

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS,
MATEMÁTICAS, FARMACIA E INFORMÁTICA
CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA



**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANIDINAS EN LOS FRUTOS
DE LAS ESPECIES VEGETALES *Prunus serotina* (Capuli),
Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl. (Mullak'a), *Monnina salicifolia*
R. & P. (Aceitunilla)”**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Br. FLORMI CARMEN TEVES MEZA.

Br. ROSELINE TORRES APAZA.

ASESORA:

M.Cs. CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ.

CUSCO-PERÚ

2011

TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN - UNSAAC

DEDICATORIAS

*A Dios Nuestro Padre, por iluminar mi camino todos
los días de mi vida.*

*A mi querida madre Lucia, por ser mi ejemplo de vida,
amor, sacrificio y dedicación.*

*A mi querido padre Vicente y a mi querido hermano
José Luis, por ser los ángeles que guían
mis pasos día a día.*

*A mis queridos hermanos: Rebeca y Henry, por su apoyo
incondicional, por los momentos compartidos y por la
confianza depositada en mi.*

A Diego por su amor, entusiasmo y por las vivencias juntos.

A mis queridas amigas Betty y Nancy, por enseñarme a sonreírle a la vida.

FLOREMI CARMEN

A Dios por la excelencia y eternidad de su sabiduría.

*A mis padres Faustino y Toribia a quienes los amo mucho
incondicionalmente.*

*A mis hermanos Mirian, Mónica, Nayda, Diego y Rider a
quienes los amo mucho.*

*A la persona especial de mi vida Giovany a quien lo amo mucho
incondicionalmente siendo una gran bendición para mi vida.*

*A mis amigos verdaderos a quienes los quiero mucho David,
Alex, Felix, Jonatan, Dennis, Wilber, Camilo, Irma, Katy, Rosa,
Carolina...*

*A todos mis Tíos, primos quienes me incentivaron en todo
momento.*

ROSELINE

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por su Sabiduría, Amparo, Protección y Fortaleza en todo momento.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por forjarnos en sus aulas.

Al Instituto de Investigación de la UNSAAC por el apoyo para la realización del trabajo de tesis.

A nuestra asesora M.Cs. Carla del Carpio Jiménez, por ser una guía indispensable, por su atención, confianza, orientaciones de manera incondicional en todo el proceso del trabajo de tesis.

A Jorge y Nancy encargados del laboratorio de control de calidad (HPLC), muchas gracias por el apoyo, motivación, tiempo, conocimientos, paciencia, para ustedes el mayor de los reconocimientos porque la realización de este trabajo se lo debemos a ustedes.

Al Ing. Mario Cumpa por sus consejos y facilitarnos su laboratorio para realizar las pruebas preliminares del trabajo de tesis.

A los laboratorios de Bioquímica, química de la UNSAAC en especial a los profesionales encargados por facilitarnos los materiales necesarios para la ejecución del trabajo de tesis.

A nuestras queridas familias por todo lo dado.

A nuestras queridas amigas y amigos por su compañía y amistad sincera.

Agradecer a todas las personas que nos apoyaron para la realización de este trabajo de investigación, que Dios ponga paz, gozo en sus corazones y bendiga abundantemente en todas las áreas de sus vidas.

INTRODUCCIÓN

Nuestro país cuenta con una gran biodiversidad en flora, especialmente en plantas medicinales; muchas de las cuales no cuentan con estudios que validen sus diferentes efectos farmacológicos, en el área andina de nuestro país se tienen muchos frutos poco conocidos en otras regiones, como son los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham.) Endlicher (Mullak'a) y *Monnina salicifolia* R. & P. (Aceitunilla), los cuales se consumen de manera natural sin ningún tipo de procesamiento industrial, se tienen escasos y en algunos casos ningún estudio respecto a las antocianinas presentes en sus frutos, su actividad antioxidante y la identificación de sus antocianidinas; por lo cual este estudio pretende aportar dicha información.

Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro propio metabolismo, surgen algunas moléculas que nos pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies reactivas de oxígeno (EROs), entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético, estas especies incluyen el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical óxido nítrico ($NO\cdot$), el oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo, ($OH\cdot$). (Venero, 2002)

Numerosos estudios, demuestran una estrecha correlación entre el consumo de frutas y verduras y la menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas, debido a su bajo contenido en colesterol y a la presencia de vitaminas, fibras, antioxidantes naturales y minerales, es por ello que el uso de antioxidantes, es estudiado de forma intensiva; particularmente, en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Se reporta que la capacidad antioxidante de una copa de vino es igual a 7 jugos de naranja ó 20 jugos de manzana. (MURILLO, 2002)

Las antocianinas son derivados glicosilados de las antocianidinas, en este último grupo están incluidos los siguientes compuestos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina. (Moenne-Loquez, 2008)

Las antocianinas son comúnmente encontradas en la capas epidermales de un gran numero de frutas, como las manzanas (*Malus pumila*), ciruelas (*Prunus domestica*) y peras (*Pyrus communis*), las antocianinas también han sido encontradas en la pulpa. Por ejemplo en las cerezas dulces (*P. avium*), la epidermis contiene cantidades significativas de antocianinas, la pulpa podría tener algunas pequeñas concentraciones del mismo compuesto, la concentración de las antocianinas se incrementa rápidamente en frutas a medida que van

madurando, las antocianinas están incluidas en la lista de compuestos naturales conocidos por su mecanismo de poderosos antioxidantes. Hay una fuente importante de colorantes naturales presentes en frutas rojas tales como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas, pasas rojas y negras. Las restricciones en el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha conducido al interés en el uso potencial de antocianinas como un colorante alimenticio en bebidas, jarabes, jugos de frutas, gelatinas, mermeladas, helados, y yogures, también como en pasta dental, productos farmacéuticos, cosméticos y productos similares .
(Astrid, 2008)

RESUMEN

Las antocianinas están presentes en muchos frutos (bayas) y flores, estos son colorantes naturales, pertenecientes al grupo de los flavonoides, a las que se les atribuye actividad antioxidante por su capacidad para neutralizar los efectos de los radicales libres sobre enfermedades crónico-degenerativas.

En la presente investigación se utilizan extractos antociánicos de los frutos de *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) y *Prunus serotina* (Capuli), con el objetivo de evaluar su actividad antioxidante a diferentes concentraciones y caracterizar sus antocianidinas.

Para determinar y comparar la actividad antioxidante *in vitro* se realizaron ensayos que corresponden a un estudio cuasiexperimental, para lo cual se utilizó dos técnicas: la captura de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y el método químico ABTS (Acido 2,2-Azinobis(-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico)), los resultados fueron expresados en porcentaje de captación de radicales libres y IC₅₀. Las antocianidinas fueron identificadas mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Todos los extractos antociánicos presentaron actividad antioxidante sobre ambos radicales, a diferentes concentraciones, de los cuales el extracto antociánico de *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a) presentó mayor actividad antioxidante, con un IC₅₀= 2.2247, 4.077 µg/ml frente a los radicales DPPH y ABTS respectivamente, seguido de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) y el extracto de *Prunus serotina* (Capuli)

De la comparación con el antioxidante patrón, ácido ascórbico (vitamina C), los tres extractos antociánicos resultaron tener menor actividad antioxidante en ambos métodos.

El presente estudio muestra que los extractos antociánicos evaluados poseen buena capacidad antioxidante, destacando *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a) y *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), además se identificó en ellos la presencia de dos antocianidinas (cianidina y delfinidina) de la seis mas comunes. Por lo tanto, además de las características colorantes, los extractos antociánicos poseen potente propiedad antioxidante que podría ser aplicado en el campo de la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, muchos mecanismos antioxidantes podrían explicar el efecto de las antocianinas, como la donación de hidrogeno y quelación de metales.

Palabras claves: ABTS, actividad antioxidante, antocianidina, antocianina, DPPH.

SUMMARY

Many fruits (berries) and flowers have anthocyanins, these are natural colorants belonging to the group of flavonoids, which have antioxidant activity for their ability to neutralize the effects of free radicals against chronic degenerative diseases.

The present investigation, used anthocyanin extracts from the fruits of *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) and *Prunus serotina* (Capuli) in order to determine the antioxidant activity and identified its anthocyanidins.

To determine and compare the antioxidant activity were performed *in vitro* assays that corresponds to a quasi-experimental study for this we used two techniques: the capturing free radicals DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the chemical method ABTS (2,2-Azinobis-(-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic acid)), the results were expressed as percentage of free radical scavenging and IC₅₀. The anthocyanidins were identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

All anthocyanin extracts showed antioxidant activity on both radicals at different concentrations, from this the anthocyanin extracts of *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a) showed higher antioxidant activity with IC₅₀= 2.2247, 4.077 µg/ml for the DPPH and ABTS radicals respectively, followed by *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) and the extract of *Prunus serotina* (Capuli).

In comparison with the standard antioxidant ascorbic acid (vitamin C), the three anthocyanin extracts had lower antioxidant activity in both methods.

The present study shows that anthocyanins extracts evaluated have high antioxidant activity, such as better sings pointing to *Muehlenbleckia volcanica* (Mullak'a) and *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), too was identified the concomitant presence of two anthocyanidins (cyanidin and delphinidin) of the six more common anthocyanidins. Therefore, so besides the coloring characteristics the anthocyanins extracts displayed good antioxidant properties, that could be applied in the field of food, cosmetic and pharmaceutical industry. Several antioxidant mechanisms may explain the effect of anthocyanins, including hydrogen donation and metal chelation.

Key words: ABTS, antioxidant activity, anthocyanidin, anthocianyn, DPPH.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

SUMMARY

CAPÍTULO I GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema.	2
1.2 Formulación del problema.	3
1.3 Objetivos.	3
1.3.1 Objetivos generales.	3
1.3.2 Objetivos específicos.	3
1.4 Justificación del estudio.	4
1.5 Hipótesis.	5

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 Visión histórica.	7
2.2 Antecedentes.	7
2.2.1 Antecedentes Etnobotánicos.	7
2.2.2 Antecedentes Fitoquímicos.	9
2.2.3 Antecedentes Farmacológicos.	9
2.3 Bases Teórico-Científicas.	12
2.3.1 Descripción de <i>Prunus serotina</i> (Capuli).	12
A.- Nombre común.	12
B.- Nombre científico	12
C.- Clasificación taxonómica.	12
D.- Características botánicas.	12
E.- Hábitat y distribución.	13
F.- Propiedades.	13
G.- Usos tradicionales.	13

H.- Composición química.	13
2.3.2 Descripción de <i>Muehlenbeckia volcanica</i> Endl. (Mullak'a)	13
A.- Nombre común.	13
B.- Nombre científico	14
C.- Clasificación taxonómica.	14
D.- Características botánicas.	14
E.- Hábitat y distribución.	14
F.- Propiedades.	15
G.- Usos tradicionales.	15
H.- Composición química	15
2.3.3 Descripción de <i>Monnina salicifolia</i> R. & P. (Aceitunilla)	15
A.- Nombre común.	15
B.- Nombre científico	15
C.- Clasificación taxonómica.	16
D.- Características botánicas.	16
E.- Hábitat y distribución.	16
F.- Propiedades.	16
G.- Usos tradicionales.	16
2.3.4 Radicales libres.	17
A.- Efecto nocivo de los radicales libres	22
a) Lípidos.	22
b) Proteínas	24
c) Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	25
d) Carbohidratos	26
2.3.5 Daño o estrés oxidativo.	26
2.3.6 Defensa antioxidante.	27
A.- Secuestro de iones metálicos	29
B.- Antioxidantes enzimáticos	30
a. Superóxido dismutasa (SOD)	30
b. Catalasa (CAT)	31
c. Glutathion peroxidasa (GSH-Px)	32
C.- Antioxidantes no enzimáticos	33
a) Antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos	34
I. Vitamina C	34
II. Glutathión	36

III. Ácido úrico	36
IV. Compuestos fenólicos	36
V. Flavonoides	37
Estructura química	37
Función antioxidante	38
b) Antioxidantes no enzimáticos lipofílicos	39
I. Vitamina E	40
II. Vitamina A	40
III. Ubiquinona	40
2.3.7 Alimentos ricos en antioxidantes	41
2.3.8 Antocianinas	41
A. Actividad biológica de las antocianinas.	44
B. Las antocianinas como colorantes naturales	47
C. Biosíntesis de las antocianinas	48
D. Transporte y acumulación en vacuolas	50
2.3.9 Vitamina C.	51
A.- Estructura química.	51
B.- Absorción y metabolismo.	52
C Propiedades y funciones fisiológicas de la vitamina C.	53
D Fuentes alimentarias.	54
GLOSARIO DE TÉRMINOS	55
ABREVIATURAS	56

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico	58
3.1.1 Muestra vegetal	58
3.2 Materiales y reactivos de laboratorio	58
3.2.1 Materiales de campo	58
3.2.2 Materiales de laboratorio	58
3.2.3 Equipos de laboratorio	59
3.2.4 Reactivos	59
3.2.5 Otros materiales	60
3.3 Metodología	61
3.3.1 Tipo de estudio	61

3.3.2 Diseño de la investigación	61
3.4 Definición y operacionalización de las variables implicadas	62
3.4.1 Variables implicadas	62
3.5 Variables no implicadas	66
3.6 Criterios de inclusión y exclusión	66
3.7 Procedimiento	67
3.7.1 Recolección de los frutos de las tres especies vegetales	68
3.7.2 Determinación de la longitud y peso de los frutos frescos.	68
3.7.3 Determinación del pH.	68
3.7.4 Determinación del tipo de pigmento	68
3.7.5 Características de solubilidad del pigmento	69
3.7.6 Estudios preliminares de frutos frescos	69
3.7.6.1 Determinación del contenido de humedad	70
3.7.6.2 Determinación de cenizas totales	70
3.7.6.3 Determinación de proteínas	70
3.7.6.4 Determinación de fibra	71
3.7.6.5 Determinación de grasa	71
3.7.6.6 Determinación de acidez	71
3.7.6.7 Determinación de carbohidratos	72
3.8 Protocolo experimental	72
3.8.1 Extracción de antocianinas	72
3.8.2 Cuantificación de antocianinas	74
3.8.3 Actividad antioxidante	76
3.8.3.1 Por el método DPPH	76
3.8.3.2 Por el método ABTS	80
3.8.4 Caracterización de las antocianidinas por el HPLC	85

CAPITULO IV

RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

De la longitud y peso de los frutos	90
De la determinación del pH	92
Estudios preliminares	92
De la determinación del tipo de pigmento	94
Del porcentaje de extracción	95
De las características de solubilidad del pigmento	96

Determinación del contenido total de antocianinas	97
Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH y ABTS	100
Caracterización de antocianidinas por HPLC	114
CONCLUSIONES	120
SUGERENCIAS	122
BIBLIOGRAFIA	123
ANEXOS	129

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se ha visto el aumento de enfermedades cardiovasculares, así se tiene en nuestro país que la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares se encuentra entre las primeras con 18.2%, por tumores malignos ha adquirido un notable incremento al convertirse en la segunda causa de muerte en el país, llegando a representar el 17.2 % del total de defunciones registradas. (Minsa, 2002)

El aumento de enfermedades inmunológicas, nerviosas y cardiovasculares están íntimamente relacionadas con la actividad tóxica de los radicales libres, nuestro cuerpo neutraliza sus efectos dañinos con la producción de antioxidantes endógenos pero además necesitamos cantidades extra provenientes de fuentes exógenas como los alimentos. Al igual que otros flavonoides las antocianinas exhiben una capacidad antiinflamatoria, antitumoral y una fuerte potencia antioxidante. (Drueke, 2002; Ferreira, 2004)

Existe una preocupación creciente por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en los alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos; ha sido investigado por Hallagan, 1991, y Lauro, 1991, quienes reportaron que los colorantes rojo N° 40 y N° 2 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia. Al mismo tiempo dichos hallazgos se relacionan con modificaciones en la hiperactividad de niños de edad escolar lo cual puede considerarse un mal neuronal agudo (Breakey et al., 2002, McCann et al., 2007). (Astrid, 2008)

Tales antecedentes son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales como las antocianinas. (Astrid, 2008)

Los estudios demuestran que los problemas causados por la actividad de los radicales libres van en aumento pudiendo ser evitados mediante la implementación de diversas terapias, entre ellas la más importante la terapia antioxidante, siendo varias de estas terapias antioxidantes difíciles de ser costeadas por una población bastante amplia alrededor del mundo. (Murillo, 2002)

Por tal motivo nos vemos en la necesidad de recurrir a terapias antioxidantes de fuentes propias de nuestro ambiente, de fácil acceso para la población, pudiendo ser una alternativa natural los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli),

Muehlenbeckia volcanica (Bentham.) Endlicher (Mullak'a) y *Monnina salicifolia* R. & P. (Aceitunilla). La información disponible en nuestro medio, respecto a la actividad antioxidante de extractos antocianicos, así también la caracterización de sus antocianinas presentes en dichos frutos, es escasa y en algunos casos no se tiene, por todo ello, se considera importante realizar este estudio comparativo en dichas especies vegetales.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles serán las antocianinas de los extractos antocianicos de los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* Endl. (Mullak'a), *Monnina salicifolia* R. & P. (Aceitunilla), estos extractos presentarán actividad antioxidante *in vitro* y cual mostrará mayor actividad?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar y comparar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos antocianicos y caracterizar las antocianinas en los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* Endl. (Mullak'a), *Monnina salicifolia* R. & P. (Aceitunilla).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Realizar los estudios preliminares en los frutos de las especies vegetales en estudio como son: humedad, proteína, grasa, ceniza, fibra, carbohidratos y porcentaje de extracción.
- 2) Determinar el contenido total de antocianinas presentes en los frutos de las especies vegetales en estudio por el método del pH diferencial.
- 3) Determinar el grado de solubilidad de los extractos antocianicos obtenidos, en solventes de diferente polaridad.
- 4) Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante sobre el radical libre DPPH, de los extractos antocianicos de los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) y *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).
- 5) Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante por el método químico ABTS, de los extractos antocianicos de los frutos de las especies vegetales *Prunus*

serotina (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) y *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).

- 6) Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante por el método químico ABTS y sobre el radical libre DPPH, de los extractos antociánicos de los frutos de las especies vegetales en estudio frente a un patrón antioxidante; el ácido ascórbico.
- 7) Caracterizar las antocianidinas presentes en los frutos de las especies vegetales en estudio por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Existen muchas evidencias de que la enfermedad cardiovascular y el cáncer causantes de los mayores índices de mortalidad pueden ser prevenidas o disminuidas con algunos cambios en la dieta, como, por ejemplo, con la reducción de la ingesta de grasa y el aumento del consumo de alimentos ricos en antioxidantes tales como las frutas, cereales y verduras. Ya que los antioxidantes endógenos no son totalmente eficientes, es razonable pensar en la importancia de las suplementaciones de la dieta con este tipo de sustancias para disminuir los efectos acumulados del daño oxidativo a lo largo de la vida.

El escaso aporte diario requerido para estos compuestos puede ser causante de serias enfermedades relacionadas con la falta de protección antioxidante que ejercen estos compuestos en muchas patologías.

Las tasas de enfermedades producto de la sobreproducción de los radicales libres van en aumento, esto es favorecido por los actuales modelos de vida influenciados por diversos factores entre los cuales los más resaltantes se tienen el humo del cigarrillo, la contaminación ambiental y especialmente el estrés. (ARLT, 2004)

Los estudios demuestran que los problemas causados por la actividad de los ROS pueden ser evitados mediante la implementación de diversas terapias, entre ellas la más importante la terapia antioxidante, siendo varias de estas terapias antioxidantes difíciles de ser costeadas por una población bastante amplia alrededor del mundo. (MURILLO, 2002)

Por tal motivo nos vemos en la necesidad de recurrir a terapias antioxidantes de fuentes propias de nuestro ambiente, de fácil acceso sobre todo económico para la población.

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al

torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabético; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. La población al verse afectada se ve en la necesidad de recurrir al uso de sustancias antioxidantes especialmente de origen natural que contrarresten el efecto dañino de los radicales libres y poder asegurar de esta manera una adecuada calidad de vida. Siendo las antocianinas una alternativa ya que constituyen una importante fuente de estos compuestos con actividad antioxidante, los cuales pueden ser utilizados con diferentes propósitos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

En nuestra zona existen diferentes frutos comestibles con características tintóreas y probable contenido antociánico, poco conocidos por tanto no estudiados y validados científicamente.

La presente investigación pretende encontrar nuevas fuentes de antioxidantes naturales que sean accesibles para la población y de fácil consumo (frutos), así también brindar una alternativa para reemplazar los colorantes artificiales dañinos para la salud por colorantes naturales como las antocianinas, con ello contribuir a la prevención y ocurrencias de patologías relacionadas con la actividad de los radicales libres, por todo ello es necesario evaluar y comparar la actividad antioxidante de los extractos antociánicos de los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* "Capuli", *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham.) Endlicher "Mullak'a" y *Monnina salicifolia* R. & P. "Aceitunilla" y determinar cuales son las antocianinas presentes en su composición. Con todo ello aportar al conocimiento fitoquímico y farmacológico de dichas especies vegetales.

1.5 HIPÓTESIS

- ❖ Los extractos antociánicos de los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* Endl. (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) presentan actividad antioxidante *in vitro*, uno de ellos muestra mayor actividad, sus antocianinas pertenecen al grupo de las seis más comunes (cianidina, delfinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina).

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 VISIÓN HISTÓRICA

Del Perú antiguo se tiene los textiles de Paracas, que a juzgar por los efectos conseguidos en sus telas, cerca de 190 tonos, la riqueza de los materiales colorantes debe haber sido muy grande y variada. Así se dice que los tonos azules se daban con las flores de la *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), esta es una planta cuyo nombre es de origen aymara, ya que se desarrollo en zonas donde se asentaron grandes culturas como Wari, Tiahuanaco e Inca, su denominación "volcánica" obedece al hecho de crecer entre rocas eruptivas. (Lock, 1997)

El *Prunus serotina* (Capuli) es de origen mexicano, introducida de México en el siglo XV, naturalizada en el Perú en los departamentos de Huánuco, Junín y en el Cusco se inicia en la provincia de Urubamba (Yucay). (Herrera, 1941)

Según G. Alcócer la voz capulí deriva de capulín, voz azteca que significa cerezo. (Soukup, 1970)

Monnina salicifolia (Aceitunilla), es una especie endémica del Perú, siendo utilizado el tinte azul-verdoso de sus frutos maduros para el teñido de fibras, se sigue el mismo proceso que con el teñido de hierba santa, pero el color se desvanece con la luz. (Brack, 1999)

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS

BRACK EGG Antonio, Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú, Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas", Cusco, 1999.

Refiere que los frutos maduros de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) sirven como alimento y el tinte azul-verdoso obtenido de ellos sirve para tratar la caspa y para hacer crecer el pelo.

MANTILLA HOLGUIN, Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra. 1ra Edición., 2002

Refiere que la *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) es usado para curar las aftas, la fiebre, el dolor de dientes para lo cual se mastican las hojas, diarrea donde se toma el jugo

obtenido a partir de las hojas, inflamaciones internas para lo cual las ramas son reposadas y se toman en mate, enfermedades de los riñones y del hígado para lo cual se toma el cocimiento de las raíces.

MONTALVO MALDONADO, D. La Medicina Tradicional en el Perú, 1988

Indica que la infusión de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) es usada para el tratamiento de enfermedades bronquiales como bronquitis, asma, dolor de garganta, inflamaciones intestinales, sinusitis, tos. El jugo de los frutos maduros de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) parecen hacer masajes suaves en las aftas, las hojas frescas se mastican para fortificar la dentadura.

ROERSCH, C. Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo I y II Koeltz Scientific Books. Centro de Medicina Andina. 1ra Edición. (1994)

Reporta usos de la *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) en enfermedades como el reumatismo, inflamación de la garganta, amigdalitis, aftas, colerina, nauseas, enfermedades del hígado, fiebre, inflamación del ojo, enfermedades del riñón.

MANTILLA HOLGUIN, Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra-Perú. 2da Edición., 2004

Refiere que el *Prunus serotina* (Capuli) es usado para tratar el insomnio, diarrea, fiebre, es cardiorregulador, antirreumático y digestivo. También es utilizado en forma tópica como desinfectante para tratar las llagas.

MOSCOSO CASTILLA. Mariano. Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad. Editorial Alpha Cusco, 4ta Edición, 1997

Refiere que las hojas de *Prunus serotina* (Capuli) se emplean como medicina casera en infusión para los cardíacos, la tos, insomnio, diarrea y fiebre, el fruto es estomacal y cura los males del corazón.

El carbón de la madera de *Prunus serotina* (Capuli) es muy desinfectante, el polvo bien cernido se pone en las heridas.

El mismo autor con respecto a la *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) refiere que es una planta muy astringente, mascando sus hojas se afirma la dentadura, la infusión de sus ramas u hojitas cura las siguientes enfermedades: la retención de orina, las disenterías, diarreas y toda inflamación intestinal. El cocimiento de la planta cura la diabetes.

2.2.2 ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

BASHIR A., HAMBURGER M., P. GUPTA., N. SOLIS, HOSTETTMANN K.,
Flavonol glycosides from *Monnina sylvatica*, Phytochemistry 1991; 30(11): 3781-3784

En esta investigación se identificó un nuevo kaenferol triglicósido y tres kaenferol glicósidos conocidos, estos fueron aislados de las partes aéreas de *Monnina sylvatica*, utilizando para ello hidrólisis ácida, enzimática y técnicas espectrofotométricas, D-glucosil-(1→2)-O-[α-L-ramnosil (1→6)]- β-D-galactosido.

AGAPITO F, SUNG I .Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales. Perú: Editorial Isabel, 2005

Refiere que la *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) contiene: taninos, emodina, glicósidos antraquinónicos, saponinas, rutina, ceras, almidones, mucílagos, gomas, pectinas, flavonoides prenilados, fenoles y celulosa.

OLSZEWSKA MONIKA. Flavonoids From *Prunus Serotina* Ehrh. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, Vol. 62 N°. 2pp. 127-133, 2005, Polish Pharmaceutical Society ISSN 0001-6837

En este estudio se reporta el aislamiento de siete flavonoles a partir de las hojas de *Prunus serotina* (Capuli), mediante espectroscopía UV y RMN, obteniéndose: hyperoside, avicularin, reynoutrin, 3-O-(6''-O-α-L-rhamnopyranosyl)-B-D-glucopyranoside, 3-O-(2''-O-α-L-rhamnopyranosyl)-B-D-glucopyranoside, 3-O-(2''-O-α-L-rhamnopyranosyl)-B-D-galactopyranoside isorhamnetin 3-O-(6''-O-α-L-rhamnopyranosyl)-B-D-glucopyranoside.

ROERSCH, C. Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo I y II Koeltz Scientific Books. Centro de Medicina Andina. 1ra Edición. (1994).

Refiere que las hojas de *Prunus serotina* (Capuli) contienen: laurocerasina, prunosa, glucosidos cianogénicos entre ellos están la amigdalina y la prulauracina.

2.2.3 ANTECEDENTES FARMACOLOGICOS

BASHIR A., HAMBURGER M., P. GUPTA., N. SOLIS, HOSTETTMANN K.,
Biphenils and a Xanthone from *Monnina sylvatica*, Phytochemistry 1992; 31(9): 3203-3205

En esta investigación se aislaron de las raíces de *Monnina sylvatica* dos estructuras nuevas de difenil, 3'-hidroxi-4',5'-dimetoxi-3,4-metilendioxidifenil y 3',4',5'-trimetoxi-3,4-

metilendioxidifenil y una xantona conocida, utilizando para ello técnicas espectrofotométricas. Se encontró que el difenil 3'-hidroxi-4',5-dimetoxi-3,4-metilendioxidifenil mostró actividad antifúngica frente a *Cladosporium cucumerinum* en un ensayo de bioautobiografía sobre cromatografía en capa delgada, y una actividad débil contra *Candida albicans* y *Trichopyton mentagrophytes* en un ensayo de dilución.

GARCÍA ESPINOZA María Cecilia, Evaluation of the Cytotoxic and Cytostatic Activities of Medicinal Plants Used by Peruvian Healers Against Cancer-Related Symptoms, Florida International University, 2000

En este estudio se evaluó las actividades citotóxica y citostática de doce plantas medicinales usadas en el Callejón de Huaylas-Ancash. Para este estudio se utilizaron preparaciones tradicionales, extractos acuosos y extractos orgánicos (metanol: cloruro de dimetilo) de las plantas, los cuales fueron probados contra la línea celular de leucemia murina P388 mediante técnicas de Citometría de Flujo. Encontrando que mas del 75% de las preparaciones tradicionales y extractos acuosos muestran actividad citostática a concentraciones de 1mg/ml. Para los extractos orgánicos la actividad citostática osciló entre 8.3% (a 6.5µg/ml) y 58.3%(a 100µg/ml). Entre los extractos particularmente interesantes se tiene el de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) porque presentó actividad citostática mas no citotóxica a concentraciones de 0.5mg/ml.

BARRÍA OJEDA C., “Efecto Antihipertensivo del Extracto de Raíz de *Muehlenbeckia hastulata* (Voqui Negro o Quilo), en Ratas Hipertensas Renovasculares” Universidad Austral de Chile, 2003

Se evaluó el efecto antihipertensivo del extracto acuoso liofilizado de raíz sin K⁺ de *Muelhenbeckia hastulata*, sobre la presión arterial sistólica (PAS) en ratas hipertensas renovasculares inducidas por el método Goldblatt 2 riñones una pinza.

Se utilizaron 30 ratas machos cepa Sprague Dawley, distribuidos al azar en 3 series experimentales de 10 ratas cada una. Serie 1: control (normotensa), Serie 2: control (NaCl 0,9%), Serie 3: tratadas (extracto de *Muehlenbeckia hastulata*) en dosis de 100mg/kg. Las soluciones se administraron, por vía oral a través de una sonda bucoesofágica, por 5 días y en volumen de 0,5 ml/100 g de peso. La medición de PAS se realizó mediante un procedimiento no invasivo, en la cola de la rata, utilizando un esfignomanómetro, un manguito inflable y un equipo de ultrasonido Doppler. La PAS fue evaluada en cuatro períodos: 1) Período de inducción (1 vez por semana), 2) Período de verificación de

establecimiento de hipertensión arterial (diaria, obteniendo un promedio), 3) Período de valoración del efecto antihipertensivo (día por medio) y 4) Período post-tratamiento (diario). La PAS se midió en el período 1 en las 3 series y en los demás períodos en las series 2 y 3.

Al analizar los datos obtenidos, se observó que la serie tratada, con el extracto acuoso liofilizado de raíz sin K⁺ de *Muehlenbeckia hastulata*, presenta una baja progresiva y estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) de la PAS en las tres mediciones realizadas en el período 3, con respecto a su control. Durante el período post-tratamiento, la PAS disminuyó el primer día aumentando en forma paulatina los dos días restantes de este período, superando levemente los 150 mm Hg, definidos como hipertensión.

Se concluye, que la administración del extracto acuoso liofilizado de raíz sin K⁺ de *Muehlenbeckia hastulata*, en dosis de 100mg/kg, disminuyó significativamente la PAS de ratas hipertensas renovasculares y mantiene su efecto antihipertensivo durante todo el período post-tratamiento.

IBARRA C., ROJAS A., LUNA F., ROJAS J., RIVERO B., RIVERO F. Vasorelaxan Constituents of the Leaves of *Prunus Serotina* "Capulin", Rev. Latinoamer. Quím. 37/2, 2009

En los resultados de esta investigación reportan que la fracción de acetato de etilo obtenida a partir del extracto metanólico de las hojas de *Prunus serotina* (Capuli) indujo una relajación significativa del músculo liso arterial. El estudio fitoquímico de dicha fracción condujo a la purificación de tres compuestos conocidos, el hiperósido, la prunina y el ácido ursólico, los cuales indujeron una relajación, dependiente de la concentración, de la aorta aislada de rata. El compuesto (1) resultó ser sólo 10 veces menos potente que la acetilcolina la cual se empleó como control positivo Sin embargo, este flavonoide fue más eficaz que la ACh para inducir vasodilatación. De manera adicional, el aceite esencial de las hojas produjo relajación del músculo liso arterial. El análisis, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, mostró que la esencia contiene cincuenta y siete constituyentes. La evaluación farmacológica de cuatro de estos componentes, el alcohol bencílico (4), el benzaldehído (5), alcohol cinámico (6) y el cinamaldehído (7), indicó que estos compuestos inducen una relajación, dependiente de la concentración, de la aorta aislada de rata. El compuesto (6) produjo el efecto vasodilatador más potente.

2.3 BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS

2.3.1 DESCRIPCIÓN DE *Prunus serotina* (CAPULI).

A. **NOMBRE COMÚN:** “Murmuntu”, “Cereza”, “Cerezo”, “Capuli”, “Chhaucha Capuli”. “Guindo”. (Pretell, 1985; Soukup, 1970).

B. **NOMBRE CIENTÍFICO:** *Prunus serotina*.

C. **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:** (Propuesta por Arthur Cronquist, Herbario Vargas, Anexo N° 3).

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Género:	<i>Prunus</i>
Especie:	<i>Prunus serotina</i> subsp <i>capuli</i> (Canavilles) McVaugh.

D. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS. (Pretell, 1985)

Árbol: De fuste erguido y generalmente corto, copa extendida irregular, árbol de buen tamaño que alcanza de 6-8m de alto, tronco con corteza lisa colorada; la ramificación empieza a los 3 metros. Cuando joven la corteza es lisa con pequeñas lenticelas.

Hojas: Las hojas de son simples, pecioladas, alternas; de 8-10cm de longitud por 2.5-3cm de ancho. El ápice es agudo a menudo atenuado, el borde finamente dentado.

Fruto: Los frutos son de aproximadamente 1-1.5cm de diámetro, son drupas de mesocarpo carnoso. La pulpa es verdosa, dulce y jugosa; sus frutos varían de color rojo oscuro a negro. Por lo general maduran entre diciembre y marzo. La planta fructifica temprano, por ejemplo en Cajamarca, a los 3-4 años de edad.

Semilla: Tiene una sola semilla por fruto, redonda y de aproximadamente la mitad de aquel. Están protegidas por un hueso impermeable al agua.

Inflorescencias: En racimos terminales de 15 o más cm de longitud, gráciles.

Flores: Aproximadamente 1cm de longitud incluyendo el pedúnculo, este de unos 4mm de longitud; cáliz hemiesférico, corola con 5 pétalos libres, blanquecinos; estambres numerosos. Pistilo con ovario súpero y globoso.

E. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Es una especie originaria de Centro América, actualmente se encuentra en Sudamérica propagada en toda la zona andina y extensamente en el Perú, de Cajamarca a Arequipa y Puno, entre 2000m-3500m.s.n.m. (Agapito 2005; Reynel, 1990)

Es una especie bastante rústica y heliofila, durante los primeros años necesita sombra moderada, así como también protección contra las heladas. Aunque mayormente se le encuentra a lo largo de cercos y canales de chacras, también crece en terrenos bastante pobres, rocosos y secos, no prospera en suelos arcillosos. (Pretell, 1985)

Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. (Mantilla, 2004)

F. PROPIEDADES

La decocción de las hojas secas es usada como cardiorregulador y para el tratamiento de infecciones cutáneas. La decocción de la corteza es usada como antirreumático y para tratar heridas y golpes. (Agapito, 2005)

G. USOS TRADICIONALES

La bebida del cocimiento de sus hojas es diurética y expectorante. Se usa para tratar el insomnio, diarrea, fiebre, cardiorregulador, antirreumático digestivo, en uso tópico: nervios laxados, llagas, desinfectante (Mantilla, 2004; Bartholomaus, 1990)

H. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Contiene: glucosidos cianogénicos entre ellos están la amigdalina y la prulauracina, también en su composición tiene nitrilos, capulin, prumasina y flavonoles (Agapito, 2005)

2.3.2 DESCRIPCIÓN DE *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham.) Endlicher. (MULLAK'A)

A. NOMBRE COMÚN: “Bejuquillo”, “Mullak'a”, “Mullaca”, “Laura”, “Coca-Coca”. (Agapito, 2005)

B. NOMBRE CIENTÍFICO: *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham.) Endlicher.

C. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA: (Propuesta por Arthur Cronquist, Herbario Vargas, Anexo N° 1)

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Caryophyllidae
Orden:	Polygonales
Familia:	Polygonaceae
Género:	Muehlenbeckia
Especie:	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham.) Endlicher.

D. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS:

Muehlenbeckia volcanica (Bentham.) Endlicher (Mullak'a), es una hierba anual, que alcanza a medir 20cm de altura; esta especie es rápidamente reconocida por poseer las hojas pequeñas, uniformemente alternas enteras, simples. Las flores son pequeñas dispuestas en racimo con pétalos polimórficos pentaméricos. Los frutos en aquenio aplanado de color negruzco azulado. (Brako, 1993).

E. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Es un arbusto silvestre que crece en áreas distribuidas en terrenos secos, rocosos, arcillosos, laderas abiertas, pajonales abiertos. (Brako, 1993).

Crece en la Sierra entre 2400-4200 m.s.n.m. (Agapito, 2005)

Se tiene como 9 especies del género *Muehlenbeckia* en el Perú, la variedad *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham.) Endlicher (Mullak'a) está presente en los departamentos de Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, Lima, La Libertad y Puno. (Brako, 1993)

Además esta especie vegetal está diseminada en países como Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Bolivia y Ecuador. (Pavlow, 1980; Roersch, 1994)

F. PROPIEDADES

Antiasmático, tónico capilar, afrodisíaco, hemostático (post parto), la raíz tiene propiedades laxantes, la parte aérea de la planta tiene propiedades antiinflamatorias, también es usado como estimulante hepático. (Agapito, 2005)

G. USOS TRADICIONALES

La *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) es usado para curar las aftas donde las raíces son hervidas y se toma el mate cada cuatro horas, la fiebre para lo cual las raíces se hacen hervir para bañarse, el dolor de dientes para lo cual se mastican las hojas, diarrea donde se toma el jugo obtenido a partir de las hojas, inflamaciones internas para lo cual las ramas son reposadas y se toman en mate tres veces al día, enfermedades de los riñones para lo cual se hace hervir la raíz y se toma como refresco, enfermedades del hígado se hace hervir la raíz y se reposan las hojas, tomar el mate como refresco, tos de calor, las raíces son hervidas y se toma el mate como refresco. (Mantilla, 2004)

Mascando las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) se afirma la dentadura, la infusión de sus ramas u hojitas cura las siguientes enfermedades: la retención de orina, las disenterías, diarreas y toda inflamación intestinal. El cocimiento de la planta cura la diabetes. (Moscoso, 1997)

H. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Contiene: Taninos, saponinas, rutina, emodina, ácido crisofánico glicósidos antraquinónicos, ceras, reínas, lectinas, gomas, almidones, celulosa, flavonoides prenilados y fenoles. (Agapito, 2005; Lock, 2004)

2.3.3 DESCRIPCIÓN DE *Monnina salicifolia* R. & P. (Aceitunilla)

A. NOMBRE COMÚN: “Anca usa”, “Condorpa usa”, “Hacchiquis”, “Muchi”, “Muchuisa”, “Muchuy”, “Muchuysa”, “Pahuata-huinao”, “Sambo-ckorota”, “Tuta huiña”, “Urpay jacha”, “Pichucha”, “Guaquito”, “Totahuiña”. (Brack, 1999; Urrunaga, 1998).

B. NOMBRE CIENTÍFICO: *Monnina salicifolia* R. & P.

C. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA: (Propuesta por Arthur Cronquist, Herbario Vargas, Anexo N° 2)

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Polygalales
Familia:	Polygalaceae
Género:	Monnina
Especie:	<i>Monnina salicifolia</i> R. & P.

D. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS:

Arbusto silvestre que llega a medir hasta 2.5m de alto, posee hojas alternas, pecioladas, elípticas, glabras, obtusas y agudas. Sus flores son en racimos terminales de color morado con cinco pétalos. El fruto es en drupa elipsoidal. (Brack, 1999)

E. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Es un arbusto silvestre que crece en la Sierra entre 1500 y 4000m.s.n.m. (Brack, 1999).

Esta distribuido en las zonas de: Amazonas, Ancash, Apurimac, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Calca, Huánuco, Huancavelica, Junín, La Libertad, Puno y Urubamba. (Urrunaga, 1998).

F. PROPIEDADES

Es utilizado para el tratamiento de enfermedades de vías respiratorias. (Urrunaga, 1998).

G. USOS TRADICIONALES

El tinte azul verdoso de los frutos es usado para teñidos, pero el color se destiñe con la luz. Los frutos maduros sirven como alimento, el tinte de los frutos sirve para tratar la caspa y para hacer crecer el pelo. (Brack, 1999).

2.3.4 RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) son especies químicas (moléculas o átomos) que poseen al menos un electrón desapareado en su orbital externo, no compartido en capacidad de aparearse, lo cual les hace altamente inestables, es decir son de vida corta, y reactivas. Para estabilizarse reaccionaran rápidamente intentando captar un electrón de las moléculas adyacentes estables mediante reacciones de oxido-reducción, cuando la molécula que ha sido atacada ha perdido un electrón se convierte en un radical libre, generándose así una reacción en cadena en la cual se forman mas radicales libres o se forman otras sustancias tóxicas con potenciales reacciones en cadena destructoras de nuestras células. (Romero, 2006; Del Rosario, 2007; U.N.M.S.M., 2006)

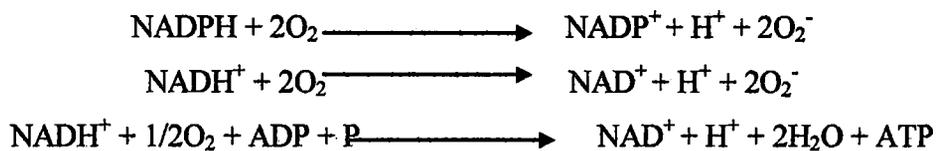
Aunque los radicales libres son de vida muy corta (del orden de una milésima de segundo), son tremendamente reactivos; por ejemplo un radical libre puede dañar un millón de moléculas mediante este proceso de auto-perpetuación (Zamora, 2007; Del Rosario, 2007)

Los radicales libres se pueden formar en el interior o exterior de las células, o incluso diseminadas por todo el organismo, como producto de sus actividades fisiológicas normales, a partir de procesos como la hipoxia, de fuentes exógenas como radiaciones, fármacos, contaminantes ambientales y de la dieta, entre otros (Del Rosario, 2007).

En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Las fuentes principales son las enzimas asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la citocromo P-450. (Céspedes y Sánchez, 2000)

Las mitocondrias son la fuente principal de radicales libres, son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular. En los sistemas biológicos los RL proceden principalmente del metabolismo del oxígeno. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. (Del Rosario, 2007)

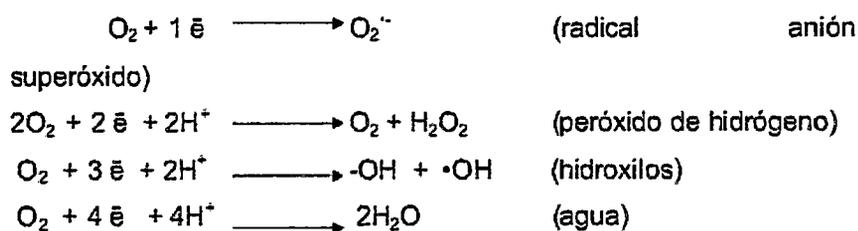
Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP. Otras fuentes de RL son los peroxisomas, organelos del citosol, muy ricos en oxidasas, generan H_2O_2 el cual es depurado por enzimas específicas como la catalasa, y es transformado en agua. (Del Rosario, 2007)



La reducción del oxígeno da lugar a tres formas incompletas reducidas del oxígeno entre este y el agua, el radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de oxígeno (H_2O_2), que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). El O_2 necesita del H_2O_2 para producir la especie oxidante ($\cdot\text{OH}$), mientras que el H_2O_2 no necesita al O_2 para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia del H_2O_2 a concentraciones superiores del O_2 , convierte al peróxido de hidrógeno en una especie muy reactiva capaz de generar daño oxidativo aunque no sea un radical libre. Se ha demostrado la generación de O_2 y H_2O_2 por parte de enzimas y mediante la autooxidación de moléculas biológicas en casi todas las fracciones celulares incluyendo la citosólica, mitocondrial, peroxisómica, microsómica, membrana plasmática y nuclear. (Del Rosario, 2007)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) pueden tener en nuestro organismo un origen endógeno relacionado con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico; también pueden provenir de fuentes externas: tabaco, contaminación del aire, radiación ultravioleta y de alta energía, ozono y ciertos medicamentos. (Del Rosario, 2007)

Metabolismo del oxígeno



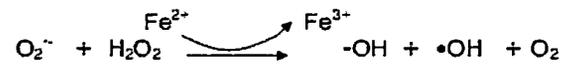
Fuente: Guyton, 2001

Generación de radical hidroxilo

Reacción de Fenton

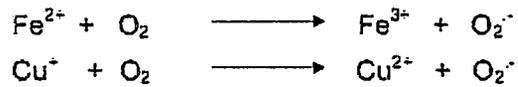


Reacción de Haber-Weiss



Fuente: Guyton, 2001

Generación de radical superóxido



Fuente: Guyton, 2001

CUADRO 2.1

Las principales especies reactivas de oxígeno en el organismo.

ERO	PARTICULARIDAD EN EL ORGANISMO
Anión superóxido (O_2^-)	Formado en reacciones de autooxidación (flavoproteínas, ciclo de redox)
Radical hidroxilo (OH^\cdot)	Formado en las reacciones de Fenton o en la de Haber-Weiss catalizada por metales (hierro). Es la especie de vida media más corta y el más reactivo de todos. Puede captar los electrones de los tioles, por lo que interactúa con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, alterando la información genética de las células. También estimula la peroxidación lipídica, afectando a los fosfolípidos de las membranas celulares.
Radical peroxilo (ROO^\cdot)	Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos o del ROOH por pérdida de H^\cdot
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Formado a partir de la dismutación del O_2^- o puede proceder directamente del O_2 . Al no contener electrones desapareados no puede ser considerado como un auténtico radical libre.
Ácido hipocloroso (HOCl)	Producido por acción del estallido respiratorio de las células defensivas. Se origina a partir del H_2O_2 por acción de la mieloperoxidasa. Tampoco puede ser considerado estrictamente como un radical libre.
Oxido nítrico (NO)	Producido por la unión del oxígeno con el nitrógeno, induciendo lipoperoxidación lipídica.
Iones Fe^{+++} y Cu^{++}	Actúan como catalizadores en la formación de radicales hidroxilo, de ahí la importancia que adquieren las proteínas encargadas de transportar estos iones, manteniéndolos "secuestrados".
Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)	Es el oxígeno molecular simple, el primer estado excitado. Se forma por la activación del O_2 (luz solar, radiaciones)

Fuente: Del Rosario, 2007

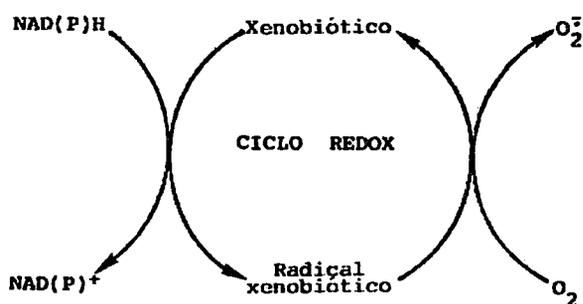
A nivel sanguíneo se esta generando H_2O_2 continuamente a partir de la oxidación del GSH y del ascorbato. Los macrófagos y neutrófilos activados liberan especies reactivas de oxígeno para destruir organismos patógenos dentro del proceso de fagocitosis. (González y col., 2000)

Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantin-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptófano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa. Y entre las sustancias y agentes es conocida ampliamente la relación de los productos cíclicos de naturaleza redox como son el paraquat, diquat, haloxano y doxorubicina, con los radicales libres. También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida; por último no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres. (Venero, 2002)

La formación de intermediarios radicales libres de muchos compuestos químicos esta catalizada por la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NAD(P)H como dador electrónico. En estos casos se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NAD(P)H y oxígeno y generación de radicales superóxido y otras especies de oxígeno reactivo. Este ciclo de redox conduce a una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos a la muerte celular. (Martínez, 1998)

FIGURA 2.1

Ciclo Redox de Xenobióticos



Fuente: Martínez Cayuela, 1998

A. EFECTO NOCIVO DE LOS RADICALES LIBRES

Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. (Martínez, 1998)

A nivel de organelos, se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles a la presión oxidativa, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial. (González y col., 2000)

a) Lípidos: Es aquí donde se produce daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera su integridad y funcionalidad como la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. (Venero 2002)

La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. (Marfil, 2008)

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la de los organelos celulares. Con respecto a la permeabilidad se afecta tanto el transporte pasivo como el activo al alterarse las interrelaciones de fluidez de los lípidos que forman las membranas biológicas. (González y col., 2000)

Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metílicos de la cadena carbonada resultando un radical libre lipídico (L.). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metílicos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno.

Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O₂ y formar un radical hidroperóxido. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido. El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada. (Martínez, 1998)

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos. (Martínez, 1998)

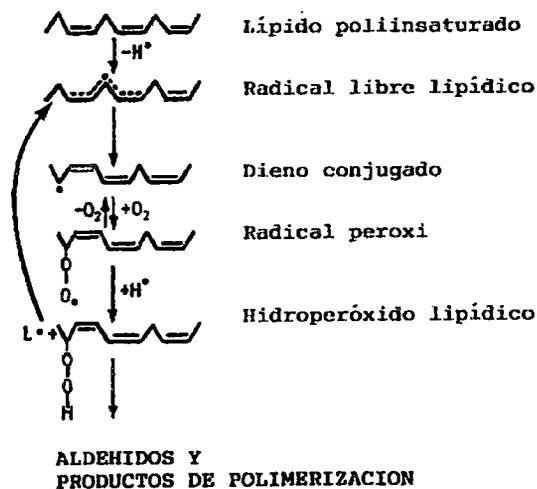
El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan más alteradas. (Martínez, 1998)

Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno. (González y col., 2000).

Dentro del proceso mismo de la lipoperoxidación, los radicales que se forman pueden causar también daños a las proteínas membranales, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas. La lipoperoxidación no sólo daña a las membranas, ya que también tiene efectos sobre lipoproteínas plasmáticas (p.ej. las lipoproteínas de baja densidad del plasma sanguíneo). Un incremento en la lipoperoxidación ha sido también asociado con el envejecimiento. (González y col., 2000)

FIGURA 2.2

Reacciones de la Peroxidación Lipídica.



Fuente: Martínez, 1998

b) Proteínas: Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas. (Venero 2002)

Las proteínas se oxidan en los puentes sulfhidrilos de las enzimas (Del Rosario, 2007)

Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido, que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo. Por último, el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del radical superóxido, también puede reducir el Cu^{2+} de la superóxido dismutasa CuZn a Cu^{1+} , reaccionando después con él y generando radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica. (Martínez, 1998)

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoácidas mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen todas ellas de estos aminoácidos para presentar actividad, se inhiben en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. (Martínez, 1998)

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido. (Martínez, 1998)

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación del triptófano hasta H_2O_2 y N-formil kinurenina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamientos entre proteínas y/o lípidos. (Martínez, 1998)

c) Ácido Desoxirribonucleico (ADN). (González y col., 2000; Martínez, 1998)

Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes.

El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN.

Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la célula muere.

Uno de los componentes de la molécula de ADN que es susceptible a ser dañado por radicales libres es la desoxirribosa, la que al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se forman rompimientos de cadena sencilla, los que son reparados por medio de las enzimas correspondientes. Cuando gran cantidad de radicales hidroxilo atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, que por su cercanía podrían conducir a la formación de rompimientos de cadena doble, los que provocan daño permanente al material genético. La reactividad del radical hidroxilo hacia los diferentes átomos de hidrógeno de la desoxirribosa varía considerablemente, siendo los carbonos 4 y 5 los sitios primarios de ataque, ya que en la molécula de ADN son los que quedan más expuestos.

Los radicales hidroxilos tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que puede observarse a este nivel son las substituciones, aunque también es frecuente observar deleciones y con menor frecuencia inserciones. Se ha visto que las substituciones frecuentemente involucran al par guanina-citosina, con el que los radicales hidroxilos y el oxígeno simple reaccionan directamente. Las mutaciones se concentran en regiones específicas del ADN, que se denominan "puntos calientes", lo que indica que están relacionadas con las secuencias de bases púricas y pirimídicas. Es probable que el oxígeno simple reaccione con la guanina eliminándola del ADN, lo que provoca la formación de rompimientos de cadena sencilla, o bien, que pueda generar un gran número de productos de reacción derivados de ella (de los que se han identificado hasta doce diferentes) los que constituirán los llamados sitios sensibles al álcali, que se convertirán en rompimientos después de tratamiento alcalino.

Uno de los productos formados es la 8-hidroxiguanosina, la que puede formarse por los radicales libres directamente sobre la molécula de ADN; o sobre los precursores de la misma, esta molécula puede identificarse en la orina humana, cuando el daño al ADN fue reparado. Las mutaciones se establecen cuando una cadena de ADN dañada es copiada durante la duplicación. Otra posibilidad, es que la duplicación quede bloqueada cuando la ADN polimerasa encuentra una lesión, o bien, en estos puntos de lesión la enzima puede leer erróneamente el mensaje de la cadena dañada y generar una cadena complementaria defectuosa.

d) Carbohidratos: Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones. (Martínez, 1998)

2.3.5 DAÑO O ESTRÉS OXIDATIVO. (Venero, 2002)

Se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado.

El daño oxidativo se genera por cambios en los sistemas de defensa ocasionando:

- Disminución en la entrada de las moléculas antioxidantes.
- Aumento en el metabolismo de antioxidantes.
- Falla en los sistemas de reparación.
- Aumento de enzimas oxidantes y blancos celulares.
- Isoformas de enzimas que generan más oxidantes.
- Estados patológicos derivados de la generación de radicales libres.

Se habla de estrés oxidativo cuando la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante del organismo. (Del Rosario, 2007)

El estrés oxidativo lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte celular. No podemos precisar si la alteración es por incremento de los radicales libres (prooxidantes) o por una disminución en la respuesta homeostática de los tejidos (defensa antioxidante). (Leyva, 2009)

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años. (Leyva, 2009)

Existen muchas evidencias de que cada vez es mayor la incidencia de ciertas patologías como consecuencia de una ingesta inadecuada de antioxidantes, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes mellitus, enfermedades relacionadas con degeneraciones neurológicas como Alzheimer, Parkinson, desórdenes autoinmunes y procesos derivados del envejecimiento celular. Gracias a la presencia de antioxidantes se puede eliminar gran parte de los radicales libres reduciendo por tanto, el estrés oxidativo celular. (Marfil, 2008)

El daño oxidativo puede ser prevenido o controlado por una serie de mecanismos defensivos celulares a los que se conoce en su conjunto como “defensa antioxidante” (Marfil, 2008)

2.3.6 DEFENSA ANTIOXIDANTE

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente: membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como son

los lípidos, proteínas, ADN, etc, funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen. (Montero, 1996)

Los antioxidantes retrasan el proceso de envejecimiento, combatiendo la degradación y la muerte de las células que provocan los radicales libres. La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres; a los que nos exponemos diariamente, nos obliga a recurrir a alimentos con propiedades antioxidantes, con capacidad para neutralizarlos. Los antioxidantes se tratan de un grupo de vitaminas, minerales y colorantes naturales y otros compuestos vegetales y enzimas (sustancias propias de nuestro organismo que intervienen en múltiples procesos metabólicos), que bloquean el efecto perjudicial de los denominados radicales libres. La mayoría de los antioxidantes se encuentran en los alimentos vegetales, lo que explica que incluir frutas, legumbres, verduras, hortalizas o cereales integrales en nuestra dieta, son tan beneficiosas. (U.N.M.S, 2006)

CUADRO 2.2

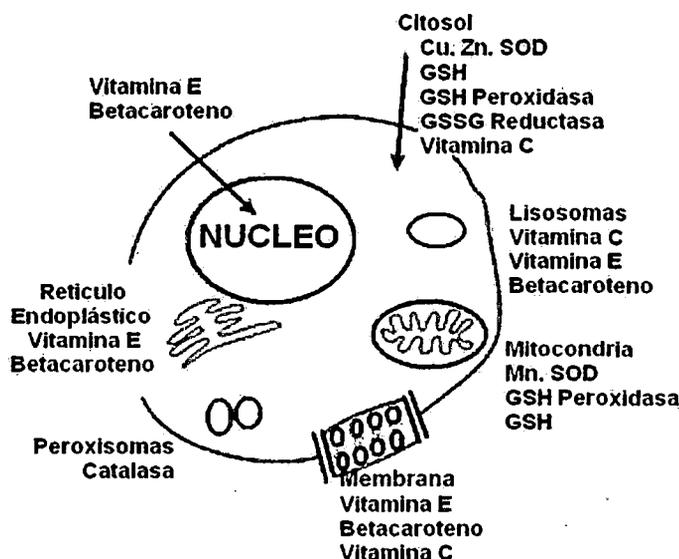
Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa.	Vitamina E.	Ceruloplasmina.
Catalasa.	Betacarotenos.	Transferinas.
Peroxidasa.	Ubiquinol-10	Lactoferrinas.
GSH.		Albuminas.
Proteínas que ligan metales.		Haptoglobinas.
Sistemas proteolíticos.		Vitamina C.
Vitamina C.		Acido úrico.
		Vitamina E.

Fuente: Venero, 2002

FIGURA 2.3

El sitio en la célula donde participan los principales mecanismos antioxidantes.



Fuente: Del Rosario, 2007

Se puede distinguir tres tipos de mecanismos de defensa antioxidante:

En los sistemas antioxidantes defensivos, un primer grupo trabaja sobre la cadena del radical inhibiendo los mecanismos de activación y un segundo grupo neutraliza la acción de los radicales libres ya formados, por tanto detiene la cadena de propagación. (Del Rosario, 2007).

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100 % de eficiencia. Los antioxidantes no enzimáticos son frecuentemente añadidos a los alimentos para prevenir la peroxidación lipídica que se asocia a numerosas patologías y a estados de estrés oxidativo. (Céspedes y Sánchez, 2000).

A. SECUESTRO DE IONES METÁLICOS

Para que se forme el radical hidroxilo, que es quien comienza el daño oxidativo, se necesita la presencia de iones de cobre o hierro. Estos iones se encuentran en muy baja concentración a nivel celular porque están secuestrados por proteínas y mantenidos, por tanto, en forma inactiva. Entre estas proteínas merecen destacarse la transferrina y la ferritina para el hierro y la ceruloplasmina y albúmina para el cobre. (Marfil, 2008; Romero, 2006)

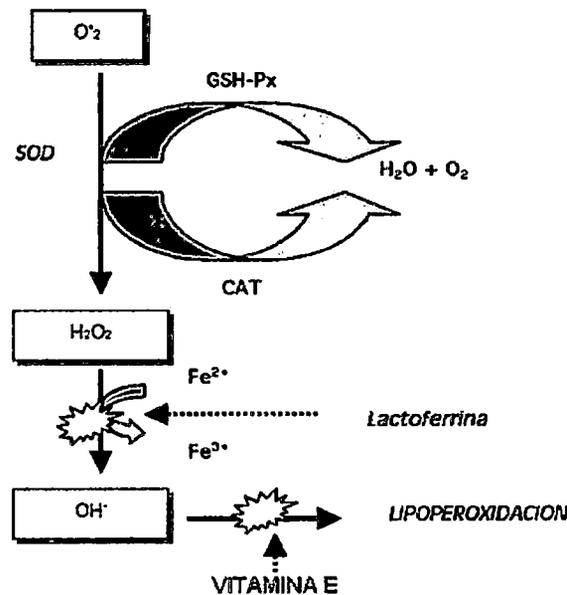
B. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS: (Del Rosario, 2007)

La función antioxidante desempeñada por las enzimas puede presentar ventajas frente a los compuestos antioxidantes en el sentido de que su actividad es regulada de acuerdo a los requerimientos celulares: pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos. El grupo de antioxidantes enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas.

En la siguiente figura se observan los mecanismos en donde las enzimas superóxido dismutasa (SOD) junto con la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidada (GSH-Px) eliminan muchos de estos compuestos. La lactoferrina (que atrapa el hierro) u otros antioxidantes como la vitamina E, disminuyen los daños producidos.

FIGURA 2.4

Mecanismos de defensa contra los daños producidos por las EROs.



Fuente: Del Rosario, 2007

a. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD). (Del Rosario, 2007): La enzima superóxido dismutasa (SOD), es del grupo de las metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados. Son esenciales para su defensa contra la toxicidad producida por los metabolitos parcialmente reducidos,

generados durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. Se conocen 3 formas de SOD según el metal que utilizan como cofactor. Estas a su vez se pueden dividir en 2 familias filogenéticas diferentes: CuZn-SOD y Fe/Mn-SOD. Entre ellas no existe homología de secuencias ni de estructuras de orden superior, lo que indica que evolucionaron independientemente en respuesta a una presión evolutiva común: la presencia de oxígeno y la amenaza de su toxicidad.

Esta enzima cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, la función de esta consiste en eliminar el radical superóxido antes de que este reaccione con moléculas biológicas susceptibles u origine otros agentes tóxicos. El peróxido de hidrogeno generado por la acción de la enzima, es eliminado por la catalasa y/o la glutatión peroxidasa.

b. CATALASA (CAT). (Del Rosario, 2007): Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; esta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y en los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280kD. Consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. La catalasa humana y la de res están ligadas a cuatro moléculas de NADPH, 1 en cada subunidad, el NADPH unido a la enzima no esta involucrado en su actividad catalítica o peroxidativa. Esta molécula puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la CAT por su propio sustrato toxico y estabiliza a la enzima. Además la catalasa constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un importante papel durante el estrés oxidativo.

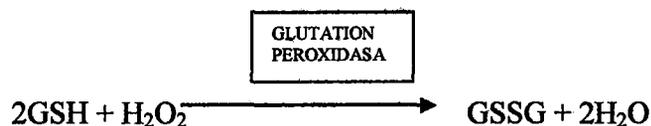
Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores. En general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de las peroxidasa, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.



El número de recambio de esta enzima es muy elevado (200.000 ciclos catalíticos x s⁻¹ x subunidad), pero su afinidad por el H₂O₂ es muy baja y, en consecuencia ciertos niveles de H₂O₂ permanecen en la célula.

c. GLUTATION PEROXIDASA (GSH-Px). (Del Rosario, 2007): Es una selenoproteína que, en las células animales se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de GSH como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente. Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GSH-Px contiene selenio bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos. Se han descrito cuatro isoformas de GSH-Px que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad de sustrato, tres de las cuales presentan estructura tetramérica. La primera de ellas, GSH-Px celular o clásica, esta prácticamente en todas las células, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes.

La segunda isoforma es la GSH-Px plasmática o extracelular, es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma de humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón. El tercer tipo es la GSH-Px fosfolípido hidroperóxido, cuya función biológica primaria es proteger contra la peroxidación lipídica reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Es la única isoforma cuya estructura es monomérica; es decir contiene un solo residuo de selenocisteína. El último tipo se denomina GSH-Px gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal. Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos.



GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

CUADRO 2.3

Localización y función de antioxidantes enzimáticos

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN FISIOLÓGICA
Superóxido Dismutasa	Citoplasma y mitocondria	Disminuye los radicales superóxido
Glutation Peroxidasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina el peróxido de hidrógeno y los hidro-peróxidos orgánicos
Catalasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina peróxido de hidrógeno

Fuente: Zamora, 2007

C. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS:

Existen muchas moléculas que pueden reaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno eliminándolas del medio e impidiendo, por tanto, su acción agresiva sobre las macromoléculas celulares. Entre estos destacan las vitaminas antioxidantes C y E, y el propio glutatión, que actúa en este caso sin intervención enzimática. Otro grupo de antioxidantes son los carotenoides y los compuestos fenólicos. Debido a que los antioxidantes endógenos no son suficientes para reducir el estrés oxidativo celular, se requiere la ingesta de antioxidantes exógenos presentes en los alimentos, que en cantidades muy pequeñas son capaces de ejercer una potente acción antioxidante. (Marfil, 2008; Romero, 2006)

Estos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas lipofílicas e hidrofílicas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. El mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. (Del Rosario, 2007)

CUADRO 2.4

Función fisiológica de los antioxidantes no enzimáticos.

ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	FUNCION FISIOLÓGICA
Vitamina E	Principal antioxidante presente en la membrana celular, neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos y anión superóxido; neutraliza peróxidos.
Vitamina C	Efecto eliminador de radicales, neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, anión superóxido; y regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Acido úrico	Su efecto es eliminar los radicales hidroxilo
Glutation	Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular
Acido lipoico	Antioxidante eficaz y es un sustituto eficaz del glutati6n
Carotenoides	Antioxidante de lípidos
Bilirrubina	Producto del metabolismo del grupo hem de la hemoglobina, tiene un efecto antioxidante a nivel extracelular
Ubiquinonas	Derivado de quinonas lipídicas solubles, cuyas formas reducidas tienen efectos eficaces como antioxidantes

Fuente: Zamora, 2007

a) ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS HIDROFÍLICOS: Se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares; estos incluyen vitamina C, glutati6n, acido úrico, bilirrubina, albúmina y flavonoides polifen6licos. (Del Rosario, 2007)

I. VITAMINA C (Del Rosario, 2007): Se encuentra bajo una forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los radicales libres superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. Este proceso transforma el ascorbato en el radical libre deshidroascorbato. El retorno a su forma nativa es por acci6n enzimática o por sustratos celulares ti6licos. A pesar de su manifiesta propiedad antioxidante (AOx), el ascorbato puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones Fe^{+3} y Cu^{+2} .

Estudios han demostrado que el acido asc6rbico aumenta la funci6n inmunol6gica al aumentar las células killer naturales y la funci6n de los linfocitos T y B, inhibe el crecimiento de distintas células de melanoma humano e induce apoptosis en células leucémicas, combate el cáncer al promover la síntesis de colágeno y prevenir así que los tumores invadan otros tejidos, se ha sugerido que un complemento diario de 1g de

vitamina C podría proteger a la persona contra la mutagénesis inducida por la quimioterapia.

La acción antioxidante del ácido ascórbico es bien conocida. Así, este compuesto:

- Reacciona directamente con el O_2^- , OH , y 1O_2 , el ácido ascórbico puede actuar reduciendo el O_2^- dando lugar a H_2O_2 y deshidroascorbato (DHA) de acuerdo con la reacción:

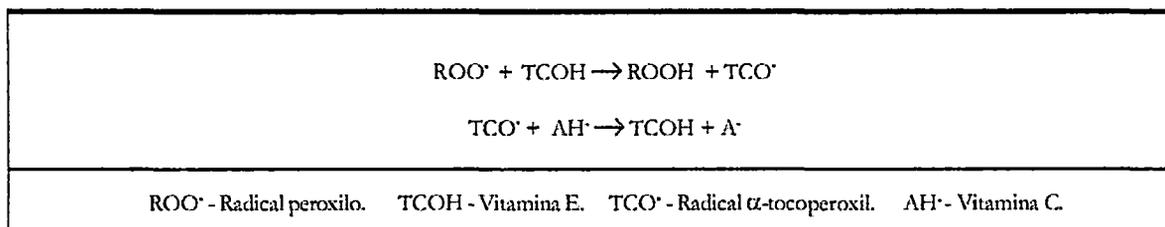


El ascorbato es también capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, según la reacción:



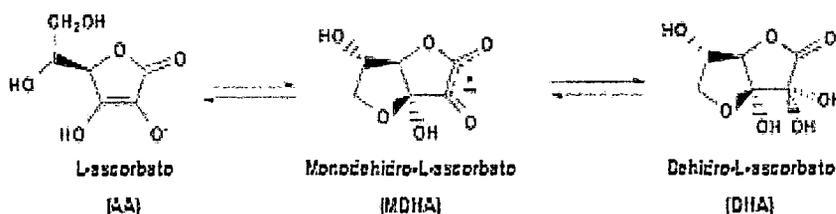
- Regenera la vitamina E, mediante la reducción del radical tocoferoxilo en un ciclo redox.

Regeneración de la vitamina E a partir de su interacción con la vitamina C



Fuente: González y col, 2000

Diferentes estados redox del ascorbato



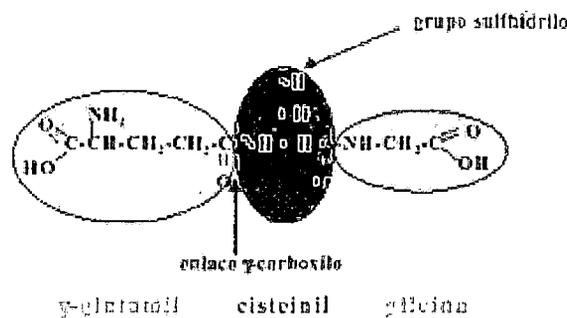
La forma disociada, el anión ascorbato (AA) es la predominante a pH fisiológico. El primer producto de la oxidación del AA es un radical libre similar a las semiquinonas denominado monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA dismuta espontáneamente a AA y a deshidroascórbico (DHA).

Fuente: González y col, 2000

II. GLUTATION. (Del Rosario, 2007): Su forma reducida (GSH) es un tripéptido, que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas de carbono, además reduce el radical libre tocoferoxilo y el radical libre deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original. La naturaleza nucleofílica de la cisteína hace que el glutatión sea un potente agente reductor.

FIGURA 2.5

Estructura del glutatión, γ -glutamil-cisteinil-glicina



Fuente: Noctor y col., 2002

III. ACIDO ÚRICO. (Del Rosario, 2007): Aunque se ha considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, su función como antioxidante biológico, intra y extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción aparentemente sería prevenir la oxidación de la vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu. Es uno de los antioxidantes biológicos más abundante en el organismo, por lo mismo el ácido úrico puede cambiar su actividad química de antioxidante a prooxidante cuando penetra en la placa aterosclerótica.

IV. COMPUESTOS FENÓLICOS: (Del Rosario, 2007; Pérez, 2003). Son sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glucósidos, etc.). Los compuestos fenólicos comúnmente referidos como polifenoles están presentes en todas las plantas y también en la dieta. Hay más de 8000 estructuras fenólicas que han sido identificadas, existiendo desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados. Entre esta gran

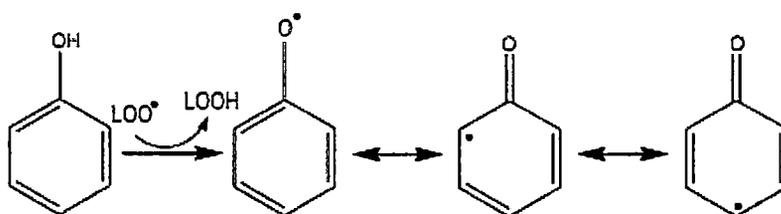
variedad de compuestos fenólicos, los mayoritarios son los flavonoides, con más de 5000 tipos distintos.

Los compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) protegen a las plantas contra los daños oxidativos y tienen el mismo efecto en el organismo humano. Estos actúan bloqueando la acción de enzimas específicas que generan inflamación, además actúan como potentes quelantes de metales y capturadores *in vitro* de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Pueden ser liposolubles o hidrosolubles y se localizan a nivel intra y extracelular. Los fenoles también modifican la aglomeración de las plaquetas e inhiben la activación de carcinogénesis.

Aunque los compuestos fenólicos están presentes en los alimentos, su nivel de ingesta varía enormemente según el tipo de dieta consumida. Por ejemplo, algunas bebidas, como el vino tinto; vegetales y frutas, como el zumo de manzana o la naranja; y las legumbres, son especialmente ricos en estos compuestos.

FIGURA 2.6

Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos



Fuente: Alonso, 2009

V. FLAVONOIDES. (Ramirez, 2006)

Son compuestos fenólicos derivados de las plantas con efectos positivos sobre la salud. Estos pigmentos naturales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, sustancias tóxicas presentes en los alimentos, la contaminación ambiental, etc.

ESTRUCTURA QUÍMICA. (Ramirez, 2006)

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en las plantas, y algunos se han aislado de los hongos y líquenes. Se han identificado más de 5000 flavonoides, entre los

que se puede destacar: citroflavonoides (quercetina, hesperidina, rutina, naringina y limoneno), isoflavonoides (genisteina, proantocianidinas, antocianidinas, ácido elálgico).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones.

Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí.

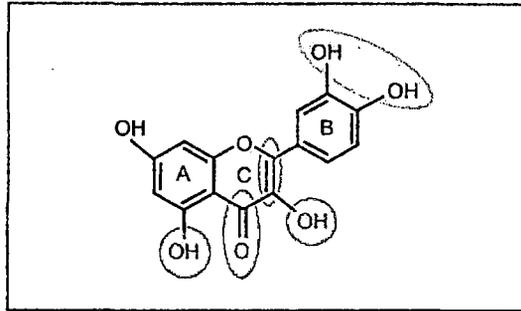
FUNCIÓN ANTIOXIDANTE. (Pérez, 2003)

Una de las funciones más estudiadas de los flavonoides es su capacidad antioxidante tanto in vivo como in Vitro. Desde hace tiempo se conocía su efecto sobre los alimentos retardando su enranciamiento e incrementando su vida media. Sin embargo, hasta esta última década no existían estudios que describiesen los mecanismos por los que actúan como antioxidantes. El creciente interés acerca de los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica, pues pueden unirse a enzimas, a transportadores de hormonas, al DNA, quelar iones metálicos, catalizar el transporte de electrones y secuestrar radicales libres. Gracias a estas funciones se han descrito efectos protectores de estos compuestos en diversas patologías como diabetes, cáncer, procesos inflamatorios y en la enfermedad cardiovascular. Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son:

1. Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
2. Doble enlace conjugado con el grupo 4-oxo del anillo C.
3. Presencia del grupo 3 y 5 OH con función 4-oxo en los anillos A y C para ejercer el máximo potencial antioxidante.

FIGURA 2.7

Esquema de un flavonoide con los grupos químicos que le confieren su poder antioxidante



Fuente: Ramírez, 2006

A: presencia de dos grupos hidroxilo en la posición orto en el anillo B (naranja claro); B: presencia de un doble enlace conjugado con el grupo 4-oxo del anillo C (naranja intermedio); C: presencia de dos grupos hidroxilo en posición 3 y 5 de los anillos A y C, respectivamente, junto al grupo 4-oxo en el anillo C (naranja oscuro). Los flavonoides presentarán alguna de las estructuras citadas, dos de ellas o todas, aumentando, respectivamente su poder antioxidante.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos.

De esta manera, bloquean la acción de dichas sustancias sobre las células. Diversos flavonoides suprimen los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoléico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos y la oxidación de las LDL haciendo estas partículas menos aterogénicas.

En la actualidad se está estudiando el papel de los flavonoides en la prevención del cáncer. Sus mecanismos de acción consisten en la inhibición de la expresión de genes mutados y la actividad de enzimas que promueven la carcinogénesis, favoreciendo la detoxificación de xenobióticos, y, por último protegiendo al DNA de la oxidación.

b) ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS LIPOFÍLICOS. (Del Rosario, 2007): Estos se ubican en membranas y, generalmente, bloquean la formación de hidroperóxidos, o interrumpen la propagación de la peroxidación lipídica, estos incluyen:

I. VITAMINA E. (Del Rosario, 2007): Su nombre genérico hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el α -tocoferol es el isómero de mayor potencia antioxidante y, junto al γ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. La captura de radicales libres superóxido, hidroxilo y peróxidos lipídicos la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y se detiene la propagación de la peroxidación lipídica.

Para estabilizar un radical libre, el tocoferol se convierte en el radical libre tocoferoxilo, este retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A. Algunos investigadores sostienen que una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno puede llevar a una disminución significativa de la concentración tisular de vitamina E.

Se ha comprobado que la vitamina E es el antioxidante más concentrado que se encuentra en las LDL, en una cantidad 20 a 300 veces mayor que cualquier otro antioxidante. *In vitro* la vitamina E inhibe la oxidación de las LDL y su acción es superior si la suplementación combina esta vitamina con la vitamina C y el beta caroteno.

II. VITAMINA A. (DEL ROSARIO, 2007): Es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales existe como provitamina llamada β -caroteno. Por su conformación estructural son excelentes captadores de radicales libres. Protegen contra la peroxidación lipídica, sobre todo la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, y elimina el ión superóxido y radicales peróxido. Al igual que la vitamina C, tiene un comportamiento dual al actuar como prooxidante en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno.

III. UBIQUINONA. (Del Rosario, 2007): También llamada coenzima-Q, es un derivado de la quinona. Su estructura es semejante al tocoferol y se le ha identificado como un portador adicional en la cadena respiratoria. Aproximadamente 50% de la ubiquinona celular se encuentra en la mitocondria. Aunque su función antioxidante *in vivo* está en discusión, su forma reducida, el ubiquinol, tiene una fuerte actividad antioxidante, comparada con su forma oxidada, llegando a consumirse antes que la vitamina E frente a una situación de exposición a radicales libres. El ubiquinol impide que las especies reactivas de oxígeno desencadenen la peroxidación lipídica y también participa en el reciclaje de vitamina E en la mitocondria. Otros compuestos sugeridos con actividad antioxidante son la albúmina, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa.

2.3.7 ALIMENTOS RICOS EN ANTIOXIDANTES. (Montero, 1996)

- Alimentos ricos en vitamina C, que también contienen alfa caroteno: pimientos rojos y verdes, fresas, naranjas, brocoli, kiwi, zumo de tomate, naranja y uva, sandía, patata y coles de brucas.
- Alimentos ricos, en b-caroteno, que contienen vitamina C: papa dulce, papaya, zanahorias, espinaca, tomates, albaricoque, manteca de maní y calabaza. Las frutas y verduras, además de proporcionar estos antioxidantes, poseen también micronutrientes, que pueden prevenir mutaciones. Así por ejemplo, el ácido fólico es necesario para la síntesis de nucleótidos en el DNA y se ha demostrado que su deficiencia causa ruptura cromosómica y es factor de riesgo en el infarto de miocardio. La niacina se requiere para formar la poli-ADP-ribosa, un componente del DNA. A la hora de establecer los niveles, diarios recomendables de antioxidantes, hay que tener en cuenta dos factores: En primer lugar, si el individuo está sano o presenta algún tipo de patología. Por ejemplo, en el caso de fumadores, estos necesitan mucha mayor cantidad de ascorbato que los no fumadores, ya que su catabolismo de vitamina C es mayor. Asimismo, las embarazadas también precisan una mayor ingesta por la pérdida de vitamina C que sufren a través de la placenta. En segundo lugar los niveles de antioxidantes son un parámetro más adecuado que la ingesta diaria de antioxidantes, puesto que la metabolización en cada individuo es distinta, siendo los niveles recomendados, de 50 uM para la vitamina C, 30 uM para la vitamina E y 4 uM para el b-caroteno.

2.3.8 ANTOCIANINAS

El término antociano fue ideado inicialmente para designar la sustancia responsable de la coloración de las flores del aciano, la palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *lyanos* (azul oscuro) (Bruneton, 1993; Leyva, 2009)

Las antocianinas forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos, teniendo una función antioxidante. (Moenne-Loquez, 2008)

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua, visibles para el ojo humano, y responsables de los colores rojo, azul o violeta de diversos tejidos incluyendo la mayoría de flores, frutos, hojas, tallos, tubérculos, raíces y cáscaras de semillas. (Guzmán y col., 2010; Leyva, 2009)

El color rojo azul o violeta depende de los grupos que estén unidos a la estructura, así como la posición del carbono que este siendo atacado. En un medio básico, el color vira de

un pigmento rojo a azul, en cambio entre mas ácido se encuentre el medio, los colores de la antocianina se hacen mas rojos. (Guzmán y col., 2010)

Las antocianinas pertenecen a un grupo de glucósidos cuya estructura general es el 2-fenilbenzopirilo o ión flavilio, debido a la poca solubilidad de estas en el agua no se encuentra de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glicosilada, siendo una de las más abundantes la cianidina-3-glucosido. Estan formados por una molécula de antocianidina (aglicón) que se une a una fracción de carbohidrato a través de un enlace B-glicosídico, donde los carbohidratos pueden ser D-glucosa, D-galactosa, etc. (Guzmán y col., 2010)

La diversidad estructural contribuye favorablemente a la existencia natural de varios antocianos con diferentes sustituciones glucosídicas. Así pues, mientras son seis las antocianidinas comunes, existen más de 540 antocianinas. (Guzmán y col., 2010)

Entre diferentes vegetales y/o variedades del mismo vegetal, el contenido total de las antocianinas puede variar considerablemente. Este puede estar afectado por genes, luz, temperatura, etc. (Guzmán y col., 2010)

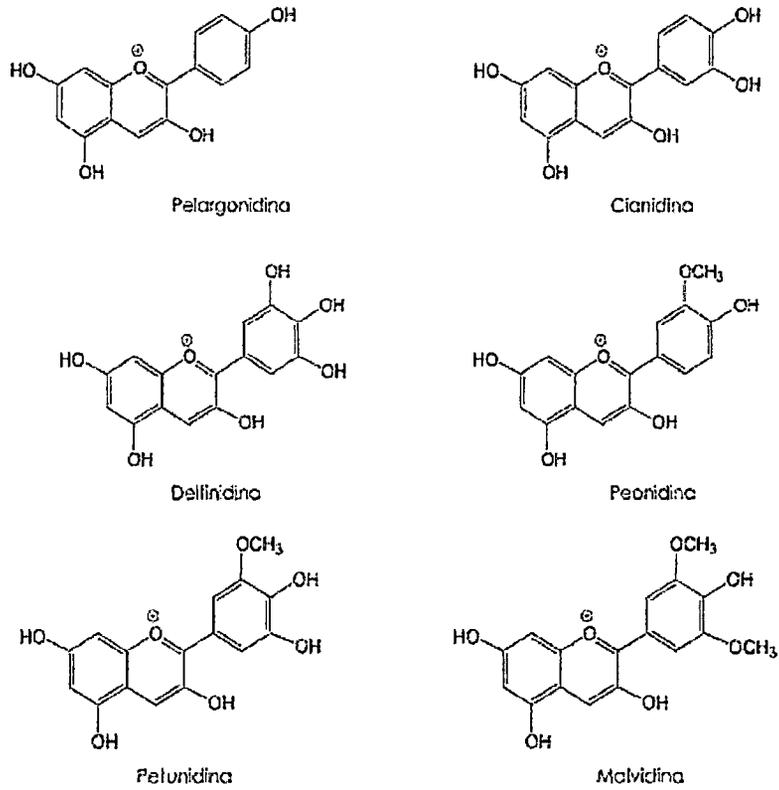
Las formas mas comunes de antocianidinas son: cianidina (Cy); encontrándose esta en el 90% de los vegetales; siendo la más abundante, seguida de la delfinidina (Df), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg), petunidina (Pt) y malvidina (Mv) (en orden decreciente), estos nombres se derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez. (Del Valle y col., 2005; Guzmán y col., 2010)

Los tipos de antocianinas se determinan de las dos bandas de absorción que todas ellas dan, una en la región UV (260-280nm) y otra en la región visible (490-550nm). La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encargan de la filtración de la luz. Dentro de las células las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos o “inclusiones antociánicas vacuolares”, en el trascurso de la maduración ocupan cada vez mas espacio en detrimento del citoplasma, que se forman mientras la síntesis de pigmentos esta en operación. (Leyva, 2009; Romero, 2008).

El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son pelargonidina (rojo-naranja), cianidina (rojo púrpura) y delfinidina (azul púrpura). (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

FIGURA 2.8

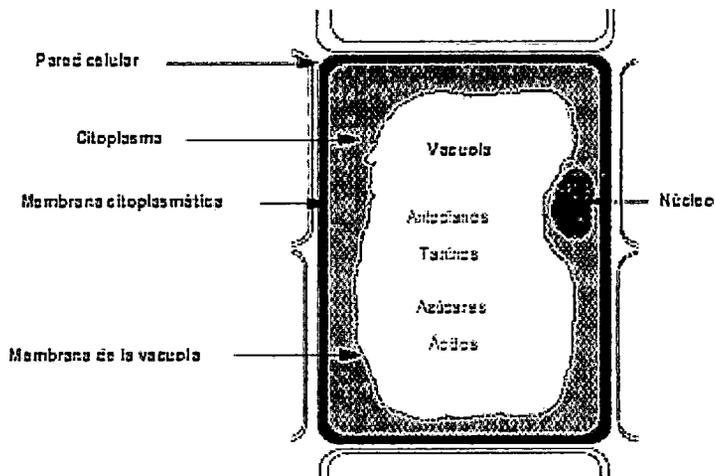
Antocianidinas



Fuente: Ocampo, 2008

FIGURA 2.9

Representación esquemática de la localización de antocianos



Fuente: Romero, 2008

A. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ANTOCIANINAS. (Astrid, 2008)

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo.

Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli et al., 1998). Estos resultados sugieren que las antocianinas son la explicación de la conocida "Paradoja Francesa". Aunque varias hipótesis existen, se propone que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto. De igual manera, Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido ($ROO\cdot$), superóxido (O_2^-), hidroxilo ($-OH$) y oxígeno singlete ($^1O^2$).

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Hagiwara et al., 2002, demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. De igual manera, Koide et al., 1997, reportaron efectos antitumorales al usar extractos de fríjoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa. En cuanto a la actividad anticancerígena, Kamei et al., 1998, reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto. Así también, Tristan et al., 2005, realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis.

Referente a la actividad antiinflamatoria, Wang y Mazza, 2002, encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados. Por otra parte, Vuorela et al., 2005, encontraron efecto supresor de prostaglandina EG_2 , sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas de frambuesa.

De acuerdo a Tristan et al., 2008, antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginiana* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hipoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidos tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes. Otro ejemplo de actividad antidiabética de las antocianinas fue reportado por Perossini et al., 1987.

Estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas han sido reportados por Ohgami et al., 2005, quienes suministraron extractos de frutas ricas en antocianinas a ratas con deficiencia ocular, lo cual resultó en un efecto antiinflamatorio y de aumento de la agudeza visual. Joseph et al., 1999, y Shukitt-Hale et al., 2005, han demostrado que el comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio puede ser mejorado a través de suplementación nutricional con extractos de arándanos y fresas.

Las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas utilizadas para la terapia de un amplio espectro de enfermedades. Las investigaciones realizadas con extractos de *Vitis vinifera* ricos en antocianinas, han demostrado que disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar, también efectos antiinflamatorios y actividad anti-edema. (Muñoz, 2005).

Las propiedades antioxidantes de las antocianinas son moduladas por las diferentes hidroxilaciones y glucosilaciones, y es la cianidina 3-glucósido la antocianina con mayor poder antioxidante, diferentes investigadores atribuyen a las antocianinas aproximadamente 50% de la capacidad antioxidante en bayas rojas; sin embargo, las uvas de color verde o amarillo también presentan capacidad antioxidante aunque levemente menor que las rojas. Algo similar sucede en manzanas amarillas, en las que su capacidad antioxidante estaría dada por otros fenoles o flavonoides diferentes de las antocianinas. (Del Valle y col., 2005)

Además de la importancia que las antocianinas tienen en relación a la protección de los vegetales ante condiciones de estrés, se han estudiado debido a los efectos benéficos de su capacidad para neutralizar los efectos de los radicales libres sobre enfermedades crónicas degenerativas, así como por ser hepatoprotector, antihipertensivo y anticancerígeno. (Del Valle y col., 2005)

Las antocianinas protegen de muchas maneras. Primero, neutralizan las enzimas que destruyen el tejido conectivo. Segundo, su capacidad antioxidante previene los antioxidantes del tejido conectivo dañado. Finalmente, reparan proteínas dañadas en las paredes de los vasos sanguíneos. (Cuevas y col., 2008)

Las pruebas biológicas sobre animales fundadas en la difusión de colorantes indican que las antocianinas disminuyen la permeabilidad de los capilares y aumentan su resistencia. Su actividad podría estar ligada a la participación del colágeno de la pared vascular en el control de la permeabilidad de la misma. Se debería en parte a una inhibición de enzimas proteolíticas de degradación de este colágeno (elastasa y colagenasa). Las propiedades a nivel capilar-venoso permiten utilizar las drogas con antocianinas y los preparados que las contienen en el tratamiento sintomático de trastornos relacionados con la insuficiencia venolinfática y la fragilidad capilar (flebología, proctología, ginecología). Se ha puesto de manifiesto otra propiedad como es el caso de aumento de la regeneración de la púrpura retiniana. Las antocianinas se proponen igualmente en oftalmología en casos de trastornos a nivel de la retina o de la coroides y para mejorar la visión crepuscular. (Bruneton, 1993)

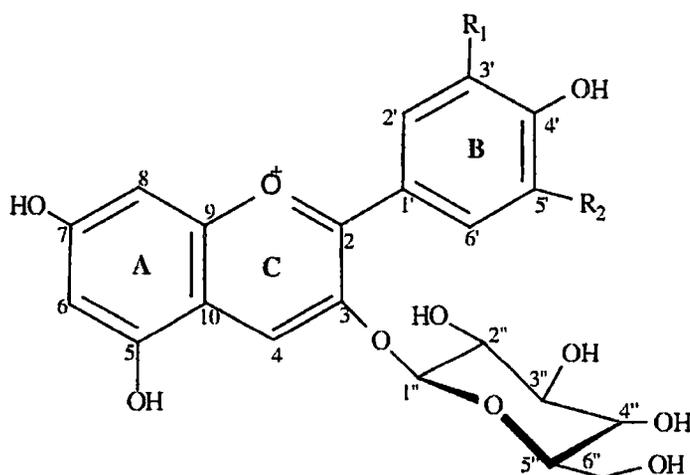
Experimentos en animales han demostrado que la suplementación con antocianinas previenen efectivamente la inflamación y el subsecuente daño a vasos sanguíneos. Esta habilidad antiinflamatoria de las antocianinas también ayuda contra las reacciones alérgicas. (Cuevas y col., 2008)

Por otro lado se ha observado que su potencial antioxidante va en contra de radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno a través de numerosos mecanismos, por ejemplo: la cianidina: protege la membrana celular de lípidos de la oxidación por una variedad de sustancias peligrosas. La cianidina es un antioxidante cuatro veces más fuerte que la vitamina E, la pelargonidina protege el radical amino de la tirosina del peroxinitrilo, un antioxidante altamente reactivo. Por otro lado, la delfinidina interfiere con el radical hidroxilo, uno de los oxidantes del cuerpo humano. (Cuevas y col., 2008)

Los antocianos, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilos librasen la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones. (Kuskoski, 2004)

FIGURA 2.10

Estructura química de los antocianos



Fuente: Kuskoski, 2004

Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Sus propiedades anti-radicales libres son fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peróxido lipídica, se ha descrito la capacidad de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. (Ramírez. 2006)

B. LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES. (Astrid, 2008).

La creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos ha sido investigada por Hallagan, 1991, y Lauro, 1991, quienes reportaron que los colorantes rojo No. 2 y No. 40 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia, pero el rojo No. 40 aún se encuentra en escrutinio en Estados Unidos. Al mismo tiempo, dichos hallazgos se relacionan con modificaciones en la hiperactividad de niños de edad escolar lo cual puede considerarse un mal neuronal agudo (Breakey et al., 2002; McCann et al., 2007). Tales antecedentes son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales como las antocianinas (Huck y Wilkes, 1996; Birks, 1999; Ersus y Yurdagel, 2007; Olaya et al., 2008; Wallace y Giusti, 2008).

Las políticas regulatorias en cuanto al uso de colorantes derivados de las antocianinas varían de país a país (Ottersäater, 1999). Estados Unidos es el país más

restrictivo en cuanto al uso de las antocianinas como colorantes naturales. Allí, cuatro de los 26 colorantes que están exentos de certificación y aprobados para el uso en alimentos se derivan de la cáscara de la uva, del extracto de la uva, del jugo de vegetales y del jugo de frutas. Las fuentes más comunes de jugo de vegetales son el repollo morado, los rábanos y diferentes variedades de bayas (Wrolstad, 2004). En contraste, en la Unión Europea, Chile, Colombia, Irán, Israel, Corea del Sur, Malta, Perú, Arabia Saudita y los Emiratos Árabes todos los colorantes derivados de las antocianinas son reconocidos como naturales (Ottersäater, 1999).

C. BIOSÍNTESIS DE LAS ANTOCIANINAS. (Astrid, 2008; Del Valle y col., 2005)

Las antocianinas únicamente se sintetizan en determinados tejidos y durante determinadas etapas de la vida de la planta.

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos (Springob et al., 2003). Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta de ácido shikímico. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonio liasa (PAL), (Winkley-Shirley, 2001), (Dixon et al, 2005) proponen la presencia de dos tipos de PAL: PAL1, localizada en el retículo endoplasmático y PAL2, ambas interactúan de manera diferencial con C4H, y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido p-coumárico. El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa (CHS), tanto PAL como CHS son inducidas por la luz y por el ataque de patógenos, y los genes que las codifican son activados por estímulos externos a nivel de transcripción. Este compuesto intermedio de 15C es transformado en una flavanona (naringinina) en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. Esta etapa es clave puesto que los diferentes patrones de hidroxilación que se distinguen en las antocianinas les dan los colores característicos que van desde rojo hasta púrpura y determinan su capacidad antioxidante.

Desde este punto a la formación de las antocianinas se involucran reacciones de oxidación y deshidratación, catalizadas por leucoantocianidina oxidasa (LDOX) y dihidroflavonol reductasa (DFR). Finalmente, se produce una glicosilación catalizada por

D. TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN EN VACUOLAS. (Del Valle y col., 2005)

En general la biosíntesis de antocianinas ha sido mas estudiada que la etapa post-biosintética, que comprende modificaciones químicas y enzimáticas, el transporte, el almacenaje, la secreción y el catabolismo.

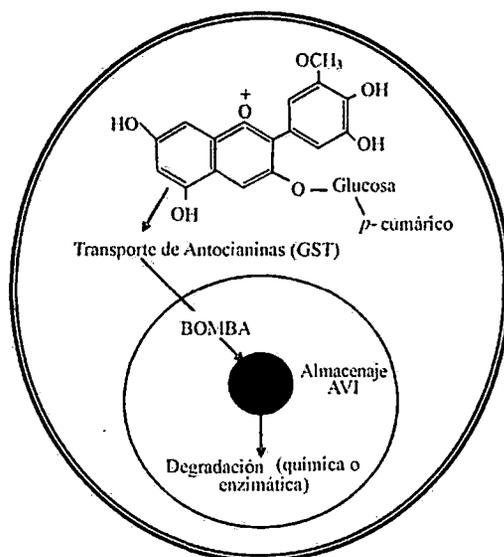
La síntesis de las antocianinas se realiza a través de etapas catalizadas secuencialmente por enzimas localizadas en el citosol y el retículo endoplasmático, pero solo se almacenan en las vacuolas. Para ser trasportadas una de las posibilidades es que se unan a una proteína de tipo glutatión S transferasa (GST), para posteriormente acumularse en las inclusiones vacuolares de antocianinas (AVI). Este mecanismo, que aun no esta totalmente elucidado, varia entre especies.

También se descubrió que la acetilación es una señal indispensable para el transporte de antocianinas, puesto que se demostró que las antocianinas acetiladas son almacenadas de manera más eficiente en las vacuolas. Aun no se conoce totalmente el mecanismo de transporte de antocianinas no acetiladas.

En resumen existen modelos divergentes que involucran acarreadores y vesículas, y si bien en los últimos años se avanza en el estudio de mecanismos de transporte, es evidente que el rol de las GST y los antocianoplastos esta en espera de ser ensamblado para entender de mejor manera estos procesos post-biosintéticos de transporte y almacenaje.

FIGURA 2.12

Esquema de los eventos post biosintéticos en antocianinas de *Vitis vinifera*.



Fuente: Del Valle y col., 2005

2.3.9 VITAMINA C. (Ramírez, 2006)

La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor. Actúa como cofactor para numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de colágeno, carnitina y algunos neurotransmisores, y puede atrapar una gran variedad de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en medios acuosos. La vitamina C se considera esencial, ya que no puede ser sintetizada por los humanos además de por los primates, cobayas y otras especies como los peces, aves e insectos. Algunos animales la sintetizan a partir de la glucosa mediante la vía del ácido glucurónico; los que no la pueden sintetizar es porque carecen de la enzima que cataliza la etapa final de oxidación; por lo tanto estos deben ingerir o adquirir la vitamina a través de la alimentación.

Esta vitamina se halla muy extendida en la naturaleza, pero se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal, en los que aparece de manera natural bajo dos formas químicas interconvertibles: ácido ascórbico (forma reducida) y ácido dehidroascórbico (forma oxidada), ambas formas poseen similar acción biológica.

A. ESTRUCTURA QUÍMICA. (Ramírez, 2006).

Dentro del término “vitamina C” se engloban todos los compuestos que presentan la actividad biológica del ácido L-ascórbico (ácido 2,3-enediol, L gulónico), cuya fórmula empírica es $C_6H_8O_6$; es un derivado lactónico del ácido heurónico y se corresponde con una forma oxidada de la glucosa; en concreto es una α -cetolactona de 6 átomos de carbono que muestra un anillo lactona de cinco miembros y un grupo enediol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente. El mencionado grupo enediol es esencial para su actividad biológica.

El ácido ascórbico o ascorbato es un buen agente reductor; al perder un electrón se forma un radical relativamente estable, el radical semihidroascórbico, el cual sufre una segunda oxidación dando lugar al ácido dehidroascórbico. Este último paso es reversible, por lo que ambas formas se pueden encontrar en la naturaleza. Si el ácido ascórbico pierde agua por deshidratación se transforma en ácido dicetogulónico mediante una reacción irreversible que da lugar a un producto que no es biológicamente activo.

B. ABSORCIÓN Y METABOLISMO. (Ramírez, 2006)

La vitamina C se absorbe rápidamente en el tracto intestinal mediante transporte activo dependiente de la dosis. Parece ser que el ácido deshidroascórbico es absorbido mediante mecanismos de difusión facilitada, aunque hay autores que piensan que pueden existir otras vías alternativas de absorción como la conversión a ascorbato en el lumen intestinal. En plasma, el ácido ascórbico es transportado en forma de ascorbato, aunque no se han identificado proteínas específicas para su transporte. Al interior de las células sanguíneas es transportado en forma de dehidroascorbato, ya que la membrana es más permeable a esta forma.

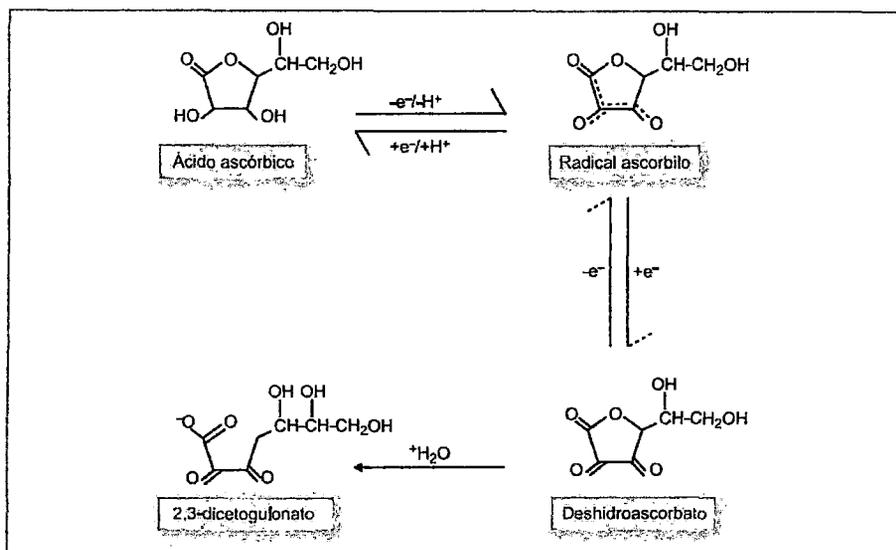
Una vez en el interior de la célula se transforma inmediatamente en ascorbato. El transporte celular de ácido ascórbico y dehidroascórbico es mediado por transportadores que varían según el tipo de células. La acumulación de ascorbato en los neutrófilos y linfocitos es mediada por transportadores de alta y baja afinidad, y la vitamina se localiza principalmente en el citosol.

Debido a que las formas oxidadas de la vitamina C son inmediatamente reducidas a ácido ascórbico, es muy poca cantidad de vitamina la que se cataboliza y se transforma en los siguientes metabolitos excretables: ácido dehidroascórbico, ácido oxálico y ácido dicetogulónico. A pesar de su absorción dependiente de la dosis, un segundo mecanismo de regulación del contenido de ascorbato en el organismo es el renal, por donde se excretan metabolitos o el propio ácido ascórbico. Investigaciones recientes han demostrado que se excretan muy bajas cantidades de ascorbato, pero esta excreción aumenta de una forma proporcional al incremento de su ingesta por la dieta.

La concentración de vitamina C en los tejidos es mayor que en el plasma y en la saliva. Niveles elevados se encuentran en las glándulas hipófisis y suprarrenal, en leucocitos, en el páncreas, los riñones, el bazo y el cerebro.

FIGURA 2.13

Metabolitos intermediarios del ácido ascórbico.



Fuente: Ramírez, 2006

C. PROPIEDADES Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA VITAMINA C.
(Ramírez, 2006).

Las funciones biológicas del ácido ascórbico se basan en su capacidad reductora en una gran variedad de reacciones bioquímicas. Gracias a su poder reductor, esta vitamina también puede reducir especies reactivas del oxígeno. Su principal función es como cofactor de numerosas reacciones que requieren cobre o hierro reducido y como antioxidante hidrosoluble que actúa intra y extracelularmente. Los productos de oxidación de la vitamina son regenerados in vivo de una forma muy rápida por glutatión, nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH) y nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducidos.

Es conocida la propiedad de la vitamina C de donar un electrón a ocho enzimas humanas. Tres participan en la hidroxilación del colágeno, dos en la biosíntesis de carnitina y las tres restantes en la biosíntesis de hormonas y aminoácidos. Algunos estudios sugieren que el ascorbato desempeña un papel importante en la expresión génica del colágeno, en la secreción celular de procolágeno y en la biosíntesis de otras sustancias del tejido conectivo, además del colágeno, como son elastina, fibronectina, proteoglicanos y elastina asociada a fibrilina.

El ácido ascórbico también está implicado en la síntesis y modulación de algunos componentes hormonales del sistema nervioso, por ejemplo en la hidroxilación de dopamina a noradrenalina.

D. FUENTES ALIMENTARIAS. (Ramírez, 2006)

La vitamina C está muy extendida en la naturaleza. En general, todas las frutas y verduras la contienen en mayor o menor cantidad, siendo escaso su contenido en los cereales. Las frutas más ricas son las ácidas, ya que el pH bajo estabiliza la vitamina C (kiwi, fresas, grosellas, mango, naranja). Entre los alimentos de origen animal, la cantidad de vitamina C es escasa, aunque aparece en hígado, riñón y cerebro.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Actividad:** Capacidad de un agente para producir un efecto. (Cabieses, 1993)
- **Antocianidina:** Aglicones de los glucósidos que dan origen a los colores azul, rojo y violeta de flores y frutos. Derivan del cloruro trihidroxiflavinilo. (Barcelo, 1982)
- **Efecto:** Resultado de una acción. (Cabieses, 1993)
- **Endógeno:** Que se origina o nace en el interior, que se origina en virtud de causas internas. (Cabieses, 1993)
- **Exógeno:** Dicho de un órgano; que se forma en el exterior de otro, como las esporas de ciertos órganos. (Cabieses, 1993)
- **Extracción:** Acción o efecto de extraer o sacar. (Cabieses, 1993)
- **Prooxidante:** Sustancia sensible a producir oxidación. (Barcelo, 1982)
- **Xenobiótico:** Compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas. (Soukup, 1970)

ABREVIATURAS

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

AOx: Antioxidantes

CAT: Catalasa

DPPH: 2,2 difenil-1-picrilhidracilo

EROs: Especies reactivas de oxígeno

g: Gramo

GSH: Glutación reducido

GSH Px: Glutación peroxidada

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)

IC₅₀: Coeficiente de inhibición

M: Molar

ml: Mililitro

mg: Miligramo

mm: Milimetro

mM: Milimolar

nm: Nanómetro

PL: Peroxidación lipídica

Q.P.: Químicamente puro

RL: Radicales libres

SOD: Superóxido dismutasa

µg: Microgramo

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 MUESTRA VEGETAL

Los frutos de *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) fueron recolectadas en el distrito de Sicuani, provincia de Canchis, departamento de Cusco, altitud de recolección entre 3400 m.s.n.m. – 3600 m.s.n.m. Los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) fueron recolectados en el distrito de Zurite, provincia de Anta, departamento de Cusco a una altitud de 3391 m.s.n.m.

3.2 MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO

3.2.1 MATERIALES DE CAMPO

- Cuaderno de campo
- Tijeras podadoras
- Bolsas de papel Kraft
- Cámara fotográfica
- Plumón indeleble

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Vasos precipitados 50ml ,100ml, 200ml ,25ml.
- Pipeta Pasteur.
- Pipeta de 1ml ,5ml, 10ml.
- Micro pipeta 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l.
- Matraz Erlenmeyer de 100ml, 250ml, 600ml.
- Probeta de 25ml ,50ml y 100ml.
- Fiola de 10ml, 25ml ,50ml
- Tubo de ensayo con tapa rosca
- Baguetas
- Embudo de vidrio (Buchner)
- Viales 20 ml
- Termómetro

- Baño Maria Biomachin 2612
- Pera de decantación 500 ml ,250 ml ,125 ml
- Cocina eléctrica
- Gradillas
- Celdas de vidrio para UV -VISIBLE
- Cartuchos 18 (mini columnas 4mm x 20 mm, tamaño de partícula 4µm,tamaño de poro 100 Å, volumen de poro 92 ml/g, con base en silica y con 18 cadenas de carbono unidos covalentemente) (3 unid)
- Papel filtro Whatman N° 1

3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC-DAD AGILENT TECHNOLOGIES
- Espectrofotómetro único 2800 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER
- Balanza analítica H.W KESSEL S.A 0.0001g
- Rota vapor Büchi B-480
- Estufa de secado
- Sonicador
- Vortex
- Agitador magnético

3.2.4 REACTIVOS

- Etanol Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Bencina Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Cloroformo Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Éter etílico .Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Metanol Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Acetona Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Acetato de etilo Q.P.(pruebas de solubilidad)
- Acido acético Q.P. (pruebas de solubilidad)
- Acetato de sodio Q.P. (pruebas de solubilidad)

- Buffer pH 1.0 (0.025 M cloruro de potasio)
- Buffer pH 4.5 (0.4 M acetato de sodio)
- Agua destilada (5 L)
- Acido clorhídrico(20 ml)
- Cloruro de potasio (15 ml)
- Acido ascórbico (cantidad suficiente para la curva estándar)
- Persulfato potásico(500 mg)
- ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
- Hidróxido de sodio 2M , 0.01 N
- Alcohol amílico Q.P(reacción de identificación)
- Amoniacó Q.P.(reacción de identificación)

3.2.5 OTROS MATERIALES

- Parafina
- Papel aluminio

3.3 METODOLOGÍA.

3.3.1 TIPO DE ESTUDIO

Para el estudio comparativo de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos antociánicos por los métodos químicos ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y para la caracterización de las antocianidinas por HPLC se realizó un estudio correlacional con diseño cuasi experimental prospectivo, se dice que es un estudio cuasi experimental porque se manipula una variable independiente (extracto antociánico) que afecta a la variable dependiente (actividad antioxidante *in vitro* y caracterización de las antocianidinas).

3.3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Para determinar la actividad antioxidante del extracto antociánico, Se propone un diseño con postprueba únicamente.

A.- Actividad antioxidante *in vitro*

A.1. MÉTODO ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).

G₁ X O₁

G₂ -- O₂

Donde:

G₁: Tubos de ensayo con el reactivo radical de ABTS.

G₂: Tubos de ensayo con el reactivo radical de ABTS.

X: Tratamiento antioxidante (patrón-ácido ascórbico, extracto antociánico de los frutos de cada una de las especies vegetales).

O₁: Medición de la absorbancia (lectura en el espectrofotómetro).

O₂: Medición de la absorbancia (lectura en el espectrofotómetro).

--: Ausencia de tratamiento antioxidante.

A.2. METODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

G₁ X O₁

G₂ -- O₂

Donde:

G1: Tubos de ensayo con el reactivo DPPH.

G2: Tubos de ensayo con el reactivo DPPH.

X: Tratamiento antioxidante (patrón –ácido ascórbico, extracto antociánico de los frutos de cada una de las especies vegetales).

O1: Medición de la absorbancia (lectura en el espectrofotómetro).

O2: Medición de la absorbancia (lectura en el espectrofotómetro).

--: Ausencia de tratamiento antioxidante

3.4 DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS

3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS

A.- VARIABLES INDEPENDIENTES

- Extracto antociánico de los frutos de cada especie vegetal para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*.

B.- VARIABLES DEPENDIENTES

- Actividad antioxidante *in vitro* del extracto antociánico de cada especie vegetal por los métodos químicos ABTS y DPPH.
- Caracterización de las antocianidinas por HPLC.

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

A.-VARIABLES INDEPENDIENTES

A.1. Extracto antociánico:

Definición conceptual: Cantidad de antocianinas presentes en el extracto del pigmento de los frutos de las tres especies vegetales, se calculará por el método de pH diferencial.

Definición operacional:

Naturaleza: Cuantitativa.

Medida: Indirecta

Escala: Razón

Procedimiento de medición: Los tubos de ensayo con contenido de los extractos de frutos de las tres especies, serán llevadas a pH 1.0 y 4.5, cuya absorbancia será medida en el espectrofotómetro.

Instrumento: Espectrofotómetro.

Expresión final: Contenido de antocianinas monoméricas expresadas como (p/p).

B.- VARIABLES DEPENDIENTES

B.1.-Actividad antioxidante *in vitro*

Definición conceptual:

Es la capacidad que tienen las sustancias polifenólicas como las antocianinas que se encuentran en el extracto de los frutos de impedir o retardar la oxidación de sustancias que lo realizan espontánea o intencionalmente. (Hernandez, 2001)

Definición operacional:

Naturaleza: Cuantitativa.

Medida: Indirecta

Escala: Razón

Procedimiento de medición: La actividad antioxidante de los extractos antocianínicos de los frutos de las especies *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), se determinará de acuerdo a la disminución de la formación de los radicales libres detectados espectrofotométricamente por la medición de absorbancia, que se detectará mediante el viraje de colores.

Instrumento: Espectrofotómetro.

Expresión final: Porcentaje de inhibición de radicales libres de DPPH y ABTS producido por los extractos antocianínicos de cada especie vegetal.

B.2.-Caracterización de las antocianidinas

Definición conceptual:

Es la identificación de las antocianidinas presentes en los frutos de especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).

Definición operacional:

Naturaleza: Cualitativa.

Medida: Indirecta

Escala: Nominal

Procedimiento de medición: Comparación de las áreas de los picos del cromatograma obtenido al correr las muestras hidrolizadas del extracto antociánico de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), con el área del pico estándar o patrón *Vitis vinifera* (Uva) y *Fragaria vesca* (Fresa).

Instrumento: HPLC-DAD (Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con detector con arreglo de fotodiodos)

Expresión final: Número de picos presentes en los cromatogramas HPLC-DAD

CUADRO 3.1

RESUMEN DE LAS VARIABLES

VARIABLES		DEFINICIÓN OPERACIONAL						
		DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESION FINAL
VARIABLE INDEPENDIENTE	Extracto antocianico de los frutos de cada una de las especies vegetales.	Solución obtenida por varios procesos fitoquímicos que contiene antocianinas y otras sustancias polifenólicas presentes en los frutos de las especies vegetales	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Método de pH Diferencial	Espectrofotómetro	Contenido de antocianinas (p/p)
VARIABLES DEPENDIENTES	Actividad antioxidante del extracto antocianico de las especies vegetales por los métodos ABTS y DPPH	Capacidad de las antocianinas y otras sustancias polifenolicas de impedir o retardar la oxidación de sustancias que lo realizan espontanea o intencionalmente.	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Disminución de radicales libres detectados por la variación en la absorbancia	Espectrofotómetro	% de inhibición de radicales libres
	Caracterización de las antocianidinas	Identificación de las antocianidinas presentes en los frutos de las especies vegetales	Cualitativa	Indirecta	Nominal	Comparación del área del pico del cromatograma de la muestra hidrolizada con el área del pico del estándar	HPLC-DAD	Número de picos presentes en los Cromatogramas HPLC-DAD.

Fuente: Elaboración propia

3.5 VARIABLES NO IMPLICADAS

C.1.- Variables intervinientes.

C.1.1 De las especies vegetales: *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

- **Altitud de la zona de recolección:** Las especies vegetales en estudio fueron recolectados en el distrito de Sicuani, provincia de Canchis, departamento de Cusco, que se encuentran entre los 3400–3600 m.s.n.m. y distrito de Zurite, provincia de Anta, departamento de Cusco, altitud de 3391 m.s.n.m.
- **Órganos de la planta:** Se trabajaron con los frutos maduros de cada especie.
- **Periodo de crecimiento:** Todas las especies se recolectaron en la etapa de madurez y donde cada especie tenga frutos con la máxima coloración violácea, roja.

3.6 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

A.- DE LAS ESPECIES VEGETALES:

- **Se incluyeron** los frutos maduros con una coloración intensa (violácea, roja), sanos y libres de contaminación biológica (bacterias, parásitos, hongos) de las especies, *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).
- **Se excluyeron** los frutos que se encuentren dañados, inmaduros y contaminados biológicamente de las especies, *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).

LUGAR DE EJECUCIÓN.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad (HPLC), Laboratorios del Departamento Académico de Química, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

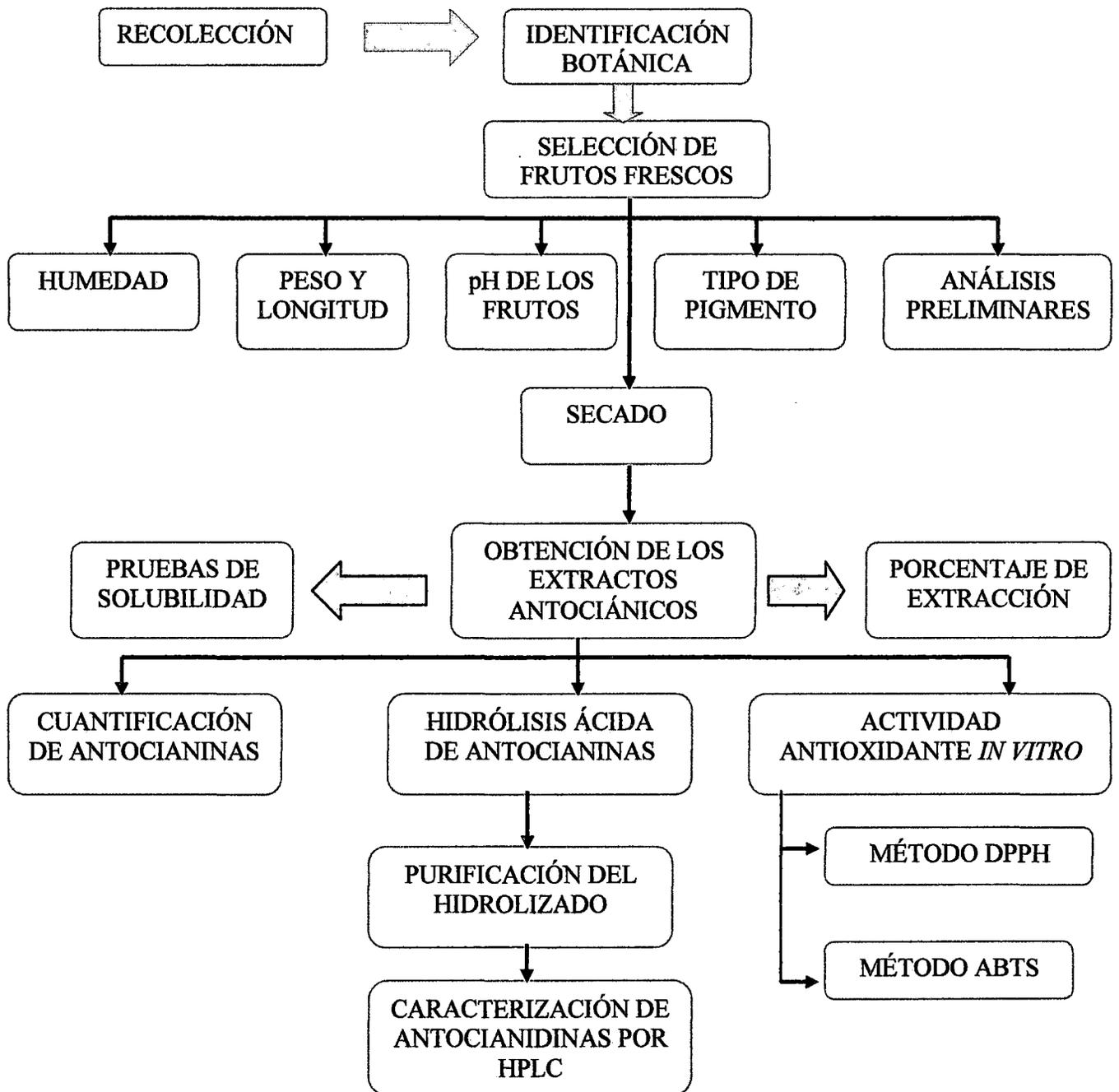
La recolección de los frutos de las especies vegetales se realizó en el distrito de Sicuani, provincia de Canchis y en el distrito de Zurite, provincia de Anta, Departamento de Cusco.

3.7 PROCEDIMIENTO

Para la preparación de la muestra, extracción, identificación botánica y actividad antioxidante de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), se trabajo de la siguiente forma:

FLUJOGRAMA 3.1

ESQUEMA DE LA INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaboración propia

3.7.1 RECOLECCIÓN DE LOS FRUTOS DE LA TRES ESPECIES VEGETALES

La recolección de los frutos de las especies *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) se efectuó entre los meses de Marzo y Abril, en los cuales los mismos se hallaron maduros y presentaron la máxima coloración violácea. los frutos de las especies *Prunus serotina* (Capuli) y *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) se recolectó en el sector denominado Suyo distrito de Sicuani, provincia de Canchis, departamento de Cusco y los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) se recolecto en el distrito de Zurite, provincia de Anta, departamento de Cusco .

3.7.2 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD Y PESO DE LOS FRUTOS FRESCOS.

La longitud de los frutos se determinó utilizando un vernier, midiendo el largo de los frutos.

El peso de los frutos se determinó con la ayuda de la balanza analítica que tiene una sensibilidad de 0.0001g.

3.7.3 DETERMINACIÓN DEL pH.

Se determinó directamente con el uso de un pH metro; utilizando el jugo de los frutos obtenidos por pulpación de los mismos.

3.7.4 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE PIGMENTO.

Para conocer el tipo de pigmento presente en los frutos de las especies *Prunus serotina* (Capuli), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) se utilizaron algunos ensayos (Cuadro 3.2), para diferenciar los pigmentos betaciánicos de los antociánicos.

CUADRO 3.2

PROCEDIMIENTOS COMUNES PARA DIFERENCIAR PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS Y BETACIÁNICOS

Ensayo	Respuesta de las antocianinas	Respuesta de las betacianinas
I.-Calentar con HCL2M durante 5 min a 100°C	Color estable	Color se desvanece
II.-Adicionar gotas de NAOH 2M	Decoloración lenta pasando de rojo a violeta – azul-verde hasta amarillo	Color cambia a amarillo
III.- Re acidificar la solución alcalina después de unos minutos	El color rojo puede ser regenerado con acidificación	El color rojo no es regenerado con la acidificación.
IV.-Distribuir entre agua y alcohol amílico	La fase alcohol amílico adquiere color rojo a PH acido.	La fase alcohol amílico no adquiere color rojo
V.-Adicionar amoniaco	Se aprecia igual comportamiento que con adición de NaOH	El color permanece violeta por algún tiempo en frío

Fuente: Lock, 2004

3.7.5 CARACTERÍSTICAS DE SOLUBILIDAD DEL PIGMENTO.

Se realizaron pruebas cualitativas de solubilidad, para lo cual se usaron diferentes solventes polares como el agua, etanol, metanol, y solventes no polares como cloroformo, bencina, acetona, éter etílico, acetato de etilo, las cuales se agregaron en orden de polaridad descendente .

3.7.6 ESTUDIOS PRELIMINARES EN FRUTOS DE LAS ESPECIES VEGETALES *Prunus serotina* (Capulí), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).

3.7.6.1 Determinación del contenido de humedad.

Se pesó en una cápsula de aluminio previamente tarado y desecado, una cantidad de 2 g de fruto fresco de cada muestra vegetal. Las cápsulas permanecieron en estufa a 105°C durante 12 horas, después se pesó.

Se volvió a introducir la cápsula en la estufa por 1 hora más y se pesó. Se repitió la operación hasta que la muestra alcanzó peso constante.

Se realizó el procedimiento en triplicado y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de humedad de la muestra por diferencia de peso, tal como se muestra en la fórmula (1).

$$\%H = \frac{(\text{Peso inicial muestra} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial muestra}} * 100 \Rightarrow (1)$$

3.7.6.2 Determinación de cenizas totales.

Se pesó 1 g de muestra seca, en una cápsula de incineración de porcelana. Se procedió a incinerar la muestra en una mufla, cuidando que a 550°C hasta que la ceniza adquirió un color blanco grisáceo. Se sacó de la mufla hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó.

Se repitió el procedimiento en triplicado y se calculó por medio de la fórmula (2) el porcentaje de cenizas en la muestra.

$$\%C = \left(\frac{\text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} \right) * 100 \Rightarrow (2)$$

3.7.6.3 Determinación de nitrógeno total (o proteínas) por el método Kjeldahl

Se pesó 0.02g de cada muestra y se depositó en los tubos de digestión Kjeldahl agregando 10ml de H₂SO₄ concentrado, CuSO₄, SeO₂, K₂O, Al₂(SO₄)₃.18H₂O. Se llevó a digestión en la unidad digestora, aumentando la temperatura gradualmente hasta alcanzar el máximo y se mantuvo por 12 horas hasta que la solución se observó clara. Se retiró el tubo de digestión y dejó enfriar a temperatura ambiente, adicionando 10 mL de agua destilada. Se ubicó el tubo de digestión en la unidad de destilación y se dejó caer una carga de 80 mL de NaOH al 40% sobre el tubo.

Luego de recibir el condensado, se procedió a titular con HCl 0.05 N estandarizado previamente.

Se realizó el procedimiento en un blanco y se determinó la concentración en blanco para realizar la corrección del porcentaje de nitrógeno que contiene la muestra

Se transformó el porcentaje de proteína bruta multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor convencional (formula (3)) para el tipo de muestra analizada.

$$\%N = \frac{[(\text{Volumen de HCl gastado} - \text{Volumen blanco}) * \text{NHCl} * 14]}{(\text{Peso muestra} * 1000)} * 100$$

$$\%P = \%N * 6,25 \quad (3)$$

3.7.6.4 Determinación de fibra

Se pesó 1 g de muestra seca y desgrasada y se vació al matraz Erlenmeyer de 100 ml y se agregó 10 ml de NaOH 1N se procedió a calentar suavemente.

La mezcla se filtró en el equipo de filtración utilizando como medio filtrante un papel filtro, donde el matraz se enjuagó con agua destilada. Se repitió el lavado con agua destilada hasta que el filtrado este transparente, en seguida se secó el papel filtro en estufa y se pesó.

Se realizó el procedimiento en triplicado y se calculó el contenido de fibra bruta como indica la formula (4).

$$\%F = \frac{\text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} * 100 \Rightarrow (4)$$

3.7.6.5 Determinación de grasa

Se pesó 2 gr de muestra ,se procedió a triturar , después se agregó 4ml de benceno ,se dejo en reposo 24h, al día siguiente se filtró las muestras , luego se llevó a un desecador para evaporar el benceno , finalmente se pesó y se calculó el contenido de grasa con la formula (5) .

$$\%G = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} * 100 \Rightarrow (5)$$

3.7.6.6 Determinación de acidez

Se pesó 1 g de muestra, se trituro y agregó 10 – 15 ml de agua destilada, se hizo calentar por 5-10 min, se dejo enfriar y se procedió a la titulación con NaOH 0.1 N con indicador fenolftaleína 3 gotas, se calculo la acidez con la formula (6)

$$\%A = \frac{(\text{Peso molecular ácido cítrico} * \text{Vol gastado NaOH} * N \text{ NaOH})}{1000} * 100 \Rightarrow (6)$$

3.7.6.7 Determinación de carbohidratos

Los carbohidratos fueron calculados con la siguiente fórmula (7):

$$\text{Proteínas} + \text{fibra} + \text{humedad} + \text{grasa} + \text{carbohidratos} = 100 \quad (7)$$

Para lo cual los resultados de proteínas, fibra, humedad, grasa, fueron importantes.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.8.1 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DESCRITO POR WROLSTAD Y COL; DE LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES Y PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.

La extracción del pigmento se desarrolló siguiendo el método descrito por Wrolstad y col, en este método, la acetona extrae las antocianinas y el cloroformo además de aislar parcialmente el pigmento. Esta adición del cloroformo da como resultado una fase de separación entre la porción acuosa que contiene (antocianinas, fenólicos, azúcares, ácidos orgánicos y otros componentes polares) y la mayor fase que contiene (solventes inmiscibles, lípidos, carotenoides, pigmentos clorofílicos y otros compuestos no polares). Este método tiene la ventaja de producir un extracto sin contaminantes lipofílicos.

• PROCEDIMIENTO

1. Los frutos secos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) y el fruto seco sin semilla de *Prunus serotina* (Capuli), fueron triturados en una licuadora usando una solución acuosa de acetona (70% v/v) en una proporción 1:1 de material vegetal y solvente.
2. El extracto obtenido se filtró a través de papel Whatman usando un embudo Buchner y una bomba de succión, realizándose la re-extracción con la solución acuosa de acetona (70% v/v), hasta obtener una solución incolora de cada especie vegetal.
3. Los filtrados se trasvasaron a una pera de decantación siendo diferentes para cada especie vegetal, añadiéndose 2 volúmenes de cloroformo con agitaciones suaves de arriba hacia abajo varias veces, luego se dejó en reposo toda la noche en una refrigeradora a una temperatura de 10 °C o hasta que se formen dos fases.
4. La porción acuosa (fase superior) fue colectada y colocada en un rotavapor a 40°C, se realizó la evaporación hasta que el extracto este seco.

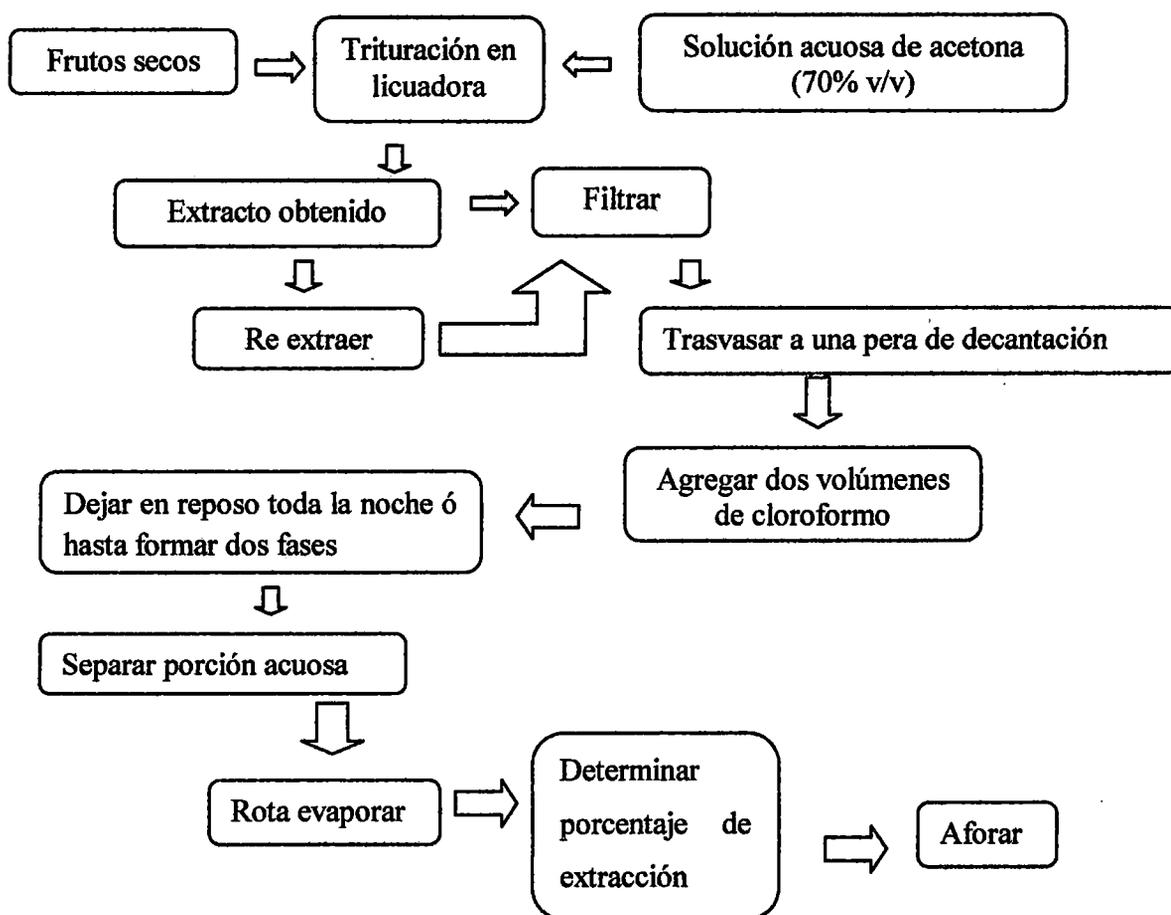
5. Se pesó el extracto seco obtenido y se determinó el porcentaje de extracción mediante la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} * 100$$

6. Se aforó cada extracto seco a un volumen conocido con agua destilada acidulada (25 ml) para *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) y *Prunus serotina* (Capuli), (50 ml) para *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).

FLUJOGRAMA 3.2

OBTENCION DEL EXTRACTO ANTOCIANICO



Fuente: Elaboración propia.

3.8.2 CUANTIFICACIÓN DEL TOTAL DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL. (Wroslstad , Ronald E; Durst, Robert W; Giusti , Monica M ;Rodriguez Saona,L.E.(2002))

FUNDAMENTO

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma de oxonio coloreado predominan a pH 1 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5

El método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas, incluso en presencia de pigmentos degradados, polimerizados y otros componentes interferentes.

Se utilizó un espectrofotómetro UV –visible, las mediciones fueron realizadas a 520 nm (máxima longitud de onda determinada) y a 700 nm.

El contenido de antocianinas monoméricas fue calculado como Cianidina -3-glucósido, usando como coeficiente de extinción molar $26900 \text{ L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ y como peso molecular 449.6 g mol^{-1} .

PROCEDIMIENTO

- Se pesó una cantidad conocida de frutos secos de las especies en estudio, con las cuales se procedió a la extracción de los pigmentos en acetona:cloroformo y se aforó a volumen conocido de solución.
- Se determinó el factor de dilución apropiado para cada una de las mezclas mediante la dilución con el buffer de cloruro de potasio pH 1 hasta que la absorbancia de cada una de las muestras a la máxima longitud de onda se encuentre dentro del rango lineal del espectrofotómetro. Se divide el volumen final de la muestra entre el volumen inicial para obtener el factor de dilución.
- Se prepararon 2 diluciones de cada una de las muestras, una usando el buffer cloruro de potasio pH 1, y la otra usando buffer acetato de sodio pH 4.5, diluyendo cada uno con el factor de dilución previamente determinado. Dejando equilibrar estos diluciones durante 15min.
- Se midió la absorbancia de cada dilución y la máxima longitud de onda determinada, en nuestro caso 520nm y a 700nm, usando como blanco agua destilada. (Todas las lecturas se realizaron entre 15 y 60 min. luego de realizada la preparación). Se debe tener en cuenta que al realizar la lectura en el

espectrofotómetro en el rango de 520nm–700nm se debe obtener una absorbancia menor a 0.8 para así cumplir con la Ley de Beer

- Se calculó la absorbancia de la muestra diluida con la siguiente fórmula(8):

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5} \quad (8)$$

Donde:

$A_{\lambda_{\text{vis-max}}}$: Lectura del pico mas alto a pH 1 y pH 4.5

$A_{700\text{nm}}$: Lectura a 700 nm a pH1 y pH 4.5

- Se calculó la concentración de antocianinas usando la siguiente fórmula(9):

$$\text{Contenido de antocianinas (p/p)} = \frac{A}{\epsilon L} * MW * DF * \frac{V}{Wt} * 100\% \quad (9)$$

A= Absorbancia de la muestra.

MW= Peso molecular de la Cianidina-3-glucósido (449.6 g/mol).

DF= Factor de dilución.

V= Volumen final en ml.

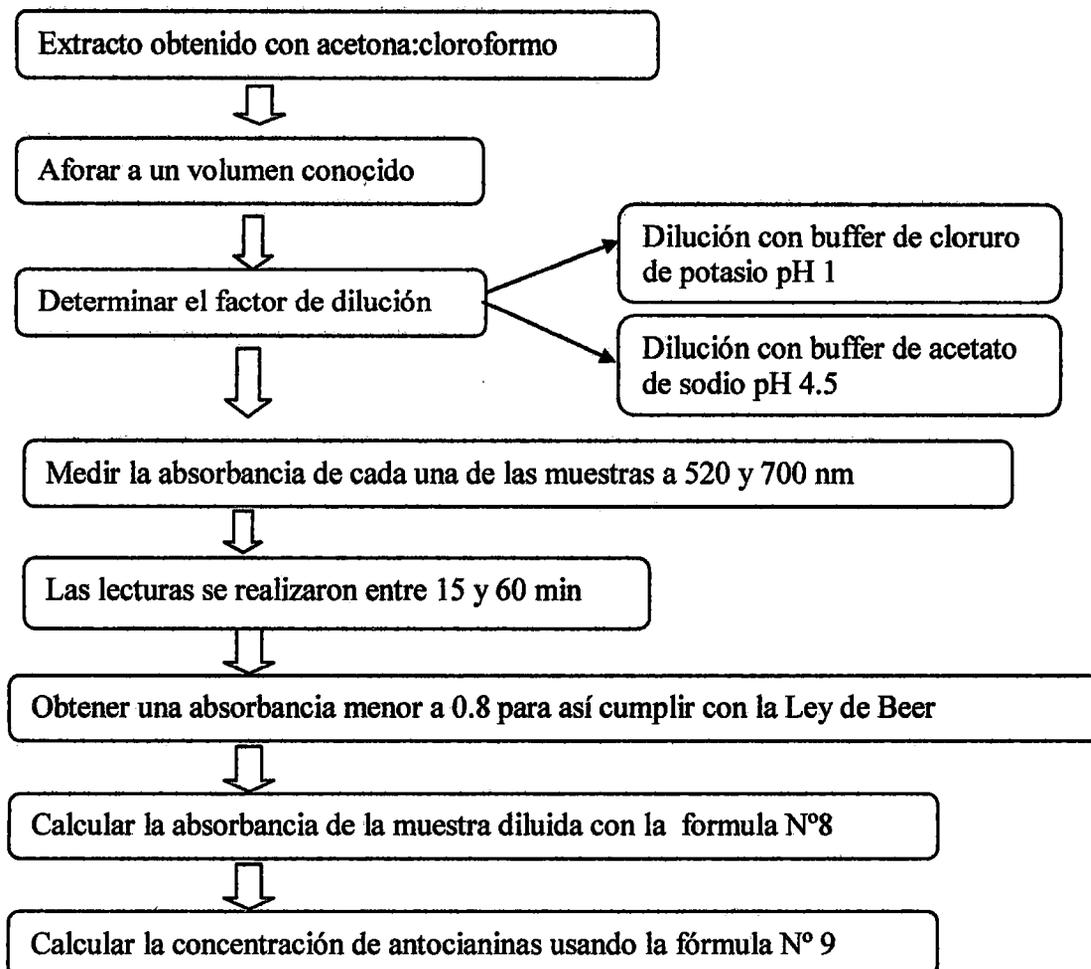
Wt= Peso de la muestra en mg.

ϵ = Absortividad molar de la Cianidina-3-glucósido (26900 L cm⁻¹mol⁻¹).

l= Grosor de la cubeta (1cm)

FLUJOGRAMA 3.3

CUANTIFICACIÓN DEL TOTAL DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL.



Fuente: Elaboración propia.

3.8.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES, POR LOS MÉTODOS ABTS Y DPPH

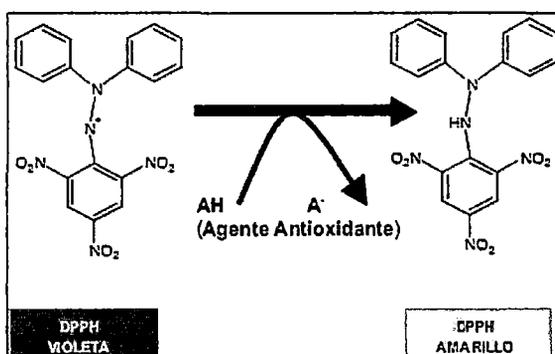
3.8.3.1 MÉTODO DEL DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo). (Brand-Williams y col., 1995)

FUNDAMENTO: Este ensayo evalúa la capacidad donante de protones o de captación de radicales libres de un posible antioxidante en donde el radical estable DPPH se decolora en presencia de estos compuestos.

El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al., DPPH, consiste en que este radical libre estable; 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta en solución metanólica, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante, La reducción del (DPPH•) se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el (DPPH•) absorbe a 517 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorbancia disminuye. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

FIGURA 3.1

Reacción del radical DPPH con la sustancia antioxidante



Fuente: Molyneux, 2004

PROCEDIMIENTO:

- Preparamos una solución de DPPH 0.1mM en metanol y una solución de buffer acetato pH 6.
- Se prepararon tubos con los extractos antociánicos obtenidos en 3.1.13, de acuerdo al número de concentraciones de los extractos a evaluar, guiarse de las tablas. Dado que el color de los extractos antociánicos puede interferir con la lectura se prepara un blanco de muestra para cada uno de los tubos.
- Los reactivos se mezclaron de acuerdo a las tablas, se agitaron vigorosamente en un vortex por espacio de 10 segundos.
- Los tubos así preparados se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos y pasado este tiempo se leyó las absorbancias a 517nm.

- Posteriormente, con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el % de captación y/o inhibición de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CAPACIDAD ANTIOXIDANTE} = \left[1 - \frac{(A_2 - A_3)}{A_1} \right] * 100$$

% INH

Donde:

A1= Absorbancia del control

A2= Absorbancia de la muestra

A3= Absorbancia del blanco de muestra

Ácido ascórbico al 100µg/ml:

Se pesó 0.001g de ácido ascórbico para luego disolverlo en 10 ml de metanol. Se elaboró la curva estándar realizando varias diluciones de esta solución madre para obtener diferentes concentraciones. (Almacenar la solución de ácido ascórbico en frascos de color ámbar o protegidas de la luz, máximo 10 días).

FLUJOGRAMA 3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES, POR LOS MÉTODOS ABTS Y DPPH

- **MÉTODO DEL DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).**

Preparar solución DPPH 0.1mM en metanol y una solución buffer acetato pH 6



Preparar tubos con los extractos antociánicos, de acuerdo al número de concentraciones de los extractos a evaluar. (Ver tablas)



Los reactivos se mezclan de acuerdo a las tablas, se agitan vigorosamente en un vortex por espacio de 10 segundos.



Mantener los tubos en la oscuridad x 30 min



Leer las absorbancias a 517 nm



Determinar el % de captación y/o inhibición de radicales libres (DPPH) mediante la fórmula N° 10

CUADRO 3.3

Procedimiento para la preparación de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)						
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN METANOL (ml)	VOLUMEN AMORTIGUADOR (ml)	VOLUMEN DPPH (ml)	VOLUMEN FINAL (ml)
Blanco	0	0	1.500	0.5	0.0	2.0
Control	0	0	0.500	0.5	1.0	2.0
T1	0.001674	0.001	0.499	0.5	1.0	2.0
T2	0.003348	0.002	0.498	0.5	1.0	2.0
T3	0.005022	0.003	0.497	0.5	1.0	2.0
T4	0.007533	0.0045	0.4955	0.5	1.0	2.0
T5	0.010044	0.006	0.494	0.5	1.0	2.0
T6	0.01674	0.010	0.490	0.5	1.0	2.0
T7	0.02511	0.015	0.485	0.5	1.0	2.0

Fuente: Brand-Williams y col., 1995

CUADRO 3.4

Procedimiento para la preparación de *Prunus serotina* (Capuli)

<i>Prunus serotina</i> (Capuli)						
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN METANOL (ml)	VOLUMEN AMORTIGUADOR (ml)	VOLUMEN DPPH (ml)	VOLUMEN FINAL (ml)
Blanco	0	0	1.500	0.5	0.0	2.0
Control	0	0	0.500	0.5	1.0	2.0
T1	0.4269	0.015	0.485	0.5	1.0	2.0
T2	0.5692	0.02	0.48	0.5	1.0	2.0
T3	0.68304	0.024	0.476	0.5	1.0	2.0
T4	0.76842	0.027	0.473	0.5	1.0	2.0
T5	0.8538	0.03	0.47	0.5	1.0	2.0
T6	1.1384	0.040	0.460	0.5	1.0	2.0
T7	1.2807	0.045	0.455	0.5	1.0	2.0

Fuente: Brand-Williams y col., 1995

CUADRO 3.5

Procedimiento para la preparación de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)

<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)						
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN METANOL (ml)	VOLUMEN AMORTIGUADOR (ml)	VOLUMEN DPPH (ml)	VOLUMEN FINAL (ml)
Blanco	0	0	1.500	0.5	0.0	2.0
Control	0	0	0.500	0.5	1.0	2.0
T1	0.04466	0.005	0.495	0.5	1.0	2.0
T2	0.08932	0.01	0.49	0.5	1.0	2.0
T3	0.116116	0.013	0.487	0.5	1.0	2.0
T4	0.13398	0.015	0.485	0.5	1.0	2.0
T5	0.17864	0.02	0.48	0.5	1.0	2.0
T6	0.26796	0.03	0.470	0.5	1.0	2.0
T7	0.35728	0.04	0.46	0.5	1.0	2.0

Fuente: Brand-Williams y col., 1995

DONDE:

T: Tubo con tratamiento.

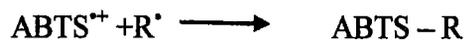
3.8.3.2 MÉTODO ABTS (Acido 2,2-Azinobis-(3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico)). (Re y col., 1999).

FUNDAMENTO:

El fundamento de este método consiste en generar el radical $ABTS^{++}$ a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y comprobar como los antioxidantes son capaces de atrapar este radical.

El radical catiónico $ABTS^{++}$ es un compuesto de color verde-azulado, con espectro de absorción en el intervalo del ultravioleta-visible, que presenta máximos a 414, 645, 734 y 815 nm. Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable, al añadir la muestra la concentración del radical disminuye y el color de la reacción desciende a medida que lo hace la concentración del radical catiónico $ABTS^{++}$, midiéndose entonces el descenso de absorbancia producido, esta absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AOH) o de un radical (R[•]):



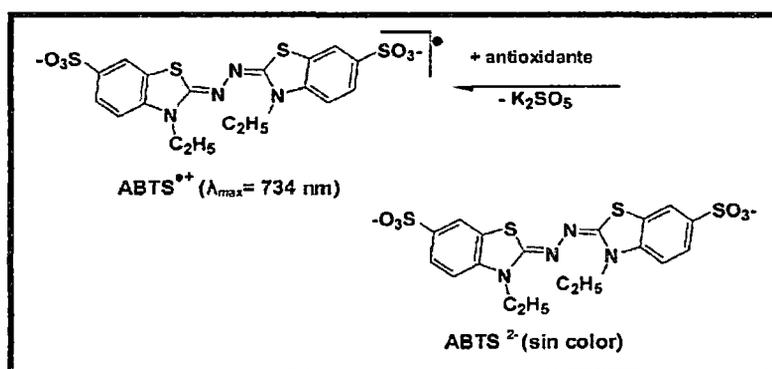


Existen diversas formas de generar el radical ABTS^{*+} , una de ellas es químicamente con persulfato potásico

El radical ABTS^{*+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7mM en agua) con persulfato potásico (2.45mM en agua) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS^{*+} se diluye con etanol, hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.02) a 734 nm

FIGURA 3.2

Reacción entre ABTS y persulfato potásico



Fuente: Huang y col., 2005

PROCEDIMIENTO:

- **Disolución de ABTS 7mM:** Se pesó 38.4 mg de sal amónica cristalizada de ABTS y se disolvió hasta un volumen de 10 ml con agua destilada.
- **Disolución de persulfato potásico 2.45 mM :** Se pesó 66.2 mg de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y se disolvió hasta un volumen de 100 ml con agua destilada.
- **Preparación de radical ABTS^{*+} :** Se hizo reaccionar el ABTS y persulfato de potásico a volúmenes iguales. Se partió de una concentración de 10 ml de ABTS 7mM y de 10 ml de persulfato potásico 2.45 mM, la reacción estequiométrica es de 1:1, la oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta 16 horas después. El radical catiónico es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad.
- **Preparación de la disolución de ABTS:** La disolución ABTS^{*+} se mezcló con etanol, hasta que su absorbancia a 734 nm sea de 0.70 (± 0.02) a 25°C .

- Se prepararon tubos con los extractos antociánicos obtenidos en 3.1.13, de acuerdo al número de concentraciones de los extractos a evaluar, guiarse de las siguientes tablas.
- Los reactivos se mezclaron de acuerdo a las tablas y se agitaron vigorosamente.
- Se midió las absorbancias de los tubos así preparados, en forma continuada durante 7 minutos a 734nm; la lectura final es la que se tomó para el cálculo del porcentaje de inhibición; se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 100 * (Abs_0 - Abs_{muestra}) / Abs_0$$

Donde:

Abs₀= Absorbancia del blanco con ABTS.

Abs_{muestra}= Absorbancia de la muestra.

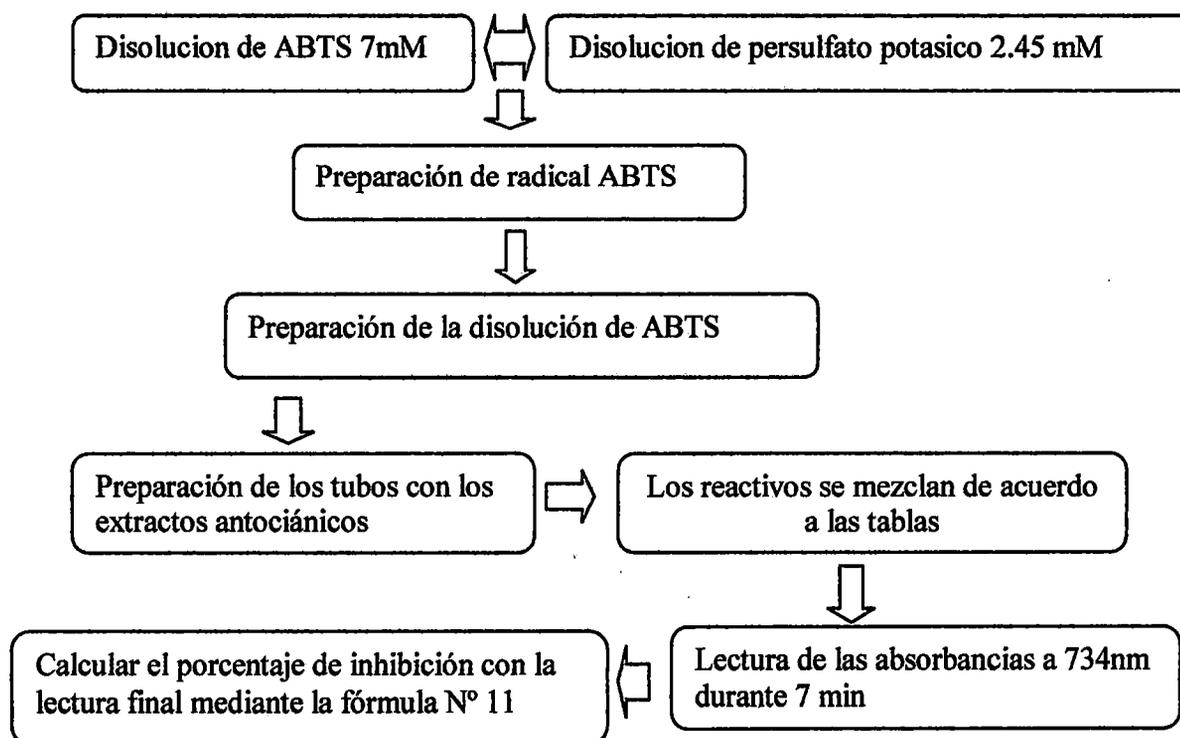
Ácido ascórbico al 200µg/ml:

Se pesó 0.002g de ácido ascórbico para luego disolverlo en 10 ml de agua destilada. Se elaboró la curva estándar realizando varias diluciones de esta solución madre para obtener diferentes concentraciones. (Almacenar la solución de ácido ascórbico en frascos de color ámbar o protegidas de la luz, máximo 10 días).

En las siguientes tablas se muestran las cantidades que se deben usar para la técnica ABTS.

FLUJOGRAMA 3.5

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS (Acido 2,2-Azinobis-(3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico).



Fuente: Elaboración propia

TABLAS GUÍA PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

CUADRO 3.6

Procedimiento para la preparación de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)				
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN ETANOL (ml)	VOLUMEN ABTS (ml)
Blanco	0	0	2.0	0
Control	0	0	0.04	1.96
T1	0.005022	0.003	0.037	1.96
T2	0.00837	0.005	0.035	1.96
T3	0.013392	0.008	0.032	1.96
T4	0.01674	0.01	0.03	1.96
T5	0.03348	0.02	0.02	1.96

Fuente: Re y col., 1999

CUADRO 3.7

Procedimiento para la preparación de *Prunus serotina* (Capuli)

<i>Prunus serotina</i> (Capuli)				
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN ETANOL (ml)	VOLUMEN ABTS (ml)
Blanco	0	0	2.0	0
Control	0	0	0.04	1.96
T1	0.2846	0.01	0.03	1.96
T2	0.5692	0.02	0.02	1.96
T3	0.8538	0.03	0.01	1.96
T4	1.423	0.05	0.00	1.96
T5	1.9922	0.07	0.00	1.96

Fuente: Re y col., 1999

CUADRO 3.8

Procedimiento para la preparación de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)

<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)				
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (ml)	VOLUMEN ETANOL (ml)	VOLUMEN ABTS (ml)
Blanco	0	0	2.0	0
Control	0	0	0.04	1.96
T1	0.08932	0.01	0.03	1.96
T2	0.13398	0.015	0.025	1.96
T3	0.17864	0.02	0.02	1.96
T4	0.26796	0.03	0.01	1.96
T5	0.35728	0.04	0.0	1.96

Fuente: Re y col., 1999

DONDE:

T: Tubo con tratamiento.

3.8.4 MÉTODO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANIDINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Hidrólisis ácida de las antocianinas.

Este método se basa en obtener los aglicones que son las antocianinas, por separación de los azúcares y otras sustancias como ácidos ligados a la estructura antocianina, con el único propósito de identificar las antocianinas presentes en el pigmento.

PROCEDIMIENTO:

1.-A 1 ml del extracto acidificado se agregó 10 ml de HCL 3N en un vial de 20 ml, luego se tapo herméticamente y se transfirió a un baño de agua hirviente, el baño de agua hirviente y los viales de las tres muestras se envolvió con papel aluminio.

2.-Se hidrolizo las tres muestras durante 45 minutos.

4.-Después se coloco los viales en un baño de hielo.

5.-El hidrolizado se aplico en el C-18 previamente activado con metanol y enjuagado con agua acidificada.

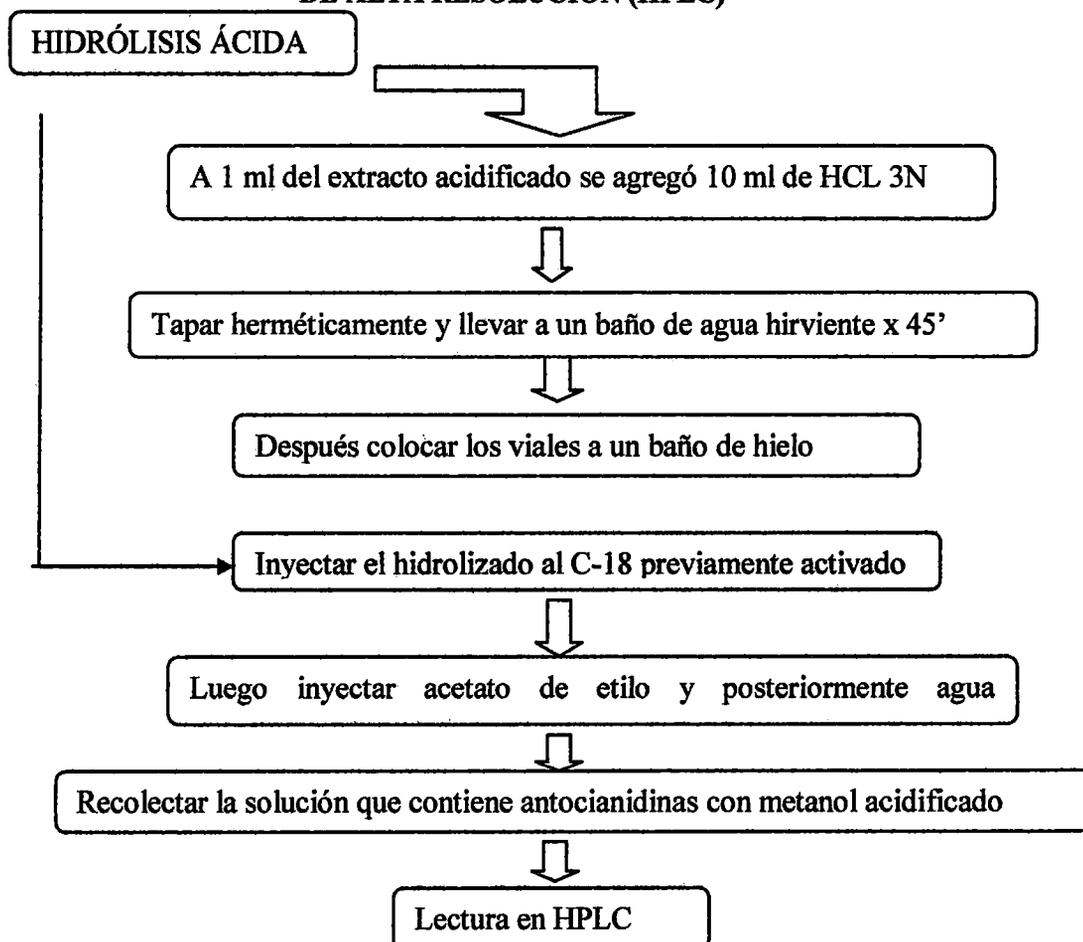
6.-Las impurezas fueron limpiadas con acetato de etilo (5ml).

7.-Se enjuago con agua acidificada (10ml).

8.-Las antocianinas se eluyeron con metanol acidificado (5 ml), se recolecto en viales de HPLC (1ml) para ser leidas en HPLC. (Hasta realizar la lectura en HPLC la muestra se almaceno en refrigeradora y en oscuridad para proteger de la luz, ya que las antocianinas son muy inestables y deben de ser analizadas preferiblemente dentro de los 60 min posteriores a su preparación).

FLUJOGRAMA 3.6

CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANIDINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)



Fuente: Elaboración propia

Caracterización de antocianidinas por HPLC

El HPLC es el método más común para realizar el análisis de antocianidinas. La muestra fue semipurificada usando un cartucho C-18 y la fracción fenólica (conteniendo antocianinas) fue eluida con metanol acidificado con HCl 1%, se Utilizó agua acidificada con HCl 0,01% para lograr un volumen conocido.

La separación de las antocianidinas se llevó a cabo en una columna C-18 eclipse XDB - C18 (2.1mmx 150mm, 5µm) usando un sistema HPLC AGILENT TECHNOLOGIES, equipado con un detector con arreglo de diodos (DAD).

La presión de trabajo fue de 137.3 – 107.9 bar, el rango de flujo fue 0.5 mL/min; la fase móvil fue una mezcla de eluyente A(ácido fórmico al 10% en agua grado HPLC) y B (acetonitrilo); la gradiente a utilizar fue : 0 min 96%A y 4% de B; 2 min 96%A y

4%B;2.01min 92%A y 8%B;3min 92%A y 8%B;4.01min 88%Ay12%B;20min 84%Ay16%B;25min 84%Ay16%B;25.01min 0.0%A y 100%B y a los 30.01min 96%A y 4%B

Se estableció un rango de flujo adecuado para obtener la separación adecuada de las antocianidinas presentes y se monitorizo a 520 nm, con un volumen de inyección de 2ul de muestra.

Establecimos como rango de flujo 0.5 ml /min, usando como fase móvil dos solventes: A: acido fórmico al 10 % en agua de grado HPLC

B: acetonitrilo

CUADRO 3.9
Preparación de los gradientes

Tiempo (min)	Porcentaje de A	Porcentaje de B
0.00	96.00	4.00
2.00	96.00	4.00
2.01	92.00	8.00
3.00	92.00	8.00
4.01	88.00	12.00
20.00	84.00	16.00
25.00	84.00	16.00
25.01	0.00	100.00
30.01	96.00	4.00

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 3.10
Condiciones para el análisis de HPLC

INSTRUMENTO	HPLC con detector DAD
COLUMNA	Eclipse XDB-C18 column,2.1mm x150mm,5um
RANGO DE FLUJO	0.5ml/min
FASE MOVIL	A=acido fórmico al 10%en agua de grado HPLC; B=acetonitrilo
GRADIENTE	0 min 96%A y 4% de B; 2 min 96%A y 4%B;2.01min 92%A y 8%B;3min 92%A y 8%B;4.01min 88%Ay12%B;20min 84%Ay16%B;25min 84%Ay16%B;25.01min 0.0%A y 100%B y a los 30.01min 96%A y 4%B.

Fuente: Datos experimentales

La identificación de los picos de las antocianidinas fue realizada en base a la comparación de los cromatogramas y tiempos de retención de los extractos concentrados de antocianidinas de las especies (uva, fresa), corridos bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente para tener patrones de comparación que nos ayudaron a identificar los picos del cromatograma.

Los 5 aglicones (antocianidinas) patrón fueron de las especies *Vitis vinifera* (Uva), y son cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina y petunidina, en tanto que la antocianidina presente en *Fragaria vesca* (Fresa) es la pelargonidina que no se encuentra presente en *Vitis vinifera* (Uva).

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV
RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

CUADRO 4.1

DE LA DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD Y PESO DE LOS FRUTOS FRESCOS
DE *Prunus serotina* (Capulí), *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) y *Monnina salicifolia*
(Aceitunilla)

Fruto <i>Prunus serotina</i> (Capulí)	Longitud (mm)	Peso (g)
Fruto 1	11.00	0.71
Fruto 2	10.00	0.59
Fruto 3	10.40	0.68
Fruto 4	10.30	0.63
Fruto 5	10.00	0.57
Promedio	10.34	0.64
Fruto <i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	Longitud (mm)	Peso (g)
Fruto 1	5.70	0.08
Fruto 2	6.00	0.10
Fruto 3	6.50	0.11
Fruto 4	5.80	0.09
Fruto 5	6.00	0.10
Promedio	6.00	0.096
Fruto <i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	Longitud (mm)	Peso (g)
Fruto 1	6.80	0.15
Fruto 2	6.50	0.12
Fruto 3	6.00	0.09
Fruto 4	5.70	0.07
Fruto 5	6.00	0.08
Promedio	6.20	0.10

Fuente: Datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión.

De acuerdo al cuadro 4.1 se puede apreciar que los frutos de *Prunus serotina* (Capuli) presenta una mayor longitud (10.34 mm) y mayor peso (0.64 g) seguido de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) y *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) respectivamente.

La longitud y el peso de los frutos varia en cada especie vegetal, esta diferencia de pesos puede deberse a la mayor cantidad de sustancias de síntesis dependiendo en la fase en que se encuentre el fruto. El crecimiento de las bayas tiene un patrón definido y se presenta en tres fases

Durante la primera fase de crecimiento, se puede observar que el contenido de clorofila total aumenta, teniendo el fruto una coloración verde, en esta fase de crecimiento acelerado hay un predominio de la síntesis de clorofilas sobre la de antocianinas. Lo más probable es que en esta fase se haya estimulado la síntesis de hormonas de crecimiento que provocan una rápida división celular. (Coombe, B. G. 1960)

En la segunda fase o de reposo aparente se produce una disminución del contenido de clorofila, pero la síntesis de antocianinas no es estimulada. (Vickery, H. B. 1952)

Esta fase puede caracterizarse también por una movilización de sustancias orgánicas hacia las semillas que muestran su máximo crecimiento en el fruto. Esta situación puede sugerir que se establezca una posible competencia entre las semillas y el fruto por los metabolismos orgánicos (Tukey, H. B. 1933)

En la tercera fase de crecimiento, se observe que el crecimiento rápido del fruto está acompañado por un incremento de la síntesis de antocianinas y el cambio de color rojo a púrpura oscuro ocurre poco antes que la tasa de crecimiento disminuya, (Boynton, D. 1959).

En esta tercera fase de crecimiento las fitohormonas podrían estimular el crecimiento rápido del fruto a través de un incremento en el alargamiento celular. El aumento rápido en la concentración de los azúcares reductores al final de la tercera fase de crecimiento podría deberse a una mayor translocación de fotosintetatos hacia el fruto o a que ciertos polisacáridos de reserva de las células se hidrolicen.

Este aumento de la concentración de azúcares traería como consecuencia una disminución en el potencial osmótico y por lo tanto un aumento en el peso fresco del fruto producido por un incremento en la capacidad de retención de agua del mismo (Coombe, B. G. 1960).

CUADRO 4.2
DE LA DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES

FRUTOS FRESCOS	pH
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	4.99 (ÁCIDO)
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	5.75 (ÁCIDO)
<i>Prunus serotina</i> (Capuli)	5.49 (ÁCIDO)

Fuente: Datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión.

El pH encontrado en los frutos de las tres especies vegetales es ácido, siendo mayor el de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), seguido de los frutos de *Prunus serotina* (Capuli) y *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) respectivamente.

El pH vacuolar varía generalmente con la edad de la planta entre 4.5-5.5 (Cooper-Driver, G; 2001)

En la segunda fase de crecimiento del fruto el pH decrece gradualmente y esto se puede deber a un incremento en la síntesis de ácidos orgánicos del ciclo de los ácidos tricarbónicos o a una fijación de CO₂ en el ácido málico. (Vickery, H. B. 1952).

La composición química del suelo puede afectar no solo al desarrollo y, por tanto, a la composición química de las plantas, sino también puede ser un factor que limite su crecimiento. El pH del suelo, que depende de la composición del mismo, es una importante variable a tener en cuenta. (Villar Del Fresno, 1999)

CUADRO 4.3
RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS PRELIMINARES DE LOS FRUTOS DE LA TRES ESPECIES VEGETALES

ESTUDIOS PRELIMINARES	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	<i>Prunus serotina</i> (Capuli)
Humedad %	24.80	28.00	15.00
Proteínas %	38.50	14.21	24.30
Grasa %	0.015	0.81	0.14
Ceniza%	1.00	1.00	1.00
Fibra %	2.30	4.60	4.00
Carbohidratos%	33.00	51.00	55.00
Acidez % (ácido cítrico)	0.49	0.56	0.48

Fuente: Datos experimentales

Nota: Los análisis fueron realizados en frutos parcialmente secos.

Análisis, Interpretación y Discusión.

En el cuadro 4.3 se muestran los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos de los cuales se puede observar que existen diferencias al respecto de las tres especies vegetales.

Humedad: Se observa que esta en el rango de 15-28 % para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).

Las frutas y las hortalizas pueden contener hasta un 90% o más de agua. El agua afecta a las condiciones de conservación de los alimentos, y por esta razón se elimina de los mismos. La eliminación del agua conduce, por tanto, a la inhibición de muchas reacciones y del crecimiento de microorganismos, consiguiéndose con ello un aumento en la vida útil de gran cantidad de alimentos (Guerra, 2005).

Son valores bajos puesto que los análisis fueron hechos en frutos parcialmente secos.

Proteínas: Los resultados están en el rango de 14.21-38.5% para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).

Las proteínas de mayor interés son las enzimas siendo responsables de la síntesis de principios activos cuando la planta vive y dan lugar a modificaciones y degradaciones de los mismos si la planta se corta (Villar Del Fresno, 1999)

Grasa: Se encuentra en el rango de 0.015-0.14% para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).

Los lípidos forman parte de la paredes celulares, fosfo y glicolipidos de membranas, ceras, cuando existe alto contenido de grasas pueden dar lugar a procesos de oxidación durante el almacenamiento por lo que se producen fenómenos de enranciamiento (Villar Del Fresno, 1999)

Ceniza: Todas las especies vegetales reportan el mismo contenido de ceniza de 1.00%

Las cenizas representan el contenido en minerales del alimento, en general las cenizas suponen menos del 5% (Vasco, 2008)

La incineración de las drogas vegetales produce una ceniza inorganica que se componen de carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice. (Villar Del Fresno, 1999)

Fibra: Se encuentra en el rango de 2.3-4.6% para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla).

Los componentes de la fibra vegetal que podemos encontrar en las frutas son principalmente: celulosa, pectinas y hemicelulosa. En la piel de la fruta, es donde se

encuentra mayor concentración de fibra. (Guerra, 2005)

Carbohidratos: Se encuentra en el rango de 33-55% para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Prunus serotina* (Capuli).

En general los alimentos vegetales tienen una elevada proporción de carbohidratos, esta fracción se compone principalmente de azúcares libres; disacáridos y monosacáridos y otros carbohidratos digeribles. (Guerra, 2005)

Acidez: Se encuentra en el rango de 0.48-0.56% para las especies vegetales estudiadas, siendo mayor el de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a).

La acidez titulable es un porcentaje de peso de los ácidos contenidos en el producto. En las frutas verdes dominan los ácidos sobre los azúcares solubles y en las frutas maduras aumentan los azúcares solubles y disminuyen un poco los ácidos. Los ácidos orgánicos que se encuentran en las frutas son el ácido cítrico, el ácido málico, el ácido tártrico y en algunas frutas hay ácido benzoico y ácido oxálico. El sabor ácido de las frutas está en relación con la proporción que hay entre azúcares solubles que contiene. (Fennema, 1993)

CUADRO 4.4

DE LA DETERMINACION DEL TIPO DE PIGMENTO (ANTOCIANINAS O BETACIANINAS) EN LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES

Ensayo	Presencia de antocianinas	Presencia de betacianinas
I. Calentamiento con HCl 2M durante 5 min en baño maria a punto de ebullición.	++++	---
II. Adición de gotas de NaOH 2M	++++	---
III. Reacidificación de la solución alcalina después de unos minutos	++++	---
IV. Distribución entre agua y alcohol amílico	++++	---
V. adición de amoniaco	++++	---

Fuente: Datos experimentales

Leyenda: ++++: positivo

----: negativo

Análisis, Interpretación y Discusión.

Al analizar el tipo de pigmento presente en los frutos de las tres especies vegetales *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Prunus serotina* (Capuli), se determinó la presencia de antocianinas (grupo de pigmentos flavonoides), siendo interesante debido a que las antocianinas y las betacianinas (pigmentos nitrogenados muy solubles en agua de color rojo violeta) no coexisten en la misma planta, ni siquiera en la misma familia lo que puede usarse para realizar una diferenciación taxonómica de especies que contengan flores, frutos u otros tejidos coloreados. (Harbone J.B. Williams Christine; 2000)

Las antocianinas a pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules. (Martínez M., 2005)

Al contrario de lo que sucede en el caso de las antocianinas, el color de las betacianinas no depende del pH. Las betacianinas mantienen su color púrpura sin ningún cambio entre pH 4 y 7, y los cambios que se producen a pH tan extremos como 2 ó 9 son pequeños. (Lock, 1999)

La determinación de la presencia de pigmentos antociánicos presentes en los frutos de las tres especies vegetales es importante porque ellos serian responsables de la actividad antioxidante evaluada posteriormente.

CUADRO 4.5

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE LOS FRUTOS DE TRES ESPECIES VEGETALES.

Fruto seco	Peso inicial muestra (g)	Peso final extracto seco (g)	Porcentaje de extracción
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	0.2505	0.0837	33.4132
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	0.7500	0.2233	29.7733
<i>Prunus serotina</i> (Capuli).	2.5000	0.7115	28.4600

Fuente: Datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión.

En el cuadro 4.5 se muestran los resultados del porcentaje de extracción,

observandose que con los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) se tiene un mayor porcentaje de extracción (33.4132%), seguido de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) (29.7733%) y *Prunus serotina* (Capuli) (28.4600%) respectivamente, teniéndose esta diferencias debido a la variación en la composición de los frutos ya sea en azúcares, fibra y ceras

CUADRO 4.6

RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES.

Solvente	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	<i>Prunus serotina</i> (Capuli).
Agua destilada	++++	++++	++++
Acetona	++++	++++	++++
Metanol	++++	++++	++++
Etanol 70°	+++-	+++-	+++-
Etanol 96°	+++-	+++-	+++-
Acetato de etilo	----	----	----
Éter etílico	----	----	----
Hexano	----	----	----
Bencina	----	----	----
Cloroformo	----	----	----

Fuente: Datos experimentales

LEYENDA: ++++: TOTALMENTE SOLUBLE

+++ -: SOLUBLE

----: INSOLUBLE

Análisis, Interpretación y Discusión.

De acuerdo a los resultados del cuadro 4.6, los extractos antociánicos de los frutos de las tres especies vegetales *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Prunus serotina* (Capuli) son solubles en solventes polares (agua, metanol, etanol), e insolubles en solventes apolares (éter, hexano, cloroformo). Este resultado va en relación a la naturaleza química de los pigmentos, los cuales son de naturaleza polar, ya

que estos compuestos pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos, que se caracterizan por su polaridad. (Harbone J.B. Williams Christine; 2000)

4.1.- DE LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES.

CUADRO 4.7

DATOS PRELIMINARES DE LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.

Fruto	Peso de fruto seco(g)	Volumen aforado final(ml)	Factor de dilución
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	1.0031	25	5
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	0.5005	50	28
<i>Prunus serotina</i> (Capuli)	2.023	25	0.7

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 4.8

VALORES DE ABSORBANCIA A DIFERENTES pH DE LA ESPECIE *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)

Muestra	Buffer	Absorbancia λ max(520 nm)	Absorbancia(700nm)
1	pH1	0.7502	0.0543
2	pH4	0.3467	0.0843

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 4.9

VALORES DE ABSORBANCIA A DIFERENTES pH DE LA ESPECIE *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

Muestra	Buffer	Absorbancia λ max(520 nm)	Absorbancia(700nm)
1	pH1	0.7467	0.0579
2	pH4	0.1513	0.0609

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 4.10

VALORES DE ABSORBANCIA A DIFERENTES pH DE LA ESPECIE *Prunus serotina* (Capulí)

Muestra	Buffer	Absorbancia λ_{max} (520 nm)	Absorbancia(700nm)
1	pH1	0.8392	0.3067
2	pH4	0.9811	0.3441

Fuente: Datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión.

En los cuadros 4.8 al 4.10 se muestran los valores de absorbancia leídos para los extractos antocianicos de los frutos de las tres especies vegetales, observándose una variación en las lecturas de absorbancias a diferentes pH, teniéndose que cuanto mas bajo es el pH la absorbancia es mayor a ($\lambda_{max}=520$ nm).

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma de oxonio coloreado predomina a pH 1 y la forma de hemiacetal incolora a pH 4.5 (Wrosta et al, 2002)

CUADRO 4.11

CONTENIDO CALCULADO DE ANTOCIANINAS EN LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES.

FRUTO SECO	ABSORBANCIA CALCULADA	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (p/p)
<i>Prunus serotina</i> (Capulí).	0.1045	0.0878mg/100g
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a).	0.5989	2000mg/100g
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	0.4335	100mg /100g

Fuente: Datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión.

El contenido de antocianinas en los frutos evaluados varía de acuerdo a la especie vegetal, mostrando un contenido alto como 2000mg/100g de antocianinas en los frutos secos de la especie vegetal *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), un contenido regular como 100mg/100g de antocianinas en los frutos secos de la especie vegetal *Monnina*

salicifolia (Aceitunilla), un contenido bastante bajo como 0.0878mg/100g de antocianinas en los frutos secos de la especie vegetal *Prunus serotina* (Capuli).

El color de cada antocianina depende de su estructura química, del pH al que se encuentre y de la presencia de sales con las que interacciona. (Menéndez, 2008)

Los frutos maduros de cada especie vegetal evaluada presentan diferentes coloraciones e intensidades de color lo cual esta relacionada con la cantidad de antocianinas (pigmentos responsables del color de los frutos) determinadas para cada una de ellas, teniéndose para los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) un color negruzco azulado intenso tanto de la capa epidérmica como de la pulpa, para los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) una coloración morada tanto de la capa epidérmica como de la pulpa y para el caso de los frutos de *Prunus serotina* (Capuli).un color rojo oscuro a negro solo de la capa epidérmica. (Brouillard, 1983)

Según los resultados encontrados, podemos inferir que la especie *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), es una de las más promisorias de las tres estudiadas en este trabajo de experimentación, pues tiene un contenido de 2000mg/100g de antocianinas, comparando con algunas otras fuentes ricas en antocianinas como arándanos (*Vaccinium myrtillus*) que es una fuente de antocianinas muy conocida y con un alto contenido de antocianinas que varía entre 300 – 320 mg/100g de fruto, Elderberry (sauco) (*Sambucus nigra*) que tiene 450 mg / 100g de fruto. (Wrolstad, 2002).

4.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE LOS FRUTOS DE LAS ESPECIES VEGETALES FRENTE AL RADICAL LIBRE DPPH Y POR EL MÉTODO ABTS

4.2.1 MÉTODO DPPH.

CUADRO 4.12

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CAPTACIÓN DEL RADICAL DPPH

CON *Muehlenbeckia volcanica* (Mullk'a)

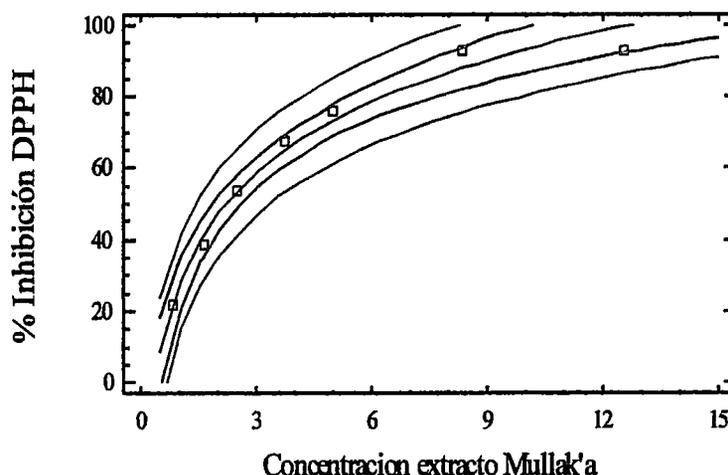
TUBOS	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (µg/mL)	%INHIBICION DEL DPPH
T1	0.837	21.5814409
T2	1.674	38.5394543
T3	2.511	53.7330502
T4	3.7665	67.6686816
T5	5.022	76.0006535
T6	8.37	92.6155857
T7	12.555	92.8606437

Fuente: Datos experimentales

Donde: T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.1

% INHIBICIÓN DPPH VS CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ANTOCIÁNICO DE *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = 27.1548 + 28.5693 \cdot \ln(\text{Concentración extracto Mullak'a})$$

Sig: 0.000

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.12 se tienen los resultados del porcentaje de captación y/o inhibición de radicales DPPH, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

En el análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antociánico mayor será la inhibición del radical libre DPPH.

El valor de (Sig.) es de 0.000, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antociánico de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.13
RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CAPTACIÓN DEL RADICAL DPPH
CON *Prunus serotina* (Capuli).

TUBOS	CONCENTRACION EXTRACTO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%INHIBICION DEL DPPH
T1	213.45	44.28
T2	284.6	51.40
T3	341.52	58.31
T4	384.21	63.72
T5	426.9	66.50
T6	569.2	80.40
T7	640.35	85.49

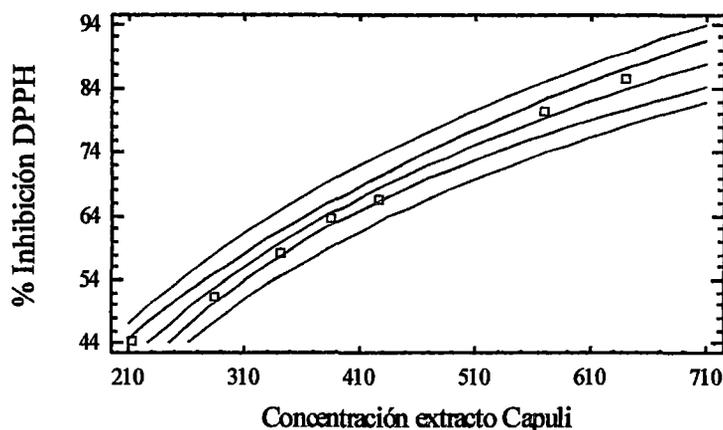
Fuente: Datos experimentales

Donde:

T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.2

**% INHIBICIÓN DPPH VS CONCENTRACIONE DEL EXTRACTO
ANTOCIÁNICO DE *Prunus serotina* (Capuli).**



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = -164.87 + 38.505 * \ln(\text{Concentración extracto Capuli})$$

Sig: 0.000

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.13 se tienen los resultados del porcentaje de captación y/o inhibición de radicales DPPH, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Compuestos con potencial antioxidante pueden actuar como prooxidantes, el grupo de sustancias polifenolicas en parte proporcionan ligeras cargas prooxidantes a traves de reacciones de transferencia de electrones llevando a una formación moderada de ROS influyen en ello factores como: la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ERO es formada; las condiciones del ensayo, la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilicidad para ser captados por la membrana y el pH del medio. (Urtagondo, 2009)

En el análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antocianico mayor será la inhibición del radical libre DPPH.

El valor de (Sig.) es de 0.000, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antocianico de los frutos de *Prunus serotina* (Capuli), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.14

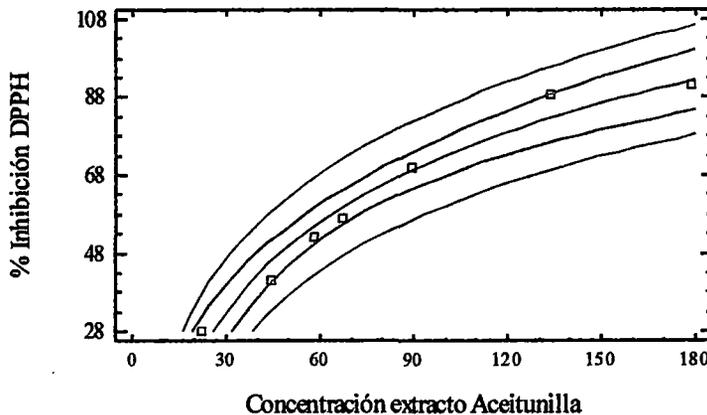
**RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CAPTACIÓN DEL RADICAL DPPH
CON *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)**

TUBOS	CONCENTRACION EXTRACTO (µg/MI)	%INHIBICION DEL DPPH
T1	22.33	28.25306611
T2	44.66	41.3550703
T3	58.058	51.95931798
T4	66.99	56.83517798
T5	89.32	70.0717918
T6	133.98	88.48339815
T7	178.64	90.90637152

Fuente: Datos experimentales

FIGURA 4.3

**% INHIBICIÓN VS CONCENTRACION DEL EXTRACTO ANTOCIÁNICO DE
Monnina salicifolia (Aceitunilla).**



La ecuación del modelo ajustado es

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = -79.6832 + 33.1351 * \ln(\text{Concentración extracto de Aceitunilla})$$

Sig: 0.000

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.14 se tienen los resultados del porcentaje de captación y/o inhibición de radicales DPPH, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antociánico mayor será la inhibición del radical libre DPPH.

El valor de (Sig.) es de 0.000, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antociánico de los frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.15
RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CAPTACIÓN DEL RADICAL DPPH
CON ÁCIDO ASCÓRBICO

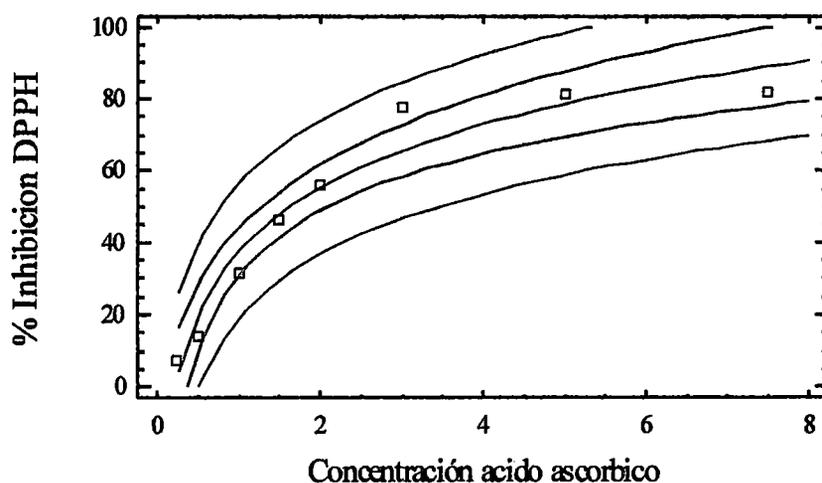
ÁCIDO ASCÓRBICO		
TUBOS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	%INHIBICIÓN DEL DPPH
T1	0.25	7.21868365
T2	0.5	14.0127389
T3	1	31.2101911
T4	1.5	46.2845011
T5	2	56.0509554
T6	3	77.7070064
T7	5	81.104034
T8	7.5	81.7409766

Fuente: Datos experimentales

Donde:

T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.4
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SOBRE EL RADICAL LIBRE DPPH DE
DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (Vitamina C).



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = 37.48 + 25.5173 * \ln(\text{Concentración Ácido ascórbico})$$

Sig: 0.000

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.15 se tienen los resultados del porcentaje de captación y/o inhibición de radicales DPPH, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del patrón aumenta también el porcentaje de inhibición del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del ácido ascórbico mayor será la inhibición del radical libre DPPH.

El valor de (Sig.) es de 0.000, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del ácido ascórbico (vitamina C), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.16
COEFICIENTE DE INHIBICIÓN IC₅₀, DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS
DE LAS MUESTRAS Y EL CONTROL FRENTE AL RADICAL DPPH.

MUESTRAS	IC ₅₀ (µg/ml)
Ácido ascórbico (Control)	1.6334
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	50.0875
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	2.2247
<i>Prunus serotina</i> (Capuli)	265.1549

Fuente: Datos experimentales

DONDE:

IC₅₀: Refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH.

Análisis, Interpretación y Discusión.

Si bien es cierto que existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, los métodos más utilizados son ABTS y DPPH. Ambos métodos presentan una excelente estabilidad aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa mientras que el radical ABTS tiene que ser generado tras una reacción en este caso química (persulfato potásico). (Castañeda y col, 2008)

De acuerdo a los cuadros 4.12 al 4.15 y a los análisis estadísticos (ANOVA), se observa una variación del % de captación y/o inhibición de radicales libres DPPH relacionada de manera directa con las diferentes concentraciones de los extractos, es decir que los extractos antociánicos de los frutos de las tres especies vegetales presentaron actividad antioxidante sobre el radical DPPH a diferentes concentraciones. La actividad antioxidante encontrada en cada uno de los casos es dosis dependiente de la concentración de extracto utilizado para cada caso.

De acuerdo con el parámetro de IC₅₀, bajos valores de IC₅₀ reflejan una alta actividad para inhibir radicales libres. (Ancos y col, 2001)

Obteniéndose para las muestras en estudio, en el cuadro 4.16, que presentó mayor actividad antioxidante el extracto antociánico de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) con un IC₅₀ de 2.2247µg/ml seguida de el extracto antociánico de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) con un IC₅₀ de 50.0875µg/ml, el extracto antociánico de *Prunus serotina* (Capuli) presentó menor actividad antioxidante en comparación con los otros extractos, con un IC₅₀ de 265.1549 µg/ml.

De acuerdo al cuadro 4.16 se tiene que los tres extractos antociánicos ensayados de los frutos de las especies vegetales, tienen menor actividad antioxidante en comparación a la actividad antioxidante del patrón; ácido ascórbico, que muestra un IC₅₀= 1.6334µg/ml Los resultados obtenidos para los extractos antociánicos superan los reportados por (Ramos 2001), donde calculó el IC₅₀= 1345.75 µg/ml para la hierba luisa.

4.2.2 MÉTODO ABTS.

CUADRO 4.17

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL RADICAL ABTS CON *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

TUBOS	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	%INHIBICION ABTS
T1	2.511	33.3380084
T2	4.185	47.2792893
T3	6.696	69.4879687
T4	8.37	78.5534415
T5	16.74	91.6607973

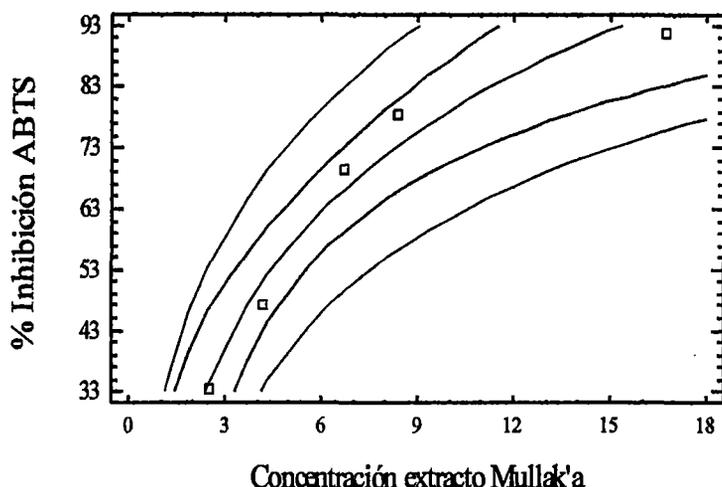
Fuente: Datos experimentales

Donde:

T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.5

**%INHIBICIÓN ABTS VS CONCENTRACION DEL EXTRACTO ANTOCIÁNICO
DE *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)**



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = 4.44489 + 32.4152 \cdot \ln(\text{Concentración extracto Mullak'a})$$

Sig: 0.002

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.17 se tienen los resultados del porcentaje de inhibición de radicales ABTS, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del radical, del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre ABTS, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antociánico mayor será la inhibición del radical ABTS.

El valor de (Sig.) es de 0.002, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antociánico de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.18

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL RADICAL ABTS CON

Prunus serotina (Capuli)

TUBOS	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	%INHIBICION ABTS
T1	142.3	17.1748252
T2	284.6	30.2740689
T3	426.9	42.4561404
T4	711.5	62.1123219
T5	996.1	77.334644

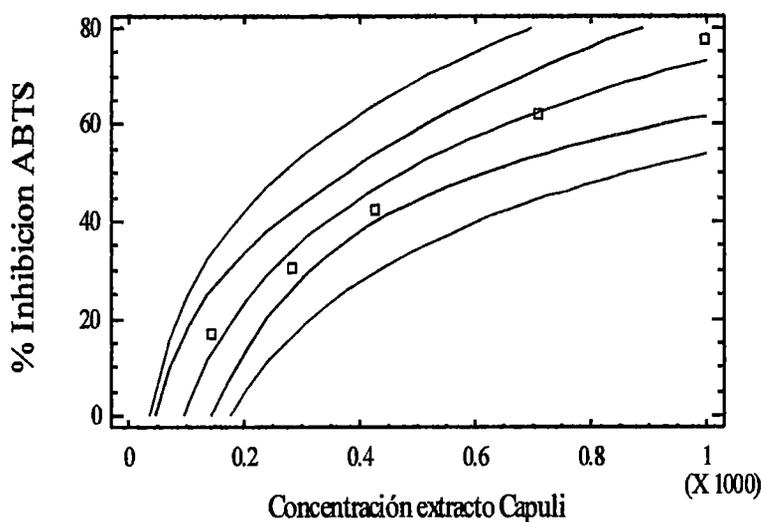
Fuente: Datos experimentales

Donde: T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.6

% INHIBICIÓN VS CONCENTRACIONE DEL EXTRACTO ANTOCIÁNICO DE

Prunus serotina (Capuli).



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = -141.186 + 31.0346 \cdot \ln(\text{Concentración extracto Capuli})$$

Sig: 0.002

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.18 se tienen los resultados del porcentaje de inhibición de radicales ABTS, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del radical, del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre ABTS, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antociánico mayor será la inhibición del radical ABTS.

El valor de (Sig.) es de 0.002, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antociánico de *Prunus serotina* (Capuli), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.19

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL RADICAL ABTS CON
Monnina salicifolia (Aceitunilla)

TUBOS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	%INHIBICION ABTS
T1	44.66	32.93279307
T2	66.99	43.38808463
T3	89.32	53.69882026
T4	133.98	71.8276581
T5	178.64	83.41840254

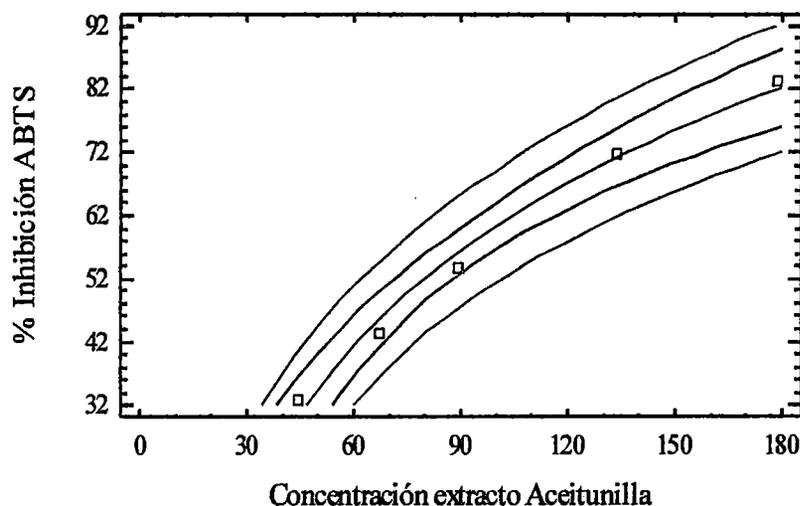
Fuente: Datos experimentales

Donde:

T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.7

**% INHIBICIÓN VS CONCENTRACION DEL EXTRACTO ANTOCIÁNICO DE
Monnina salicifolia (Aceitunilla).**



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = -111.229 + 37.2653 * \ln(\text{Concentración extracto Aceitunilla})$$

Sig: 0.002

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.19 se tienen los resultados del porcentaje de inhibición de radicales ABTS, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del extracto antociánico aumenta también el porcentaje de inhibición del radical, del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre ABTS, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antociánico mayor será la inhibición del radical ABTS.

El valor de (Sig.) es de 0.002, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del extracto antociánico de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), mayor actividad antioxidante.

CUADRO 4.20
RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL RADICAL ABTS CON
ÁCIDO ASCÓRBICO

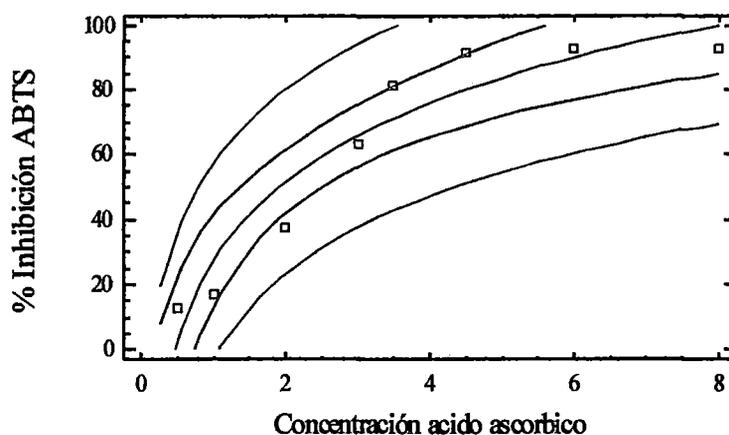
TUBOS	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	%INHIBICION ABTS
T1	0.5	12.86821705
T2	1	16.74418605
T3	2	37.32503888
T4	3	63.02652106
T5	3.5	81.15264798
T6	4.5	91.31782946
T7	6	92.54658385
T8	8	92.7244582

Fuente: Datos experimentales

Donde:

T= Tubos con tratamiento.

FIGURA 4.8
% INHIBICIÓN ABTS VS CONCENTRACION DEL ÁCIDO ASCÓRBICO
(VITAMINA C).



La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = 26.3938 + 33.6602 * \ln(\text{Concentración Acido ascórbico})$$

Sig: 0.002

Análisis e interpretación

En el cuadro 4.20 se tienen los resultados del porcentaje de inhibición de radicales ABTS, en el cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del patrón aumenta también el porcentaje de inhibición del radical, del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante, llegando a un límite máximo para luego descender a mucho mayor concentración (actividad prooxidante).

Del análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%; se tiene que el porcentaje de inhibición del radical libre ABTS, es directamente proporcional con el antioxidante y su concentración, se observa que a mayor concentración del extracto antocianico mayor será la inhibición del radical ABTS.

El valor de (Sig.) es de 0.002, nos indica que los resultados son estadísticamente significativos afirmando que las concentraciones influyen sobre la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración del ácido ascórbico (vitamina C).

CUADRO 4.21
COEFICIENTE DE INHIBICIÓN IC₅₀, DE LOS EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS
DE LAS MUESTRAS Y EL CONTROL FRENTE AL RADICAL ABTS.

MUESTRAS	IC ₅₀ (µg/ml)
Ácido ascórbico (Control)	2.0164
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	75.6803
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	4.077
<i>Prunus serotina</i> (Capuli)	473.6244

Fuente: Datos experimentales

DONDE:

IC₅₀: Refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del radical ABTS.

Análisis, Interpretación y Discusión.

Entre los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable, originando resultados reproducibles y coherentes. (Kuskoski y col, 2005)

De acuerdo a los cuadros 4.18 a 4.20 se observa una variación del % de inhibición de radicales ABTS relacionada de manera directa con las diferentes concentraciones de los extractos, es decir que los extractos antociánicos de los frutos de las tres especies vegetales presentaron actividad antioxidante sobre el radical ABTS a diferentes concentraciones. La actividad encontrada en cada uno de los casos es dosis dependiente de la concentración del extracto utilizado.

Se tiene que bajos valores del parámetro IC_{50} reflejan una alta actividad para inhibir radicales libres. (Ancos y col, 2001)

De acuerdo a esto se tiene en el cuadro de IC_{50} que presentó mayor actividad antioxidante el extracto antociánico de los frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) con un IC_{50} de 4.077 μ g/ml seguida de el extracto antociánico de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) con un IC_{50} de 75.6803 μ g/ml, el extracto antociánico de *Prunus serotina* (Capuli) presentó menor actividad antioxidante en comparación con los otros extractos, con un IC_{50} de 473.6244 μ g/ml.

De acuerdo al cuadro 4.21 se tiene que los tres extractos antociánicos ensayados de los frutos de las especies vegetales, tienen menor actividad antioxidante en comparación a la actividad antioxidante del patrón; ácido ascórbico, que muestra un IC_{50} = 2.0164 μ g/ml

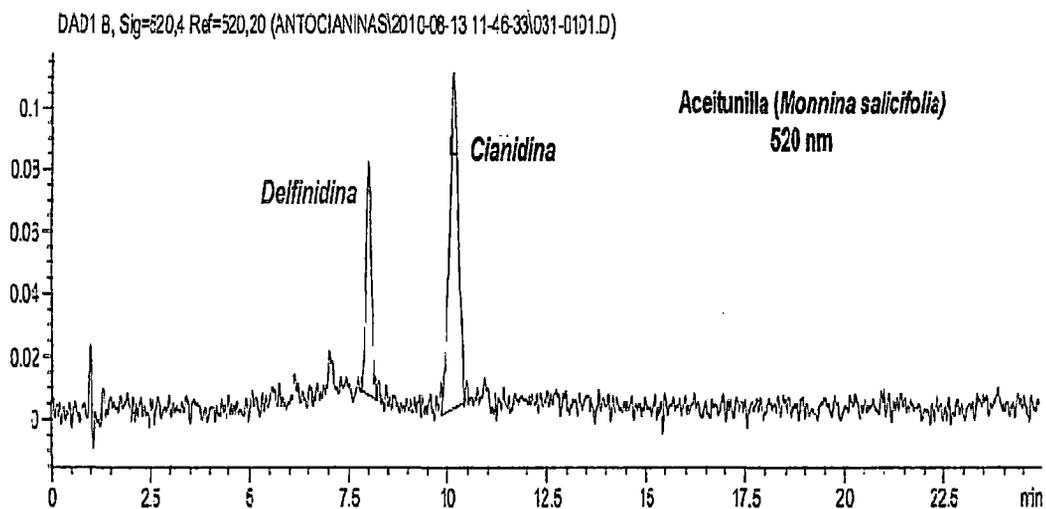
Los resultados obtenidos para el extracto antociánico de Mullak'a superan los reportados por Sandoval et al. (2002), en la que evaluaron la actividad antioxidante con muestras de uña de gato *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* en la que obtuvieron el IC_{50} = 7.7 y 4.8 μ g/ml respectivamente, evidenciándose así la buena capacidad antioxidante de este recurso.

4.3. CARACTERIZACION DE LAS ANTOCIANIDINAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC), PRESENTES EL LOS FRUTOS DE LAS TRES ESPECIES VEGETALES.

El análisis por HPLC se realizo bajo las condiciones establecidas en el cuadro 3.10 y los hidrolizados de los pigmentos de la uva y fresa se utilizaron como patrones de

referencia bajo las mismas condiciones establecidas para el análisis de las tres especies vegetales.

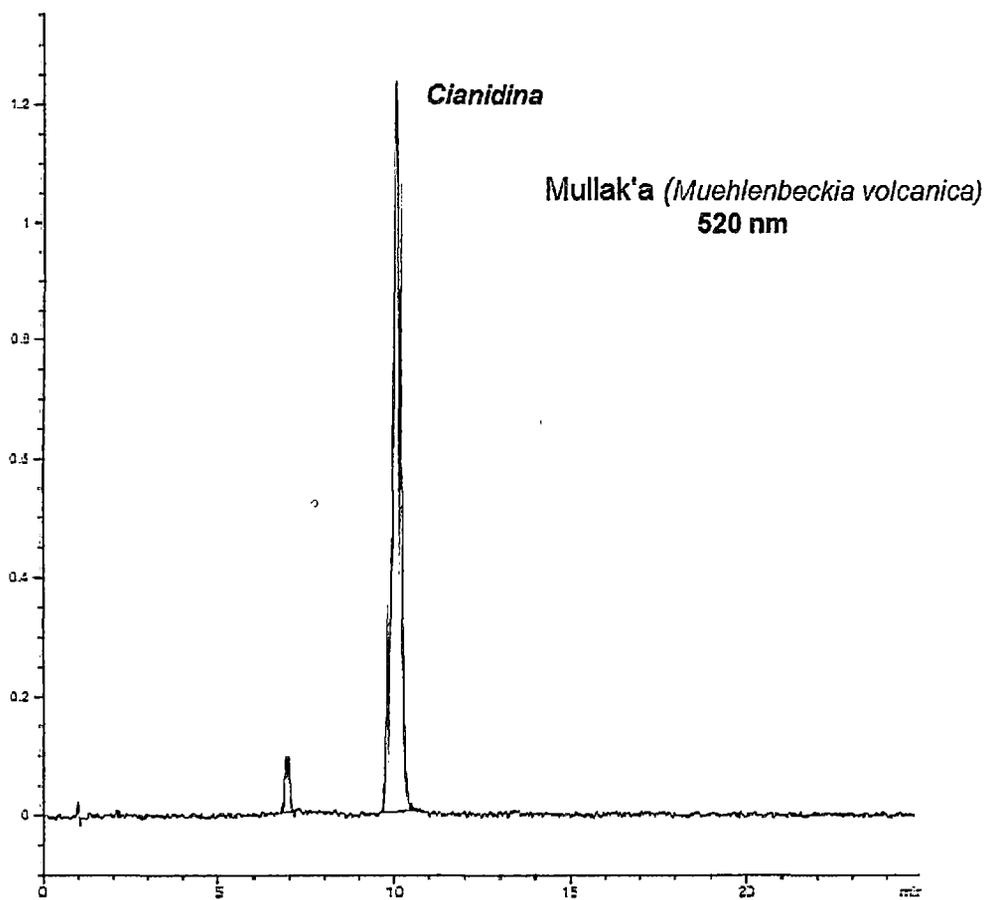
FIGURA 4.9 *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)



A) ACEITUNILLA

La hidrólisis acida del pigmento de la especie vegetal *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) dio a conocer la presencia de dos aglicones ;delfinidina y cianidina, siendo la delfinidina la antocianidina mas polar por lo que su tiempo de retención es mas corto que la cianidina, Figura 4.9

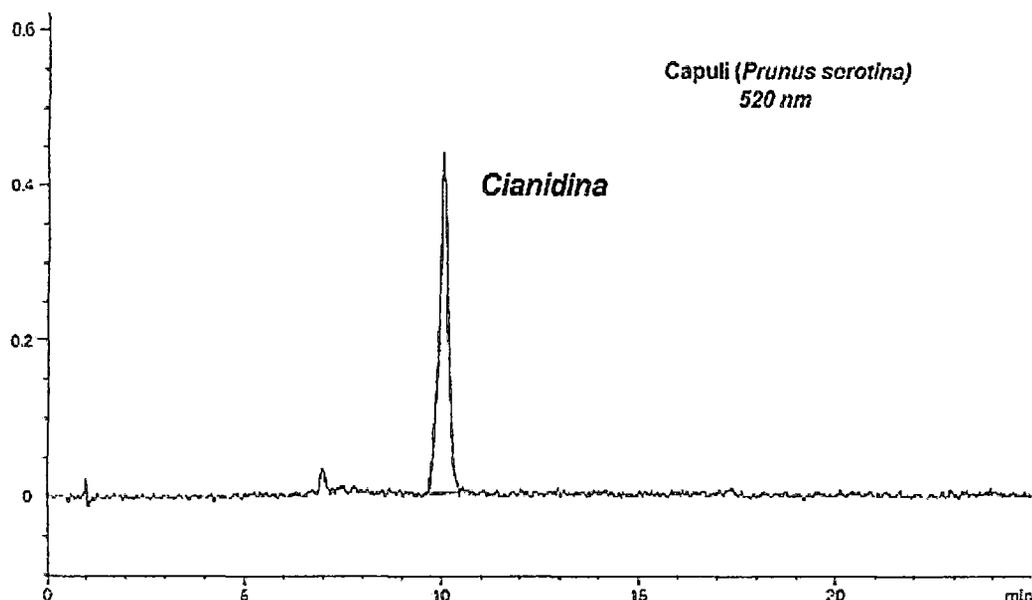
FIGURA 4.10 *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)



B) MULLAK'A

La hidrólisis ácida del pigmento de la especie vegetal *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) dio a conocer la presencia de un aglicón; cianidina, Figura 4.10

FIGURA 4.11 *Prunus serotina* (Capuli)



C) CAPULI

La hidrólisis ácida del pigmento de la especie vegetal *Prunus serotina* (Capuli) dio a conocer la presencia de un aglicón la cianidina, FIGURA 4.11

Los cromatogramas correspondientes presentan un perfil de elución adecuado. En la comparación de los respectivos cromatogramas de cada especie vegetal con los cromatogramas de referencia *Vitis vinifera* (Uva) y *Fragaria vesca* (Fresa) Figura 4.12, existe una coincidencia dependiendo de la antocianidina presente en cada especie vegetal.

Tanto los frutos de *Vitis vinifera* (Uva) como los de *Fragaria vesca* (Fresa) son usadas como fuente conocida de estándares de antocianidinas para la caracterización de pigmentos. En los frutos de *Vitis vinifera* (Uva) están presentes los 5 aglicones más comunes de la naturaleza siendo cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina, y petunidina; mientras que la antocianidina presente en los frutos de *Fragaria vesca* (Fresa) es la pelargonidina. (Wrolstad, 2002)

La eliminación del azúcar de la estructura de la antocianina durante la hidrólisis, reduce la polaridad de la molécula, volviéndola más compatible con la fase estacionaria (columna), de modo que su elución con la fase móvil tarda más tiempo. (Strack y Wray, 1989).

Los tiempos de retención de cada una de las muestras se detallan en el cuadro 4.22

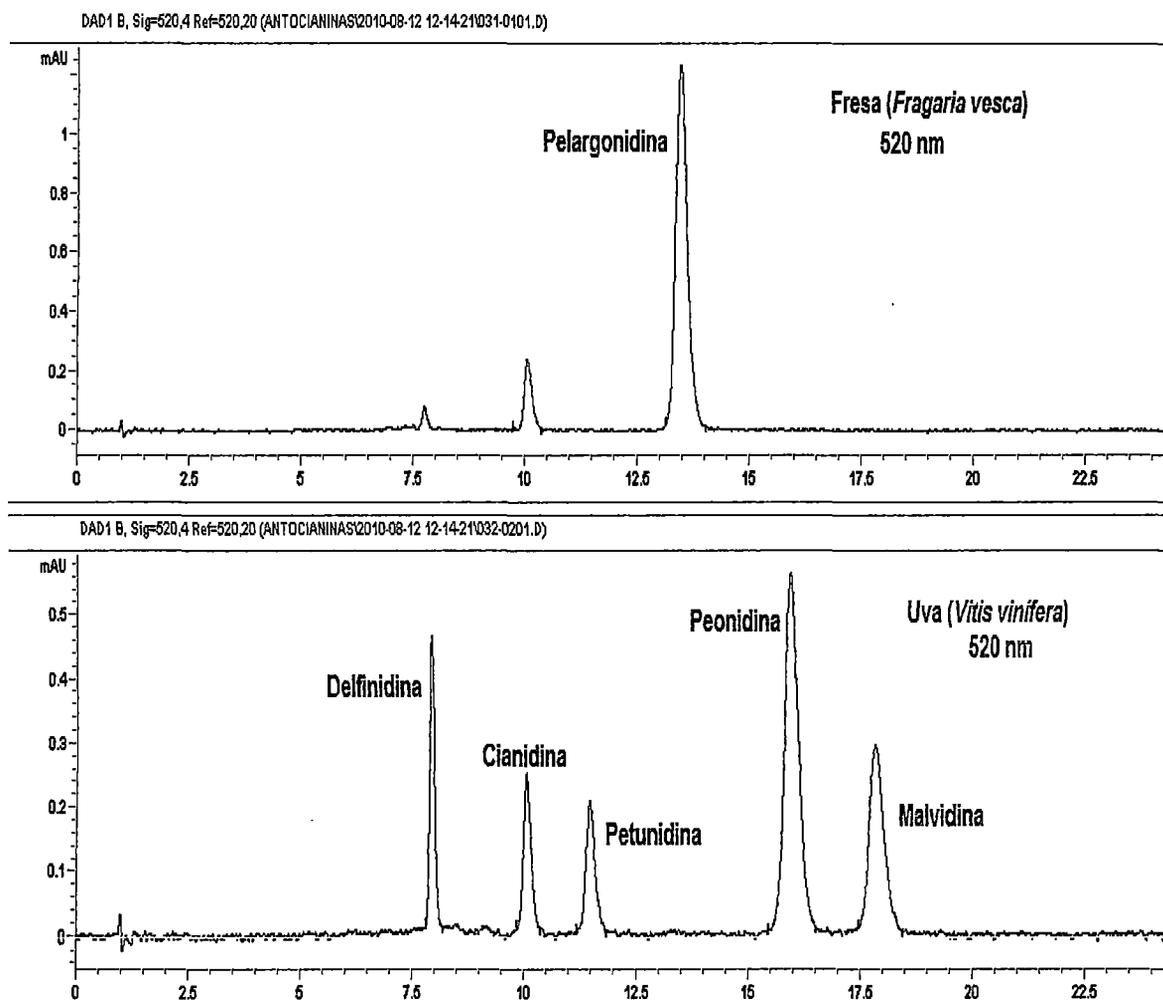
CUADRO 4.22

TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LAS ANTOCIANIDINAS PRESENTES EN LAS ESPECIES VEGETALES *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Prunus serotina* (Capuli), *Vitis vinifera* (Uva), *Fragaria vesca* (Fresa).

ESPECIE	PICO	IDENTIFICACIÓN DE LA ANTOCIANIDINA	TIEMPO DE RETENCIÓN
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	1	Cianidina	10
<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	1	Delfinidina	8
	2	Cianidina	10
<i>Prunus serotina</i> (Capuli)	1	Cianidina	10
<i>Vitis vinifera</i> (Uva)	1	Delfinidina	8
	2	Cianidina	10
	3	Petunidina	11
	4	Peonidina	16
	5	Malvidina	18
<i>Fragaria vesca</i> (Fresa)	1	Pelargonidina	13

Fuente: Elaboración propia

FIGURA 4.12: FRESA Y UVA



CONCLUSIONES

1. Los extractos antociánicos de los frutos de las especies vegetales estudiadas, presentan actividad antioxidante *in vitro*, siendo el efecto dosis dependiente, mostrando el siguiente orden decreciente: *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Prunus serotina* (Capuli). Se identificó la presencia de dos antocianidinas en los frutos de las especies vegetales estudiadas.
2. En las pruebas preliminares de los frutos de las tres especies vegetales en estudio, *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), *Prunus serotina* (Capuli), reportaron lo siguiente: porcentaje de humedad: 24.8; 28; 15%, cantidad de proteína: 38.5; 14.21; 24.3%, cantidad de grasa: 0.015; 0.81; 0.14%, cantidad de ceniza: 1; 1; 1%, cantidad de fibra: 2.3; 4.6; 4%, carbohidratos: 33; 51; 55%, porcentaje de extracción: 33.4132; 29.7733; 28.4600% para cada caso respectivamente.
3. El contenido de antocianinas totales para cada extracto antociánico, reporta para la especie vegetal *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a) 2000mg/100g en frutos secos, para *Monnina salicifolia* (Aceitunilla) 100mg/100g en frutos secos y para *Prunus serotina* (Capuli) 0.0878mg/100g en frutos secos.
4. Los extractos antociánicos de los frutos de las tres especies vegetales, son solubles en solventes de naturaleza polar e insolubles en solventes de naturaleza apolar.
5. Todos los extractos antociánicos ensayados, presentaron actividad antioxidante sobre el radical DPPH, la mayor actividad antioxidante lo presentó el extracto antociánico del fruto de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), con un $IC_{50}=2.2247$ $\mu\text{g/ml}$, seguida de la especie vegetal *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), con un $IC_{50}=50.0875$ $\mu\text{g/ml}$, siendo el extracto antociánico del fruto de *Prunus serotina* (Capuli) el que presentó menor actividad antioxidante con un $IC_{50}=265.1549$ $\mu\text{g/ml}$.
6. Los extractos antociánicos ensayados, presentaron actividad antioxidante por el método químico ABTS, la mayor actividad antioxidante lo presentó el extracto

antociánico del fruto de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a), con un $IC_{50}=4.077$ $\mu\text{g/ml}$, seguida de la especie vegetal *Monnina salicifolia* (Aceitunilla), con un $IC_{50}=75.6803$ $\mu\text{g/ml}$, siendo el extracto antociánico del fruto de *Prunus serotina* (Capuli) el que presentó menor actividad antioxidante con un $IC_{50}=473.6244$ $\mu\text{g/ml}$.

7. Los extractos antociánicos ensayados de los frutos de las tres especies vegetales, tienen menor actividad antioxidante en relación a la actividad antioxidante del patrón; ácido ascórbico, que muestra un $IC_{50}=1.6334, 2.0164$ $\mu\text{g/ml}$ para el radical DPPH y el método químico ABTS respectivamente.

Siendo 1.36 veces menor la actividad antioxidante de la especie vegetal *Muehlenbeckia volcánica* "Mullak'a" con respecto al patrón ácido ascórbico frente al radical DPPH y 2.02 veces menor la actividad antioxidante de la especie vegetal *Muehlenbeckia volcánica* "Mullak'a" con respecto al patrón ácido ascórbico frente al radical ABTS.

8. Las antocianidinas identificadas por HPLC y por comparación con los cromatogramas de los patrones de referencia de las especies *Vitis vinifera* (Uva) y *Fragaria vesca* (Fresa) son: *Monnina salicifolia* (Aceitunilla): Delfinidina y Cianidina, *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a): Cianidina, *Prunus serotina* (Capuli): Cianidina.

SUGERENCIAS

A las autoridades.

- Equipar los laboratorios de investigación científica y facilitar el acceso a los estudiantes.
- Implementar las bibliotecas con información actualizada.

A los docentes, estudiantes e investigadores.

- Realizar estudios *in vivo* y pruebas clínicas para corroborar la actividad antioxidante del extracto antociánico.
- Realizar la caracterización de las antocianinas presentes en los frutos de estas especies vegetales.
- Realizar estudios sobre toxicidad aguda y crónica.
- Llevar a cabo estudios para evaluar otras actividades biológicas atribuidas a las antocianinas de los frutos.
- Realizar estudios de coloración utilizando los pigmentos de las tres especies vegetales para determinar el grado de tinción y la estabilidad de las sustancias coloreadas, importantes en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

LIBROS Y OTRAS MONOGRAFÍAS:

- 1) **AGAPITO F, SUNG I** .Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales. Perú: Editorial Isabel; 2005.
- 2) **ASTRID GARZÓN Gloria**. Las Antocianinas Como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión, Acta Biol. Colomb. 2008, Vol. 13 N°. 3, 27-36.
- 3) **BARCELO José**. Diccionario Terminológico de Química. España: Editorial Alambra; 1982.
- 4) **BARTHOLOMAUS, A. et al**. El Manto de la Tierra, Flores de los Andes. Editorial CAR GTZ KEW; 1990.
- 5) **BRACK EGG Antonio**. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cusco: Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas”; 1999.
- 6) **BRAKO L. J. L. ZARUCCHI**. Monographs in Sistematic Botany from The Missouri Botanical Garden. Vol. 45. Missouri Botanical Garden; 1993.
- 7) **BRUNETON Jean**. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª ed. Zaragoza-España: Editorial Acribia; 1993.
- 8) **CABIESES F**. Apuntes de Medicina Tradicional Peruana. Tomo II. Perú: Editorial Lima; 1993.
- 9) **CHÁVEZ J, CHIRE T, LOAYSA L**. Curso: Principios Bioactivos de Plantas Andinas y Amazónicas del Perú. Capacidad antioxidante de Compuestos Bioactivos. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. UNALM, 2002.
- 10) **DRUEKE TILMAN**. Arteriosclerosis y Arterioesclerosis en Insuficiencia Renal Crónica: la Importancia del Potencial del Estrés Oxidativo, 2002.
- 11) **FENNEMA R**. Química de los Alimentos. 2ª ed. España: Editorial Acribia; 1993.
- 12) **FERREIRA RICARDO**. Estrés Oxidativo y Antioxidantes. Centro de medicina Biomolecular. Argentina, 2004.
- 13) **GOODMAN-GILMAN**. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª ed. México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 1996.
- 14) **GUYTON A., HALL J**. Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2001.
- 15) **HERRERA F.L**. Sinopsis de la Flora del Cusco. Tomo I Parte Sistemática. 1941.

- 16) **LOCK DE UGAZ O.** Colorantes Naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1997.
- 17) **LOCK DE UGAZ O.** Investigación Fitoquímica .Métodos en el Estudio en los Productos Naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2004.
- 18) **LOCK DE UGAZ O, CABELLO V.** Análisis de Flavonoides en Plantas. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2006.
- 19) **MANTILLA HOLGUIN.** Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra. 2ª ed. Perú; 2004.
- 20) **MARTINEZ M. Alejandro.** Flavonoides, Universidad de Antioquia, Medellín, 2005.
- 21) **MONTERO María.** Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela. España, 1996
- 22) **MOSCOSO CASTILLA. Mariano.** Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad. 4ª ed. Cusco: Editorial Alpha; 1997.
- 23) **MURILLO E.** Actividad Antioxidante de Bebidas de Frutas y de Té Comercializadas en Costa Rica. Universidad de Panamá/Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT) 2002.
- 24) **OCAMPO C., RÍOS V., BETANCUR J., OCAMPO S.** Curso práctico de Química Orgánica Enfocado a Biología y Alimentos. Universidad de Caldas; 2008.
- 25) **PAVLOW M.** El Gran Libro de las Plantas Medicinales. España: Editorial Everest S.A; 1980.
- 26) **PRETELL, J. et al.** Apuntes Sobre Algunas Especies Andinas de la Sierra Peruana. Proyecto FAO/HOLANDA/INFOR. 1985.
- 27) **RAMIREZ TORTOSA María, QUILES MORALES José.** Vitamina C, Vitamina E y Otros Antioxidantes de Origen Alimentario. FUNIBER. 2006
- 28) **REYNEL C., LEÓN J.;** Árboles y Arbustos Andinos para Agroforestería y Conservación de Suelos. Proyecto FAO/HOLANDA/DGFF. 1990.
- 29) **ROERSCH C.** Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo I y II. Perú: Koeltz Scientific Books. Centro de Medicina Andina; 1994.
- 30) **SOUKUP J.** Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana; 1970.
- 31) **VALDIZÁN H., MALDONADO A.** La Medicina Popular Peruana. Tomo III. Lima, 1922.

- 32) **VILLAR DEL FRESNO Angel.** Farmacognosia General. España. Editorial Síntesis; 1999.
- 33) **U.N.M.S.M FACULTAD DE MEDICINA DE SAN FERNADO.** I Curso Nacional Teórico Práctico de “Antioxidantes en Recursos Fioterapéuticos”; 2006.
- 34) **URRUNAGA SORIA Rosa.** Conocimientos, Prácticas e Innovaciones Asociadas a los Parientes Silvestres. Proyecto Conservación in situ de Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres. PER/98/G33.

TESIS:

- 35) **ALONSO CARRILLO Nancy.** Actividad Antioxidante de *Satureja macrostema*. [trabajo para optar por el título de magister en ciencias en alimentos]. 2009. Instituto Politécnico Nacional, México.
- 36) **CUEVAS MONTILLA E., ANTEZANA A. Y WINTERHALTER P.** Análisis y Caracterización de Antocianinas en Diferentes Variedades de Maíz (*Zea Mays*) Boliviano. [tesis doctoral]. 2008. Universidad Mayor San Simón Cochabamba.
- 37) **DEL ROSARIO PALOS SUÁREZ Giovanna María.** Evaluación de la Actividad Antioxidante de la Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en un Modelo Experimental de Diabetes en Ratas Wistar. [trabajo para optar por el título de magister en tecnología avanzada]. 2007. Instituto Politécnico Nacional, Santiago de Querétaro.
- 38) **GUERRA OPORTO Cecilia Ana.** Elaboración de Láminas de Fruta a Partir de Arándano (*Vaccinium corymbosum*) c.v. Elliot y Manzana (*Malus pumila* Mill.) c.v. Liberty. 2005. [trabajo para optar por el título de ingeniero en alimentos]. Universidad Austral de Chile.
- 39) **LEYVA DANIEL, Diana Elizabeth.** Determinación de Antocininas, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en Licores y Fruto de Mora. [trabajo para optar por el título de ingeniero en alimentos]. 2009. Universidad Tecnológica de la Mixteca, México.
- 40) **MARFÍL NAVARRO Rocío.** Parámetros de Calidad y Componentes con Interés Nutricional del Aceite de Argán (*Argania spinosa*). [tesis doctoral]. 2008. Universidad de Granada, España.

- 41) **MENENDEZ GOVEA .Walter Vicente.** Obtención de Colorante para su Uso en Yogurt a Partir de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y del Mortiño (*Vaccinium myrtillus* L.). [trabajo para optar por el título de ingeniero en alimentos]. 2008. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil–Ecuador.
- 42) **MOENNE-LOCOZ CALDERÓN Deniss Karime.** Potencial Antioxidante de Papas y Harina de Papas Nativas de Chiloé. [trabajo para optar por el título de ingeniero en alimentos].2008. Universidad de la Frontera, Chile.
- 43) **MUÑOZ MUÑOZ M., SOTO ROJAS V.,** Determinación de la Capacidad Protectora de Antocianinas de un Extracto de *Vitis Vinifera* en Aortas de Rata Sometidas a Estrés Oxidativo. [trabajo para optar por el título de licenciado en kinesiología]. 2005. Universidad de Chile.
- 44) **ROMERO CASCALES Inmaculada.** Extracción de Compuestos Fenólicos de la Uva al Vino. Papel de los Enzimas de Maceración. [trabajo para optar por el título de ingeniero en alimentos]. 2008. Universidad de Murcia.
- 45) **ROMERO VIACAVA Marta.** Evaluación de plantas medicinales con propiedades antioxidantes en los distritos de Ayacucho, Carmen Alto y Quinoa de la provincia de Huamanga-Ayacucho. 2006. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Ayacucho.
- 46) **URTAGONDO CASADEVALL Vanessa,** Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales .citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. 2009. Universidad de Barcelona.
- 47) **VASCO BARRENO Verónica Cristina,** Determinación de Parámetros Físico-Químicos de Zanahoria Amarilla (*Daucus carota*) como Base para el Establecimiento de la Norma de Requisitos. [trabajo para optar por el título de bioquímico farmacéutico]. 2008. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

REVISTAS:

- 48) **ANCOS B., GONZALES E., CANO M.** Ellagic acid, Vitamin C and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Storage in Raspberry Fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. v. 48, n. 10, p. 934-939.

- 49) **ÁVALOS GARCÍA A., PÉREZ-URRIA CARRIL E.** Metabolismo Secundario de Plantas, Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2009. 2 (3): 119-145.
- 50) **BOYNTON, D. and M. H. WILDE.** Development of the black raspberry fruit. I. Seasonal increases in gross volume, dimension and dry weight. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1959. 73: 158-163.
- 51) **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. y BERSET C.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensmittel. Wissenschaft. Und Technologie. 1995. 22, 25-30.
- 52) **BROUILLARD R.** The In Vivo Expression of Anthocyanin Colour in Plants, Phytochemistry. 1983. 22, 1311-1323.
- 53) **CASTAÑEDA C., RAMOS LL., IBÁÑEZ V.** Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Siete Plantas Medicinales, Revista Horizonte Médico. 2008 vol 8.
- 54) **CÉSPEDES T, SÁNCHEZ D.** Algunos Aspectos Sobre el Estrés Oxidativo; el Estado Antioxidante y la Terapia de Suplementación. Rev. Cubana Cardiol. 2000. 14(1):55-60.
- 55) **COOMBE, B. G.** Relationship of Growth and Development to Changes in Sugars, Auxins, and Gibberellins in Fruit of Seeded and Seedless Varieties of *Vitis vinifera*. Plant Physiol. 1960. 35: 241-250.
- 56) **COOPER-DRIVER G.** Contributions of Jeffrey Harborne and Coworkers to study of anthocyanins, Phytochemistry. 2001. 56:pag 229 - 236
- 57) **DEL VALLE LEGUIZAMÓN G., GONZÁLEZ LEÓN A., BÁEZ SAÑUDO R.** Antocianinas en Uva (*Vitis vinifera L.*) y su Relación con el Color. Rev. Fitotec. Mex. 2005. Vol. 28(4): 359-368.
- 58) **GONZÁLEZ TORRES María Cristina; BETANCOURT RULE Miguel; ORTIZ MUÑIZ Rocío.** Daño Oxidativo y Antioxidantes, Bioquímica, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2000. Vol. 25, Núm. 1, enero-marzo, pp. 3-9.
- 59) **.GUZMÁN FIGUEROA M., ORTEGA REGULES A., ANAYA BERRIOS C.** Piranoantocianinas: Modificaciones Estructurales de Antocianinas. Universidad de las Américas. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 1-4 (2010): 84 – 95. Puebla-México.
- 60) **HARBONE J.B. WILLIAMS CHRISTINE.** Advances in Flavonoides Research since 1992, Phytochemistry. 2000. 55, 482 – 500

- 61) **HUANG D., OU B., PRIOR RL.** The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1841-1858.
- 62) **KUSKOSKI E, ASUERO A, GARCÍA PARRILLA M, TRONCOSO A, FETT R.** Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campiñas.* 2004. out.-dez.
- 63) **MARTÍNEZ-CAYUELA M.** Toxicidad de Xenobióticos Mediada por Radicales Libres de Oxígeno, *Ars. Pharmaceutica.* 1998. 39:1; 5-18.
- 64) **MOLYNEUX P.** The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, 26(2): 211-219
- 65) **NOCTOR G, GÓMEZ L, VANACKER H, FOYER CH.** Interactions Between Biosynthesis, Compartmentation and Transport in the Control of Glutathione Homeostasis and Signaling. *J. Exp. Bot.* 2002. 53: 1283–1304.
- 66) **PEREZ G.** Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Centro de Investigaciones Biomédicas. *Revista Cubana Invest. Biomed.* 2003:22(1):48-57.
- 67) **RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C.** Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1996. v. 20, p. 933-956.
- 68) **STRACK, D., and V. WRAY.** Anthocyanins. in: *Methods in Plant Biochemistry.* 1989. Vol. 1. Plant Phenolics. Dey, P. M., and J. B. Harbone (eds). Academic Press. London. pp: 325-356.
- 69) **VENERO GUTIÉRREZ Justo R.** Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 2002. 31(2):126-33.
- 70) **VICKERY H. B.** The behavior of Isocitric Acid in Excised Leaves of *Bryophyllum calicinum* During Culture in Alternating Light and Darkness. *Plant Physiol.* 1952. 27: 9-17.
- 71) **WROSLSTAD RONALD E; DURST ROBERT W; GIUSTI MONICA M, RODRIGUEZ SAONA L.** Analys of Antocyanins in Nutraceuticals. American Chemical Society. ACS Symposium. 2002. Series 803,42-46.
- 72) **ZAMORA S Juan Diego.** Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. Chil. Nutr.* 2007. Vol. 34, N° 1.

ANEXOS

ANEXO N° 1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• AEROPUERTO POSTAL
N° 971 - Cusco - Perú

• FAX: 051 052 281171 - 222582

• TELEFONO

Calle Tiguas N° 127

Teléfono: 052 22221 - 224891 - 221631 - 254038

• CIUDAD UNIVERSITARIA

Av. Dr. La Cruz N° 511 - Teléfono: 226501 -
222812 - 244180 - 222825 - 212228

• CENTRAL TELEFÓNICA: 222271 - 252119
242825 - 243335 - 243351 - 247514

• LOCAL CENTRAL

Calle de Armas 130
Teléfono: 221511 - 221721 - 22 8515

• MUSEO INKA

Calle del Abate N° 103 - Teléfono: 227192

• CENTRO AGRONÓMICO MAYRA

San Antonio de Chuca - Teléfono: 777141 - 227249

• COLEGIO "FORTUNATO L. HERBERA"

Av. De la Cultura N° 71

-Lima y Extranjero- Teléfono: 227192

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICA

Que, las Bachilleres: **TEVES MEZA, FLORMI CARMEN** y **TORRES APAZA, ROSELINE**, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado al Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herborizada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario; de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie *Muehlenbeckia volcanica*, Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Caryophyllidae
Orden	:	Polygonales
Familia	:	Polygonaceae
Género	:	<i>Muehlenbeckia</i>
Especie	:	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham) Endlicher
N. vulgar	:	Mullak'a, muñacca

Se le expide, la presente certificación de determinación de la especie para los fines que vicaran por conveniente

Cusco, Abril de 2010

Arch/HV CUZ



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)

M. Sc. Ericka de la Cruz Manrique
Directora

ANEXO N° 2

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- | | | |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • APARTADO POSTAL
N° 924 - Cusco - Perú • FAX: 720760 - 720761 - 720762 • RECTORADO
Caja Telef. N° 127
Teléfono: 720761 - 720762 - 720763 - 720764 | <ul style="list-style-type: none"> • CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 1111 - Teléfono: 225601 -
225612 - 225620 - 225625 - 225626 • CENTRAL TELEFÓNICA: 225629 - 225630
225635 - 225636 - 225637 - 225638 • LOCAL CENTRAL
Paseo de Arzobispo
Teléfono: 225631 - 225632 - 225633 | <ul style="list-style-type: none"> • MISMO INKA
Cuarto de Alambres N° 101 - Teléfono: 227180 • CENTRO AGRONÓMICO ANITA
San Antonio de Cuzco - Teléfonos: 227145 - 227146 • COLEGIO "FÉLIX SAYO L. HERBERIA"
Av. De la Cultura 1672
Teléfono: 227187 - 720765 - 720766 |
|--|---|--|

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICA

Que, las Bachifères: **TEVES MEZA, FLORMI CARMEN** y **TORRES APAZA, ROSELINE**, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado al Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herborizada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario; de la que se, desprende que el material analizado corresponde a la especie *Monnina salicifolia*. Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Polygales
Familia	:	Polygalaceae
Género	:	<i>Monnina</i>
Especie	:	<i>Monnina salicifolia</i> R. & P.
N. vulgar	:	Zambo colorata, aceturquia

Se le expide, la presente certificación de determinación de la especie para los fines que vieran por conveniente

Cusco, Abril de 2010

Arch/HV CUZ



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)

[Signature]
D. Sc. Francisca De La Torre Mancera
Directora

ANEXO N° 3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APUJADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 224131 - 224132 - 222512
- REGISTRO
Calle Veve N° 123
Teléfono: 222211 - 224031 - 224032 - 224033
- CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 1311 - Teléfono: 222661 -
222111 - 222222 - 222333 - 222444
- CENTRAL TELEFÓNICA: 222155 - 222210
222222 - 222333 - 222444 - 222555
- LOCAL CENTRAL
Paseo de Armas s/n
Teléfono: 222571 - 222721 - 222813
- MUSEO ENKA
Calle 14 de Abril s/n N° 151 - Teléfono: 222510
- CENTRO AGRONÓMICO N° 1474
515 Arzobispo s/n Cusco - Teléfono: 222143 - 222245
- COLEGIO "FORTUNATO L. BERKLEA"
Av. De la Cultura N° 123
"Escuela Universitaria" - Teléfono: 222102

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICA

Que, las Bachilleres: **TEVES MEZA, FLORMI CARMEN** y **TORRES APAZA, ROSELINE**, de la Carrera Profesional de **Farmacia y Bioquímica** de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado al Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herborizada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario; de lo que se, desprende que el material analizado corresponde a la especie *Prunus serotina* subsp *capuli* Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Rosidae
Orden : Rosales
Familia : Rosaceae
Género : *Prunus*
Especie : *Prunus serotina* subsp *capuli* (Cavonilles) McVaugh
N. vulgar : *Capuli*

Se le expide, la presente certificación de determinación de la especie para los fines que vieran por conveniente

Cusco, Abril de 2010



Arch/HV CUZ

Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)

M. Sc. Fructuosa Cecilia Toro Manrique
Directora

ANEXO N°4 (FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS)

Determinación de la humedad en los frutos

ESPECIE VEGETAL	Número de determinaciones		
	1°	2°	3°
<i>peso de muestra fresca</i>			
<i>peso de muestra seca</i>			
<i>porcentaje de humedad</i>			
<i>porcentaje promedio de humedad</i>			

Estudios preliminares de los frutos de la tres especies vegetales

Estudios preliminares	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Mullak'a)	<i>Monnina salicifolia</i> (Aceitunilla)	<i>Prunus serotina</i> (Capuli)
Humedad %			
Proteínas %			
Grasa %			
Ceniza%			
Fibra %			
Carbohidratos %			
Acidez % (ácido cítrico)			

Características de solubilidad del pigmento

Solvente	Solubilidad
Cloroformo	
Bencina	
Acetona	
Eter etílico	
Etanol 96°	
Etanol 70°	
Etanol 40°	
Metanol	
Agua destilada	

Leyenda:

- Totalmente soluble = ++++
- Parcialmente soluble = ++--
- Poco soluble = +---
- Insoluble = -----

Cuantificación total de antocianinas por pH diferencial**Valores de absorbancia a diferentes pH**

Muestra	Buffer	Absorbancia	Absorbancia	Promedio
		nm λ	nm λ	
1	pH 1			
2	pH 1			
3	pH 1			
1	pH 4.5			
2	pH 4.5			
3	pH 4.5			

Para los resultados obtenidas del porcentaje de inhibición del radical libre (DPPH)

<i>ESPECIE VEGETAL</i>						
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	VOLUMEN METANOL (mL)	VOLUMEN AMORTIGUADOR (mL)	VOLUMEN DPPH (mL)	VOLUMEN FINAL (mL)
Blanco						
Control						
T1						
T2						
T3						
T4						
T5						
T6						

Para los resultados obtenidas del porcentaje de inhibición del radical libre (método ABTS)

ESPECIE VEGETAL				
TUBOS	EXTRACTO (mg)	VOLUMEN EXTRACTO (mL)	VOLUMEN ETANOL (mL)	VOLUMEN ABTS (mL)
Blanco				
Control				
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				

Tiempos de retención de las antocianidinas presentes en las especies vegetales por HPLC

Especie vegetal	Pico	Identificación de la Antocianidina	Tiempo de retención
<i>Muehlenbeckia volcanica</i>			
<i>Monnina salicifolia</i>			
<i>Prunus serotina</i>			
<i>Vitis vinifera</i>			
<i>Fragaria vesca</i>			

ANEXO N° 5 (FOTOS DE LAS ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS)

Fotografía N°1



Hojas, tallos y frutos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

Fotografía N°2



Hojas y tallos de *Muehlenbeckia volcanica* (Mullak'a)

Fotografía N°3



Hojas, tallos y frutos de *Prunus serotina* (Capuli)

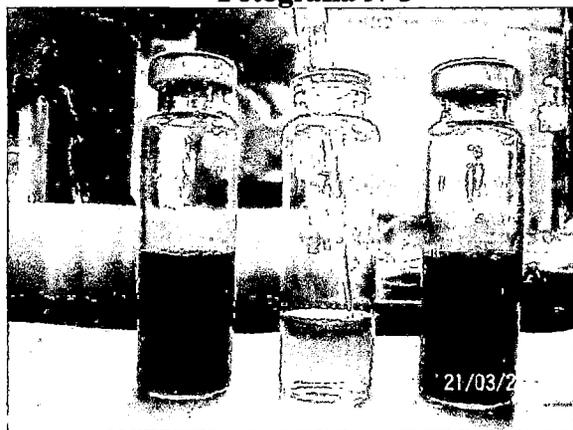
Fotografía N°4



Hojas, tallos, flores y frutos de *Monnina salicifolia* (Aceitunilla)

ANEXO N°5 (FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LA PARTE EXPERIMENTAL)

Fotografía N°5



Hidrolizados de los extractos

Fotografía N°6



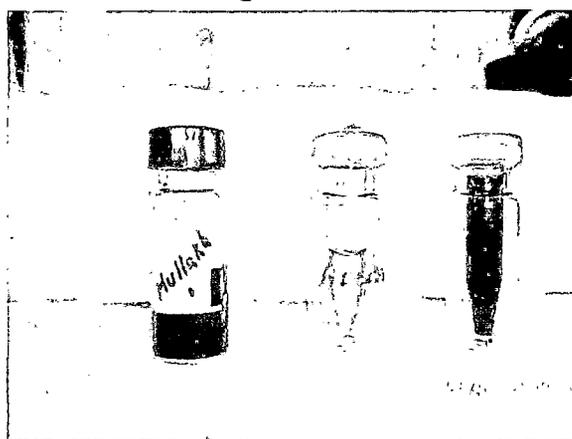
Proceso de activación del cartucho C-18

Fotografía N°7



Elución de las antocianidinas

Fotografía N°8



**Muestras de antocianidinas
colectadas en viales para su
lectura en HPLC**

Fotografía N°9

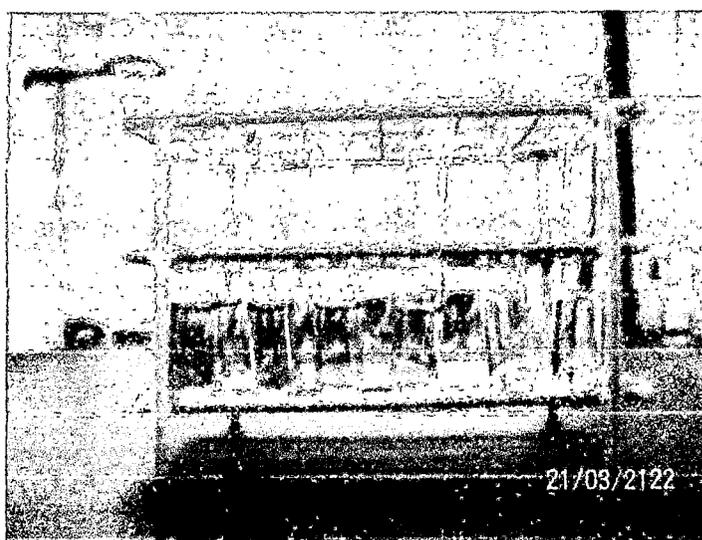


Fotografía N°10



Equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC en el cual se hizo la identificación de las antocianidinas de los extractos antocianicos

Fotografía N°11



Muestras procesadas con DPPH