



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS:

PARA OPTAR DEL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS,
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, DE LA HOJAS DE *Eriobotrya*
japonica "nispero"**

AUTOR:

BACH. KAREN LIZBETH VENTURA CHOQUE

ICA – PERÚ.

2 019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a nuestros padres por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. Por los consejos, valores que hicieron posible cumplir uno de mis anhelos más deseados.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida, por guiar mi camino. A los docentes de mi facultad por la educación académica brindada con su experiencia y profesionalismo.

ÍNDICE.

	Pág.
CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	x
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	12
1.1. Descripción de la realidad problemática.	12
1.2. Formulación del problema.	13
1.3. Justificación e importancia.	13
1.4. Objetivos	15
1.5. Hipótesis y Variables	15
CAPÍTULO II. BASES TEÓRICAS.	17
2.1. Antecedentes.	17
2.2. Marco teórico.	20
2.2.1. <i>Níspero (Eriobotrya japonica)</i>	20
2.2.1.1 Origen	20
2.2.1.2 Taxonomía	21
2.2.1.3 Condiciones de cultivo	22
2.2.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO	24
2.2.3. Antioxidantes	26
2.2.3.1. Sistemas antioxidantes	26

2.2.4. Clasificación de los antioxidantes	26
2.2.4.1. Medición de la actividad	27
2.2.5. Polifenoles	33
A) DEFINICIÓN	37
 CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.	 48
3.1. Material	48
3.1.1. Diseño, nivel y tipo de investigación.	48
3.1.2. La especie estudiada.	48
3.2. Métodos	49
3.2.1. Tratamiento a la especie estudiada.	49
3.2.2. Obtención de extractos	52
3.2.3. Caracterización de los extractos	52
3.2.4. Determinación del contenido de Flavonoides totales	57
3.2.5. Determinación de la actividad antioxidante	58
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	 61
4.1. Resultados.	61
4.1.1. Del material objeto de estudio	61
A) De la obtención del material a utilizar	61
B) de la caracterización del material seco y molido	61
4.1.2. De la obtención de extractos	61
A) Del extracto etanólico	61
B) Del fraccionamiento del extracto etanólico	61
4.1.3 De la caracterización de los extractos	61
A) Del análisis organoléptico	61
B) De la determinación de cenizas	62

C) De la determinación de metabolitos secundarios	62
4.1.4. De la determinación cuantitativa de polifenoles totales	63
4.1.5 De determinación del contenido de flavonoides totales	66
4.1.6. De la determinación de la actividad antioxidante	69
4.2. Discusión.	72
CONCLUSIONES.	74
RECOMENDACIONES.	75
FUENTES DE INFORMACIÓN.	76
ANEXO.	82

RESUMEN.

El presente trabajo de tesis es un estudio sobre las hojas de la especie vegetal *Eriobotrya japonica* "nispero". Estas hojas se secan y se muelen para obtener un material pulverulento, granuloso de color verde, sabor amargo y olor suigéneris. De este producto, utilizando etanol como solvente y por el método de digestión obtuvimos el extracto etanólico, el cual fue separado para obtener fracciones de este extracto que se utilizaron para la identificación de metabolitos secundarios; determinándose la presencia de metabolitos de naturaleza fenólica, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, catequinas y saponinas. A los extractos etanólico o fracción A y a la fracción D se les determina sus contenido de polifenoles totales utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu que una solución 1.4 % de fracción A tiene un contenido de fenoles totales equivalente al de una solución de ácido gálico de concentración 162,67 mg de ácido gálico / 100 ml y un contenido de flavonoides totales de 8,36 mg expresados como equivalentes a quercetina. Similarmente a la fracción D se les determina sus contenido de polifenoles totales utilizando una solución 1 % de fracción D y tiene un contenido de fenoles totales equivalente al de una solución de ácido gálico de concentración 89,19 mg de ácido gálico / 100 ml y un contenido de flavonoides totales de 8,75 mg expresados como equivalentes a quercetina. Estos extractos: etanólico y fracción D, tienen una capacidad para inhibir la actividad del radical libre DPPH de absorbancia 1,026 de 52,24 % y 70,77 % respectivamente

Palabras claves: *Eriobotrya japonica*, cuantificación de polifenoles totales, cuantificación de flavonoides totales, actividad antioxidante.

ABSTRACT

This thesis work contains a study on the leaves of the plant species *Eriobotrya japonica* "nispero". These leaves are dried and ground, obtaining a granular powdery material of green color, bitter taste and suigeneris smell. From the dried and ground leaves using ethanol as a solvent and by the method of digestion, ethanolic extract is obtained that was fractionated to obtain fractions of this extract that were used for the identification of secondary metabolites; determining the presence of metabolites of phenolic nature, tannins, flavonoids, coumarins, alkaloids, catechins and saponins. The ethanolic extracts or fraction A and fraction D are determined by their total polyphenol content using the Folin Ciocalteu reagent that a solution 1.4% of fraction A has a total phenolic content equivalent to that of a solution of gallic acid of concentration 162 , 67 mg of gallic acid / 100 ml and a total flavonoid content of 8.36 mg expressed as equivalent to quercetin. Similarly to fraction D, their total polyphenol content is determined using a 1% solution of fraction D and has a total phenolic content equivalent to that of a solution of gallic acid with a concentration of 89.19 mg of gallic acid / 100 ml and a Total flavonoid content of 8.75 mg expressed as equivalent to quercetin. These extracts: ethanolic and fraction D, have. an ability to inhibit the activity of DPPH free radical absorbance 1,026 of 52.24% and 70.77% respectively

Keywords: *Eriobotrya japonica*, quantification of total polyphenols, quantification of total flavonoids, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de tesis se realizó para determinar los metabolitos secundarios y actividad antioxidante de las hojas de níspero *Eriobotrya japonica* que crece en el distrito de Los Molinos, de nuestra región Ica, lugar en el que actualmente ninguna empresa trabaja con el producto, por lo que se hace necesidad llevar a cabo este estudio.

Nuestra región posee un notable clima, en el cual crecen una diversidad de cultivos. Algunos de estos cultivos han alcanzado preponderancia económica nacional pues se cultivan con fines de industrialización o para exportación. En ambos casos se generan una sobrecarga de residuos agrarios como son plantas pos cosecha que mayoritariamente terminan siendo quemadas en los propios campos de cultivos generándose grandes cantidades de humo lo cual contamina el ambiente, otras son destinadas a la producción de compost o fertilizante orgánico. Pero no todos los cultivos pueden utilizarse con criterio técnico o científico, pues la falta de estudios para dar uso a la mayoría de cultivos agroindustriales o de exportación. Uno de esos cultivos es el del níspero *Eriobotrya japonica*. Esta observación motivó a que desarrolle como tema de tesis “Determinación de metabolitos secundarios, actividad antioxidante, de la hojas de *Eriobotrya japonica* “níspero”, Trabajo que he culminado y lo presento en tres capítulos. El primero contiene la información general para desarrollar el proyecto, el segundo contiene información sobre los antecedentes de estudios en esta especie vegetal, el marco teórico referente al tema y el marco conceptual que aclara algunos de los términos utilizados. Finalmente doy a conocer las conclusiones, discusión y recomendaciones que se emanan de nuestra labor; así como la bibliografía consultada para desarrollar el tema.

Al término de esta labor espero haber dejado una información de valor para iniciar estudios que permitan demostrar que las hojas de *Eriobotrya japonica* “NISPERO” se pueden utilizar para la obtención y uso de sus metabolitos secundarios.

Debido a la falta de comprensión de cómo utilizar el níspero, se ha pasado por alto su potencial socioeconómico y puede ser un producto que la gente acepte como oportunidad de surgir económicamente. Es importante fomentar la investigación sobre este producto. Porque es posible encontrar un nicho particular y asegurar el éxito del producto en el mercado nacional e internacional.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.

El níspero se encuentra en gran parte en nuestro país, sin embargo, es muy poco su consumo y mucho menos conocen las propiedades beneficiosas que puede dar el fruto o las hojas del níspero.(1)

Considerando que deberíamos darle más importancia al consumo de las hojas o fruto del níspero este trabajo busca desarrollar el estudio fotoquímico de las hojas de ésta especie, para determinar si los metabolitos secundarios presentan actividad antioxidante para así buscar el medio de su actividad antibiótica. Por estas razones expuestas, se generó la necesidad de investigar la actividad antioxidante de estos metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de esta planta.

Ante ello, ésta investigación se enfoca en la evaluación de la actividad antioxidantes de las hojas de la especie vegetal *Eriobotrya japonica* "níspero", la actividad antioxidante se consigue mediante la captura de radicales cromogénicos como el ácido 2,2'-azino-bis- (3-etiltiazolin-bencenosulfónico-6) (ABTS *.) Y los radicales 2,2-difenil-1-catiónico. Por cierto. Utilice picril hydracil (DPPH *) y espectroscopia UV-VIS (luz ultravioleta visible).

1.6. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

Problema principal

¿Qué metabolitos secundarios y actividad antioxidante presentará las hojas de níspero *Eriobotrya japonica*?

Problemas específicos

¿Cuáles son las características del extracto etanólico de las hojas de *Eriobotrya japonica* ?

¿Cuál es el contenido de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas pos cosecha de *Eriobotrya japonica* Determinar ¿Qué % de actividad antioxidante tiene el extracto etanólico de las hojas pos cosecha de *Eriobotrya japonica*

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.

Justificación

La ejecución del presente proyecto es importante porque: Del uso adecuado de residuos orgánicos se puede obtener materia prima para obtener extractos, tinturas, entre otros.

No existe trabajo de investigación que dé a conocer la composición fitoquímica y actividad antioxidante de las hojas de *Eriobotrya japonica* “níspero”, del distrito de los Molinos - Ica.

La investigación para determinar la composición química bromatológica, el tipo de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante que tiene las hojas de *Eriobotrya japonica* “níspero”, del distrito de los Molinos – Ica, que quedan después del consumo del fruto es importante porque:

Permitirá conocer los tipos de metabolitos secundarios que poseen los extractos de este residuo. De estas hojas últimamente, el extracto etanólico, viene siendo estudiado por sus propiedades larvícidas contra

las larvas de los zancudos que son vectores de enfermedades epidemiológicas de las zonas tropicales y subtropicales.

De demostrarse que a partir de las *Eriobotrya japonica* –“ níspero”, del distrito de los Molinos – Ica , se obtiene algún extracto con actividad antioxidante se abrirán nuevas oportunidades de investigación con el objetivo de hallar al ò los metabolitos responsables de esta actividad.

Importancia

Es de gran importancia saber que, el estudio de especies vegetales, ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas desde el punto de vista estructural y que inhiben de manera notable la formación del biofilm, algunos ejemplos notables son los flavonoides, terpenoides y ácidos grasos. Estos hallazgos, en conjunto con la gran diversidad de especies vegetales , constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos que actúen sobre las determinantes patogénicas de ciertos microorganismos como *Escherichia coli*, causantes de diarreas crónicas y trastornos gastrointestinales, tomando en cuenta que la tolerancia de los biofilms bacterianas a los agentes antimicrobianos tiene importantes consecuencias clínicas, ya que, actualmente más del 60% de las infecciones bacterianas están asociadas a formación de biofilms.

La presente investigación es importante porque aporta conocimientos científicos sobre metabolitos secundarios, la actividad antioxidante, lo que permitirá utilizar las hojas de esta planta como una alternativa en la elaboración de nuevos fármacos.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los metabolitos secundarios y evaluar la actividad antioxidante de las hojas de níspero "*Eriobotrya japonica*".

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad antioxidante de las hojas de níspero mediante los métodos DPPH* Y ABTS*.
- Medir la capacidad antioxidante de las hojas del níspero y sus aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica.

HIPÓTESIS Y VARIABLES

1.5.1. Hipótesis Principal.

-Las hojas de *Eriobotrya japonica* "níspero", tienen características fitoquímicas propias de un alimento vegetal con metabolitos secundarios del tipo fenoles con alta actividad antioxidante .

1.5.2. Hipótesis Secundarias.

- El material seco y molido de las hojas de *Eriobotrya japonica* "níspero" tienen: Humedad 10 – 14 %, cenizas 2,2 – 3,8 %, fibras 18- 16 %, grasa 28- 34 % proteínas 8,0- 1,2 % y carbohidratos 40,0 – 56,0 %.
- Los extractos de polaridad creciente de las hojas de *Eriobotrya japonica* "níspero", tienen metabolitos secundarios del tipo de los polifenoles, triterpenos, alcaloides y flavonoides.
- Alguno de los extractos de las hojas de *Eriobotrya japonica* "níspero", tiene metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

1.5.3 Variables.

Variable independiente.

El extracto de las hojas del *Eriobotrya japonica*

Variable dependiente.

- Metabolitos secundarios
- Actividad antioxidante

1.5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Posición de la variable	Nominación de la variable	Indicador	Índice
Variable independiente	El extracto de las hojas del <i>Eriobotrya japonica</i>	Características fisicoquímicas	Color, aspecto, sabor, olor
Variable dependiente	-Metabolitos secundarios	g de material –ml de solvente- minutos de extracción Color, olor, sabor ,aspecto -Rendimiento	Rendimiento ml/100 g Excelente, bueno, regular, malo % % g/ml
	-Actividad antioxidante	DPPH	% de inhibición al DPPH

CAPITULO II. BASES TEÓRICAS.

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Algunos estudios referentes a esta especie vegetal son los reportados por:

Gabamukulya Y⁸, (2014) Presenta un estudio con el objetivo de determinar la composición fitoquímica, las actividades antioxidantes y anticancerígenas de extracto etanólico y acuoso de *Eriobotrya japonica* del este de Uganda. La actividad antioxidante se determinó usando los métodos 2, 2-difenil-2-picrilhidrazilo y de potencia reductora, mientras que la actividad anticancerosa in vitro se determinó usando tres líneas celulares diferentes, Determinando que los extractos tenían metabolitos secundarios: alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas y lactonas, antraquinonas, taninos, glucósidos cardiacos, fenoles y fitoesteroles. Los fenoles totales en el extracto de agua fueron $(683.69 \pm 0.09) \mu\text{g} / \text{ml}$ de equivalentes de ácido gálico (GAE) mientras que fue $(372.92 \pm 0.15) \mu\text{g} / \text{ml}$ de GAE en el extracto etanólico. La potencia reductora fue de $216,41 \mu\text{g} / \text{ml}$ en el extracto de agua y $470,51 \mu\text{g} / \text{ml}$ de GAE en el extracto etanólico. La actividad antioxidante in vitro IC₅₀ fue de $2,0456 \text{ mg} / \text{ml}$ y $0,9077 \text{ mg} / \text{ml}$ para hojas etanólicas y extractos de hojas, respectivamente. El extracto etanólico de hojas resultó selectivamente citotóxico in vitro para líneas celulares tumorales (EACC, MDA y SKBR3) con valores IC₅₀ de $335.85 \mu\text{g} / \text{mL}$, $248.77 \mu\text{g} / \text{mL}$, $202.33 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectivamente, Los resultados mostraron que las hojas de *Eriobotrya japonica* era un nuevo agente antioxidante y anticancerígeno prometedor.

Ana Cruz M. y Haydeé Hernández U. (2012) realizaron un estudio para determinar La actividad antioxidante y compuestos fenólicos en las hojas de *Eriobotrya japonica* para la elaboracion de un té, para ello se

extrajo, se identificó y se cuantificó los compuestos fenólicos en extractos alcohólicos de hojas de níspero, determinaron el contenido de clorofilas, actividad antioxidante de los extractos y se realizó una comparación el contenido de compuestos fenólicos de las infusiones o tés, más utilizadas con la tisana de hojas de níspero.

Erika A. López L. (2010) realizaron estudios para determinar la “Caracterización bioquímica del níspero (*Eriobotrya japonica*): Cinética de la polifenoloxidasas e identificación de compuestos fenólicos”. Los fenoles identificados presentaron actividad antimicrobiana, por lo que podrían tener una aplicación en la industria de los alimentos, y el catecol no solo fue el más representativo cuantitativamente, sino que además no ha sido reportado para níspero.

(Kazunari *et al.*, 2008). Se realizó ensayos del extracto metanólico-acuoso de las hojas del níspero ha demostrando la actividad antibiótica sobre las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis*. Una decocción de las hojas fue evaluada sobre *Mycobacterium tuberculosis* dando como resultado una inhibición débil.

(Argueta *et al.*, 1994). Algunos de estos triterpenoides, sesquiterpenoides, flavonoides y taninos han reportado actividad biológica como antioxidante, antiviral, citotóxica, antimutagénica, antitumoral y propiedades hipoglicemiantes.

E. Martínez V. Mayo de 1997 Realizó el Aislamiento Y Caracterización de metabolitos secundarios de *Bougainvillea glabra*, choisy, (Nyctaginaceae); *Leucophyllum frutescens*, (Rerl) I. M. Johnston, (Scrophulariaceae) Y *Eriobotrya japonica*, Linsl (Rosaceae).

De Tommasi y col. , 1990. En el estudio fueron detectados por lo menos cuatro derivados glicosilados de *E. japónica*, el sesquiterpeno loquatifolina A, herolidol, el ácido triterpénico maslínico, ácido trihidroxi-urs-12-endentato-28-, ácido ursólico y un derivado hidroxilo. Dentro de los alcaloides y sus derivados metilados se logro identificar el flavonoide loguatosido el cual fue aislado de la corteza de la fruta.

2.2. MARCO TEÒRICO

2.2.1. Níspero (*Eriobotrya japónica*)

2.2.1.1 Origen y distribución de la especie

Mencionada e identificada por primera vez como originaria del valle de Daduhe en el sur de China, y se creía que era de origen japonés, contrariamente a la descripción de Lindley, pero hasta que una publicación local introduce el término japónica para la semilla (Zhang et al. al., 1990). Se debe otorgar mérito al científico botánico alemán Camper que, en 1690, descubrió esta especie, quizás al llegar a Europa en 1784, algunos ejemplares se cultivaron en el Jardín Botánico de París. Según muestras de Mauricio, el género fue introducido por los jesuitas de Guangdong. Tres años más tarde, hasta mediados del siglo XIX, cuando fue descubierto en Inglaterra, fue incluido en las colecciones públicas y privadas del Levante español (gobernado por Saguntosi, Capitán Roig), Malta, Argelia, Grecia y Sicilia en Turquía. Introducido en Florida en 1867 y California en 1870, su cultivo sin haber prosperado económicamente. (Lin et al., 1999). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los principales productores son Asia, con India, Filipinas, Indonesia y China. Parte de América del Sur también se encuentra entre los 10 principales productores ^(12,13).

PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE NÍSPERO

País	Toneladas
India	3.700.000
Filipinas	3.600.000
Indonesia	2.000.000
China	1.675.192
Colombia	1.120.000
Tailandia	704.000
Pakistán	468.500
Brasil	335.000
Bangladesh	267.000
Perú	253.179

Fuente: FAO

2.2.1.2 Taxonomía y características generales⁽¹⁷⁾

División: Spermatophyta

Subdivisión: Magnoliophytina (Angiospermae)

Clase: Magnoliatae (Dicoytledoneae)

Subclase: Roside

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Maloidea (Pomoidea)

Género: Eriobotrya

Especie: *Eriobotrya japonica*

Es un arbusto grande siempre verde con una copa redondeada, tronco corto y corteza gris y fisurada. Mide de 5-10 m de altura pero frecuentemente es más bajo entre 3-4 m. Hojas alternas miden de 10-25 cm de largo, y son de color verde oscuro en el haz, con formas elípticas, aterciopeladas y nerviaciones prominentes

Su época de floración se produce a finales de otoño o en invierno (de octubre a febrero) y los frutos maduran de abril a junio. Sus flores miden 2 cm de diámetro

aproximadamente, son blancas y con 5 pétalos. Los frutos están agrupados y pueden ser ovales, redondeados o en forma de pera, miden de 3-5 cm de largo, con una cutícula lisa o pilosa, amarilla o naranja y a veces rojiza. La pulpa es succulenta; ácida, dulce o sub ácida dependiendo del cultivar. Cada fruto contiene cinco óvulos, de los cuales de tres a cinco maduran dando grandes semillas pardas. La piel puede despellejarse manualmente en fruta madura

2.2.1.3 Condiciones de cultivo⁽¹⁸⁾

La recolección de las hojas de la planta fue de la ciudad de Ica se necesita recolectar la hojas de un árbol orgánico sin pesticidas,

Es un árbol siempre verde, de porte pequeño a mediano (5 a 8 m de altura), pertenece a la familia Rosaceae y está agrupado dentro de la subfamilia Pomoideae, la cual incluye a especies frutales tan importantes como el manzano, el peral, el membrillo y el tejocote

Hojas. Se desarrollan con mayor frecuencia sobre las ramas del año; son grandes y lanceoladas, de 12 a 30 cm de largo y de 5 a 8 cm de ancho, alternas, subsésiles, coriáceas, rugosas, remotamente dentadas, de color verde oscuro lustroso en el haz, y velludas de color ocre en el envés; las nervaduras laterales son prominentes. Aunque es de hoja perenne, en la brotación se produce una caída natural, principalmente en las ramas de dos y tres años de edad.

2.2.1.4 PARTICULARIDADES:

ANTIOXIDANTES: Ayuda a eliminar los radicales libres del cuerpo y neutralizar sus efectos dañinos ⁽¹⁸⁾.

MUCOLÍTICAS: Actúa como un agente mucolítico natural, permitiendo que las secreciones de los bronquios y la nariz se relajen y aclaren ⁽¹⁸⁾.

DESINTOXICANTES: Mejora la capacidad del hígado para eliminar toxinas del cuerpo. El jugo de semilla de melón agregado a los jugos al cocinar y moler tiene propiedades de limpieza de cálculos biliares ⁽¹⁹⁾.

ANTIINFLAMATORIAS: Para la urticaria, reduce la irritación de la piel y se debe aplicar infusión sobre la piel inflamada ⁽¹⁹⁾.

INMUNOLÓGICAS. Aumenta la inmunidad y, a menudo, ayuda a prevenir la cistitis recurrente ⁽¹⁵⁾.

ANTIBACTERIANA. Muestra actividad antibiótica contra bacterias como *Escherichia coli* ⁽¹⁶⁾.

OTRAS. También estimula la producción de insulina, mejorando así el manejo de la diabetes.

2.2.2. ANÁLISIS FITOQUÍMICOS

Se han hecho varios estudios sobre la composición química de *E. Japonica*, especialmente de sus hojas, de donde se han aislado y caracterizado más de 50 compuestos⁽¹⁷⁾.

Tabla N° 1

PRINCIPALES COMPUESTOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE NÍSPERO

Órgano	Compuestos químicos	Referencia
Hojas	<p>Aceites esenciales: nerolidol (61~ 74%), farnesol, α-pineno, β-pineno, camfeno, β-mirceno, p-cimeno, óxido de linalool, α-ilangeno, α-farneseno, canfor, nerol, geraniol, α-cadinol, cis-β, γ-hexenol;</p> <p>Sesquiterpenos: loquatifolín A, derivados glicosilados de nerolidol e isohumbertiol (más de ocho, aislados y caracterizados);</p> <p>Ácidos triterpénicos: ursólico, corosólico, oleanólico, euscáfico, pomólico, tormético, metil ursolato, 3-epicorosólico, 1β-hidroxieuscáfico, maslínico, metil arjunolato, betunílico, hiptadiénico, entre otros;</p> <p>Flavonoides: hiperósido, rutín, kaempferol, quercetina y sus derivados (más de 15, aislados y caracterizados).</p>	<p>Yanagisawa <i>et al.</i>, 1988</p> <p>De Tommasi <i>et al.</i>, 1990, 1992</p> <p>Chen & Li, 2008</p>
Cáscara del fruto	Flavonoide: loquatósido	Agrawal & Misra, 1980
Fruto	Enzima: polifenol oxidasa	Sélles <i>et al.</i> , 2006
Semilla	<p>Bencenoide: amigdalín;</p> <p>Aminoácido: 4 -metilenprolina</p>	<p>Kato, 1986; Gray & Fowden, 1972</p>

Fuente: Huang et al ., 2005

2.2.3. Antioxidantes

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Matill, H.A. 1947).

Por antioxidante se entiende como: toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda, inhibe o previene la oxidación de dicho sustrato; y desde el punto de vista biológico es: todo compuesto que protege los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” (Halliwell, B. and Gutteridge. J.M.C. 2007). Los antioxidantes son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica. Además de estas aplicaciones en medicina los antioxidantes tienen muchas aplicaciones industriales, tales como conservantes de alimentos, de cosméticos y la prevención de la degradación del caucho y la gasolina (Castro Dantas, T.N. et al. 2003; Huang, D. et al. 2005).

Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y la

vitamina E, enzimas como catalasa, superóxido bismutasa así como diversas peroxidasas. Los niveles tan minúsculos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes pueden causar estrés oxidativo, que daña e inclusive puede matar las células. (Vickers, T. 2007).

2.2.3.1 Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes, son usados en el sistema fisiológico como protección de radicales, donde se encuentran numerosos compuestos de diversas estructuras, como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas, etc.), antioxidantes endógenos de bajo peso molecular (glutatión, ácido úrico, etc.), antioxidantes exógenos⁽²¹⁾.

2.2.4. Clasificación de los antioxidantes

No hay establecido un criterio único para la clasificación de los antioxidantes, por que varios de ellos actúan por diversos mecanismos. La literatura reporta varias formas de clasificación a saber:

- Clasificación por país de origen, en esta clasificación se encuentran AO's naturales y sintéticos. Antioxidantes naturales derivados de plantas y animales. Entre los antioxidantes naturales destacan los carotenoides como los flavonoides, ácidos fenólicos, ácido hidroxicinámico, ácido hidroxibenzoico y polifenoles (Tsao R y Dengb.Z. 2004) y los antioxidantes sintéticos son fundamentalmente compuestos fenólicos que cuentan con diversos grupos alquilo, como por ejemplo butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), entre otros como ter-butil-hidroquinona (TBHQ) y propilgalato (PG); la bibliografía construida por investigaciones avanzadas indica que la estructura de estos tipos de

componentes permiten entregar protones a un radical libre (Ramalho, V.C. and Jorge, N. 2006)

- Clasificación de acuerdo al mecanismo de acción se pueden agrupar todos los antioxidantes como profilácticos, bloqueadores de cadena (secuestradores de radicales) y de reparación. (Tabla N° 2).

TABLA N° 2

Clase	Modo de Acción
Antioxidantes preventivos	Quenchers o desactivadores de 1O_2 , Quelantes. Reductores.
Bloqueadores de cadena	Quenchers o atenuadores de radicales, Scavengers o secuestradores de radicales

Tabla 2. Clasificación de antioxidantes según origen. (Fuente: Autor)

La clasificación por organismos de acción orgánica ha desarrollado diversas estrategias para proteger las células de los procesos relacionados con las ERO's a través de la acción de los antioxidantes. Dentro de esta categoría, los antioxidantes se dividen en tres sistemas. (Sánchez, R.M.; 1998)

- Clasificación por acción in vivo Hemos desarrollado diversas estrategias para proteger a las células de procesos que involucran ERO's a través de la acción antioxidante bioactiva. Disminuye gradualmente con el tiempo. Dentro de esta categoría, los antioxidantes se agrupan en tres sistemas. (Sánchez, R.M.; 1998)

2.2.4.1. Medición de la actividad antioxidante ⁽²¹⁾

Las propiedades antioxidantes de una muestra no se pueden determinar basándose únicamente en ensayos. De hecho, se realizan muchos modelos experimentales in vitro para evaluar la actividad antioxidante de las muestras objetivo. Sin embargo, cabe señalar que existen diferentes tipos de modelos. Por lo tanto, puede ser un poco difícil comparar los resultados de un método con otro.

La mayoría de las pruebas para determinar la capacidad antioxidante se basan en reacciones químicas que se pueden dividir en dos categorías.:

- 1) Son ensayos que se basan en alguna reacción por intercambio químico de átomos de hidrógeno (HAT).
 $ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + AA\cdot$
- 2) Son ensayos que se basan en alguna reacción por intercambio químico de electrones (ET).

Los ensayos que se basan en alguna reacción por intercambio químico de electrones (ET) incluyen reacciones REDOX que utilizan oxidantes como indicadores de los parámetros de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT controlan típicamente la dinámica competitiva que consiste en captadores de radicales libres sintéticos, ensayos de moléculas oxidativas y antioxidantes. Se desarrollaron pruebas basadas en HAT y ET para medir la capacidad de las muestras para eliminar los radicales libres, no los antioxidantes.

TABLA N°3..

ENSAYO	CATEGORIA
Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS**)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*)	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC.)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP).	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico.	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL).	

. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT.
(Fuente: Huang et al., 2005).

Recientemente, se han utilizado diversas pruebas espectroscópicas para medir la actividad antioxidante de alimentos, muestras biológicas y extractos de plantas. Las pruebas de antioxidantes in vitro son generalmente relativamente sencillas de realizar utilizando dispositivos captadores de radicales libres. En el análisis de eliminación de radicales libres, el método DPPH * es el más rápido, el más fácil (no se requieren varios pasos) y el menos costoso en comparación con otros modelos. Mientras tanto, la prueba de decoloración ABTS * es aplicable a antioxidantes hidrófilos y lipófilos. Por tanto, estos dos métodos son los más utilizados.

- **Ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH*)** ⁽¹⁹⁾

Este modelo de ensayo fue propuesto por Blois (1958) y pudo demostrar por primera vez la propiedad de los radicales libres como DPPH* para aceptar átomos de hidrógeno (H) en moléculas de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*) se conoce como un radical libre estable debido a la división de electrones no apareados en toda la molécula, por lo que la molécula no se daña. Se hundió. Cuando están presentes la mayoría de los radicales libres. La división de electrones también aumenta el característico color púrpura intenso de los radicales absorbidos por el metanol a 517 nanómetros. El color púrpura desaparece cuando la solución DPPH* reacciona con un antioxidante que puede producir átomos de hidrógeno. Los cambios de color se controlaron espectrofotométricamente y se utilizaron para determinar los parámetros de las propiedades antioxidantes. Los resultados de la prueba DPPH* se muestran de forma diferente. La mayoría de los estudios dieron como resultado una concentración inhibitoria máxima media (IC50) definida como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Este valor se calculó representando gráficamente entre la concentración inhibitoria y la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos purificados, el valor de CI50 depende de la concentración final de DPPH* utilizada (Deng et al. 2011). La prueba DPPH* tiene algunos inconvenientes que limitan su aplicación: ○

- Existen diferencias en los métodos para tomar medidas entre antioxidantes y grupos peroxilo.
- Si, DPPH** es un nitrógeno de nitrógeno largo, que no lo mantiene con un grupo de peroxilo muy activo y el transitorio que contiene la corriente de lepidos. La mayoría de los antioxidantes responden rápidamente al peroxilo extremista que trabajan lentamente o similares a la DPPH*. Estos límites están indicados para determinar 50 IC en el rango 103 (ácido ascórbico) hasta 103 minutos (diariamente).
- La respuesta del Hintar entre el DPP* y los antioxidantes no son una línea recta en el foco de DPCH*, por lo que la potencia del antioxidante utilizada.

**Ensayo de decoloración con el radical catiónico
Acido 2,2'- Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-
Sulfónico (ABTS*+)**

Miller, Nueva Jersey. et al. En el año 1993, tuvo la seguridad respecto de la capacidad antioxidante de ABTS* para poder ejercer el secuestro de aniones radicales de larga duración. En estas pruebas, ABTS* fue propulsado por algunos radicales libres de peróxido como persulfato de potasio (RE 1999), peróxido de hidrógeno (Villano, D. et al. 2004) y peroxidasa de rábano picante (Labrinea, EP et al. Georgiau, CA; 2004; 2004) otros oxidantes que forman radicales ABTS* catiónicos son de color

verde oscuro, y los compuestos con capacidad antioxidante en la medición reaccionan directamente para reducir el color de los cationes radicales ABTS*. Los resultados obtenidos se expresan como inhibición y son concentraciones relativas. Por lo tanto, se denomina capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). Dado que los radicales son solubles en medios polares y apolares y no se ven afectados por la fuerza iónica, estamos evaluando antioxidantes hidrófilos y lipófilos en extractos de plantas, animales y fluidos corporales (Huang, D. et al.2005; Roginsky, V. y Lissi, EA 2005; antes, RL; et al.2005). La formación de radicales ABTS es la base de cualquier método espectrofotométrico que se aplica para lograr medir la actividad antioxidante completa de algunas soluciones e inclusive sustancias puras, así como también mezclas acuosas. La prueba inicial de ABTS se basa en la activación de peróxido de hidrógeno de metil mioglobina en presencia de ABTS para generar radicales catiónicos en presencia o ausencia de antioxidantes. Ha sido cuestionado por su veloz reacción de antioxidantes, lo que contribuye a la reducción de radicales ferilmioglobina. Una forma más adecuada de análisis es el blanqueo, donde el radical 23 se produce directamente en una forma estable antes de reaccionar con antioxidantes (Re et al., 1998). Los radicales ABTS * son más adecuados para probar compuestos coloreados como las antocianinas, lo que reduce la probabilidad de interferencia de compuestos debido a compuestos coloreados

absorbidos en la región visible o por reacciones secundarias. Además, se ha demostrado que los radicales generados químicamente (persulfato de potasio) son estables y reproducibles, lo que los convierte en una alternativa mucho más económicamente viable.

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación DPPH*, según la fórmula de (Yen and Duh.et al., 1994) (ecuación 1):

$$\frac{\% \text{ de captación DPPH}^*}{\% \text{ de captación ABTS}^{**}} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

A inicial es la absorbancia de control a los 0 min y A final es la absorbancia del antioxidante a los 10 min. El% de absorción de DPPH* es proporcional a la concentración de antioxidantes y la concentración reductora: la concentración inicial de DPPH*. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o ser inactivos frente al DPPH* debido al impedimento estérico.

2.2.2. POLIFENOLES

A) DEFINICIÓN

Son compuestos químicos que tienen un anillo bencénico y al menos uno de sus hidrógenos está reemplazado por un grupo oxidrilo constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos de las plantas. Estos compuestos son esenciales para su fisiología, ya que contribuyen a su morfología, crecimiento, y reproducción. Se ha podido detectar que los polifenoles están directamente involucrados en los sistemas de defensa de las plantas frente a componentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y algunos predadores.²²

B) IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES

En los últimos años, los polifenoles con muchas otras actividades biológicas han despertado un gran interés en la medicina ya que tienen efectos beneficiosos sobre la patogénesis de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (cáncer, enfermedades, etc., enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas). Por tanto, indica que puede actuar como agente antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano, antitrombótico y anticanceroso.^{23,24}

C) CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS POLIFENOLES.

Comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos.

Las principales clases de polifenoles en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos.

Flavonoides.

Es el grupo de plantas más extendido, y en la actualidad se han identificado más de 4000 compuestos diferentes. Su estructura química general es la del difenilpropano (C₆-C₃-C₆), que consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos mediante tres carbonos formando un heterociclo oxidante (anillo C).

Los flavonoides se pueden dividir en diferentes subclases, dependiendo del estado de oxidación de la cadena de carbono. Los más representativos de ellos son los flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas).

Los flavonoides generalmente se unen a otros carbohidratos y ácidos orgánicos, pero en las plantas también pueden unirse como agliconas, son el grupo más común de flavonoides utilizados en alimentos vegetales, siendo la quercetina el principal representante, suelen encontrarse en los alimentos en forma glicosilada y son los principales azúcares implicados en la glucosa o ramnosa. Las flavonas son los flavonoides más comunes en el reino vegetal y están formadas principalmente por los glucósidos luteolina y apigenina, perejil y apio. Solo las fuentes primarias son comestibles. Además, la piel de la fruta contiene grandes cantidades de flavonas polimetilpentadas (tangeretina, nobiletina, sinensetina). Las flavanonas se caracterizan por una cadena saturada de tres carbonos y un átomo de oxígeno C₄. Los alimentos ricos en flavanonas son los cítricos, pero también se encuentran en algunas plantas aromáticas como los tomates y la menta. Entre los diversos componentes de la flavanona, la naringenina, en particular, es abundante principalmente en pomelo, hesferetina, naranja, erodictyol y limón. Las flavanonas se encuentran generalmente en formas glicosiladas en alimentos

como la hesperidina (un complejo de rutinosa y hesperetina). Se informa que el jugo de naranja contiene de 470 a 761 mg / L de hesperidina. Debido a que las isoflavonas son químicamente similares al estrógeno y tienen la capacidad de unirse a este receptor hormonal, se clasifican como fitoestrógenos. En los alimentos, las isoflavonas se pueden encontrar como agliconas o más comúnmente como conjugados de glucosa. Las principales isoflavonas son genisteína, daidzeína y copriciteína, la mayoría de las cuales se encuentran en legumbres. La soja y sus derivados son la principal fuente de isoflavonas en la dieta humana. Las antocianidinas (peralugonigin, marubizin, cyanigin) son pigmentos solubles en agua responsables de la mayoría de los colores rojo, azul y morado de frutas, verduras, flores y otros tejidos o productos vegetales. Las antocianidinas se encuentran a menudo como glucósidos (antocianinas) en las plantas debido a sus agliconas altamente lábiles. Las antocianidinas se encuentran en el vino tinto, ciertos cereales y verduras, pero sobre todo en las frutas. El contenido de antocianidinas en los alimentos suele ser proporcional a la intensidad del color y puede alcanzar valores de peso fresco de 2-4 g / kg para pasas y arándanos. Los flavonoides se encuentran naturalmente en forma de monómeros (catequinas) y polímeros (proantocianidinas o taninos condensados).

A diferencia de otros flavonoides, no existen en su forma glicosilada en los alimentos, lo que los distingue. Aunque las catequinas y epicatequinas (EC) son los flavonoides más comunes en frutas, las galocatequinas, epigalocatequinas (EGC) y epigalocatequinas (EGCG) se encuentran en legumbres, uvas y principalmente semillas de té. Las proantocianidinas son flavonoides que provocan la astringencia de determinadas frutas (uvas, manzanas, bayas, etc.) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.). Los únicos datos disponibles en la literatura se refieren a abundantes dímeros y trímeros de catequina como la catequina,

ya que es difícil evaluar el contenido de proantocianidina de los alimentos debido a su amplia gama de estructuras y pesos moleculares.^{25,26,27}

Ácidos fenólicos.

El ácido hidroxibenzoico (como el osteoácido y el ácido protocatecuico) rara vez se encuentra en alimentos de origen vegetal, por lo que no se ha estudiado mucho.

Estos compuestos forman parte de una estructura compleja que permite que los taninos se hidrolicen. Con la excepción de los frutos rojos como los arándanos, el contenido de ácido hidroxibenzoico de algunas plantas comestibles es relativamente bajo y puede alcanzar un peso fresco de 270 mg / kg. El té verde también es una fuente importante de osteoacidez y las hojas pueden contener hasta 4,5 g / kg de peso fresco. El aceite de frambuesa y de oliva puede contener hasta 100 mg y 0,22 mg de ácido protocatecuico, respectivamente, por kilogramo de peso corporal fresco.^{25,26}.

Los ácidos hidroxicinámicos

Son más comunes que el ácido hidroxibenzoico. Los principales representantes de este grupo son el ácido cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico. Se puede ver que estos ácidos a menudo están glicosilados en los alimentos o forman ésteres con ácido quínico, ácido shikímico o ácido tartárico. La combinación de ácido cafeico y ácido quínico produce ácido clorogénico (CGA) que se encuentra en muchas frutas, especialmente en el café. (Una taza de café de 128 ml puede contener entre 70 y 350 mg de CGA). Así, el ácido ferúlico es más abundante en los cereales y en los

granos de trigo puede llegar a 0,8 a 2 g por kg de peso seco (90% del total de polifenoles).^{25,26}

Alcoholes fenólicos.

El tirosol (4-hidrofeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) son los principales representantes del grupo de los alcoholes fenólicos, y el tirosol también se encuentra en bebidas como el vino tinto, el vino blanco y la cerveza.

Estilbenos.

El estilbeno se encuentra en pequeñas cantidades en la dieta humana y el resveratrol es el compuesto fenólico más representativo de este grupo 4, contribuye significativamente a las altas concentraciones de resveratrol en el jugo de uva y el vino tinto, alcanzando 0,3-7 mg de aglicona / L y 15 mg de glucósido / L.

Lignanós.

Los lignanos se forman mediante la dimerización de dos unidades de fenilpropano. La mayoría de estos compuestos son de naturaleza libre, pero muy pocos derivados glicosilados.^{25,26}

D) BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO.

La biodisponibilidad se puede explicar de varias formas. La definición ampliamente aceptada es la velocidad a la que los nutrientes se digieren, absorben y metabolizan de la manera habitual. El concepto de biodisponibilidad es muy importante. Esto se debe a que los polifenoles más abundantes no son necesariamente los más activos en el organismo debido a su baja actividad intrínseca, baja absorción intestinal, alta tasa metabólica y rápida excreción. En general, el metabolismo de los polifenoles

se produce mediante una serie de reacciones comunes a todos los seres humanos, similares a la desintoxicación metabólica que sufren muchos heterobiólogos para reducir los efectos citotóxicos. Células latentes aumentadas, hidrofilia, aclaramiento de orina o bilis promovido. Los estudios en animales de laboratorio han demostrado que ciertos polifenoles como la quercetina, la daidzeína y la genisteína pueden absorber ciertos polifenoles como ciertas antocianidinas o ácidos fenólicos como el ácido clorogénico directamente del estómago en lugar de los glucósidos. Sin embargo, los polifenoles restantes más resistentes al hidrólisis ácida en el estómago llegan intactos al intestino delgado y sólo algunos ácidos hidroxinámicos conjugados y algunos glucósidos son absorbidos directamente por el aglicón. Puede afectar la absorción en el intestino. Primero, es hidrolizado por enzimas intestinales como la lactasa-azúcar lisina hidrolasa (hidrólisis extracelular) o -glucosidasa (hidrólisis intracelular). Por lo tanto, los polifenoles glicosilados se absorben más fácilmente en el intestino grueso que otros polifenoles glicosilados, como los que se unen a las moléculas de ramnosa, y son absorbidos y degradados por enzimas de la microbiota del intestino grueso. Tras la absorción, los polifenoles experimentan reacciones verbales (metilación, sulfatación, conjugación de ácido glucurónico y glicina y fosfo en el caso de ciertos ácidos fenólicos) en las células intestinales y luego en los hepatocitos. Por lo tanto, los polifenoles que normalmente ingresan al torrente sanguíneo y a los tejidos son diferentes de los polifenoles originales. Polifenoles en alimentos. Varios estudios in vivo (humanos y animales) han sugerido que el 5% de la ingesta diaria total de polifenoles es absorbido por el duodeno y el 5% llega al torrente sanguíneo principalmente sin alterar la estructura del flavanol. El resto (95%) del total de polifenoles ingeridos llega al colon y es fermentado y absorbido por los microorganismos del colon para producir metabolitos

microbianos representados por derivados que se unen al plasma. Una vez absorbidos y metabolizados, los polifenoles pueden regresar al duodeno a través de un ciclo de absorción y prolongar su presencia en el cuerpo. Finalmente, los polifenoles que circulan en el plasma antes de ser eliminados de la orina se unen fuertemente a la albúmina y son particularmente fáciles de integrar en los tejidos metabólicos (hígado, estómago, tejidos intestinales, cólicos y nefritis). También puede acumularse en tejidos diana específicos como tejido pulmonar, páncreas, cerebro, corazón y bazo.^{26,28,29,30.}

E) POLIFENOLES Y SALUD.

Polifenoles e inflamación

Se ha informado que la quercetina y el resveratrol son agentes antiinflamatorios vasculares, y la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) juega un papel importante en el inicio de la aterosclerosis al activar las señales de la inflamación. Se encontraron reducciones muy significativas en los niveles de óxido nítrico intracelular y se evidencia la sobreproducción de superóxido en las células endoteliales de la vena umbilical humana tratadas con oxLDL pero no con LDL. El desequilibrio redox se evitó agregando quercetina o resveratrol como moduladores de la respuesta inflamatoria, reduciendo al menos en parte la sobreexpresión de quimiocinas y moléculas de adhesión después del tratamiento de oxLDL. Los datos obtenidos de este estudio demuestran que los polifenoles pueden influir en la inflamación vascular no solo como antioxidantes sino también como moduladores de las vías de señalización redox inflamatorias.^{29,30}

Los polifenoles en enfermedades cardiovasculares

Ciertos polifenoles (Plavanol y Prabanol) tomados como suplemento o con alimentos pueden mejorar la salud y / o reducir el riesgo de estas enfermedades. Entre los mecanismos por los cuales los polifenoles pueden proteger el corazón se encuentran la función endotelial mejorada, la supresión de angiogénesis, la migración celular y la proliferación vascular. Se ha informado que la ingestión de isoflavonas de soja reduce el riesgo de infarto de miocardio. En este estudio, se administraron isoflavonas a la dieta de 40.500 mujeres posmenopáusicas (de 40 a 59 años) para evaluar la tasa de accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Los resultados muestran que el aumento de la ingesta de isoflavonas de soja reduce el riesgo de esta afección.^{29,30}

Polifenoles y diabetes

Se ha podido demostrar que los niveles bajos de antioxidantes en plasma están asociados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, y muchas complicaciones diabéticas que conducen a la muerte del paciente están asociadas con el estrés. Tratamiento de esta enfermedad El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción (ROS) y la decodificación en el sistema biológico. Por tanto, existe una base para el uso terapéutico de antioxidantes y la prevención de las complicaciones diabéticas. Para reducir el estrés oxidativo de esta enfermedad, algunos de los antioxidantes estudiados son la cianidina, que se encuentra más comúnmente en los frutos rojos. Los estudios han demostrado que la ingestión de 100 g de polvo de arándano liofilizado que contiene 1,2 g de antocianinas totales aumenta significativamente los parámetros antioxidantes.^{29,30}

Polifenoles y cáncer

El origen y la causa del cáncer aún no está claro, pero los radicales libres como ROS y nitrógeno pueden inducir la peroxidación de lípidos, causando daño a diferentes células y otros cánceres pueden inducir cáncer. Varios estudios con estos antecedentes han demostrado que existe una fuerte asociación inversa (habla) entre la ingesta de frutas y verduras y el riesgo de varios tipos de cáncer. Por estas razones, a lo largo de las décadas, los investigadores se han interesado en aislar los compuestos que se encuentran en las plantas para su evaluación como posibles agentes anticancerígenos. Los antioxidantes se encuentran entre las principales categorías de inhibidores cancerígenos y los polifenoles son los más utilizados y estudiados. Se ha informado en la literatura de compuestos tales como quercetina, rutina, luteolina, miricetina, ácido rosmarínico y catequinas para proteger el ácido desoxirribonucleico (ADN) del daño por especies reactivas de oxígeno. Otro compuesto importante es el resveratrol, que tiene un fuerte efecto anticancerígeno. El resveratrol se encuentra en la piel de las uvas (en concentraciones bajas) y los vinos tintos se encuentran en concentraciones más altas. Varios estudios han informado que las células cancerosas tienen causas antitumorales y fatales. También existe una clara evidencia de que las catequinas en el té verde (epigallocatequina, catequina, epicatequina, etc.) tienen importantes efectos anticancerígenos.^{30,31}

Polifenoles en desórdenes neurodegenerativos

Las bondades de los polifenoles son debido a sus propiedades antioxidantes también se han evaluado en la actividad del sistema nervioso central (SNC). Como se mencionó anteriormente, los

radicales libres pueden causar peroxidación de lípidos en las membranas de las células y causan disfunción neuronal y muerte, por lo que el consumo de antioxidantes tiene el potencial de prevenir el estrés oxidativo. Este proceso de peroxidación de lípidos está presente en todas las enfermedades y está asociado con un riesgo reducido de enfermedad. Enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson. Los estudios indican que los extractos metafóricos y metafóricos (nativos de América del Sur) contienen al menos 4 sustancias polifenólicas que son capaces de inhibir la acetilcolinesterasa, una enzima que sobreexpresa provoca efectos nocivos Dinámica clínica de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, incluso cuando el gua está realmente presente, los compuestos antioxidantes pueden reemplazar las moléculas bioactivas que evitan la desnaturalización. trigésimo primero Los compuestos catequina, epicatequina, quercetina y procianidina disminuyen la producción de ROS e incrementan la actividad de algunas enzimas antioxidantes como el catarismo, la superóxido dismutasa, el glutatión reductasa y el glutatión peroxidasa, y la oxidación en la sangre del cuerpo.³¹

1.1. MARCO CONCEPTUAL

Estudio fitoquímico. Métodos de análisis químicos dirigidos a la investigación para identificar metabolitos secundarios de especies vegetales⁽¹⁾.

Estudio químico bromatológico. Métodos de análisis químicos dirigidos a la investigación para identificar cuantificar los metabolitos primarios o componentes mayores de un material biológico⁽⁴⁾.

Extracción: Es una operación de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla en un disolvente selectivo⁽¹⁾.

Caracterización: Es la fijación de las características del material determinado que viene siendo estudiado⁽⁴⁾.

Características organolépticas. Son aquellas particularidades del material analizado que pueden ser determinadas utilizando los órganos de nuestro sentido⁽⁴⁾.

Características físico químicas. Son aquellas particularidades del material analizado que pueden ser determinadas por distintas técnicas de caracterización, de acuerdo al interés que despierte dicho material⁽⁴⁾.

Aceite vegetal: Es una mezcla de compuestos ácidos orgánicos de cadena lateral larga, por lo general entre de 12 átomos hasta 24 átomos de carbono. Algunos de ellos saturados y otros con insaturaciones se obtienen principalmente de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía ⁽⁷⁾.

Solvente orgánico: Compuesto químico orgánico de naturaleza líquida muchos de los cuales tienen punto de ebullición menor al punto de ebullición del agua y se les utiliza solos o en combinación con otro para disolver materias insolubles en agua ⁽⁹⁾.

Actividad antioxidante. Propiedad de ciertos componentes o compuestos químicos que es capaz de atrapar electrones libres de los radicales libres ⁽¹⁾.

Radical libre. Especie química que exhibe o presenta un electrón desapareado lo cual lo hace ser extremadamente reactivo ⁽¹⁾.

Caracterización. Asignación de una o varias propiedades de aquello que se caracteriza ⁽⁴⁾.

Cuantificación. Proceso que permite conocer el contenido de un análisis en la alícuota analizada y desde aquí se puede expresar en porcentaje, ppm u otra unidad ⁽¹⁵⁾.

Fenoles. Compuestos químicos de naturaleza bencénica en el que al menos uno de sus hidrógenos haya sido sustituido por el radical oxidrilo ⁽²⁶⁾

Flavonoides. Compuesto químico de naturaleza fenólica constituido por tres ciclos o anillos dos bencénicos y uno lactónico ⁽²⁶⁾.

Concentración inhibitoria media. Es la cantidad expresada en microlitros o microgramos de un compuesto o extracto químico que tiene la capacidad para inhibir el 50 % de la absorbancia del radical libre DPPH de absorbancia comprendida entre 0.970 – 1.030 ⁽¹⁾.

Porcentaje de inhibición. Es la cantidad expresada en microlitros o microgramos de un compuesto o extracto químico que tiene la capacidad para inhibir un determinado % de la absorbancia del radical libre DPPH de absorbancia sin exposición a algún antioxidante y es considerada 100 % de actividad libre del radical DPPH ⁽¹⁾.

Estudio fitoquímico. Métodos de análisis químicos dirigidos a la investigación para identificar metabolitos secundarios de especies vegetales ⁽³⁾.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA^{32,33,34,35,36}

3.1. MATERIAL

3.1.1. Tipo, nivel y diseño de investigación

Tipo	:	Básica
Nivel	:	Descriptivo
Diseño de investigación	:	Experimental transversal

3.1.2. LA ESPECIE ESTUDIADA

Para el presente estudio la población estuvo constituida por todas las hojas del cultivo *Eriobotrya japonica* “níspero” que crece en el Distrito de los Molinos de la provincia de Ica. y la muestra la conformó 5 kg de plantas cosechadas de donde se obtuvieron hojas pos cosecha de *Eriobotrya japonica* “níspero”.

POBLACIÓN Y MUESTRA

A) POBLACIÓN

Las hojas de *Eriobotrya japonica* de las plantaciones del distrito de Los Molinos

B) MUESTRA

hojas de *Eriobotrya japonica* separadas de 5 kg de plantas que crece en el distrito de los molinos – Ica

C) Criterio de inclusión:

Hojas sin signo deterioro mecánico, físico o biológico

D) Criterio de exclusión

Hojas con signos de deterioro o contaminadas

3.2 MÉTODOS

3.2.1. TRATAMIENTO A LA ESPECIE ESTUDIADA

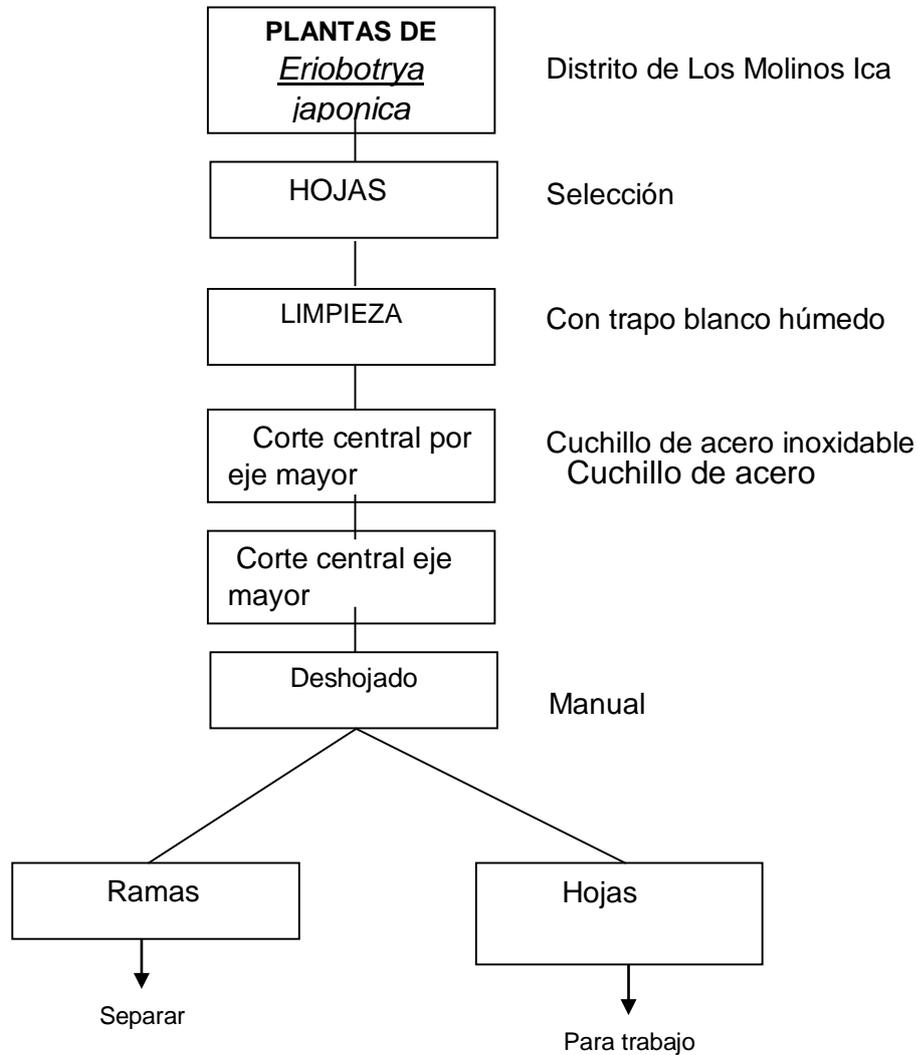
A) A) Obtención de las hojas secas de *Eriobotrya japonica*
“níspero”.

Los procesos para obtener las hojas de *Eriobotrya japonica* se ilustran en el flujograma siguiente:

FLUXOGRAMA N° 01

PROCESOS PARA OBTENER HOJAS DE *Eriobotrya japonica*

“níspero”



Las hojas se secarán a la sombra por 15 días y luego a la estufa a 55 – 60 °C hasta sequedad total e inmediatamente procederse a la molienda con molino manual.

B) **CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL SECO Y MOLIDO**^(35,36,37)

1º. Análisis organoléptico

Color y aspecto. 5.0 g de material seco y molido es colocado en una luna de reloj y desde aquí se juzga su color, allí mismo se evalúa el aspecto previo contacto con los dedos de la mano.

Sabor y olor. El material esparcido en la luna de reloj es utilizado para determinar su el olor y sabor

2º. Determinación de cenizas

Método: Se utilizó el método Gravimétrico.

Fundamento: Se funda en la destilación de la parte orgánica de la muestra al ser sometido a altas temperaturas dejando la parte mineral o cenizas que generalmente son blancas o grisáceos.

Procedimiento:

-Se coloca 5.0 g de muestra a analizar y se transfiere a una cápsula de peso conocido, se lleva la cápsula con la muestra al calor directo de una cocina eléctrica, hasta que esté completamente carbonizada. La cápsula que contiene el material carbonizado se lleva a la mufla graduada a una temperatura de 550 -560 °C y se mantiene allí 2 horas. Se retira de la mufla y se pasa al desecador para que enfríe y se pesa. Se repite este proceso hasta alcanzar constancia de peso.

Cálculo:

$$\% \text{ de Ceniza} = \frac{\text{g ceniza} \times 100}{5}$$

Donde:

% de Ceniza = g de ceniza en 100 g de muestra

g ceniza = g de ceniza que quedan

5 = g de muestra analizada

100 para referir a porcentaje

3.2.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS^(36,37)

A) OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO

50.0 g del material seco y molido se colocan en un erlenmeyer de 1,000 mL y se adiciona 400 ml de etanol 96 ° y la pastilla magnética. Se lleva al plato calefactor con agitación magnética y se ajusta los mandos del equipo o plato calefactor para alcanzar 50 °C y se mantiene así por 12 horas. Seguidamente se procede a filtrar. El líquido filtrado se guarda y al marco se le adiciona 300 mL de etanol y se repite la segunda extracción por 12 horas más; de lo que se obtiene un segundo líquido filtrado que se une al primero y ambos se concentran hasta la eliminación del solvente. El marco se desecha.

B) FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Los procesos para la obtención de las fracciones del extracto etanólico se ilustran en el flujograma siguiente:

3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

1º. Análisis organoléptico se determinó:

Color: En un tubo de ensayo se depositan 3 g del extracto a analizar se deja en reposo por cinco minutos y se evalúa

Olor: En un luna de reloj se depositan 3 g del extracto a evaluar se agita con la varilla y se procede a evaluar el olor.

Sabor: Con una cucharilla de plástico se retiran unos mg del extracto a evaluar y se lleva a la boca para la evaluación del sabor. El extracto no es ingerido.

Aspecto: de las apreciaciones anteriores y palpando la consistencia del extracto se evaluó el aspecto.

2º. Análisis de metabolitos secundarios

Para esta parte del trabajo se usó las fracciones del extracto etanólico. Los que fueron preparados a una concentración de 100 mg/ mL. Se utilizaron reacciones de precipitación y coloración para determinar el tipo de compuestos químicos presente en los extractos.

Las reacciones que se usaron fueron:

A. REACCIÓN DE CLORURO FÉRRICO: Para determinar compuestos fenólicos.

Procedimiento: A 2 ml de muestra se agrega 0.5 ml de solución de FeCl_3 al 5 %. Se considera positiva la aparición de coloraciones azul, verde o negra. Se ensayó el extracto etanólico o fracción A

B. REACCIÓN DE GELATINA 1% EN NaCl 10 %: Para determinar taninos.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se colocó 3 ml de solución de gelatina 1 % en NaCl 10% y se agregó 0.5 ml de la muestra a ensayar. La formación de un precipitado o turbidez blanco o crema es indicativa de presencia de taninos. Se ensayó el extracto etanólico o fracción A.

C) REACCIÓN DE SHINODA: Para determinar flavonoides.

Procedimiento: A 1 ml de muestra a analizar se le añaden unas 8-10 partículas de limadura de magnesio y seguidamente se añaden 6 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se espera que termine la reacción y se añade 1 ml de alcohol amílico se agita, se deja en reposo y se observa el color en la fase amílica.

Es positivo si se observa la aparición de una coloración anaranjada o roja. Se ensayó la fracción A y D

D) REACCIÓN DE ROSEMHEIN: Para determinar leucoantocianidinas y/o catequinas.

Procedimiento: Se colocan 2 ml de muestra a analizar en un tubo de ensayo y se agrega 1 ml de HCl concentrado, se pone en baño maría hirviendo por 15 minutos, se retira, se enfría y luego se adicionan 2 ml de H₂O destilada y 3 ml de alcohol amílico. Se deja en reposo por 15 minutos y luego observamos el color en la fase amílica. Se considera positiva la aparición de un color que va desde el carmesí oscuro hasta rosado débil, esto para leucoantocianidinas y color marrón para catequinas.

Se ensayaron el extracto etanólico y la fracción D.

E) REACCIÓN DE LIEBERMAN BUCHARD: Para determinar Esteroides y/o Triterpenoides

5 mL de la muestra a analizar se colocan en una capsula de porcelana y se concentran a sequedad en Baño María. Seguidamente se disuelve con 3 mL cloroformo y desde aquí se cogen las alícuotas.

Procedimiento: Dos mL muestra disuelta en cloroformo, se agrega 5 gotas de ácido acético, se mezcla y se adiciona unas gotas del reactivo anhídrido acético/H₂SO₄ 50:1. Se considera positiva la aparición de un color azul, verde o anaranjado.

Se ensayo la fracción B y C

F) REACCION DE BORTRAGER: Para determinar Nafto y/o Antraquinonas.

Procedimiento: A dos ml muestra se agrega 2 ml de solución acuosa de NaOH al 10%, se agita suavemente y se observa el color que toma la fase acuosa. Se considera positiva cuando la fase acuosa se torna de color roja.

Se realizó en la fracción B

G) REACCIONES DE DRAGENDORF, WAGNER, HAGER Y MAYER: para

Se procedió a ejecutar 4 reacciones sobre la fracción C. Las reacciones fueron:

Reacción de Dragendorff

Procedimiento

Se acidificó el extracto a ensayar con gotas de HCl al 1% y se añadieron 3 gotas del reactivo. La aparición de un precipitado anaranjado o rojo indican que la reacción es positiva.

Reacción de Wagner

Procedimiento

La muestra a analizar se acidificó con HCl al 1% y se añade 2 ó 3 gotas del reactivo. La aparición de un precipitado marrón indica que la reacción es positiva.

Reacción de Hager

Procedimiento

0,3 ml de extracto se acidifica con HCl al 1% y se añade 3 gotas del reactivo. La aparición de precipitado crema-amarillo indicará que la reacción es positiva.

Reacción de Mayer

Procedimiento

0,3 ml de muestra se acidificaron HCl al 1% y se añadieron 3 gotas de reactivo. La aparición de un precipitado amarillo indica que hay reacción positiva al reactivo.

H) PRUEBA DE FLUORESCENCIA. Para determinar cumarinas

Se realizó en el extracto etanólico y fracción B

Procedimiento: Se corta un papel filtro en tiras de 1.5 cm de ancho por 6 cm de largo. Para cada extracto a ensayar se utiliza una tira de papel y se procede como sigue:

Se marca tenuemente con lápiz tres puntos equidistantes; en el primero y segundo punto se impregna 1 gota del extracto a ensayar, al tercer punto 1 gota de KOH 0,5 M; se espera que sequen; y luego al primer punto se agrega 1 gota de KOH 0,5 M y se espera que seque. Seguidamente se observa a la luz ultravioleta de 366 nm de longitud de onda. La aparición de fosforescencia en el primer punto es indicativa de la presencia de cumarinas.

I) PRUEBA DE LA ESPUMA: Para determinar saponinas.

Se realizó en el extracto etanólico

Procedimiento: En un tubo de ensayo de 13 x 100 se colocan 3 ml del extracto a ensayar y se añade agua destilada completar 10 y se agita fuertemente durante 1 minuto.

La presencia de saponinas será indicada por la formación de espuma que persistirá por 30 minutos y a una altura no menor a 1 cm.

3.2.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES ⁽³⁾

El trabajo se realizó en las fracciones A y D preparadas a una concentración de 1.4 % y 1.0 % mg/mL respectivamente.

A) MÉTODO DE TRICLORURO DE ALUMINIO

Fundamento: El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides presentes en solución metanólica; produciéndose un desplazamiento de la absorbancia hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Esta propiedad es solamente de los flavonoides y no de otras sustancias fenólicas.

B) REACTIVOS.

✓ **Solución de AlCl_3 al 10% en etanol 96°**

Se pesan 10.0000 g de tricloruro de aluminio y se disuelven con etanol 96° cuantitativamente hasta completar un volumen de 100 mL en una fiola.

✓ **Solución madre de Quercetina 0.05%**

Se pesan 50 mg de quercetina y se disuelven cuantitativamente con etanol 96° en una fiola enrasada a 100 ml.

✓ **preparación de estándares de quercetina.**

A partir de la solución madre de quercetina se preparan 25 ml de soluciones estándar de concentración 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y 20.0 mg de quercetina /100 ml etanol 96, respectivamente.

✓ **Preparación de acetato de potasio 1M**

Se pesa un 0.1 mol de acetato de potasio y se diluye con agua destilada csp 100 mL

D) PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS

- De cada muestra a analizar se cogerá 0.5 ml y se pondrá en contacto con: 1.5 ml de etanol 96°, 0.1 mL de solución de AlCl_3 10% en etanol, 0.1 mL de solución de acetato de potasio 1 M y se diluye agregándole 2.8 mL de agua destilada. Se deja en reposo por 30 minutos. Seguidamente leer a longitud de onda (λ) = 415 nm

E) PROCEDIMIENTOS PARA OBTENER LAS CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA REACCIÓN QUERCETINA TRICLORURO DE ALUMINIO.

--El equipo se calibra con un blanco que no contiene ni muestra ni estándar solo solvente etanol 96° y reactivo.

-De cada estándar de: 4, 8, 12, 16, y 20 mg de quercetina/100 mL. se cogió 0.5 mL similarmente a los procesos con las muestras analizadas. Las absorbancias de estas determinaciones sirven para expresar los resultados de la muestra como contenido de flavonoides equivalentes a quercetina

E) CÁLCULOS

Utilizando el método de los mínimos cuadrados y los resultados de las absorbancias versus las concentraciones de las soluciones estándares de quercetina se obtiene los valores a, b y m de la recta que fueron utilizados para determinar la concentración de flavonoides en las muestras conociendo sus absorbancias.

3.2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ⁽³⁾

Para esta parte del trabajo se utilizó la fracción A y D

A) MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO USANDO DPPH COMO RADICAL LIBRE

El 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es un compuesto químico radical y cuando son

expuestas a agentes secuestradores de radicales libre su concentración disminuye Este proceso se mide usando usando el espectrofotómetro.

B) FUNDAMENTO

El método se basa en que el radical libre DPPH (solución color violeta) reacciona con compuestos secuestradores de electrones desapareados, disminuyendo su concentración (pérdida de la intensidad de color) que es monitoreada a una longitud de onda de 517 nanómetros.

C) PREPARACIÓN DE REACTIVOS^(38)

Solución de DPPH

-Se pesan 22.00 mg del reactivo y se disuelven en 100 ml de metanol. La solución preparada se guarda protegiéndola de la luz del día.

Solución Amortiguadora de Acetato pH 6

Para preparar 500 mL de ácido acético 0.1 M, se diluye a un litro con agua destilada y se va incorporando 136.08 g de acetato sódico tri hidrato mientras se mide con potenciómetro el pH de la solución

D) DETERMINACION DEL % INHIBICIÓN AL RADICAL DPPH

El % de inhibición al radical libre DPPH es la concentración del extracto expresada en micro litros que es capaz de hacer disminuir en las unidades % respectivas la concentración de una solución patrón del radical libre 1,1, difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) cuya absorbancia conocida es 100 %.

E) SET DE TRABAJO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Los procesos para determinar el % de inhibición al radical libre DPPH se presentan en el cuadro siguiente:

**CUADRO N° 1
SET DE TRABAJO PARA DETERMINAR LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Muestra	Ensayo	Muestra (ml)	Metanol (ml)	Solución buffer (ml)	Reactivo DPPH (ml)
Fracción A	1	0.1	8.4	1.0	0.5
	2	0.1	8.4	1.0	0.5
	3	0.1	8.4	1.0	0.5
Fracción B.	1	0.1	8.4	1.0	0.5
	2	0.1	8.4	1.0	0.5
	3	0.1	8.4	1.0	0.5
	3	0.1	8.4	1.0	0.5

Fuente: La autora de la tesis

Los reactivos se adicionaron en el orden de izquierda a derecha, se mezclaron adecuadamente y se dejó reposo por 30 minutos protegiéndolo de la luz; después se lleva a la lectura en el espectrofotómetro a 517 nm de longitud de onda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1. DEL MATERIAL OBJETO DE ESTUDIO

a) De la obtención del material a estudiar

El promedio de hojas secas y molidas que deja cada planta pos cosecha de *Eriobotrya japonica* es de 826,8 g

b) De la caracterización del material seco y molido:

- De las características organolépticas del material seco y molido fueron las siguientes:

Color: verde

Olor: Suigeneris

Sabor: desagradable, áspero, astringente, y amargo.

Aspecto. tiene un aspecto de polvo granuloso.

-Del contenido de cenizas

El promedio del contenido de cenizas fue de 5,08 %

4.1.2. DE LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

A) Del extracto etanólico

El rendimiento de extracto etanólico por el método de digestión utilizado es de 13,87 %.

B) Del fraccionamiento del extracto etanólico

De 10.00 g de extracto etanólico o fracción a Se obtiene:

- 5.26 g de fracción B
- 0.84 g de fracción C
- 1.73 g de fracción D

4.1.3 DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

A) Del análisis organoléptico

Para esta parte del trabajo se examinaron los extractos libres de solvente. Los resultados se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 2.
RESULTADOS DEL ANALISIS ORGANOLEPTICO AL EXTRACTO
ETANOLICO Y SUS FRACCIONES.

EXTRACTO O FRACCIÓN	COLOR	OLOR	SABOR	ASPECTO
Etanólico	Verde intenso	suigeneris	Amargo áspero	pasta
Fracción B	Verde intenso	Inodoro	Amargo áspero	Pasta pegajosa
Fracción C	Ámbar claro	Inodoro	Amargo	Película pastosa
Fracción D	Ámbar	inodoro	Soso	Película pastosa

Fuente: La autora del trabajo

B) De la determinación de cenizas

Solamente se determinó las cenizas del extracto etanólico siendo su resultado 1,92 %

C) De la determinación de metabolitos secundarios

Las reacciones se trabajaron con soluciones preparadas al 1 % a partir de extractos o fracciones libre de solvente. Los resultados se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 3.
RESULTADOS DEL ANALISIS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN HOJAS DE NÍSPERO

REACCION	EXT.O FRACCION	RESULTADO
TRICLORRURO FERRICO	Etanólico Fracc. .D	++++ ++
GELATINA SAL	Etanólico Fracc. D	++++ -
SHINODA	Etanólico Fracc.D	+++ +++
BORTRAGUER	Fracc. B	-
LIEBERMAN BURCHARD	Fracc. B Fracc.C	+++ ++
FLUORESCENCIA	Etanólico	++
ROSENHEIM	Etanólico Fracción D	+ Catequinas + catequinas
DRAGENDORFF	Fracción C	++++
MAYER	Fracción C	++
HAGER	Fracción C	+++
WAGNER	Fracción C	+++
ESPUMA	Etanólico	+

Fuente: La autora del trabajo

**4.1.4. DE LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE POLIFENOLES
TOTALES**

**A. De las absorbancias de las soluciones patrón de ácido
gálico.**

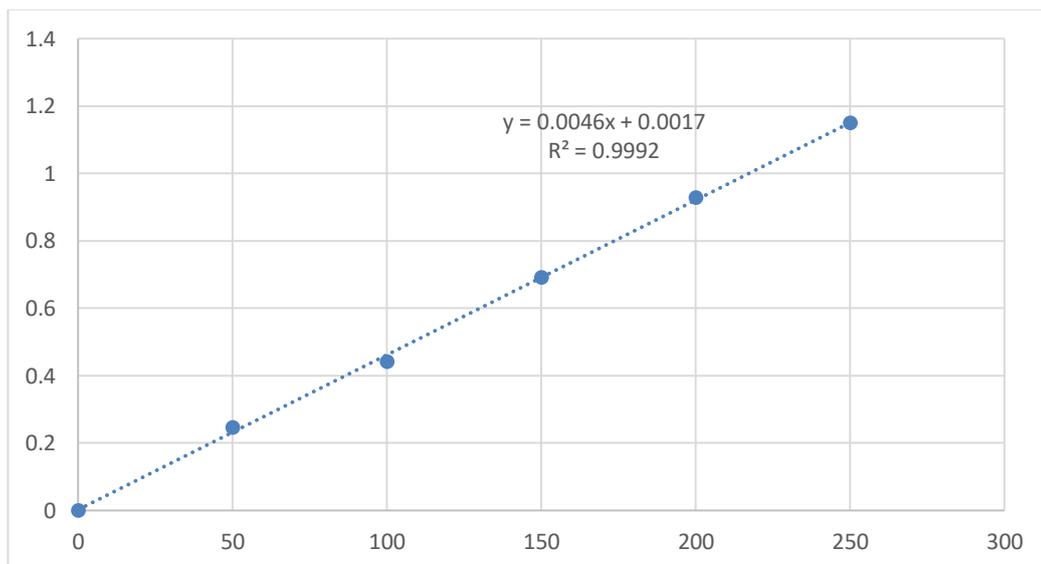
Los resultados \bar{X} de 3 determinaciones se presentan en el cuadro y grafico siguiente:

CUADRO N° 4.
RESULTADO DE LAS ABSORBANCIA DE LAS SOLUCIONES PATRÓN DE
ÁCIDO GÁLICO FRENTE AL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

Muestra	Absorbancias	Absorbancia menos blanco
Blanco	0.036	0.000
50	0.283	0.247
100	0.477	0.441
150	0.728	0.692
200	0.965	0.929
250	1.186	1.150

Fuente: La autora del trabajo

GRAFICO N° 01
CURVA DE ABSORBANCIA DE LAS SOLUCIONES PATRÓN DE ÁCIDO
GÁLICO VERSUS EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU



Fuente: La autora del trabajo

Estos datos fueron analizados por el método estadístico de los mínimos cuadrados y se determinaron los valores de la recta $Y = mx + b$

Obteniéndose los valores:

$$m = 0.0046$$

$$b = 0.0017$$

$$R^2 = 0.9992$$

Con estos datos y aplicando la ecuación de la recta se calculan las concentraciones de fenoles totales de las muestras (valores X) ya que se conocen las absorbancias (valores Y) de las muestras.

B. ABSORBANCIAS Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Los resultados de las absorbancias, contenido de fenoles expresados como mg equivalente a ácido gálico/100 ml y % (g de fenoles (EAG)/100 g de muestra se presentan en los cuadros y gráficos siguientes:

CUADRO N° 5

**RESULTADO PROMEDIO DE 3 DETERMINACIONES DE POLIFENOLES.
EXPRESADOS COMO mg DE POLIFENOLES (EAG)/100 mL EN MUESTRAS
ANÁLIZADAS**

FRACCIÓN	ABSORB.	ABS- BLANCO	mg FT
Blanco	0.038	----	----
Ext. Etanólico	0.786	0.750	162.67
Frac. D	0.450	0.412	89.19

Fuente: La autora del trabajo

4.1.5 De la determinación del contenido de flavonoides totales

- De la curva de calibración entre quercetina y tricloruro de aluminio

Los resultados se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N°6.
RESULTADOS DE LAS ABSORBANCIAS PARA ELABORAR LA
CURVA DE VALORACION QUERCETINA -TRICLORURO FÉRRICO

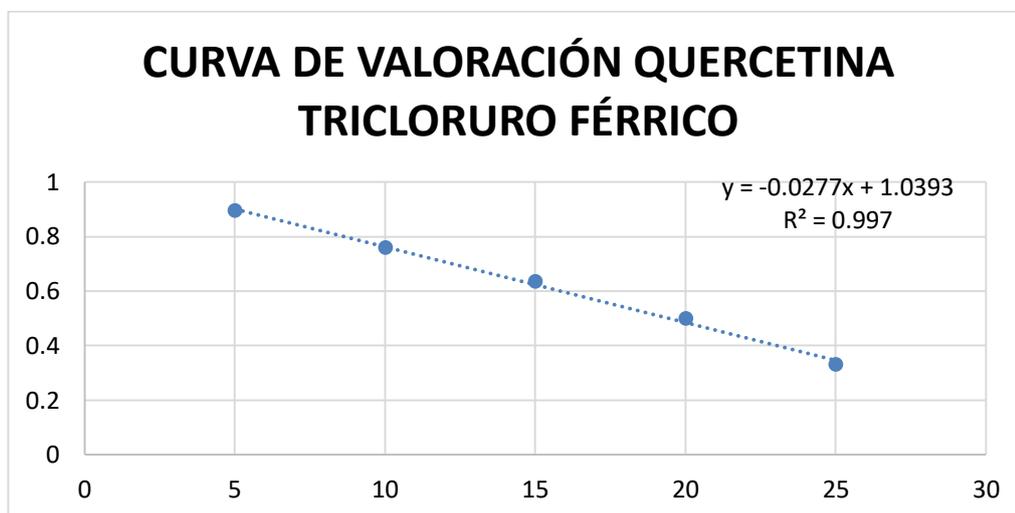
CONCENTRACIÓN DE SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE QUERCETINA mg/100 mL	ABSORBANCIAS
2.00	0.196
8.00	0.411
12.0	0.610
16.0	0.812
20.0	1.044

Fuente. La autora del trabajo

Estos resultados analizados por el método estadístico de los mínimos cuadrados y se obtienen los valores de la recta:

Y conociendo la absorbancia de las muestras analizadas matemáticamente se procedió a calcular la concentración de flavonoides, que se presenta seguidamente.

GRÁFICO Nº 2
CURVA DE VALORACIÓN QUERCETINA TRICLORURO FÉRRICO



Fuente cuadro nº 6 la autora de la tesis

Estos datos fueron analizados por el método estadístico de los mínimos cuadrados y se determinaron los valores de la recta $Y = mx + b$

Obteniéndose los valores:

$$m = 1.0393$$

$$b = -0.00277$$

$$R^2 = 0.997$$

Con estos datos y aplicando la ecuación de la recta se calculan las concentraciones de fenoles totales de las muestras (valores X) ya que se conocen las absorbancias (valores Y) de las muestras.

Los resultados del contenido de flavonoides totales se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N°7
RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES
TOTALES EN HOJAS DE *Eriobotrya japonica*

MUESTRA	ABSORBANCIA	ABSOR – BLANCO	CONCENTRACIÓN
Blanco	0.024	0.000	0.000
Fracción A	0.486	0.462	8.36
Fracción D	0.504	0.480	8.74

Fuente: La autora del trabajo

4.1.6. DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

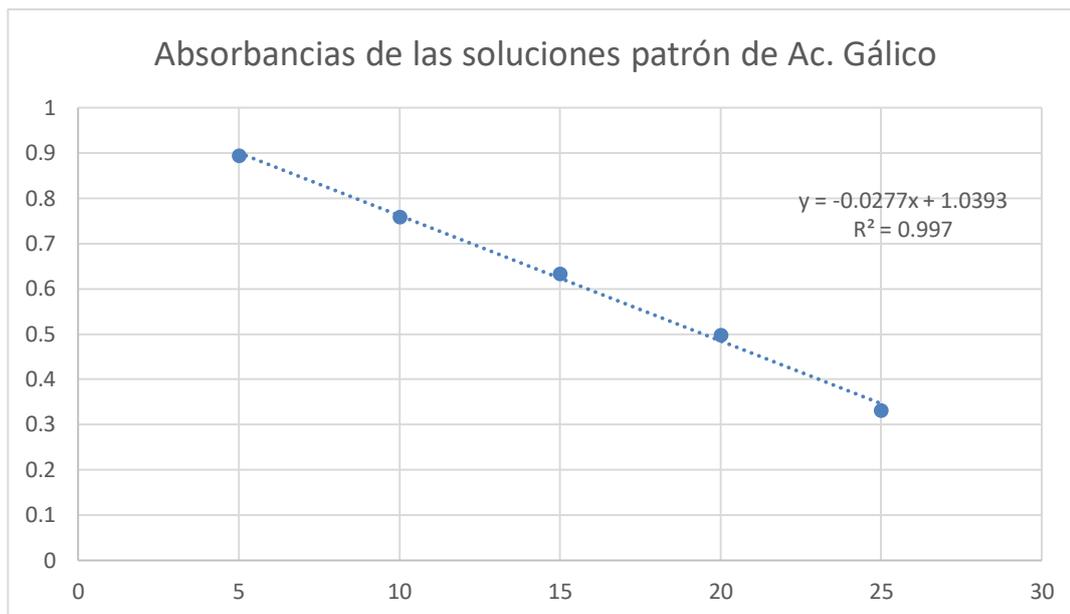
A. DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS SOLUCIONES PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO.

Las absorbancias de las soluciones de ácido gálico 5, 10, 15, 20 y 25 mg/100 ml versus el reactivo DPPH se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 8
ABSORBANCIAS DE LAS SOLUCIONES PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO.

Solución de Ácido Gálico	Absorbancia
5 mg/100 mL	0.894
10 mg/100 mL	0.759
15 mg/100 mL	0.634
20 mg/100 mL	0.498
25 mg/100 mL	0.331

Fuente: La autora del trabajo



Fuente: La autora del trabajo

Estos datos fueron analizados por el método estadístico de los mínimos cuadrados y se determinaron los valores de la recta $Y = mx + b$

Obteniéndose los valores:

$$m = 0.0017$$

$$b = 0.0046$$

$$R^2 = 0.9992$$

Con estos datos y aplicando la ecuación de la recta se calculan las concentraciones de fenoles totales de las muestras (valores X) ya que se conocen las absorbancias (valores Y) de las muestras.

Los resultados del % de inhibición al radical libre DPPH se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 9.

**% DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE AL RADICAL LIBRE DPPH DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE NÍSPERO Y SU FRACCIÓN D**

Muestra ensayada	Absorbancia	Disminución de absorbancias	% de la disminución	% actividad antioxidante
DPPH	1.026	0.000	100	0.00
Ext. Etanólico	0.516	0.490	47.75	52.24
Frac. D	0.706	0.300	29.23	70.77

Fuente: La autora del trabajo

DISCUSIÓN

Es necesario evaluar los impactos ambientales que generan los procedimientos para culminar un proceso productivo. La agroindustria galopante generará inevitablemente aumento de residuos agrarios que en nuestro medio no se le utiliza con fines económicos principalmente terminan siendo quemados. En la provincia de Ica uno de los cultivos de mucha importancia económica es el de *Eriobotrya japonica* (níspero) especie vegetal de la familia de las Rosaceae que el reporte bibliográfico Medina J⁶ señala como especies promisorias como fuente de metabolitos secundarios.

De la cuantificación del contenido de polifenoles totales utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu en extracto etanólico al 1,4 % y la fracción D del extracto etanólico al 1,0 % determinamos un contenido de 162,67 y 89,19 mg de polifenoles totales (equivalentes a ácido gálico)/100 ml. El contenido de flavonoides determinado en nuestro trabajo 8,36 y 8,74 mg de flavonoides totales (equivalentes a quercetina)/100 ml para el extracto etanólico y su fracción D respectivamente sugiere que la fracción D es concentrada en contenido de flavonoides o que la obtención de flavonoides del extracto etanólico de hojas de *Eriobotrya japonica* podría ir por ese método. En nuestro trabajo además hemos determinado la actividad antioxidante del extracto etanólico y su fracción D y hemos determinado que tienen una capacidad de 52,24 % y 70,77 % para inhibir la actividad del radical libre DPPH de una solución de DPPH de absorbancia 1,026. La pérdida de intensidad de color expresada como disminución de actividad del radical libre DPPH de 1,026 a valores de 0,516 y 0,706 es ocasionada por compuestos químicos con capacidad para atrapar radicales libres.

CONCLUSIONES

-Las características de las hojas de *Eriobotrya japonica* secas y molidas tienen un aspecto granuloso pulverulento de color verde y olor suigeneris de sabor áspero, astringente y amargo .Presentan 5,08 % como contenido de cenizas.

-De 100 g de hojas pos cosecha de *Eriobotrya japonica* por el método de digestión 50-55°C dos veces por 12 horas se obtiene 13.87 g de extracto etanólico. El fraccionamiento de 10 g del extracto etanólico produce 5.26g de fracción B, 0.84 g de fracción C y 0.1.73 g de fracción D

-En las hojas pos cosecha de *Eriobotrya japonica* se ha determinado la presencia de compuestos químicos de naturaleza fenólica, taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos esteroidales, catequinas, alcaloides y saponinas.

-El contenido de polifenoles totales en la fracción preparada al 1,4 % es equivalente al de una solución de ácido gálico con 162,67 m Acido gálico/100ml de solución. Mientras que la fracción D preparada al 1 % tiene un contenido de polifenoles totales equivalentes al de una solución de ácido gálico 89,19 mg/100ml. Para estos mismos extractos el contenido de flavonoides totales es de 8,36 y 8,74 mg de flavonoides totales equivalentes a quercetina.

La capacidad para inhibir al radical libre DPPH para el extracto etanólico y su fracción D es de 52.24 y 70,77 % respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Estudiar los posibles usos de los metabolitos secundarios en las hojas *Eriobotrya japonica* a fin de dar un valor económico agregado a este subproducto.
- Implementar una base de datos con información generada en investigaciones realizadas en la región, para organizar y salvaguardar los estudios realizados.
- Separar los componentes químicos de la fracción que son los responsables de la promisorio actividad antioxidante que presenta este extracto.

CAPITULO IV

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. LOCK DE UGAZ, O. (1994)"Investigación Fotoquímica-Métodos en el Estudio de Productos Naturales"- 2da Ed. Edit. Pontificia Universidad Católica del PerúFondo.
2. Cruz AP, Hernández U. Y. Actividad antioxidante y compuestos fenolicos en hojas de Eriobotrya Japonica para la elaboracion de un te. [en linea] ; 2012 [citado 2019 Enero 02. Disponible en : <http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/ixtapa/autoplay/docs/extensos/CIENCIA%20DE%20LOS%20ALIMENTOS/CAL441ENC20120131.pdf>
3. Rosas P.GY. Actividad antibacteriana del extracto metanólico y compuestos derivados de las hojas del níspero (eriobotrya japonica). [en linea]; 2015 [citado 2018 diciembre 20. disponible en : <http://132.248.9.195/ptd2015/enero/0724031/Index.html>
4. Erika A, Lopez L. Caracterización bioquímica del níspero (Eriobotrya japonica): Cinética de la polifenoloxidasas e identificación de compuestos fenolicos. [en linea].; 2010 [citado 2019 Enero 11. Disponible en : https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Bioquimica/36.pdf .
5. Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., Mietner, T. Microbiología Médica. Manual moderno: México 2008.
6. Eduardo alberto martinez vega faculta de ciencias biologicas divis 1 estudios de postgrado, a [en línea] 2010, agosto [citado: 1997 mayo de 1997] disponible en: <http://eprints.uanl.mx/511/1/1020121313.PDF>
7. Zorofchain s, Fadaeinasabad M, Nikzad S y col. Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated

- Acetogenins and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16(7), 15625-15658.
8. Komansilan A, Abdul L, Yanuwadi B. Isolation and identification of larvicide bioactive from soursop (*Annona muricata* Linn) seeds against the larvae of *Aedes aegypti* mosquito, *International Journal of Engineering & Technology*. Vol: 12 No: 03 June 2012
 9. Gabamukulya Y, Abou F, Wamunyokoli F y col. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Volume 7, Supplement 1, September 2014, Pages S355-S363.
 10. Raveloson L, Razafindralava H, Nantenaina F y col. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata*(Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*(Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Volume 4, Issue 10, October 2014, Pages 798-806.
 11. Coria A, Gonzales E, Yahia E. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. Available online 22 January 2016.
 12. Panda A. *Annona squamosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: Possible involvement of quercetin. *Phytomedicine*. Volume 14, Issue 12, 4 December 2007, Pages 799-805.
 13. Anilde M, Rodriguez J, Trindade R y col. Effect of *Annona muricata* L. (1753) (Annonaceae) seeds extracts on *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). *African Journal of agricultural research*. Vol.10(48), pp. 4370-4375, November 2015
 14. Correa J, Ortiz D, Larrahonda J. Y col. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): Una revisión bibliográfica. *Boletín*

- Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2012; 11 (2): 111 – 126
15. Vit P, Santiago B, Perez E. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. Interciencia, vol. 39, núm. 5, mayo, 2014, pp. 350-353.
 16. Dorado D, Hurtado A, Martínez H y col. Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. Información Tecnológica – Vol. 27 N° 5 2016 37.
 17. *Annona muricata*. Graviola. Se puede conseguir en: <http://laboratorioebers.com/producto/graviola-annona-muricata/>
 18. Leiva S, Galloso G y Chang L. *Annona muricata* L. “guanábana” (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa* 25 (1): 127 - 140, 2018
 19. *Annona muricata*. Se puede conseguir en: https://es.wikipedia.org/wiki/Annona_muricata.
 20. Graviola, principios activos y componentes químicos Se puede conseguir en: <http://www.supernatural.cl/GRAVIOLA-PRINCIPIOS-ACTIVOS.asp>.
 21. *Annona muricata*. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. se puede conseguir en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=guan%C3%A1bana&id=7568>.
 22. REPO R., ENCINA C. “Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas”. *Rev. Soc. Quím. Perú*. 2008, 74, N° 2 (108-124)
 23. BRAND –WILLIAMS W, CUVELLIER M BERSET E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science & Technology*, 28, 25–30.1995.
 24. A. montes “Bromatología y Nutrición” Tomo I. Editorial Universitaria – Buenos Aires.

25. Pearson. "Composición y Análisis de los Alimentos" Edit. Continental. 1992.
26. HARRIS D. "Análisis Químico Cuantitativo" 2da Edición. Editorial Reverte S.A. 2001.
27. SKOOK-WETS-HOLLER. "Fundamentos de Química Analítica Cuantitativa". Editorial Reverte S.A. 2003.
28. LOCK O. "Investigaciones Fitoquímicas" Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1992.
29. Chang Raymond y COLLEGE Williams. "Química". 2002. 7 a Edición. Ed. Mac GRAW- Hill. México D.F.
30. Zapata C, Cardona M. Estudio de la biodisponibilidad de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides para su utilización en la industria de las bebidas.(2014) Tesis para optar al título de Especialista en Alimentación y Nutrición. Universidad Lasallista.
31. Lutz M. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos en alimentos. Perspectivas en Nutrición Humana. vol. 15, N° 2, julio-diciembre de 2013, p. 217-226
32. Santos C. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética Conferencias Sección A: Nutrición y Dietética. Universidad de Salamanca.
33. Delgado L. Mecanismos de acciones implicadas en la bio actividad de flavonoides. Caenorhabditis elegans y líneas celulares como sistemas modelo. (2015). Tesis para optar el Grado de Doctor en Farmacia. Universidad de Salamanca.
34. REPO R., ENCINA C. "Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas". Rev. Soc. Quím. Perú. 2008, 74, N° 2 (108-124)
35. Brand –Williams W, uvellier M Berset E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – Food Science & Technology, 28, 25–30.1995.

36. HARRIS D. "Análisis Químico Cuantitativo" 2da Edición. Editorial Reverte S.A. 2001.
37. SKOOK-WETS-HOLLER. "Fundamentos de Química Analítica Cuantitativa". Editorial Reverte S.A. 2003.
38. Guano G. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto de las hojas de tomate (*Solanum lycopersicum l*) en lesión, inducida en ratones (*Mus musculus*). (2015). Tesis para optar el título de Bioquímica Farmacéutica. Riobamba-Ecuador

Ica, Diciembre del 2019

.....
KAREN VENTURA CHOQUE

Tesista

ANEXO. 1 MATRIZ DE CONSISTENCIA

Problema.	Hipótesis.	Variables.	Objetivos.	Metodología.
<p>Principal. ¿Cuáles son ¿Qué actividad antioxidante y antibacteriana presentará las hojas de níspero <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i>?</p> <p>Problemas secundarios. Determinar ¿cuáles son las características del extracto etanólico de las hojas de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> ? Determinar ¿cuál es el contenido de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas pos cosecha de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> Determinar ¿qué % de actividad antioxidante tiene el extracto etanólico de las hojas pos cosecha de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> ?</p>	<p>Principal. Hipótesis principal. Las hojas de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> “níspero”, tienen características fitoquímicas propias de un alimento vegetal con metabolitos secundarios del tipo fenoles con alta actividad antioxidante y antibiótica Hipótesis secundarias. El material seco y molido de las hojas de <i>Eriobotrya</i> japónica “níspero” tienen: Humedad 10 – 14 %, cenizas 2.2 – 3.8 %, fibras 18- 16 %, grasa 28- 34 % proteínas 8.0- 12 % y carbohidratos 40.0 – 56.0 %. - Los extractos de polaridad creciente de de las hojas de <i>Eriobotrya</i> japónica “níspero”, tienen metabolitos secundarios del tipo de los polifenoles, triterpenos, alcaloides y flavonoides. - Alguno de los extractos de de las hojas de <i>Eriobotrya</i> japónica “níspero”, tienen metabolitos secundarios que tienen actividad antioxidante.</p>	<p>Variable independiente. El extracto de las hojas de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> “níspero”</p> <p>Variables dependientes. - Metabolitos secundarios - Actividad antioxidante</p>	<p>Objetivo general. Evaluar la actividad antioxidante de las hojas de níspero “<i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i>”.</p> <p>Objetivos específicos. Identificas los metabolitos secundarios presentes en las hojas de níspero “<i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i>”. •Determinar la actividad antioxidante de las hojas de níspero mediante los método DPPH* Y ABTS*. • Medir la capacidad antioxidante de las hojas del níspero y sus aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica.</p>	<p>Tipo, Nivel y Diseño. Básica. Descriptiva. Experimental-transversal.</p> <p>Población y muestra. Las hojas de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> de las plantaciones del distrito de Los Molinos MUESTRA 5 Kg de hojas de <i>Eriobotrya</i> <i>japónica</i> crece en el distrito de los molinos – Ica</p>

Anexo № 02.



Anexo N° 03

