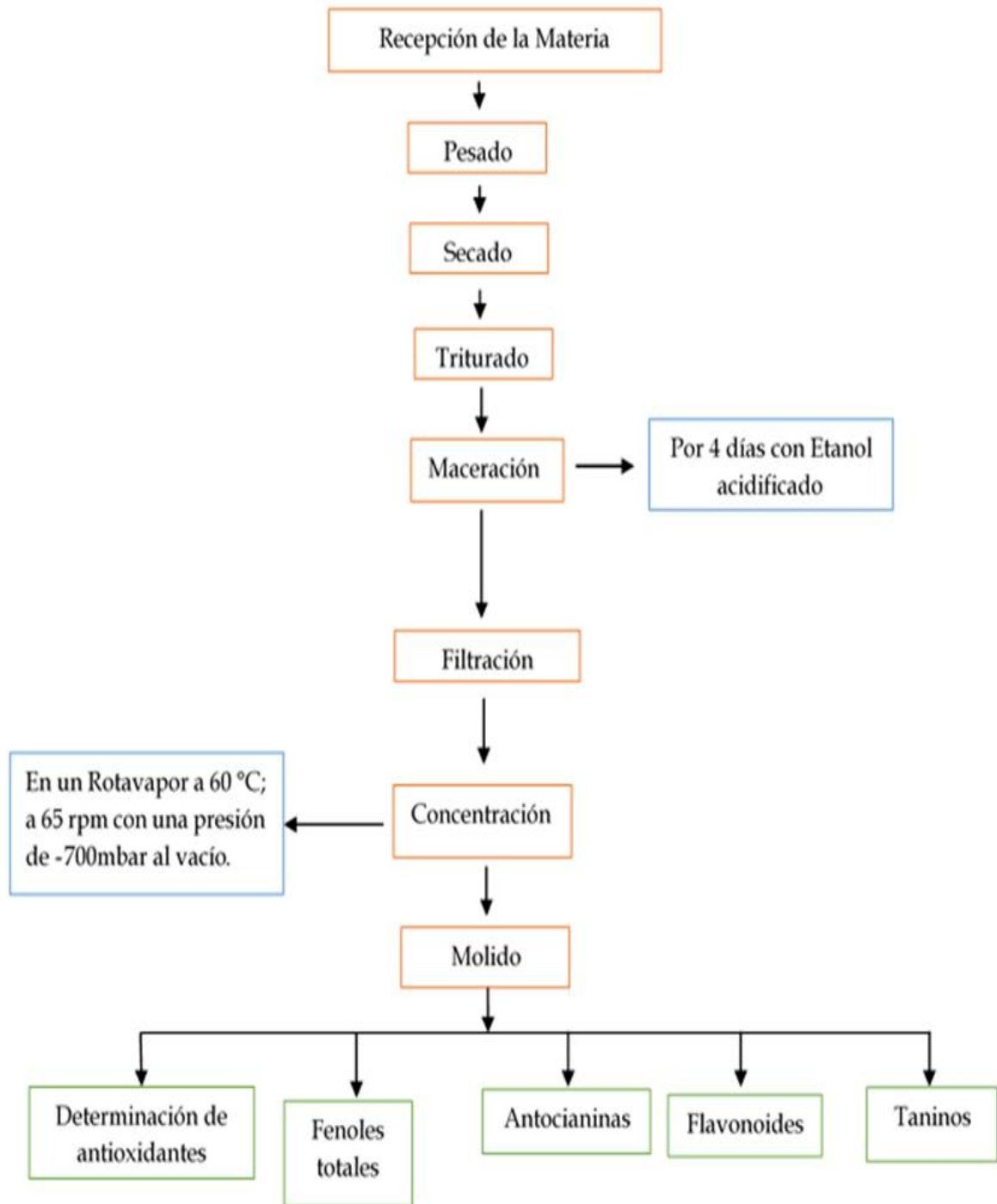
3.2.2.7. Molido.

El extracto seco fue molido en un mortero con pilón pudiéndose obtener un peso de 6,37 gramos (hojas y flores) y 1,6 gramos (tallos) en forma de polvo, que fueron envasados en bolsas de aluminio trilaminado para evitar contacto con la luz.

3.2.2.8. Determinación de Antioxidantes.

Posteriormente fue determinada la actividad antioxidante y la presencia de fenoles totales, Antocianinas, Taninos y Flavonoides.

Figura N° 11. Obtención de los extractos de hojas, flores y tallo de la menta dulce (*Lippia dulcis*).



3.2.3. ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

3.2.3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Se pesó 100g de muestra pulverizada de las hojas, flores y del tallo de *Lippia dulce Trev.* (menta dulce) al cual se le adicionó 500 ml de Etanol (Et-OH) absoluto acidificado al 1% con ácido clorhídrico en un frasco con tapa y se dejó en reposo protegiéndolo de la luz durante 96 horas (04 días), luego se filtró y se colocó en el rotavapor a 60 rpm, -700mbar de presión reducida a una temperatura 60°C para la separación del solvente con el extracto. El extracto obtenido, se puso en una placa de vidrio para la evaporación de residuos del solvente a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó por 04 (cuatro) días para obtener una muestra representativa de los metabolitos contenidos en la especie en estudio, una vez obtenido el extracto etanólico se reconstituyó con metanol absoluto al 50% con ácido fórmico al 1%, para las respectivas diluciones y los ensayos subsiguientes.

3.2.3.2 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 las hojas, flores y del tallo por triplicado, se le agregó 1.5 ml de agua destilada, 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogenizó, después de 5 minutos se agregó 200 µl de solución de carbonato de sodio (CaCO₃) al 20 %, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

Para la preparación del blanco se utilizó 200 µl Metanol (CH₃OH) al 1% con ácido fórmico (CH₂O₂), se le agregó 1.5 ml de agua destilada, 100 µl de

reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 minutos se adiciono 200 μ l de solución de carbonato de sodio al 20 %.

Posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm. en un espectrofotómetro UV-Visible. La concentración de fenoles se calculó con base en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/ml.

3.2.3.3 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

La metodología empleada fue la de Sotero y García (2009), realizándose mediante la lectura de la absorbancia a $\lambda = 374$ nm, del extracto etanólico reconstituido. A 3000 μ l del extracto etanólico, por triplicado, como blanco se utilizó agua destilada, se realizó la medición de la absorbancia a $\lambda = 374$ nm. Para realizar los cálculos del contenido de flavonoides totales, se utilizó el coeficiente de extinción molar de la quercetina como patrón ($\epsilon = 78,66$ g/mol*cm).

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

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 de muestra

3.2.3.3.1 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.

La metodología empleada fue la de Gutiérrez *et al* (2000), se le agregó 100 µl del extracto etanólico, 200 µl del acetato de potasio 1M, 200 µl de nitrato de aluminio al 10 %, dejar reposar por 30 minutos en temperatura ambiente protegido de la luz; se realizó la lectura de la absorbancia a $\lambda = 415$ nm y utilizando como blanco metanol acidificado con ácido fórmico al 1 %.

3.2.3.4. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, POR EL MÉTODO pH DIFERENCIAL.

Las antocianinas, son bioactivos importantes que tienen funciones y acciones biológicas, que incluye actividad oxidante, que promueve la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (HOGAN *et al.*, 2010). 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.

3.2.3.4.1. PROCEDIMIENTO.

Se preparó 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 equilibraran y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 400 a 700 nm, esperando una absorbancia de la muestra entre 0.1 y 1.2. Utilizando como blanco agua destilada (H₂O).

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 λ vis-máx. Es la lectura del pico más alto a pH 1 y pH 4.5, y a λ 700, es la lectura a λ 700 nm, tanto para pH 1 como pH 4.5, para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente formula:

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

Dónde:

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.

3.2.3.5. DETERMINACIÓN TANINOS.

La metodología empleada fue la de Valls *et al* (2000). Se mezclan 1 ml del extracto etanólico con 5 ml de mistura de vainillina (50 ml de 1 gr de Vainillina en 100 ml de metanol y 50 ml de ácido fórmico 8% en metanol). El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo el extracto etanólico por ácido fórmico 8 % en Metanol (CH₃OH). Se efectuó la lectura de absorbancia a 500 nm, se homogenizó y se dejó en reposo 30 minutos protegido de la luz. El calibrado se realiza con soluciones de (+)-catequina (20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml).

3.2.3.6. ANÁLISIS 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 protocianidoles); los datos numéricos fueron procesados en la hoja de cálculo Excel 2016.

3.2.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

3.2.4.1. Método: Miranda Martínez, Migdalia y Cuéllar Armando. 2000.

3.2.4.2. Fundamento:

La muestra se somete a la acción extractiva de solventes de polaridad creciente (Hexano-Etanol-Agua) sobre el mismo material vegetal, modificando el pH del medio, con el fin de extraer los metabolitos secundarios según su solubilidad en el disolvente empleado; luego en cada fracción de disolvente se realiza la identificación de metabolitos secundarios haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.

3.2.4.3. Procedimiento:

Se deja macerar 5g de materia prima fresca en 50 ml de hexano (solvente “no polar”) durante 24 horas al medio ambiente; luego el extracto etéreo resultante se filtra y se distribuye en alícuotas de 5ml en 6 tubos de ensayo, concentrando luego los tubos a sequedad en baño maría, para finalmente proceder a realizar las reacciones de identificación para: *alcaloides, triterpenos-esteroides, quinonas, cumarinas, carotenos, aceites esenciales y grasas.*

El residuo del extracto etéreo se seca y se deja macerar con 50ml de etanol (solvente semi polar) durante 24 horas al medio ambiente, el extracto etanólico resultante se filtra y se distribuye en alícuotas de 5ml en 5 tubos de ensayo para finalmente proceder a identificar: *azúcares reductores, saponinas, aminoácidos-aminas, cumarinas, fenoles y taninos.*

El extracto etanólico sobrante se lleva a sequedad para luego adicionarle 10ml de HCl al 10%, se calienta hasta 60°C y se filtra, este paso se repite una vez más (lavados ácidos); luego con 1ml del filtrado se realiza el ensayo para alcaloides. El resto del filtrado se ajusta a pH 9 con amoníaco, se le añade 0.9g de sulfato de sodio (desecante), se filtra y se extrae 2 veces con 15ml de cloroformo. Con 2ml de la fase acuosa se realiza el ensayo para identificar flavonoides. La fase clorofórmica se distribuye en

alícuotas de 5ml en 3 tubos de ensayo y se concentra a sequedad para realizar la identificación de: *glucósidos cardiotónicos, flavonoides y quinonas*.

El residuo del extracto etanólico se seca y se deja macerar con 50ml de agua destilada (solvente polar) durante 24 horas al medio ambiente, luego se filtra y se distribuye en alícuotas de 5ml en 8 tubos de ensayo, para finalmente realizar la identificación de: *alcaloides, azúcares reductores, fenoles-taninos, saponinas, flavonoides, mucilagos, principios amargos y glicósidos*.

Finalmente, la identificación de la presencia de los metabolitos secundarios estuvo sujeta a la aplicación de ensayos químicos.

Reacciones de Identificación:

Las reacciones de Identificación que se realizaron fueron:

- 1- Alcaloides: Dragendorff.
- 2- Triterpenos y Esteroides: Liebermann Buchard y Rosenheim.
- 3- Quinonas: Borntrager
- 4- Lactonas Cumarinas: Baljet.
- 5- Carotenos y Retinol: Sotero y García.
- 6- Saponinas: Espuma.
- 7- Aminoácido-Aminas: Ninhidrina
- 8- Fenoles y Taninos: Cloruro Férrico.
- 9- Flavonoides: Shinoda

3.2.4.4. ENSAYO PARA ALCALOIDES (DRAGENDORFF)

El ensayo para alcaloides se realizó en el extracto etanólico. Parte de la *fracción etanólica* se evapora hasta sequedad. Al extracto seco se le adicionan 10 ml de ácido clorhídrico al 10%, se calienta y se filtra (este procedimiento se repite por una vez más). De esta forma se obtiene un residuo y una disolución ácida (lavados ácidos). Se mide 1 ml de los lavados ácidos y se le adiciona unas gotas del reactivo Dragendorff.

Un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de alcaloides.

3.2.4.5. ENSAYO PARA TRITERPENOS Y ESTEROIDES (LIEBERMANN-BURCHARD)

El ensayo para triterpenos y esteroides se realizó en los extractos etanólico. El residuo obtenido a partir de la *fracción etanólica* para realizar el ensayo de alcaloides se re disuelve en 4 ml de cloroformo, de estos, se toma 1 ml y se le añade el mismo volumen de anhídrido acético. Por la pared del tubo de ensayo se dejan caer de 3-4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

La aparición de una coloración verde-azul indica la presencia de estructuras esteroideas y una coloración rojo-rosado indica la presencia de estructuras triterpénica.

3.2.4.6. ENSAYO PARA QUINONAS (BORNTRAGER)

A partir de la *fracción etanólica* para el ensayo de alcaloides, se ajustó a PH 9 y se añadió 0,5 g de sulfato de sodio. Se realizó una extracción con cloroformo (lavar 2 veces con 15 ml de cloroformo). De esta forma se obtienen dos fases, acuosa y clorofórmica. La fase clorofórmica (1 ml) se mezcla con igual volumen de hidróxido de sodio al 5%.

Una coloración rosa- rojo en la fase alcalina indica la presencia de quinonas.

3.2.4.7. ENSAYO PARA LACTONAS Y CUMARINAS (BALJET)

La *fracción etanólica* (2 ml) se evaporó hasta sequedad y se disuelve en 1 ml de etanol, se le añade una mezcla recién preparada de 1 ml de ácido pícrico al 1% en etanol y 1 ml de hidróxido de sodio al 10% en agua.

Un color o precipitado rojo- naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos (cumarinas).

Para el ensayo de Cumarinas fijas, se siembra en un papel filtro dos puntos de muestra y a uno de los puntos agregamos una gotita de KOH y se lleva

al UV, si uno de los puntos presenta fluorescencia amarillo verdoso el resultado es positivo (+).

3.2.4.8. DETERMINACIÓN DE CAROTENOS Y RETINOL

La metodología empleada fue la de Sotero y Gracia (2009), Pesar 10 gr de muestra en un matraz y añadir 50 ml de alcohol n-butílico saturado con agua destilada. Tapar y agitar durante 2 min y dejar en reposo por espacio de 20 min. Filtrar a través de un papel de filtro. Llenar una cubeta de 1 cc con el extracto de la muestra y la otra con solvente (alcohol n-butílico saturado con agua). Leer la absorbancia a 450 nm, efectuar tres lecturas.

$$\beta - \text{carotenos mg/100 gr de muestra} = \frac{(A - B) \times 1,57}{W}$$

- ❖ Para la determinación del Retinol, se procede igual que para la determinación de B - caroteno, con la única diferencia de que las lecturas de la absorbancia tienen que ser a una longitud de onda de 470 nm, efectuar tres lecturas.

$$\text{Retinol mg/100 gr de muestra} = \frac{(A - B) \times 10,90}{W}$$

Donde:

A = Lectura de la absorbancia de la muestra.

B = Lectura de la absorbancia del solvente.

D = Longitud de onda.

W = Peso tomado de la muestra.

3.2.4.9. ENSAYO PARA SAPONINAS (ESPUMA)

A la *fracción etanólica* (1 ml) se le adicionó 10 ml de agua y se agita la mezcla fuertemente durante 2 minutos.

Si aparece una espuma jabonosa de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos esto indica la presencia de saponinas.

3.2.4.10. ENSAYO PARA AMINOÁCIDOS Y AMINAS (NINHIDRINA)

A la *fracción etanólica* (1 ml) se le adicionó 1 ml de disolución de Ninhidrina al 5% en etanol. Se calienta en baño maría por unos 5-10 minutos.

La aparición de una coloración azul violácea indica la presencia de aminas.

3.2.4.11. ENSAYO PARA FENOLES Y/O TANINOS (CLORURO FÉRRICO)

A la *fracción etanólica* (1 ml) se le añadió 0,5 ml de una disolución de cloruro férrico al 5 % en disolución salina.

La aparición de un color o precipitado verde, rojo, azul o negro indica la presencia de fenoles y/o taninos.

3.2.4.12. ENSAYO PARA FLAVONOIDES (SHINODA)

A la *fase etanólica* (2 ml) se le adicionó 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un trozo (1,2 gr aprox.) de magnesio metálico. Después de concluida la reacción se añade 1 ml de alcohol amílico y se agita.

Si el alcohol amílico se colorea intensamente de amarillo, naranja, rojo o carmelita, el ensayo indica la presencia de flavonoides.

3.2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXICIDANTE MEDIANTE EL METODO DE DPPH⁺ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Preparación de la muestra: Se pesó 50 mg de la muestra etanólica seca, se le adicionó Metanol (CH₃OH) y se le enrazó a 10 ml, consiguiendo una concentración de 5 mg/ml; se dejó reposar por durante 30 minutos a la cual llamamos Solución Patrón, posteriormente se extrajo cinco concentraciones de la SP, 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,01 mg/ml.,

Para la elaboración de las concentraciones se usó la siguiente fórmula:

$C_1V_1=C_2V_2$; donde:

- 0,5 mg/ml= 1 ml de la SP y enrazar a 10 ml con Metanol.
- 0,25 mg/ml= 0,5 ml de la SP y enrazar a 10 ml con Metanol.
- 0,1 mg/ml= 0,2 ml de la SP y enrazar a 10 ml con Metanol.
- 0,05 mg/ml= 0,1 ml de la SP y enrazar a 10 ml con Metanol.
- 0,01 mg/ml= 0,02 ml de la SP y enrazar a 10 ml con Metanol.

Preparación de la solución de DPPH: Se preparó la solución stock de 1 ml 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.

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

Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control 0.1 mM de DPPH), y **Am**, es la absorbancia de la muestra (solución creciente de los extractos) en tiempo n.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS.

4.1. Tamizaje Fitoquímico.

En la tabla N° 05 muestra los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en las hojas y flores.

Lippia dulcis Trev.

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla N° 05 podemos inferir que la especie menta dulce presenta abundante concentración de; Quinonas (++); Fenoles y Taninos (+++); Flavonoides (+++) y otros, pudiéndose inferir que presenta una posible actividad antioxidante.

Tabla N° 05. Resultados del tamizaje fitoquímico

MENTA DULCE				
METABOLITOS	ENSAYOS	HOJAS Y FLORES		
		HEXAN O	ETANO L	AGU A
ALCALOIDES	Drangerdorff	0	0	0
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann-buch y Rosenheim	+		
QUINONAS	Borntrager	0	-	-
CUMARINAS Y LACTONAS	Baljet	-	-	-
CAROTENOS Y RETINOL	Sotero y García	-	+++	+++
SAPONINAS		Kedde	-	0
AMINOACIDOS - AMINAS	Molish	-	-	0
FENOLES Y TANINOS	Espuma	-	+++	+
FLAVONOIDES	Ninhidrina	-	++	-
LEYENDA:	(+++) Abundante (++) Moderado (+) Leve (0) Ausente (-) No se realizo			

4.2. Determinación de β - Caroteno y Retinol de la *Lippia dulcis* Trev.

La presencia de β - Caroteno y Retinol, se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la metodología. En la tabla N°6 y N° 7 se puede observar la cantidad de β - Caroteno y Retinol presentes en la *Lippia dulcis*.

Tabla N° 06. Contenido de β - Caroteno de la *Lippia dulcis*.

β- Caroteno			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,021	1,943	21,8030347
2	0,021	1,942	21,7916908
3	0,021	1,941	21,7803468
4	0,021	1,941	21,7803468
5	0,021	1,94	21,7690029
6	0,02	1,939	21,7690029
7	0,02	1,938	21,757659
8	0,02	1,938	21,757659
PROMEDIO			21,7760928

Tabla N° 07. Contenido de Retinol de la *Lippia dulcis*

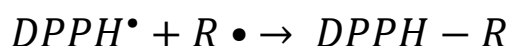
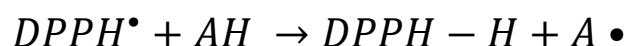
Retinol			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,015	1,149	89,3106936
2	0,015	1,149	89,3106936
3	0,015	1,149	89,3106936
4	0,015	1,149	89,3106936
5	0,015	1,149	89,3106936
6	0,015	1,148	89,2319364
7	0,015	1,148	89,2319364
8	0,015	1,148	89,2319364
PROMEDIO			89,2811597

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la tabla N°05 y N°06, podemos decir que la *Lippia dulcis*, presenta un promedio de 21,7760928 mg/100 gr de β -Caroteno, y un promedio de 89,2811597 mg/ 100 gr de Retinol.

4.3. Evaluación de la Actividad Antioxidante, Fenoles Totales, Antocianinas, Flavonoides y Taninos de las hojas y flores de la especie *Lippia dulcis*.

4.3.1. 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 $\lambda = 515$ y $\lambda = 540$ nm (Murillo *et al.*, 2007); para la determinación se midió a $\lambda = 517$ 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)



4.3.2. Determinación de la actividad antioxidantes de las Hojas y Flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

En la tabla N° 08, se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de las Hojas y Flores de *Lippia dulcis* (menta dulce) y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexo N° 01;02;03.), en la tabla N° 09 se encuentra el porcentaje de inhibición con las debidas concentraciones donde la actividad antioxidante superior al 25% se encuentra en concentraciones de 5 mg/ml. Presenta un porcentaje de inhibición de 71,75 %.

Tabla N° 08. Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a la hoja y flor de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Número de lecturas	Promedio solución DPPH (1mM)	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (hojas y flores)			
		concentraciones			
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,478	0,183	0,419	0,455	0,460
2	0,478	0,165	0,416	0,457	0,460
3	0,478	0,150	0,413	0,457	0,460
4	0,478	0,141	0,410	0,457	0,459
5	0,478	0,134	0,406	0,454	0,459
6	0,478	0,123	0,405	0,453	0,459
7	0,478	0,118	0,404	0,452	0,459
8	0,478	0,113	0,402	0,453	0,459
9	0,478	0,115	0,401	0,454	0,459
10	0,478	0,107	0,400	0,454	0,459
Promedio	0,478	0,135	0,408	0,455	0,459
Porcentaje de Inhibición, %		71,75	14,72	4,87	3,88

Tabla N° 09. Porcentaje de inhibición de las Hojas y Flores de la *Lippia dulcis* (menta dulce).

Extracto etanolico <i>Lippia dulcis</i> (hojas y Flores)				
CONCENTRACIONES [mg / ml]	5	0,5	0,25	0,01
PROMEDIO DE ABSORCIÓN (A°)	0,135	0,408	0,455	0,459
% DE INHIBICIÓN	71,75	14,72	4,87	3,88

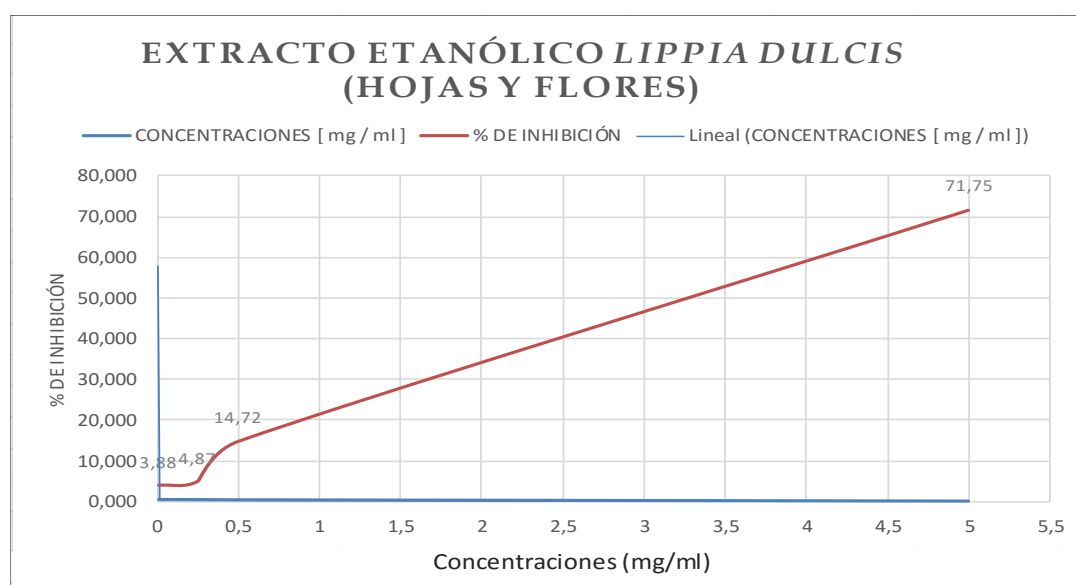
En la Figura N° 12 se puede observar una actividad antioxidante de las hojas y flores donde se puede observar que la concentración mínima inhibidora es de 1,66 mg/ml con un porcentaje de inhibición de un 25%, aproximadamente.

Según Tovar (2013), determinó la actividad antioxidante de la parte aéreas de 30 plantas que pertenecen a 8 familias en Colombia, en ellas considera como extracto activo aquel que muestra un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25 % valor que se usó como referencia

considerando que equivale a la mitad de la actividad antioxidante presentada por la Hidroquinona, ya que utilizo a este como control positivo, similar a nuestro trabajo.

Clara Celis 2007 reporta actividad antioxidante en aceite esenciales de varios tipos: *Lippia alba*, quimiotipo carvona 289 (mg de AE/ mg de DPPH?); *Lippia alba*, quimiotipo citral 305 (mg de AE/ mg de DPPH?); *Phyla dulcis* 8.47 (mg de AE/ mg de DPPH?); *Lippia origanoides* 6.0 (mg de AE/ mg de DPPH?)

Figura N° 12. Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).



4.3.3. Evaluación de fenoles totales de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Los fenoles totales del tallo, de la hojas, flores y tallo, fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva patrón del ácido gálico obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura N° 13, donde la concentración del ácido gálico que va a concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/ml ($y = 10.315x + 0.0221$; $R^2 = 0.9967$) y la absorbancia respectiva medida a una $\lambda = 765$ nm.

Figura N° 13. Curva padrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales.

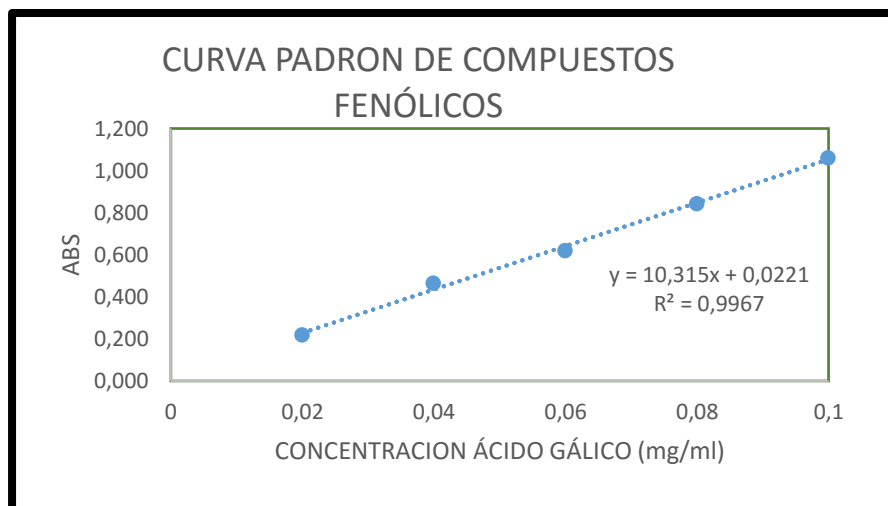


Tabla N° 10. Contenido de fenoles totales de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extracto seco	Alicuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	factor de dilución	Alicota en el tubo	lectura en el espectrofotómetro	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)	Abs.765 nm	mgGAE/m	mgGAE	mgGAE/mg alicuota extracto seco	mgGAE/100 g muestra original	mgGAE/100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c		f=e/d	g	h	i = @	j = i* c	k = j / a	j = h/a	
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216	112,216	0,000
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216	112,216	0,000
		R5	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
		R6	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		

En la tabla N° 10, se muestra la manera de calcular y el contenido de fenoles totales en las flores y hojas, de tal manera se puede observar el valor 112,216 ± 0,000 mg EAG/100 g muestra original, siendo un promedio de las mediciones. (ver anexo N° 07).

4.3.4. Evaluación Flavonoides de las Hojas y Flores *Lippia dulcis* (menta dulce).

Los flavonoides presentes en las hojas y flores de la especie *Lippia dulcis* fue determinado por absorción a $\lambda=374$ nm y calculado mediante la aplicación de la fórmula mostrada en la metodología, en la tabla N° 11 consignan los datos obtenidos, en la cual obtenemos cantidades de 45.68 ± 0.04 g quercetina/100g muestra original.

Los flavonoides contienen en su estructura química un numero variable de grupos hidroxilos fenólicos y excelentes propiedades de quelacion del hierro y otros metales de transición, los que le confieren una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer, a su vez propiedades antiinflamatorias y antitromboticas. (S. Martinez-Flores, 2002).

Tabla N° 11. Determinación de flavonoides de las hojas y flores de *Lippia dulcis*.

Tipo de muestra	Código	repetición	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ϵ	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		l/cm ² *mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
Lippia ducis 1	extracto 1	R1	0,623	302,236	30,00	78,66	3,00	45,73		
		R2	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,68	0,04
		R3	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
		R5	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,63	0,04
		R6	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58		

4.3.5. EVALUACIÓN ANTOCIANINAS DE LAS HOJAS Y FLORES DE *Lippia dulcis* (MENTA DULCE)

En la tabla N° 13, se observan las absorbancias por triplicado de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm, de las hojas y flores de la *Lippia dulcis* (menta dulce) a pH 1 y pH 4.5 y valores fijos a 700 nm, lo cual se observa en la tabla N° 12.

El extracto de hojas y flores de *Lippia dulcis* no reporta presencia de antocianinas.

TABLA N° 12. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de flores y hoja de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	A°	λ (nm)	A°
522 nm	0.035 A	461 nm	0.065 A
508 nm	0.038 A	461 nm	0.065 A
528 nm	0.035 A	441 nm	0.131 A
526 nm	0.034 A	441 nm	0.131 A
543 nm	0.031 A	439 nm	0.144 A
528 nm	0.035 A	444 nm	0.117 A

FIGURA N°14. Absorción del extracto etanólico de flores y hoja *Lippia dulcis* (Menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.

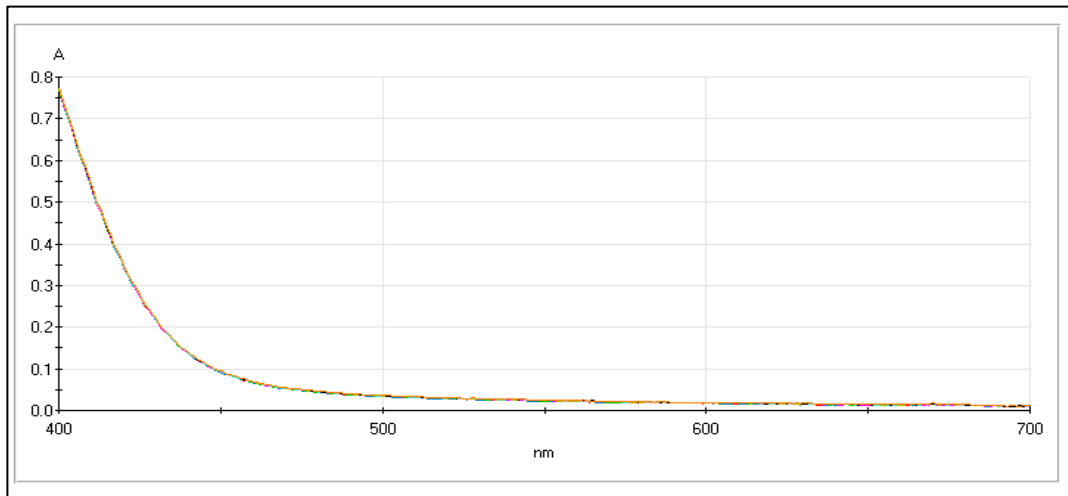


FIGURA N°15. Absorción del extracto etanólico de flores y hoja *Lippia dulcis* (Menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

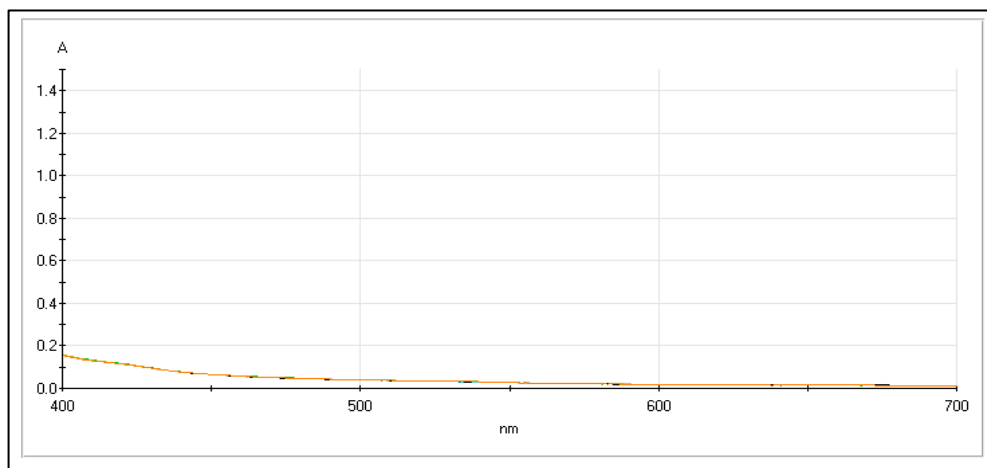


Tabla N°13. Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en las hojas y flores de la menta dulce.

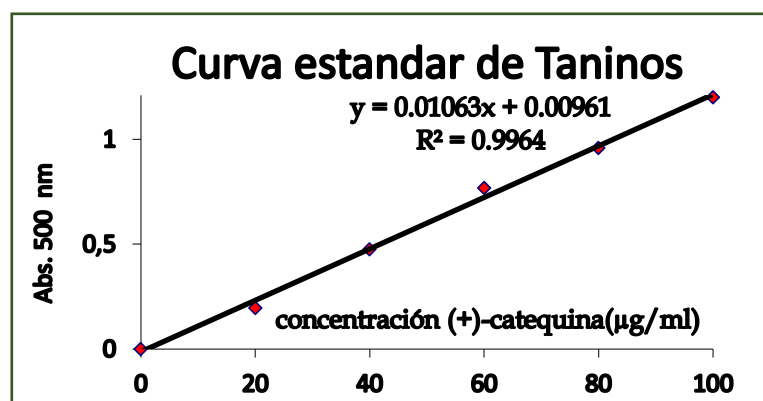
Tipo de muestra	Código	repetición	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		l/cm* ² mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,623	302,236	30,00	78,66	3,00	45,73		
		R2	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,68	0,04
		R3	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
		R5	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,63	0,04
		R6	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58		

4.3.6. EVALUACIÓN TANINOS DE LAS HOJAS Y FLORES DE *Lippia dulcis* (MENTA DULCE).

Las catequinas y proantocianidoles también conocidos como taninos condensados, fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva estándar de taninos obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura N° 16, donde las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml ($y = 0.01063x + 0.00961$; $R^2 = 0.9964$) y la absorbancia respectiva medida a una $\lambda = 500$ nm, esta curva fue empleada para la determinación de taninos en el tallo, Flores y hojas.

Las plantas que tienen taninos son muy útiles como antisépticos y antiinflamatorios en casos de bronquitis, hemorroides, sabañones, etc. (Evans 1984; Evans W. 1984).

Figura N°16. Curva estándar de taninos para cálculo de taninos



En la tabla N° 14 se muestra el contenido de catequinas y proantocianidoles (taninos condensados) con un valor de $14,208 \pm 0,104$ mg (+)-catequina/100 gr de muestra original.

Tabla N° 14. Contenido de taninos condensados de las hojas y flores de *Lippia dulcis*.

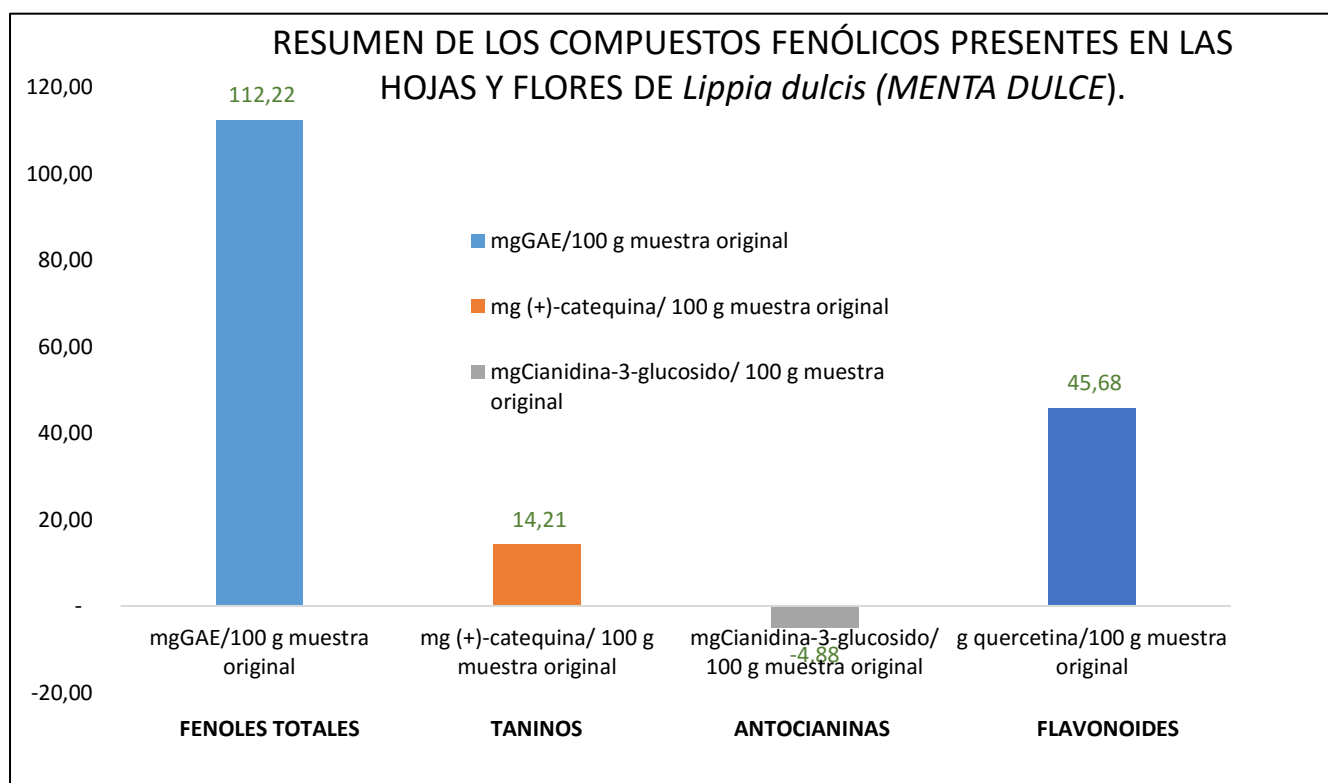
Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extracto seco	Alicuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	Alicuota en el tubo	lectura espectrofotometro	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs.500 nm	µg (+)-Catequina/ml	mg (+)-Catequina/ml	mg (+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alicuota extracto 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		
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,089	7,468	0,007	0,224	2,241	14,268		
		R2	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,089	7,468	0,007	0,224	2,241	14,268	14,208	0,104
		R3	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,088	7,374	0,007	0,221	2,212	14,088		

4.3.7. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE FLORES Y HOJAS DE *Lippia dulcis*.

Tabla N°15. RESUMEN DE LOS CONTENIDOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LAS HOJAS Y FLORES DE *Lippia dulcis*.

Muestra <i>Lippia dulcis</i>	concentración FT		concentración taninos		Concentración de antocianinas		Concentración de flavonoides	
	mgGAE/100 g muestra original	±	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	±	mgCianidina-3-glucosido/100 g muestra original	±	g quercetina/100 g muestra original	±
	112,22	0,00	14,21	0,10	4,88	3,73	45,68	0,04
	112,22	0,00	13,91	-	9,32	1,48	45,63	0,04
	112,22	0,00			6,44	2,94	45,58	-

FIGURA N° 17. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LAS HOJAS Y FLORES DE *Lippia dulcis*.



De acuerdo a la Figura N° 17, podemos inferir que los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante en el extracto de las hojas y flores de *Lippia dulcis* Trev., (menta dulce) en orden decreciente a la presencia de flavonoides (45, 68 ± 0,04 g quercetina/100 g muestra original), fenoles totales (112,22 ± 0,0 mgGAE/ 100 g muestra original), taninos (14,21 ± 0,10 mg (+)-catequina/100g muestra original).

4.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDEOS Y TANINOS DEL TALLO DE LA ESPECIE *Lippia dulcis* (menta dulce).

4.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTES DEL TALLO de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tabla N° 16. Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas al tallo de *Lippia dulcis* (Menta dulce).

Número de lecturas	Promedio solución DPPH (1mM)	Extracto Etanolico <i>Lippia dulcis</i> (Tallo)			
		concentraciones			
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,331	0,146	0,143	0,219	0,295
2	0,331	0,083	0,111	0,212	0,291
3	0,331	0,047	0,092	0,208	0,286
4	0,331	0,020	0,084	0,206	0,284
5	0,330	0,146	0,079	0,197	0,280
6	0,330	0,083	0,074	0,162	0,280
7	0,330	0,047	0,067	0,142	0,280
8	0,330	0,020	0,063	0,141	0,281
9	0,331	0,146	0,059	0,139	0,282
10	0,331	0,083	0,222	0,137	0,281
Promedio	0,331	0,082	0,100	0,176	0,284
Porcentaje de Inhibición, %		75,24	69,90	46,65	14,10

En la tabla N° 16 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce) y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexo N° 04;

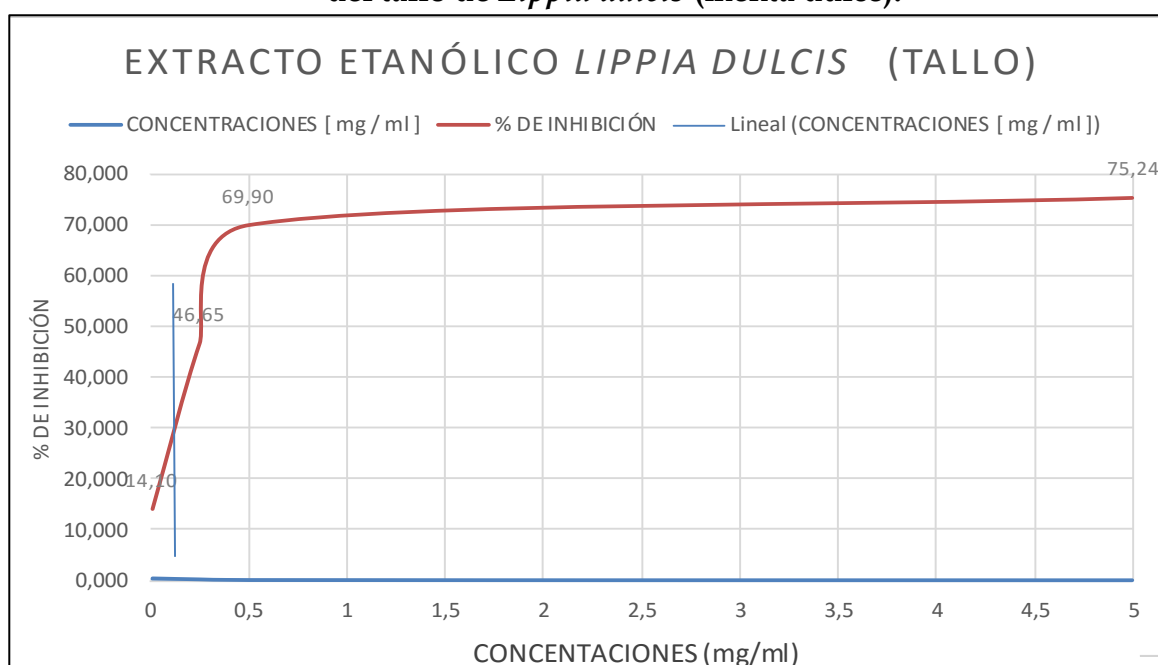
05 y 06), en la tabla N° 17 se encuentra el porcentaje de inhibición con las debidas concentraciones donde la actividad antioxidante superior al 25% se encuentra en concentraciones de 0,25 mg/ml presenta un porcentaje de inhibición de 46,65 %.

Tabla N° 17. Porcentaje de inhibición del tallo de la *Lippia dulcis* (menta dulce).

Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (Tallo)				
CONCENTRACIONES [mg / ml]	5	0,5	0,25	0,01
PROMEDIO DE ABSORCIÓN (A°)	0,082	0,100	0,176	0,284
% DE INHIBICIÓN	75,24	69,90	46,65	14,10

En la Figura N° 18 se puede observar una actividad antioxidante del tallo donde se puede observar que la concentración mínima inhibidora es de 1,74 mg/ml con un porcentaje de inhibición de un 25%, aproximadamente.

Figura N° 18. Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).



4.4.2. EVALUACIÓN DE FENOLES TOTALES DEL TALLO DE LA *Lippia dulcis* (MENTA DULCE).

En la tabla N° 18 se muestra la forma del cálculo de la presencia del contenido de fenoles totales en tallo con un valor $96,103 \pm 0,0$ mg EAG/100 g muestra original obtenido del valor promedio de las mediciones (ver anexo N° 12), no existen trabajos anteriores a este.

Tabla N° 18. Tabla de contenido de fenoles totales en el tallo de *Lippia dulcis*.

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extrato seco	Alicuota de extrato seco	Volumen enrasado 1	factor de dilucion	Alicota en tubo	lectura en el espectrofotometro	concentracion FT	concentracion FT	concentracion FT	concentracion FT	MEDIA FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)	Abs.765 nm	mgGAE/ml	mgGAE	mgGAE/mg Alicuota extrato seco	mgGAE/100 g muestra original	mgGAE/100 g muestra original	
			a	b=a*1000	c		f=e/d	g	h	i=@	j=i*c	k=j/a	j=h/a	
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		
		R2	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155	96,103	0,090
		R3	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,641	0,060	6,000	60,000	96,000		

4.4.3. EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS DEL TALLO DE LA *Lippia dulcis* (menta dulce).

En las Figuras N° 19 y N° 20, se muestra el espectro de absorción a pH 4.5 y pH 1.0 del extracto etanólico del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce) hecho por un barrido de absorción a λ de 400 a 700 nm.

En la Tabla N° 19. Se muestra las absorbancias de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm que aparecen en las figuras N°19, N°20 respectivamente de la a pH 4.5 y pH 1 (ver anexo N° 20), y valores fijos a 700 nm, la cantidad promedio obtenido de antocianinas aplicando la fórmula descrita en la metodología, fue de 0.5654 ± 0.5463 mg de cianidina-

3-glucosido/100 g de muestra original, las cuales se muestran en la Anexo N° 14. No existen reportes de trabajos anteriores a este

TABLA N° 19. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	A°	λ (nm)	A°
551 nm	0.055	513 nm	0.059
505 nm	0.075	543 nm	0.051
502 nm	0.080	528 nm	0.055
544 nm	0.065	502 nm	0.065
544 nm	0.067	543 nm	0.052
506 nm	0.083	543 nm	0.052

FIGURA N°19. Absorción del extracto etanólico del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.

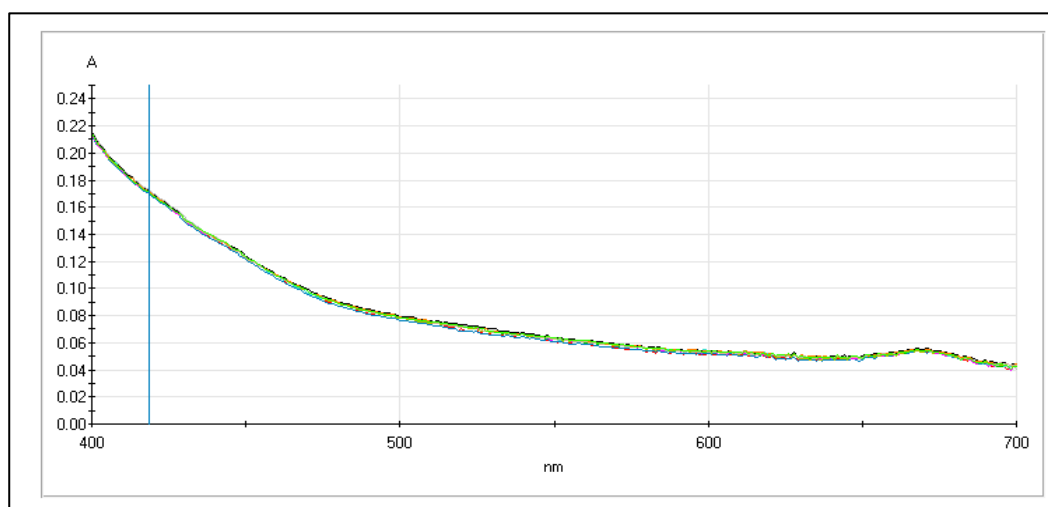


FIGURA N°20. Absorción del extracto etanólico del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce). De 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

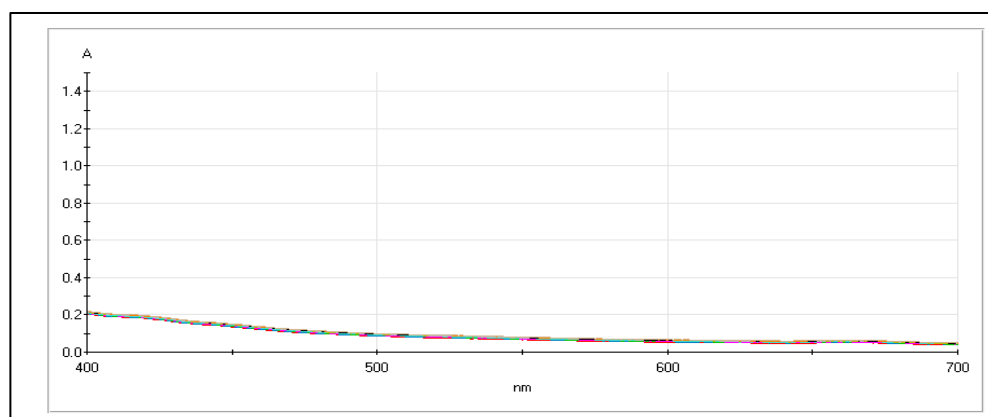


TABLA N°20. Absorciones y cálculo de antocianinas presentes del tallo de la *Lippia dulcis*. (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	Repetición	ABS = λ Vis-máx	ABS = λ Vis-máx nm	ABS = 700 nm	ABS = 700 nm	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ϵ	L	Concentración de antocianinas	Media antocianinas	SD
			pH 1	pH 4.5	pH 1	pH 4.5								
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol		l/cm ² *mol	cm			
lippia dulcis (tallo)	extracto 1	R1	0,0550	0,0590	0,021	0,023	-0,0020	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-0,0641		
		R2	0,0750	0,0510	0,02	0,023	0,0270	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,8657	0,5664	0,5463
		R3	0,0800	0,0550	0,02	0,023	0,0280	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,8977		

4.4.5. EVALUACIÓN DE FLAVONOIDES DEL TALLO DE *Lippia dulcis*. (MENTA DULCE).

Los flavonoides presentes en el tallo de *Lippia dulcis* fue determinado por absorción a $\lambda = 415$ nm y se consignan los datos en la Tabla N° 20 obteniendo 0.20 ± 0 g quercetina/100g muestra original. (Ver anexo N° 16). No existen trabajos anteriores a este.

TABLA N° 21. Determinación de flavonoides del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce)

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM	FD	ϵ	L	Concentración de flavonoides	Media flavonoides	SD
				g/mol		l/cm ² *mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
Lippia dulcis (tallo)	extrato 1	R1	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
		R2	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20	0,20	0,00
		R3	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		

Los flavonoides por acción de la captura del radical libre ejercen un efecto protector en los daños del tejido isquémico por perfusión, y por acción como antioxidante exhibiendo varios efectos benéficos como antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y con actividad anti cáncer.

4.4.6. EVALUACION DE TANINOS DEL TALLO DE *Lippia dulcis* (MENTA DULCE).

Los taninos condensados, fueron cuantificados siguiendo la ecuación que se cita en el numeral 4.2.6., y la figura N° 16.

TABLA N^a 22. Contenido de taninos de tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota del extrato seco	Alicuota del extrato seco	Volumen enrasado 1	Alicuota en el tubo	lectura en el Equipo	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs.500 nm	µg(+)-Catequina/ml	mg(+)-Catequina/ml	mg(+)-Catequina	mg(+)-catequina/g alicuota extrato seco	mg(+)-catequina/100g muestra original	mg(+)-catequina/100g muestra original	
			a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g* c	i = h / b	j = h/a		
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230	6,330	0,087
		R2	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230		
		R3	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,05	3,800	0,004	0,380	3,800	6,079		
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,052	3,988	0,004	0,399	3,988	6,380	6,330	0,087
		R2	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230		
		R3	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,052	3,988	0,004	0,399	3,988	6,380		

La determinación de la presencia de taninos se muestra en la tabla N^o 22. Con un valor de 6.330 ± 0.087 mg (+)-catequina/100g de muestra original, confirmando la abundante presencia detectado en el abordaje fitoquímico de los taninos son compuesto muy común en este tipo de especies en forma de árboles. No existen reportes de trabajos anteriores a este.

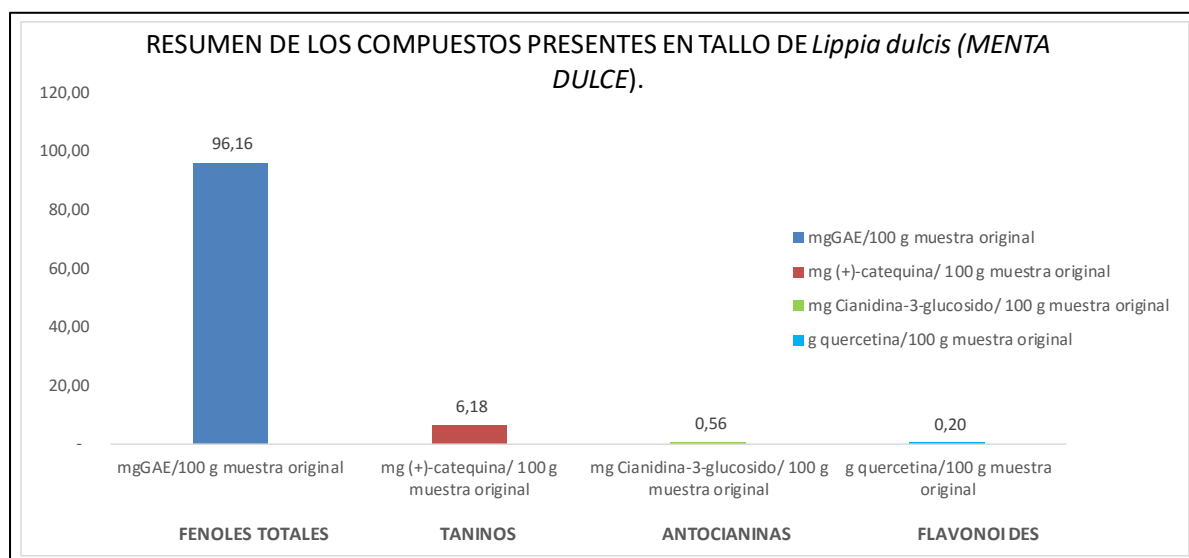
4.4.7. RESUMEN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN TALLO DE *Lippia dulcis*.

TABLA N^o 23. RESUMEN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL TALLO DE LA *Lippia dulcis*

lippia dulcis (tallo)	concentracion FT		concentración taninos		Concentración de antocianinas		Concentración de flavonoides	
	mgGAE/100 g muestra original	±	mg(+)-catequina/100 g muestra original	±	mg Cianidina-3-glucosido/100 g muestra original	±	g quercetina/100 g muestra original	±
	96,16	-	6,33	0,09	0,56	0,50	0,20	0,00
	96,10	0,09	6,33	0,09	0,56	0,50	0,20	-
	96,16	-	6,23	-	-	-	0,20	-

FIGURA N° 21. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL TALLO DE *Lippia dulcis*.

De acuerdo a la figura N° 21, podemos inferir que la actividad antioxidante que presenta el extracto etanólico del tallo de la *Lippia dulcis* Trev., se debe a la presencia de fenoles totales (96,16 mgGAE/100 g de muestra original), taninos (6,18 mg (+)-catequina/100 gr muestra original), antocianinas (0,56 mg de Catequina/100 mg de muestra original) y flavonoides (0,20 mg de quercetina/100 mg de muestra original).



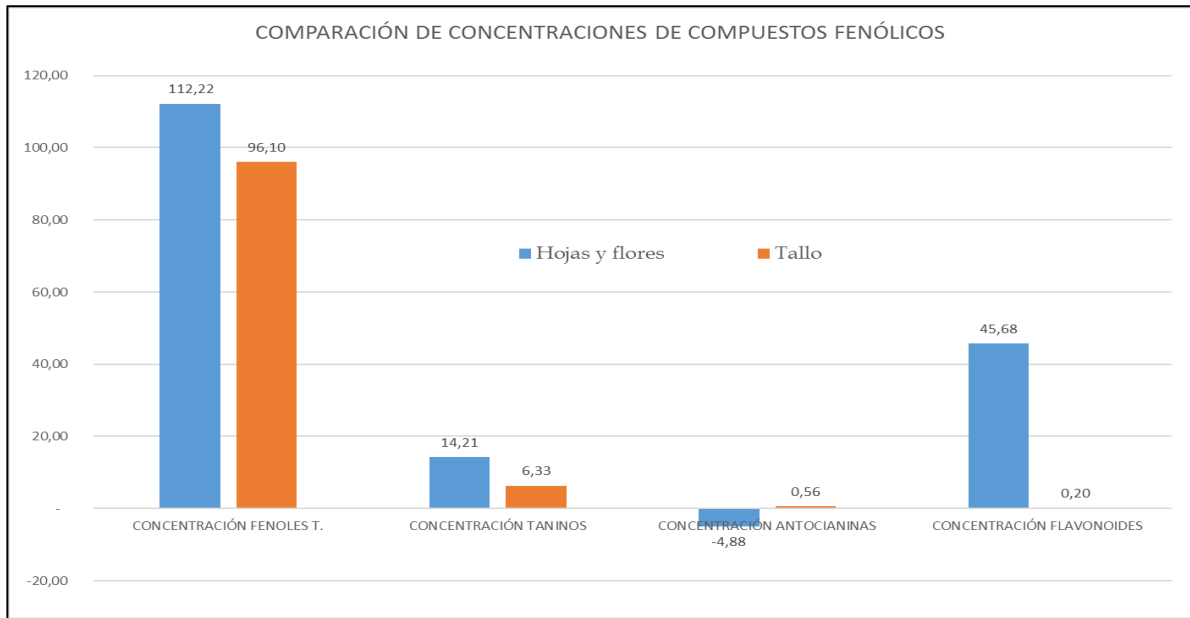
4.4.8. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES ENTRE LOS EXTRACTOS DE HOJAS/FLORES Y DEL TALLO DE LA ESPECIE *Lippia dulcis*. (menta dulce)

Tabla N° 24. Comparación del contenido de Compuestos Fenólicos entre el tallo y las hojas/Flores de *Lippia dulcis*.

Muestra <i>Lippia dulcis</i>	A.A. al 25% (mg/ml)	CONCENTRACIÓN FENOLES T.		CONCENTRACIÓN TANINOS		CONCENTRACIÓN ANTOCIANINAS		CONCENTRACIÓN FLAVONOIDES	
		mgGAE/100 g muestra original	±	mg (+)- catequina/ 100 g muestra original	±	mg Cianidina-3- glucosido/ 100 g muestra original	±	g quercetin/ 100 g muestra original	±
Hojas y flores	1,3	112,22	0.00	14,21	0.10	-4,88	-	45,68	0.04
Tallo	0,09	96,10	0.0	6,33	0.09	0,56	0.50	0,20	0.0

En la figura N° 22, podemos observar la comparación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de tallo y en el de hojas y flores, donde el extracto de hojas flores presenta mayor concentración en flavonoides (46,68 g quercetina/ 100 muestra original), fenoles totales (112,22 mg EAG / 100 gr muestra original) y taninos (14,21 mg (+)- catequina/ 100 gr muestra original) en relación al extracto de tallo que presenta Flavonoides (0,20 g quercetina/ 100 muestra original), fenoles totales (96, 10 mg EAG / 100 gr muestra original), taninos (6, 33 mg (+)- catequina/ 100 gr muestra original) de *Lippia dulcis* Trev.,

FIGURA N° 22. Comparación del contenido de compuestos fenólicos entre el tallo y las hojas/flores de *Lippia dulcis*.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. CONCLUSIONES.

Las hojas y flores de *Lippia dulcis* presentan actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de acuerdo a nuestras condiciones experimentales. Dicha actividad antioxidante está relacionada a la presencia en forma decreciente de flavonoides, fenoles totales y taninos en las hojas y flores de *Lippia dulcis*. La actividad antioxidante de las hojas y flores de *Lippia dulcis* se manifestó a una concentración mínima de 1,3 mg/ml aproximadamente, donde se obtuvo un 25% de actividad mediante la prueba de DPPH.

El tallo de *Lippia dulcis* presentan actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de acuerdo a nuestras condiciones experimentales. Dicha actividad antioxidante está relacionada a la presencia de fenoles totales y taninos en el tallo de *Lippia dulcis*. La actividad antioxidante del tallo de *Lippia dulcis* se manifestó a una concentración mínima de 0,09 mg/ml aproximadamente, donde se obtuvo un 25% de actividad mediante la prueba de DPPH.

5.2. RECOMENDACIONES.

Realizar un estudio de la concentración mínima inhibidora (IC₅₀) de los extractos del tallo y de las hojas/flores de *Lippia dulcis Trev* para determinar la cantidad más próxima necesaria para su consumo.

Realizar un estudio para determinar el rendimiento de extracción y aislamiento del edulcorante (hernandulcina), presente en la *Lippia dulcis*.

Realizar estudios *in vivo* de la actividad antioxidante del extracto de hojas, flores y tallo de *Lippia dulcis Trev*.

Realizar estudios de aislamiento y elucidación de compuestos fenólicos presentes en los extractos del tallo, hojas y flores de *Lippia dulcis Trev* para determinar el compuesto responsable de la actividad antioxidante.

Realizar estudios de la actividad antioxidantes de otras especies de plantas utilizadas en la etnomedicina por el poblador amazónico.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM MD. N., BRISTI N.J., RAFIQUZZAMAN MD. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal; 2012; 21: 143-152.

ALLENDE MARTÍNEZ LUIS MIGUEL. 1997. Efectos del Retinol (Vitamina A) en la Activación de Linfocitos T Humanos y sus Implicaciones Terapéuticas. Madrid.

AMES, B. N., M. K. SHIGENAGA Y T.M. HAGEN. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci. 90: 7915-7922

ARNÉR ELIAS S.J. Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. Biochimica et Biophysical Acta. 2009; 1790: 495-526.

BENTIGER N., BRISMARK K., DALLNER G. The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion; 2007. 7:541-550.

BEUTNER, S., BLOEDORN, B., FRIXEL, S., HERNÁNDEZ BLANCO, I., HOFFMANN, T., MARTIN, H.D., MAYER, B., NOACK, P., RUCK, C., SCHMIDT, M., SCHULKE, I., SELL, S., ERNST, H., HAREMZA, S., SEYBOLD, G., SIES, H., STAHL, W. Y WALSH, R. (2001). "Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions", J. Sci. Food Agric., Vol. 81, pgs. 559-568.

BEWLEY, G.C., W.J. MACKAY Y J.L. COOK. (1986). Temporal variation for the expression of catalase in *Drosophila melanogaster*: correlations between rates of enzyme synthesis and levels of translatable catalase-messenger RNA. Genetics. 113: 919-938.

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

BOVERIS, A., N. OSHINO Y B. CHANCE. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128:617-630.

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.

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

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

BRAVO, L., R. ABIA. "Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994. 42(7): 1481-1487.

BRIZUELA, M.A. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis en opción del grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. ICIDCA, 2003.

BRONZETTI, G. (1994). Antimutagens in food. *Trends in food science y technology*. 5:390 395.

CADENAS, E. Y L. PARKER. (2002). *Hadbook of antioxidants*. 2ª Edición. Madison. New York. USSA.1-19pp.

CARDOSO C.L., SILVA H.S, CASTRO-GAMBOA IAN., BOLZANI V.S. (2005). New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*; 16: 1353-1359.

CAROCHO M., FERREIRA I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*; 51: 15-25.

CARROL, K. K., KUROWSKA, E. M., GUTHRIE, N., Use of citrus limonoids and flavonoids aswell astocotrienols for the treatment of cancer, en International Patent WO9916167. 1999.

ÇELİK S.E., ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K., APAK R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*; 8: 1300–1309.

CEMELI E., BAUMGARTNER A., ANDERSON D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*; 2009. 681: 51–67.

COMPADRE C.M.; ROBBINS, E.F; KINGHORN, A.D. The intensely sweet herb, *Lippia Dulcis Trev.* Historical uses, Field inquiries, and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. 1986, 15(1), p.p. 89-106.

COSTA L.S. Y J.A. IMLAY. (2001). Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*.183:7182-7189.

DELGADO VARGAS, F.; PAREDES LÓPEZ, O. 2003. Colorantes naturales para la alimentación y usos nutraceuticos. CRC PRESS. U.S.A.

DAVIES, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." *IUBMB Life* **50**: 279-89.

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.

DONMA, M. M. AND O. DONMA. (2005). "Phytonutrients and children: The other side of the medallion." *Food Research International* 38(6): 681-692.

DORFMAN, L.M. (1973). Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions. *NSRDS*: 1- 38 pp.

DORMAN H.J.D, HILTUNEN R. (2004). Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis L.*) extract and subfractions. *Food chemistry*; 88:193-199.

- DORIA E., BUONOCORE D., FOCARELLI A., MARZATICO F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.1 (1): 1-13 p.p
- DREHER, D. Y A.F. JUNOD. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J. Cancer*. 32A:30-38.
- DEVLIN, T.M. (2004). *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverte: 590 pp.
- ESCARPA A., GONZALES M.C. An Overview Of Analytical Chemistry Of Phenolic Compounds In Food. *Crit. Rev. Anal. Chem*. 2001. 31, 51-139.
- ESTER MOLINA. El papel de los antioxidantes como desaceedores del envejecimiento. *RENut*. 2012; 6 (3): 1109-1119.
- Evans, W. 1984, *Farmacognosia*. 13^o Impresión, México D.F. Editorial Continental, S.A. de C.V. págs. 410-412.
- Evans, W. 1984. *Farmacognosia*, 3^o Impresión. México D.F. Editorial Continental, S.A. de C.V. págs.88, 104, 173-175.
- E. MARTA. KUSKOSKI; AGUSTIN G. ASUERO; ANA M. TRONCOSO; JORGE MANCINI-FILHO; ROSEANE FETT. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutas. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 2005; 25(4): 726-732.
- FARNSWORTH, E. J. y GONZALES. *Guide to the Visitor's Natural History Trail, La Selva*. Organization for Tropical Studies (OTS), San Jose, Costa Rica, 1989.
- FANG, Y. Z., S. YANG Y G. WU. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition *Nutrition*. 18: 872-879.
- FERGUSON, L.R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res*. 307:395-410.

- FINKEL, T. AND HOLBROOK, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408; 239-247.
- FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 1927: 73, 627-650.
- FRANCISCO DE OLIVEIRA P, FRANCISCO MACHADO RA, BOLZAN A, BARTH D. Extracción con fluidos supercríticos de Hernandulcina a partir de *Lippia dulcis* Trev. *J. of Supercritical Fluids.* 2012; 63:161-168.
- GUPTA, M.P. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Bogotá: Editorial Presencia Ltda; 1995.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R. E. 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, 2001.
- GUTIÉRREZ GAITÉN. Y. I., MIRANDA MARTINEZ M., VARONA TORRES N., RODRIGUEZ A.P. 2000. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. revista Cubana de Farmacia, v, 34, n. 1, p. 50-55.
- HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr. Rev.* 1999. 57: 104 -113.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 52(8 Pt 1):253-265.
- HALLIWELL, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *Jurnal of the Royal Society of Medicine.* 82: 747-751.
- HALLIWELL, B. Y J, M GUTTERIDGE. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- HEIM, K. E., A. R. TAGLIAFERRO, ET AL. (2002). "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572-584.

HERNÁNDEZ NE, TERESCHUK ML Y ABDALA L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *J Ethnopharmacol* 2000, 73:317- 322.

JAYES P, ET, AL. Aceites Escenciales de Nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae, Informe Final Proyecto de Investigación. Fac. Farmacia/DIGI/USAC. 2008.

JOSEPHY, P.D. Y B. MANNERVIK. (2006). *Molecular Toxicology*. 2^a. Oxford University Press: 19-20 pp.

KANEDA, N.; LEE, I.-S.; GUPTA, M.P.; DOEL SOEJARTO, D.; DOUGLAS AND KINGHORN, A. (+)-4 β -Hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpeno from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *Journal of Natural Products*, 1992, 55 (8), pp. 1136-1141.

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

KATALINIC V., MODUN D., MUSIC I., BOBAN M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3 ethylbenzothiazoline 6- sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; 2005. 140: 47-52.

KIM B.Y., LEE K.S., CHOO Y.M., KIM I., JE Y.H., WOO S.D., LEE S.M., PARK H.C., SOHN H.D., JIN B.R. Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 2008; 150: 161-169.

KOHLMEIER, L., N. SIMONSEN Y K. MOTTUS. (1995). Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 103(Suppl 8): 177-184.

LE BOURG E. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*. 498:183-186.

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

LOCK, O Investigación fotoquímica métodos en el estudio de productos naturales. 2ª Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima- Perú. 1994. 300 p.

LLOBERA, A. (2004). "Obtenció d'antioxidants naturals a partir de subproductes del procés de vinificació del raïm autòcton Manto negro". Conselleria d'Agricultura i Pesca, Quaderns d'Investigació, Vol. 1.

MACKENZIE E.L., RAY P.D., TSUJI Y. Role and regulation of ferritin H in rotenone mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 2008. 44: 1762-1771.

MAJO, D. D., LA GUARDIA, M., GIAMMANCO, S., LA NEVE, L., GIAMMANCO, M. (2008). "The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents". *Food Chemistry*, Vol. 111, pgs. 45-49.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S., GONZÁLES-GALLEGO J., CULEBRAS J.M., TUÑÓN M.J. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII (6). P 271-278.

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

MARTÍNEZ MARTÍNEZ ALEJANDRO. 2003. Carotenoides. Universidad de Antioquia, Medellin

MARWAH R.G., FATOPE M.O., MAHROOQI R.A., VARMA G.B, ABADI H.A., KHAMIS S., BURTAMANI-AL. (2007) Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*; 101:465.

MAYOR-OXILIA, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.* 5:23-29.

MIRANDA M. & CUELLAR A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana; 2000. p. 41.

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

MONAGAS, M., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., BARTOLOMÉ, B. (2006). "Evolution of thebphenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle", Food Chemistry, Vol. 95(3), pgs. 405-412.

MULDER A.M., CONNELLAN P.A., OLIVER C.J., MORRIS C.A. Bovine lactoferrina supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. Nutrition Research. 2008; 28: 583-589.

NEFF, J. Y HOLMAN, J.R. How the latest products toe the fine line between foods and drugs. Food Proc. 1997. 58 (4); 23-26.

ONO, M.; MORINAGA, H.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AND NOHARA, T. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 53 (9), pp.1175-1177.

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.

ONO, M.; TSURU, T.; ABE, H.; ETO, M.; OKAWA, M.; ABE, F.; KINJO, J.; AND NOHARA, T. Bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. *Journal of Natural Products*, 2006, 69 (10), pp. 1417-1420.

ORELLANA POLANCO AD, MARTÍNEZ ARÉVALO JV, CÁCERES A. Agrotecnología para el cultivo de Orozuz o hierva dulce, En: Martínez Arévalo JV, Yesid Bernal H, Cáceres A. editores. Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas, Colombia: © Convenio Andrés Bello; 2000. p. 270-275.

PARK, K.K., J.H. PARK, Y.J. JUNG Y W.Y. CHUNG. (2003). Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism. *Mutat Res.*542:89-97.

PASTORE A., FEDERECI G., BERTINI E., PIEMONTE F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*; 2003. 333: 19-39.

PÉREZ LEONARD, HEIDY. Nutraceuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA*. 2006. Vol. 40 (03); 20-28.

PÉREZ - VIZCAÍNO F, DUARTE J, JIMÉNEZ R, SANTOS-BUELGA C, OSUNA A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 67-75.

PINEDA, A. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de Guatemala. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 79 p. 2005.

PODSEDEK A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*; 2007. 40: 1-11. p.p.

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

RAIMONDI, S., D. UCCELLETTI, D. MATTEUZZI, U.M. PAGNONI, M. ROSSI, Y C. PALLESCHI. (2008). Characterization of the superoxide dismutase *SOD1* gene of *Kluyveromycesmarxianus* L3 and improved production of SOD activity. *ApplMicrobiol Biotechnol*. 77:1269-1277.

ROBBINS, R. J."Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 51(10): 2866-2887.

- RAHMAN.K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2: 219-236.
- RICE-EVANS CA, MILLER NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 790-795
- ROCHE M., RONDEAU P., SINGH N.R., TARNUS E., BOURDON E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*; 2008. 582: 1783–1787.
- RUPASINGHE, H. P., CLEGG, S. (2007). "Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources", *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 20, pgs. 133-137.
- SANTOS-BUELGA, C. AND A. SCALBERT. "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000. 80(7): 1094-1117.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem*. 2002. 50, 2432-2438.
- SERRANO RÍOS M, SASTRE GALLEGO A, COBO SANZ JM. Tendencias en alimentación funcional. Instituto Danone. Madrid: You and Us; 2005. p. 1-14.
- SLOAN, E. The top 10 trends to watch and work on. *Food Technol*. 1996. 50 (7): 55-71.
- 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.

- SIDDHURAJU P., BECKER, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*; 101: 10-19.
- SINGLETON, V. and ROSSI, J. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic. Vo. 16.* p. 144-158.
- SOHAL, R.S. Y R.G. ALLEN. (1990). Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol.*25:499-522.
- SOTERO S. V. E., GARCIA DE SOTERO D. E., 2009. Manual de análisis Químico de Alimentos, 1° Edición, Edit, CONCYTEC, Iquitos-Perú. Pág. 7-8.
- SOUTO-BACHILLER, ET AL. Terpenoides, Composición De *Lippia Dulcis*. *Phytochemistry.* 1997; 44, 1077-1086.
- SUJA K.P., JAYALEKSHMY A., ARUMUGHAN C. (2004). Free radical Scavenging behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH⁺ System. *Journal of agricultural and food chemistry*; 52: 912-915.
- SWAIN T., GOLDSTEIN J.L. methods in polyphenol chemistry. Pergamon Press, Oxford. 1964, 131-1964.
- TAPIA A., RODRIGUEZ J., THEODULOZ C., LOPEZ S., FERESIN G.E., SCHMEDA-HIRSCHMANN G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *baccharis grisebachii* . *Journal of Ethno-pharmacology*; 95: 155-161.
- TURRENS, J.F. (1997). Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Reports.* 17:3-8.
- 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.

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). Tesis graduación sin publicar, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos-Perú. Pág. 47-48.

VENKATACHALAM, S.R. Y S. CHATTOPADHYAY. (2005). Natural radioprotective agents: An overview. *Current Organic Chemistry*. 9: 389-404.

WEBSTER R.D. Voltammetric studies on the α -tocopherol anion and α -tocopheroxyl (Vitamin E) radical in acetonitrile. *Electrochemistry Communications*; 1999. 1: 581-584.

WOODRUFF, R.C., J.P. PHILLIPS Y A.J. HILLIKER. (2004). Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient *Drosophila*. *Genome*.47:1029-1935.

YAISA CASTILLO CASAÑA. GRETTEL RIVERÓN FORMENT. Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. *Rev cubana Genet Comunit*. 2014;8(1):5-11

YOUNGSON, R. (2003). Antioxidantes Y Radicales Libres. Vol 132. Vida Natural. Colección Vida Natural II. España. 113pp.

ZBIGNIEW, W., M. HANAUSEK, SLAGA, J. THOMAS J. (2004). Mechanisms of chemoprevention. *Chest*. 125(5 Suppl):128S-33S.

ANEXO

Anexo N° 1. Absorbancias del extracto de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (hojas y flores)			
		concentraciones			
	DPPH (1 mM)	5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,478	0,193	0,419	0,454	0,460
2	0,478	0,169	0,418	0,455	0,460
3	0,478	0,154	0,413	0,458	0,460
4	0,478	0,144	0,412	0,457	0,459
5	0,478	0,143	0,407	0,454	0,459
6	0,478	0,126	0,405	0,453	0,459
7	0,478	0,120	0,404	0,452	0,459
8	0,478	0,115	0,404	0,454	0,459
9	0,478	0,112	0,401	0,454	0,459
10	0,478	0,108	0,400	0,454	0,459
Promedio	0,478	0,138	0,408	0,455	0,459
Porcentaje de Inhibición, %		71,05	14,58	4,92	3,91

Anexo N° 2. Absorbancias del extracto de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH 100 (µM)	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (hojas y flores)			
		concentraciones			
	5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml	
1	0,478	0,182	0,419	0,455	0,460
2	0,478	0,169	0,418	0,458	0,460
3	0,478	0,150	0,413	0,457	0,460
4	0,478	0,141	0,410	0,457	0,459
5	0,478	0,131	0,406	0,454	0,459
6	0,478	0,123	0,405	0,454	0,460
7	0,478	0,118	0,404	0,453	0,460
8	0,478	0,114	0,402	0,452	0,459
9	0,478	0,120	0,401	0,454	0,459
10	0,478	0,107	0,400	0,454	0,459
Promedio	0,478	0,136	0,408	0,455	0,460
Porcentaje de Inhibición, %		71,65	14,69	4,85	3,87

Anexo N° 3. Absorbancias del extracto de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH 100 (uM)	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (hojas y flores)			
		concentraciones			
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,478	0,174	0,419	0,455	0,461
2	0,478	0,158	0,412	0,458	0,460
3	0,478	0,147	0,412	0,457	0,460
4	0,478	0,138	0,409	0,458	0,460
5	0,478	0,127	0,406	0,454	0,459
6	0,478	0,121	0,405	0,453	0,459
7	0,478	0,117	0,404	0,452	0,459
8	0,478	0,110	0,401	0,454	0,459
9	0,478	0,113	0,401	0,454	0,459
10	0,478	0,107	0,400	0,454	0,459
Promedio	0,478	0,131	0,407	0,455	0,460
Porcentaje de Inhibición, %		72,55	14,88	4,83	3,87

Anexo N° 4. Absorbancias del extracto del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (1 mM)	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (tallo)			
		concentraciones			
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,331	0,152	0,149	0,220	0,295
2	0,331	0,088	0,114	0,213	0,294
3	0,331	0,048	0,093	0,208	0,289
4	0,331	0,022	0,085	0,206	0,284
5	0,330	0,152	0,080	0,200	0,280
6	0,330	0,088	0,074	0,168	0,280
7	0,330	0,048	0,068	0,144	0,280
8	0,330	0,022	0,063	0,139	0,280
9	0,331	0,152	0,060	0,142	0,282
10	0,331	0,088	0,560	0,137	0,281
Promedio	0,331	0,086	0,135	0,178	0,285
Porcentaje de Inhibición, %		73,99	59,29	46,25	13,94

Anexo N° 5. Absorbancias del extracto del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (tallo)			
	DPPH	concentraciones			
	(100 uM)	5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,331	0,145	0,141	0,219	0,295
2	0,331	0,083	0,110	0,212	0,291
3	0,331	0,047	0,092	0,208	0,285
4	0,330	0,020	0,084	0,206	0,284
5	0,330	0,145	0,079	0,197	0,280
6	0,330	0,083	0,074	0,161	0,280
7	0,330	0,047	0,067	0,142	0,280
8	0,330	0,020	0,063	0,141	0,282
9	0,330	0,145	0,059	0,137	0,281
10	0,330	0,083	0,055	0,137	0,281
Promedio	0,330	0,082	0,082	0,176	0,284
Porcentaje de Inhibición, %		75,23	75,05	46,72	14,05

Anexo N° 6. Absorbancias del extracto del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce), con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución	Extracto etanólico <i>Lippia dulcis</i> (tallo)			
	DPPH	concentraciones			
	(100 uM)	5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,331	0,140	0,138	0,218	0,294
2	0,331	0,077	0,109	0,212	0,289
3	0,330	0,045	0,092	0,208	0,284
4	0,331	0,018	0,084	0,205	0,283
5	0,331	0,140	0,079	0,194	0,280
6	0,330	0,077	0,073	0,157	0,280
7	0,331	0,045	0,067	0,140	0,279
8	0,330	0,018	0,062	0,143	0,282
9	0,331	0,140	0,059	0,138	0,282
10	0,331	0,077	0,052	0,138	0,281
Promedio	0,331	0,078	0,082	0,175	0,283
Porcentaje de Inhibición, %		76,50	75,36	46,99	14,30

Anexo N° 7. Determinación de fenoles totales hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extracto seco	Alicuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	factor de dilución	Alicuota en el tubo	lectura en el espectrofotómetro	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT mgGAE/100 g muestra original	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)	Abs.765 nm	mgGAE/m	mgGAE	mgGAE/mg alicuota extracto seco	mgGAE/100 g muestra original		
			a	b = a*1000	c		f=e/d	g	h	i=@	j = i* c	k= j / a		
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216	112,216	0,000
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216	112,216	0,000
		R5	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
		R6	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
Lippia dulce 3	extracto 1	R7	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216	112,216	0,000
		R8	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		
		R9	0,1000	100,00	30,00	1,000	0,300	0,628	0,059	1,762	17,622	112,216		

Anexo N° 8. Determinación de taninos de hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extracto seco	Alicuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	Alicuota en el tubo	lectura espectrofotómetro	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos mg (+)- catequina/ 100 g muestra original	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs.500 nm	µg (+)- Catequina/ml	mg (+)- Catequina/ml	mg (+)- Catequina	mg (+)- catequina/g alicuota extracto seco	mg (+)- catequina/ 100g muestra original		
			a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g* c	i= h / b	j = h/a		
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,089	7,468	0,007	0,224	2,241	14,268	14,208	0,104
		R2	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,089	7,468	0,007	0,224	2,241	14,268		
		R3	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,088	7,374	0,007	0,221	2,212	14,088		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908	13,908	-
		R5	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908		
		R6	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908		
Lippia dulcis 3	extracto 1	R7	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908	13,908	-
		R8	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908		
		R9	0,1000	100,00	30,00	0,200	0,087	7,280	0,007	0,218	2,184	13,908		

Anexo N° 9. Determinación de antocianinas de hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

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	SD
			(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	
Lippia dulcis 1	extrato 1	R1	0,035	0,065	0,011	0,011	-0,0300	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-2,8711		
		R2	0,038	0,065	0,011	0,011	-0,0270	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-2,5840	-4,8809	3,7325
		R3	0,035	0,131	0,011	0,011	-0,0960	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-9,1876		
Lippia dulcis 2	extrato 1	R4	0,034	0,131	0,011	0,011	-0,0970	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-9,2834		
		R5	0,031	0,144	0,011	0,011	-0,1130	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-10,8146	-9,3153	1,4837
		R6	0,035	0,117	0,011	0,011	-0,0820	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-7,8478		
Lippia dulcis 3	extrato 1	R7	0,035	0,067	0,011	0,011	-0,0320	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-3,0625		
		R8	0,04	0,122	0,011	0,011	-0,0820	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-7,8478	-6,4441	2,9426
		R9	0,035	0,123	0,011	0,011	-0,0880	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-8,4220		

Anexo N° 10. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	A°	λ (nm)	A°
522 nm	0.035	461 nm	0.065
508 nm	0.038	461 nm	0.065
528 nm	0.035	441 nm	0.131
526 nm	0.034	441 nm	0.131
543 nm	0.031	439 nm	0.144
528 nm	0.035	444 nm	0.117

Anexo N° 11. Determinación de flavonoides de las hojas y flores de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentración de flavonoides	Media flavonoides	SD
				g/mol		l/cm*mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
Lippia dulcis 1	extracto 1	R1	0,623	302,236	30,00	78,66	3,00	45,73		
		R2	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,68	0,04
		R3	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
Lippia dulcis 2	extracto 1	R4	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66		
		R5	0,622	302,236	30,00	78,66	3,00	45,66	45,63	0,04
		R6	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58		
Lippia dulcis 3	extracto 1	R7	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58		
		R8	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58	45,58	-
		R9	0,621	302,236	30,00	78,66	3,00	45,58		

Anexo N° 12. Determinación de fenoles totales del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extrato seco	Alicuota de extrato seco	Volumen enrasado 1	factor de dilucion	Alicota en tubo	lectura en el espectrofotometro	concentracion FT	concentracion FT	concentracion FT	concentracion FT	MEDIA FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)	Abs.765 nm	mgGAE/ml	mgGAE	mgGAE/mg Alicuota extrato seco	mgGAE/100 g muestra original	mgGAE/100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c		f=e/d	g	h	i=@	j=i*c	k=j/a	j=h/a	
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		
		R2	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155	96,103	0,090
		R3	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,641	0,060	6,000	60,000	96,000		
lippia dulcis (tallo)	2	R1	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		
		R2	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155	96,155	-
		R3	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		
lippia dulcis (tallo)	3	R1	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		
		R2	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155	96,155	-
		R3	0,1000	100,00	100,00	1,000	0,200	0,642	0,060	6,010	60,097	96,155		

Anexo N° 13. Determinación de taninos del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota del extrato seco	Alicuota del extrato seco	Volumen enrasado 1	Alicuota en el tubo	lectura en el Equipo	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs. 500 nm	$\mu\text{g (+)-Catequina/ml}$	$\text{mg (+)-Catequina/ml}$	mg (+)-Catequina	$\text{mg (+)-catequina/g alicuota extrato seco}$	$\text{mg (+)-catequina/ 100 g muestra original}$	$\text{mg (+)-catequina/ 100 g muestra original}$	
			a	$b = a \cdot 1000$	c	e	f	$g = @$	$g = @$	$h = g \cdot c$	$i = h / b$	$j = h / a$		
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230		
		R2	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230	6,330	0,087
		R3	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,05	3,800	0,004	0,380	3,800	6,079		
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,052	3,988	0,004	0,399	3,988	6,380		
		R2	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230	6,330	0,087
		R3	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,052	3,988	0,004	0,399	3,988	6,380		
lippia dulcis (tallo)	1	R1	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230		
		R2	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230	6,230	-
		R3	0,1000	100,00	100,00	0,100	0,051	3,894	0,004	0,389	3,894	6,230		

Anexo N° 14. Determinación de antocianinas del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	Repetición	$\text{ABS} = \lambda \text{ Vis-máx pH 1}$	$\text{ABS} = \lambda \text{ Vis-máx nm pH 4.5}$	$\text{ABS} = 700 \text{ nm pH 1}$	$\text{ABS} = 700 \text{ nm pH 4.5}$	$A = (a-c) - (b-d)$	PM	FD	ϵ	L	Concentración de antocianinas	Media antocianinas	SD
			(a)	(b)	(c)	(d)						$\text{mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original}$	$\text{mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original}$	
												g/mol	$\text{l/cm}^* \text{mol}$	
lippia dulcis (tallo)	extracto 1	R1	0,0550	0,0590	0,021	0,023	-0,0020	449,2	3,0	26.900,0	1,0	-0,0641		
		R2	0,0750	0,0510	0,02	0,023	0,0270	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,8657	0,5664	0,5463
		R3	0,0800	0,0550	0,02	0,023	0,0280	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,8977		
lippia dulcis (tallo)	extracto 1	R4	0,0650	0,0650	0,021	0,023	0,0020	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,0641		
		R5	0,0670	0,0520	0,021	0,023	0,0170	449,2	3,0	26.900,0	1,0	0,5451	0,5557	0,4970
		R6	0,0830	0,0520	0,021	0,023	0,0330	449,2	3,0	26.900,0	1,0	1,0580		

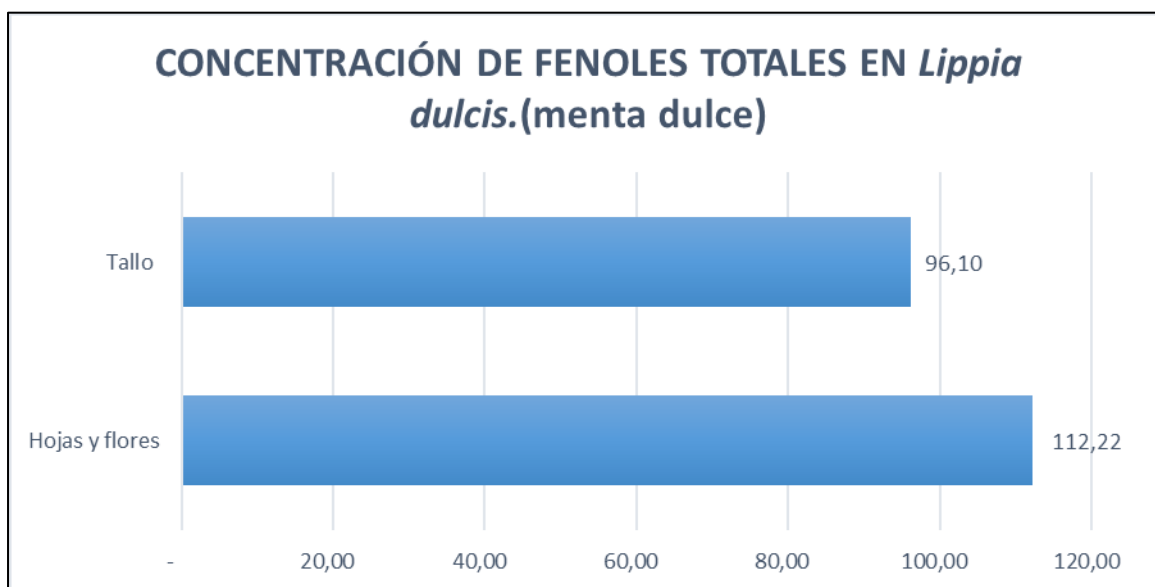
Anexo N° 15. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	A°	λ (nm)	A°
551 nm	0.055	513 nm	0.059
505 nm	0.075	543 nm	0.051
502 nm	0.080	528 nm	0.055
544 nm	0.065	502 nm	0.065
544 nm	0.067	543 nm	0.052
506 nm	0.083	543 nm	0.052

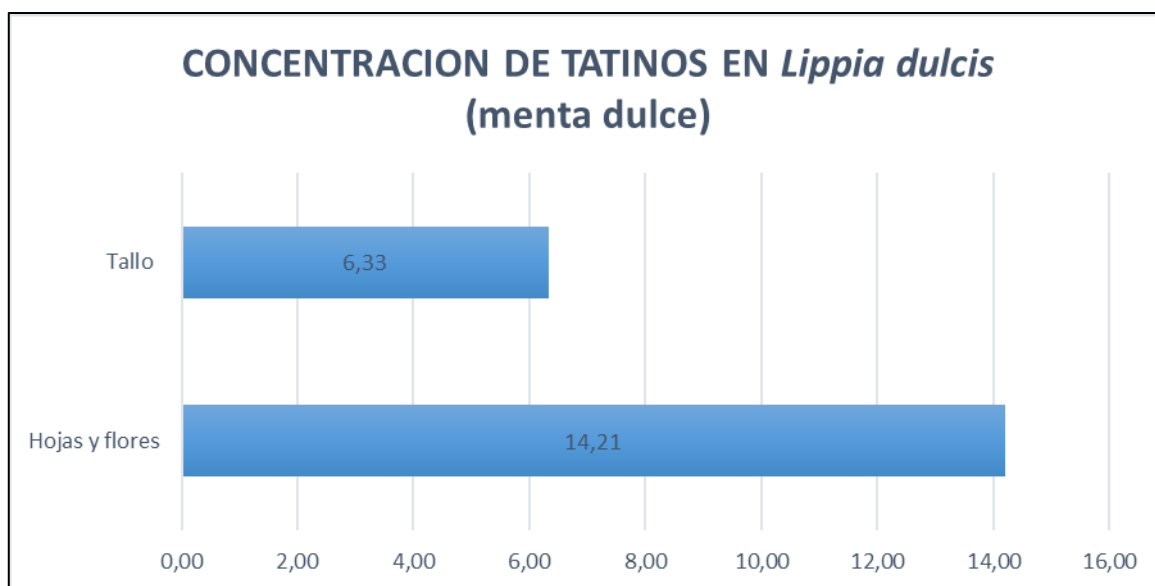
Anexo N° 16. Determinación de flavonoides del tallo de *Lippia dulcis* (menta dulce).

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM	FD	ϵ	L	Concentración de flavonoides	Media flavonoides	SD
				g/mol		l/cm ² *mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
lippia dulcis (tallo)	extrato 1	R1	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
		R2	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20	0,20	0,00
		R3	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
lippia dulcis (tallo)	extrato 1	R4	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
		R5	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20	0,20	0,00
		R6	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
lippia dulcis (tallo)	extrato 1	R7	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		
		R8	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20	0,20	0,00
		R9	0,016	302,236	10,00	78,66	1,00	0,20		

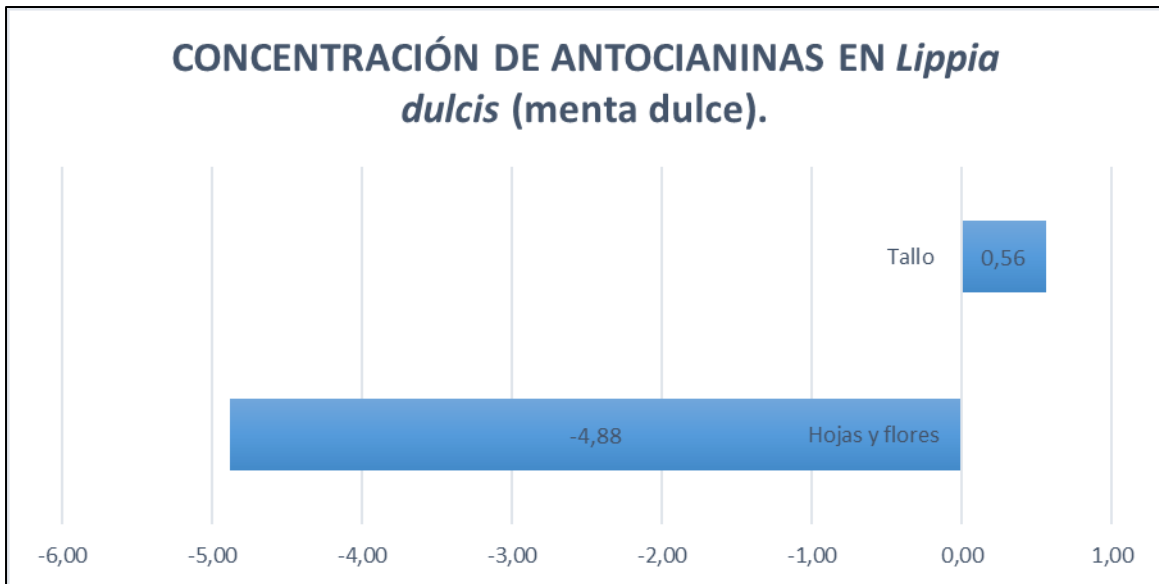
Anexo N° 17. Comparación de fenoles totales de la *Lippia dulcis* (menta dulce).



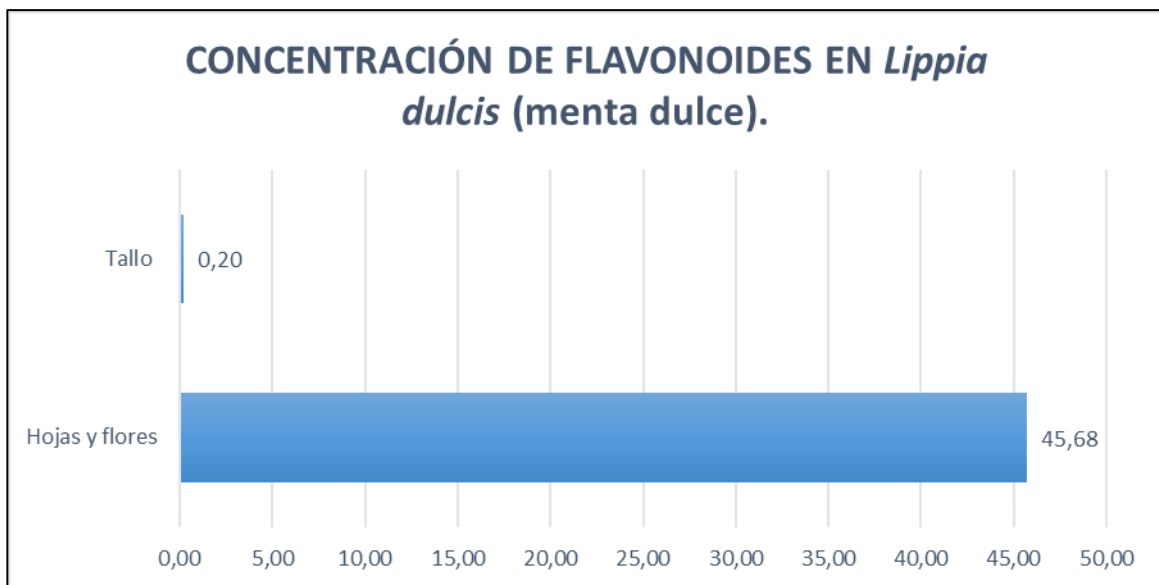
Anexo N° 18. Comparación de taninos de la *Lippia dulcis* (menta dulce).



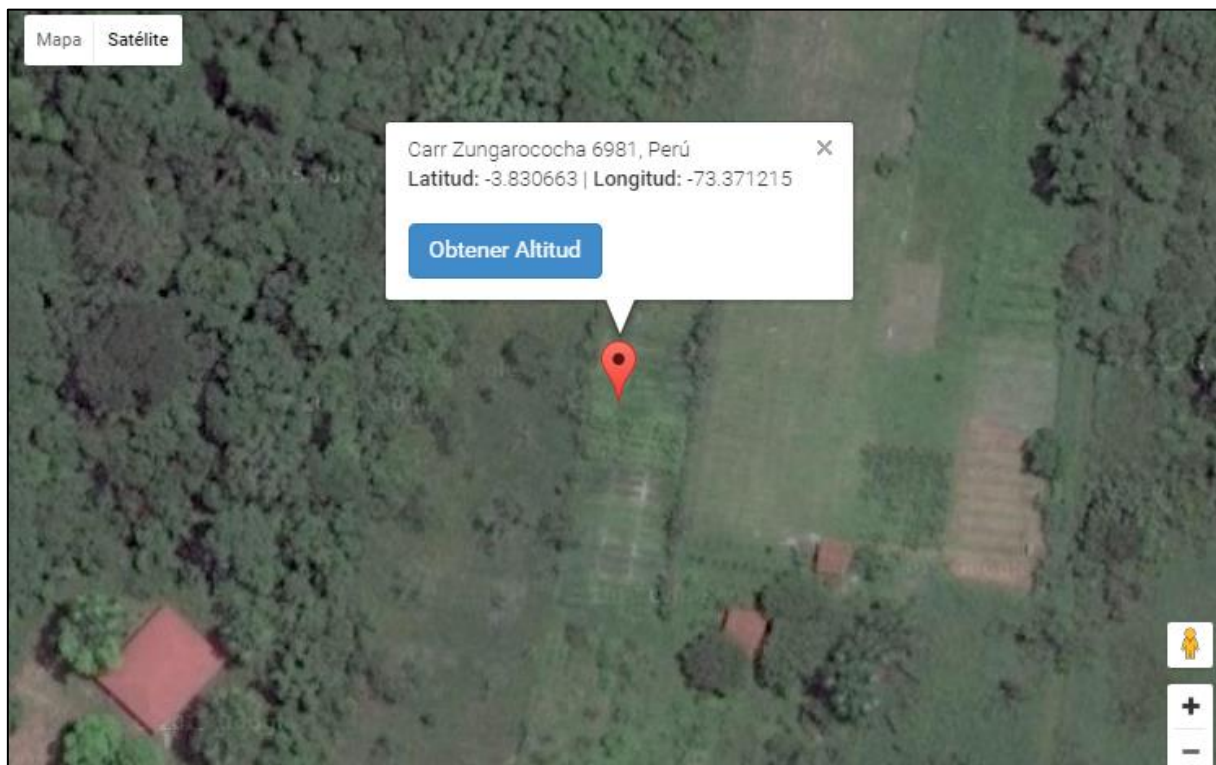
Anexo N° 19. Comparación de antocianinas de la *Lippia dulcis* (menta dulce).



Anexo N° 20. Comparación de flavonoides. de la *Lippia dulcis* (menta dulce).



Anexo N° 21. Imagen satelital de la ubicación geográfica del huerto “PLANTAS MEDICINALES” del cual se obtuvo la materia prima para este estudio.



Anexo N° 22. Determinación de β - caroteno de la *Lippia dulcis* (menta dulce).

β - Caroteno			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,021	1,943	21,8030347
2	0,021	1,942	21,7916908
3	0,021	1,941	21,7803468
4	0,021	1,941	21,7803468
5	0,021	1,94	21,7690029
6	0,02	1,939	21,7690029
7	0,02	1,938	21,757659
8	0,02	1,938	21,757659
PROMEDIO			21,7760928

Anexo N° 23. Determinación de retinol de la *Lippia dulcis* (menta dulce).

Retinol			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,015	1,149	89,3106936
2	0,015	1,149	89,3106936
3	0,015	1,149	89,3106936
4	0,015	1,149	89,3106936
5	0,015	1,149	89,3106936
6	0,015	1,148	89,2319364
7	0,015	1,148	89,2319364
8	0,015	1,148	89,2319364
PROMEDIO			89,2811597

Anexo N° 24. Tamizaje fitoquímico de la *Lippia dulcis* (menta dulce).

MENTA DULCE				
METABOLITOS	ENSAYOS	HOJAS Y FLORES		
		HEXANO	ETANOL	AGUA
ALCALOIDES	Drangerdorff	0	0	0
	Mayer	0	0	0
	Wagner	0	0	0
QUINONAS	Borntrager	0	++	-
CUMARINAS	Baljet	0	0	-
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann-Buch	0	-	-
CAROTENOS	Carr-Prince	-	-	-
ACEITES ES. - GRASAS	Sudan III	+		
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	-	+++	+++
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	-	+++	+++
FLAVONOIDES	Shinoda	-	+++	+++
SAPONINAS	Espuma	-	+++	+
AMINOACIDOS - AMINAS	Ninhidrina	-	++	-
GLICOSIDOS CARDIOT	Kedde	-	0	-
GLICOSIDOS	Molish	-	-	0
MUCILAGOS	Prueba del Tacto	-	-	0
PRINC. AMARGOS ASTRING	Prueba del Gusto	-	-	0