UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICION HUMANA

TESIS

TÍTULO

"EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS PRESENTES EN LA MADERA Y HOJAS DE *Brosimum rubescens* (PALISANGRE)."

Trabajo final de carrera para optar el título profesional de Licenciada en Bromatología y Nutrición Humana

PRESENTADO POR:

Br. CARROL KATERINE ZURITA RODRIGUEZ

Br. JESSICA ELIZABETH ZAMBRANO TELLO

ASESORES:

DR. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO

DR. FERNANDO TELLO CÉLIS

IQUITOS – PERÚ

2015

Dedicatoria

- **JESSICA ELIZABETH ZAMBRANO TELLO**

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios por darme salud para terminar la tesis, a mi padre Emilio Zambrano Valles y mi madre Patricia Tello Zubiaurr, por todo el apoyo brindado durante mi carrera universitaria, por el apoyo moral en los momentos más difícil que pasamos.

A mi familia mi esposo Piero Perea, mi hijita Zoe Cecilia y a mi suegra Elsa Díaz porque siempre me dieron cariño, amor y muchos ánimos para terminar satisfactoriamente este trabajo.

A mis hermanos Diego Zambrano Tello, Cristina Zambrano Tello y mi abuelita Rosita Tello porque siempre estuvieron pendiente de mi carrera y de lo que me faltaba y por estar siempre en las buenas y las malas.

- **CARROL KATERINE ZURITA RODRIGUEZ**

A Dios por permitirme estar viva y con buena salud para terminar la tesis, a mi mamita Lupita Rodríguez Celis por su apoyo incondicional, por estar siempre cuando más la necesito, a mi hermoso hijo Iker André Novoa Zurita por darme la fuerza y motivación de seguir en mis proyectos .

A mi hermana Jenny Cristina Zurita Rodríguez, mi padre Humberto Antonio Zurita Montero y mi abuelita Melita Celis Montero por brindarme el apoyo y cariño siempre.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar dar gracias a Dios por habernos permitido concluir con el presente trabajo.

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, a través del Vice-Rectorado de Investigación financió el proyecto **ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA ESPECIE *Jatropha curcas* (piñón blanco).**

A nuestros asesores el Drs. Alenguer Alva Arévalo y Fernando Tello Celis, por su apoyo en todo el desarrollo de la investigación y redacción del presente trabajo.

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

Al personal de la planta piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNAP por su disposición en todo momento durante el desarrollo del presente trabajo.

AUTORIZACIÓN DEL ASESOR

Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, docente principal y Fernando Tello Celis, docente asociado del Departamento de Ingeniería de Alimentos, de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Que las bachilleres; Carrol Katerine Zurita Rodríguez y Jessica Elizabeth Zambrano Tello, han realizado bajo nuestra dirección la tesis intitulado: "Evaluación de Antioxidantes Fenólicos Presentes en la Madera y Hojas de *Brosimum rubescens* (Palisangre)", considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el jurado calificador, a tal efecto damos pase para su sustentación y posterior obtención del título de Licenciada en Bromatología y Nutrición Humana.

A los citados bachilleres a presentar el trabajo final de carrera para proceder a su sustentación cumpliendo, así con la normativa vigente que regula el reglamentos de grados y títulos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo.

Dr. Fernando Tello Celis.

MIEMBROS DEL JURADO

Tesis aprobada en la sustentación pública en la ciudad de Iquitos en las instalaciones del Auditorio de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; llevada a cabo el 04 de Diciembre del 2015 a horas 18:00 horas; siendo miembro del jurado calificador los abajo firmantes:

Carlos Enrique López Panduro
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 31070

Elmer Alberto Barrera Meza
Ingeniero en Industrias Alimentarias
C.I.P.: 116648

Juan Alberto Flores Garazatuà
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP 31648

Emilio Díaz Sangama
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 38911

UNAP

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Escuela Profesional de Bromatología en Industrias Alimentarias

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, siendo las .....18..... horas del día Viernes 04 de Diciembre del 2015, en las instalaciones del Auditórium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicado en la calle Nauta 5ta. cuadra de esta ciudad, se dio inicio a la sustentación pública del Trabajo de Final de Carrera intitulado **"EVALUACION DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS PRESENTES EN LA MADERA Y HOJAS DE *Brosimum rubescens* (PALISANGRE)"**, presentado por las bachilleres **CARROL KATERINE ZURITA RODRIGUEZ y JESSICA ELIZABETH ZAMBRANO TELLO,** con el asesoramiento de don Alenguer Gerónimo Alva Arévalo y Fernando Tello Celis.

Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal Nº 168-FIA-UNAP-2015, del 12 de Agosto del 2015.

Ing. Carlos Enrique López Panduro	-	Presidente
Ing. Elmer Alberto Barrera Meza	-	Miembro
Ing. Juan Alberto Flores Garazatúa	-	Miembro
Ing° Emilio Diaz Sangama	-	Miembro Suplente

Siendo las .....19..... horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido .....aprobado..... con la nota de .....16..... y el calificativo de .....muy bueno....., estando las bachilleres aptas para obtener el Título Profesional de Licenciadas en Bromatología y Nutrición Humana.

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

Carlos Enrique López Panduro
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 31070
Presidente

Elmer Alberto Barrera Meza
Ingeniero en Industrias Alimentarias
C.I.P.: 116648
Miembro Titular

Juan Alberto Flores Garazatua
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP 11648
Miembro Titular

Emilio Diaz Sangama
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP: 38911
Miembro Suplente

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ANEXOS	IV
RESUMEN	1
CAP. I	2
1 Introducción	3
CAP. II	5
2 Revisión de Literatura	6
2.1 *Brosimun rubescens* Taubert (palisangre)	6
2.1.1 Descripción Botánica	6
2.1.2 Distribución y Hábitat	8
2.1.3 Utilización	8
2.1.4 Estudios Fitoquímicos	8
2.1.5 Estudios Farmacológicos	11
2.1.6 Estudios Toxicológicos	12
2.1.7 Clasificación Taxonómica	13
2.1.8 Uso Tradicional	13
2.1.9 Distribución Geográfica	14
2. 2 Antioxidantes	14
2.2.1 Definición	14
2.2.2 Compuesto Fenólicos	15
2.2.2.1 Frutas como fuente de antioxidantes	15
2.2.2.2 Propiedades antioxidantes fenólicos de alimentos	17
2.3 Alimentos nutracéuticos	18
2.3.1 Los alimentos nutracéuticos se dividen en tres grupos	19
2.3.2 Criterios que deben cumplir los alimentos nutracéuticos	19
2.3.3 Productos químicos y colorantes como nutracéuticos	20
2.4 Compuesto fenólicos	22
2.4.1 Cuantificación de compuesto fenólicos	25
2.4.2 Técnicas espectrofotométricas	26
2.4.3 Ensayos ultravioleta	27
2.4.4 Compuesto fenólicos en alimentos	27
2.4.5 Compuesto fenólicos en bebidas	28
2.4.6 Té	29
2.4.7 Vino	30
2.5 Análisis para antioxidantes fenólicos	30
2.5.1 Determinación de fenoles totales	30
2.6 Determinación de Flavonoides	32
2.6.1 Acción antioxidante de los flavonoides	35

2.6.2 Estructura de flavonoides 36
2.6.3 Extracción y purificación de flavonoides 38

2.7 Determinación de Antocianinas 39
2.7.1 Estructura y estabilidad 40
2.7.2 Los estudios han demostrado 41
2.7.3 Extracción y aislamiento 43
2.7.4 Identificación 43
2.7.5 Distribución 45

2.8 Determinación de Taninos 45
2.8.1 Catequinas 47
2.8.2 Proantocianidoles 48
2.8.3 Actividad antioxidantes de taninos 48
2.8.4 Mecanismo de la actividad antioxidante en taninos 49

2.9 Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) 49
2.9.1 Los resultados del ensayo DPPH• se han presentado de diferentes Maneras 50

2.10 Espectrofotometría 51
2.10.1 Parámetros en medición 53
2.10.1.1 La transmitancia (T) 53
2.10.1.2 La absorbancia (A) 53
2.10.1.3 Longitud de onda 54
2.10.1.4 Índice de absorbancia 54
2.10.1.5 Curva espectral 55

CAP. III MATERIALES Y METODOS 56

3 Materiales y Métodos 57
3.1 Equipos 57
3.2 Reactivos 59
3.3 Tipo y diseño muestral 59
3.4 Diseño muestral 60
3.5 Población y muestra 60
3.5.1 Población 60
3.5.2 Muestra 60
3.6 Procedimiento para la recolección de información 61
3.7 Evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH 63
3.8 Preparación del extracto etanólico 64
3.9 Determinación de fenoles totales 64
3.10 Determinación de antocianinas, por el método pH-diferencial 65
3.10.1 Procedimiento 65
3.11 Determinación de flavonoides 66
3.12 Determinación de flavonoides 67
3.13 Determinación de taninos 67
3.14 Análisis de los datos 67

CAP. IV RESULTADOS Y DISCUSIONES 68

4 Resultados y discusiones 69
4.1 Evaluación de la actividad antioxidante, fenoles totales, antocianinas Flavonoides y taninos de la madera de la especie *Brosimun rubescens* (Palisangre) 69
4.1.1 Determinación de la actividad antioxidante con el método del DPPH 69
4.1.2 Determinación de la actividad antioxidante madera *Brosimun rubescens* (Palisangre) 69
4.1.3 Evaluación de fenoles totales de la madera de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 72
4.1.4 Evaluación antocianina de la madera de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 74
4.1.5 Evaluación flavonoides de la madera de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 75
4.1.6 Evaluación taninos de la madera de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 77

4.2 Evaluación de la actividad antioxidante, fenoles totales, antocianinas, Flavonoides y taninos de la hoja de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 79
4.2.1 Determinación de la actividad antioxidante de la hoja con el método Del DPPH 79
4.2.2 Evaluación de los fenoles totales de la hoja del *Brosimun rubescens* (Palisangre) 81
4.2.3 Evaluación de antocianinas de la hoja de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 81
4.2.4 Evaluación de flavonoides de la hoja de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 83
4.2.5 Evaluación de taninos de la hoja de *Brosimun rubescens* (Palisangre) 84

4.3 Comparación entre la madera y la hoja del palisangre 85

CAP. V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 87

5 Conclusiones 88
6 Recomendaciones 89

CAP. VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

ANEXOS 99

LISTAS DE TABLAS

Tabla N° 01:	Compuesto obtenido de la especie *Brosimun rubescens* Taubert.	10
Tabla N° 02:	Clasificación de la radiación electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas.	52
Tabla N° 03:	Equipos y materiales usados en la tesis.	58
Tabla N° 04:	Reactivos usados en la tesis.	59
Tabla N° 05:	Promedios de la repeticiones y lecturas realizadas a la madera de *Brosimun rubescens.*	70
Tabla N° 06:	Porcentaje de inhibición de la madera del *Brosimun rubescens*	70
Tabla N° 07:	Contenido de fenoles totales de madera de *Brosimun rubescens*	73
Tabla N° 08:	Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en la madera *Brosimun rubescens.*	75
Tabla N° 09:	Determinación de flavonoides de la madera del *Brosimun rubescens.*	76
Tabla N° 10:	Contenido de catequinas y proantocianidoles de la madera *Brosimun rubescens.*	78
Tabla N° 11:	Promedios de las repeticiones y lectura realizada a la hoja del *Brosimun rubescens.*	79
Tabla N° 12:	Porcentaje de inhibición de las hojas de *Brosimun rubescens.*	80
Tabla N° 13:	Contenido de fenoles totales de la hoja de *Brosimun rubescens.*	81
Tabla N° 14:	Absorciones y cálculos de antocianinas presente de la hoja del *Brosimun rubescens.*	83
Tabla N° 15:	Determinación de flavonoides de la manera del *Brosimun rubescens.*	84
Tabla N° 16:	Contenido de catequinas y proantocianidoles de la hoja de *Brosimun rubescens.*	84
Tabla N° 17:	Comparación de la actividad antioxidante y/o compuesta presentes.	85

LISTAS DE FIGURAS

Figura N° 01:	Tronco, hojas y viruta del palisangre	7
Figura N° 02:	Cumarinas aisladas del *Brosimun rubescens*	9
Figura N° 03:	Estructura del fenol	23
Figura N° 04:	Estructura de la quercetina	33
Figura N° 05:	Núcleo básico de un flavonoide	37
Figura N° 06:	Estructura básicos de varias clases de flavonoide	38
Figura N° 07:	Estructura molecular de las antocianinas	40
Figura N° 08:	Estructura básica pigmentos de la antocianinas	42
Figura N° 09:	Valores espectroscópico para algunas antocianinas aisladas	44
Figura N° 10:	Mecanismo de reacción de vainillina con tanino	46
Figura N° 11:	Catequinas	47
Figura N° 12:	Proantocianidinas	48
Figura N° 13:	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	50
Figura N° 14:	Obtención del extracto de la madera y hoja de *Brosimun rubescens*	62
Figura N° 15:	Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de la madera de *Brosimun rubescens*	72
Figura N° 16:	Curva padrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales	73
Figura N° 17:	Absorción del extracto etanólico de la madera de *Brosimun rubescens* de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas	74
Figura N° 18:	Absorción del extracto etanólico de la madera de *Brosimun rubescens* de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas	74
Figura N° 19:	Curva estándar de taninos para cálculo de catequinas y proantocianidoles	77

Figura N° 20: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentración de la hoja del *Brosimun rubescens* 80

Figura N° 21: Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Brosimun rubescens* de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas 82

Figura N° 22: Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Brosimun rubescens* de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas 82

Figura N° 23: Cuadro comparativo de compuesto fenólicos presentes en la hoja y madera de *Brosimun rubescens* 86

LISTA DE ANEXOS

Anexo N° 01:	Absorbancia del extracto de la madera del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	100
Anexo N° 02:	Absorbancia del extracto de la madera del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	100
Anexo N° 03:	Absorbancia del extracto de la madera del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	101
Anexo N° 04:	Absorbancia del extracto de la hoja del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	101
Anexo N° 05:	Absorbancia del extracto de la hoja del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	102
Anexo N° 06:	Absorbancia del extracto de la hoja del *Brosimun rubescens* con el método DPPH	102
Anexo N° 07:	Determinación de fenoles totales madera del *Brosimun rubescens*	103
Anexo N° 08:	Determinación de antocianinas madera del *Brosimun rubescens*	103
Anexo N° 09:	Absorbancia obtenidas entre 400 a 700 nm para la determinación de antocianinas de la madera del *Brosimun rubescens*	104
Anexo N° 10:	Determinación de flavonoides madera del *Brosimun rubescens*	104
Anexo N° 11:	Determinación de catequinas y proantocianidoles madera del *Brosimun rubescens*	105
Anexo N° 12:	Determinación de fenoles totales de la hoja del *Brosimun rubescens*	105
Anexo N° 13:	Determinación de antocianinas de la hoja del *Brosimun rubescens*	105
Anexo N° 14:	Absorbancia obtenidas entre 400 a 700 nm para la determinación de antocianinas de la hoja del *Brosimun rubescens*	106

Anexo N° 15:	Determinación de flavonoides de la hoja del *Brosimun rubescens*	106
Anexo N° 16:	Determinación de catequina y proantocianidoles de la hoja del *Brosimun rubescens*	107
Anexo N° 17:	Comparación de fenoles totales del *Brosimun rubescens*	107
Anexo N° 18:	Comparación de antocianinas del *Brosimun rubescens*	108
Anexo N° 19:	Comparación de flavonoides del *Brosimun rubescens*	108
Anexo N° 20:	Comparación de taninos del *Brosimun rubescens*	109
Anexo N° 21:	Muestra de la viruta de la madera de *Brosimun rubescens*	110
Anexo N° 22:	Muestra de la hoja de *Brosimun rubescens*	111
Anexo N° 23:	Obtención de los extractos de la madera y hoja del *Brosimun rubescens*	112
Anexo N° 24:	Elaboración del método de DPPH en la madera y hoja de *Brosimun rubescens*	113

RESUMEN

Del extracto etanolico al 1% de ácido fórmico de la madera desechada por artesanos y las hojas de la especie *Brosimun rubescens* (palisangre) se evaluó la capacidad antioxidante (AA) mediante la prueba del DPPH y el contenido de fenoles totales (106,024 ± 0,392 mg EAG/100 g muestra original), antocianinas (34.367 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original), flavonoides (24.48 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original), taninos (160 mg (+)-catequina/100g de muestra original) de la madera; y las hojas de fenoles totales (190,168 ± 0,0 mg EAG/100 g muestra original), antocianinas (0.9227 ± 0.046 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original), flavonoides (0.6 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original), catequinas y protoantocianidoles (4.24 ± 0,0 mg (+)-catequina/100g de muestra original). La AA de la madera se debería a la presencia mayoritaria de flavonoides, en cambio en las hojas serían los fenoles totales.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Debido al conocimiento popular milenario y algunas veces por falta de recursos económicos, muchas culturas usan aun a las plantas como una fuente de productos medicinales, alimenticios y especias culinarias. Actualmente, hay una tendencia mundial en la población por el consumo de productos con propiedades nutricionales y funcionales, esta visión se encuentra sustentada en el simple hecho de que un producto no simplemente es visto como fuente de energía sino también como una forma de prevenir enfermedades, varios autores afirman que ciertos metabolitos secundarios ayudan a combatir y prevenir enfermedades oncológicas y cardiovasculares, es decir, su utilización es mejor apreciada como alimento nutracéutico.

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

El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales, llegando a conocer y usar unas dos a tres mil plantas medicinales. Pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales y tóxicas de estas plantas han sido realizados. Actualmente, en la Amazonía peruana se han reportado, por lo menos, 3140 especies útiles de la cuales aproximadamente 1044 especies tienen uso medicinal. (Brack, 1995).

Gentry (1988), basado en inventarios de árboles con diámetros mayores a 10 cm y de lianas, identifica en el Perú, en el Departamento de Loreto, uno de los bosques tropicales más diversos del mundo, como los de Yanamono con 300 especies y Mishana con 289 especies maderables.

La familia Moraceae comprende 37 géneros y 1100 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. Entre las especies sobresalientes de la familia está *Brosimum rubescens* en la región amazónica conocido como palisangre, es un árbol de 25 a 40 metros de altura y su madera es muy empleada en la elaboración de artesanía gracias al color rojo intenso de su madera y brillo natural. Además su madera, corteza y hojas son utilizadas en medicinas tradicionales como anticonceptivas, antihemorrágicas, tónicas y para tratar fiebres posiblemente causadas por la malaria. (Alba, 2007)

La especie *Brosimum rubescens* (Palisangre), se viene utilizando y comercializando en mayor escala para uso artesanal, por medio de este proceso se desperdicia el residuo, con esta madera desechada se evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico y determinó la presencia de los compuestos responsable de ello como los fenoles totales, flavonoides, antocianinas y taninos, comparando además con la evaluación de la hoja del palisangre, esta especie que contienen estos compuestos con un principio activo, bajo un manejo sostenible pueden dar oportunidad a los pobladores nativos y ribereños de mejorar su calidad de vida.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Brosimum rubescens* Taubert, (PALISANGRE)

2.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La especie *Brosimum rubescens* Taubert, de la familia Moraceae, de 40 – 120 cm de diámetro y 25 – 40 m de altura total, con el fuste cilíndrico, la ramificación en el segundo al tercer tercio, la base del fuste recta o con raíces superficiales cilíndricas y cortas.

Corteza externa lenticelada color marrón rojizo, las lenticelas alargadas, protuberantes, de unos 4 – 6 x 10 – 20 mm, dispuestas en hileras horizontales, muy congestionadas y conspicuas hacia la parte basal del fuste.

Corteza interna homogénea, color amarillo blanquecino, con secreción de látex blanco, abundante, de flujo rápido.

Ramitas terminales con sección circular, color marrón claro cuando secas, de unos 2 – 4 mm de diámetro, lisas, glabras, con estipulas terminales muy largas y delgadas, características, de 1.5 – 3.5 cm de longitud, en forma de punta de lanza.

Hojas simples, alternas y dísticas, de unos 6 – 11 cm de longitud y 2.5 – 4 cm de ancho, el peciolo de 4 – 8 mm de longitud, las láminas elípticas a oblongas, enteras, la nerviación pinnada, los nervios secundarios 14 – 18 pares, muy tenues sobre todo en la cercanía de los bordes, el ápice largamente acuminados, la base aguda, las hojas glabras y rígidas.

Inflorescencia, la especie es usualmente monoica y produce inflorescencia bisexuales o unisexuales, en cabezuelas más o menos globosas de unos 3 – 8 mm de diámetro con pocas a numerosas flores.

Flores unisexuales, muy pequeñas, con el perianto reducido, las flores femeninas acompañadas de brácteas diminutas (hasta 1 mm de longitud), el ovario diminuto, el estilo y estigma de 1 – 2 mm de longitud, las flores masculinas con un perianto irregular y diminutos de casi 1 mm de longitud, los estambres 1 – 2, de casi 1 mm de longitud, Frutos, pequeñas drupas en

infrutescencias globosas o subglobosas, de hasta 2 cm de diámetro, rojizas cuando maduras. (Reynel *et al.*, 2003).

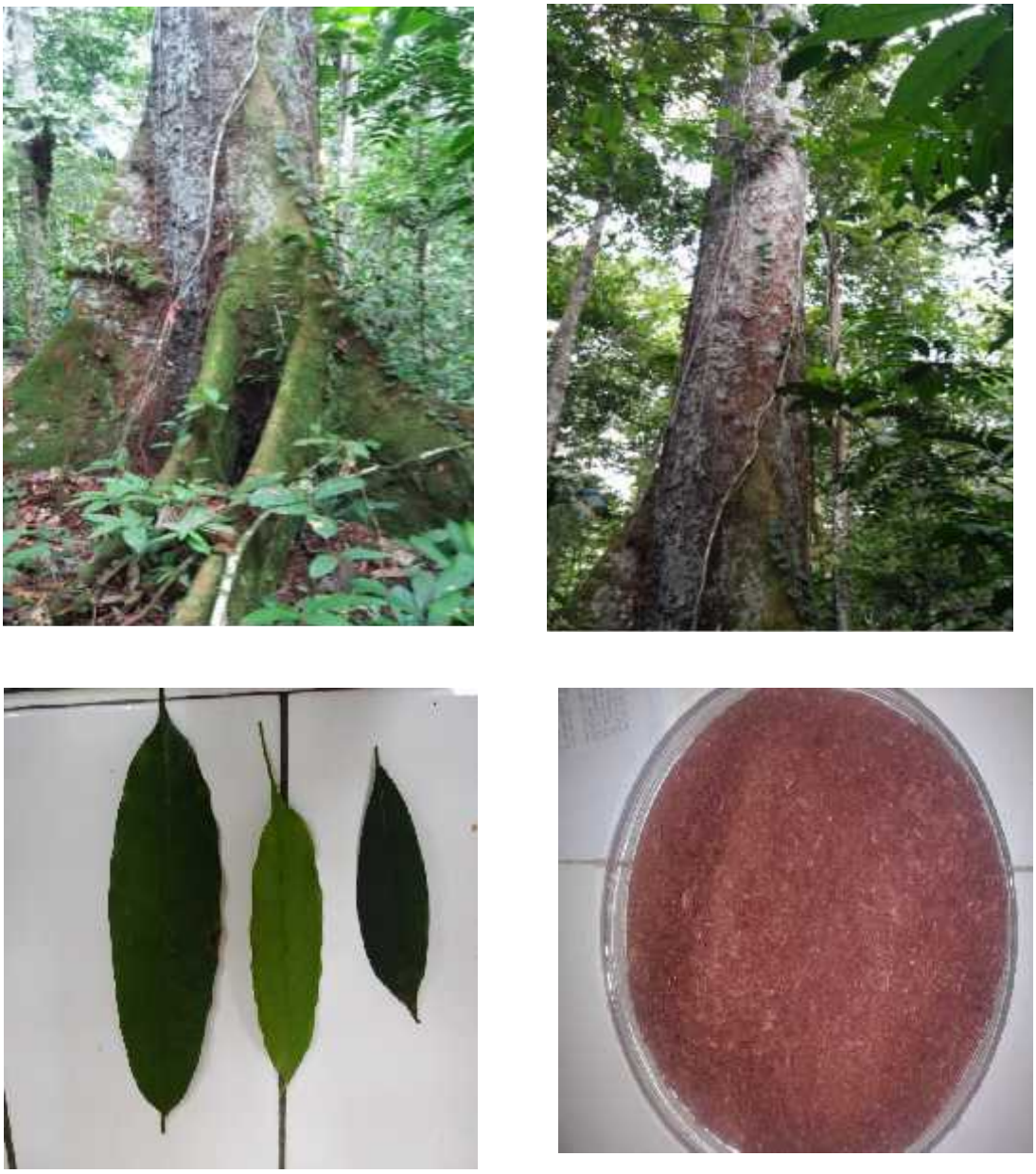


FIGURA Nº01. Tronco, hojas, viruta del palisangre.

2.1.2 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

Su distribución se encuentra a partir de Centroamérica (Panamá) hasta la región amazónica, en Brasil, Perú, Colombia y las Guayanas, mayormente debajo de los 700 msnm. Se le observa en ámbitos con pluviosidad elevada y constante; es una especie esciófita, presente en zonas de bosques primarios, en suelos arcillosos a limosos con tendencia ácida, fértiles y bien drenados, con pedregosidad baja a media. (Reynel *et al.*, 2003).

2.1.3 UTILIZACIÓN

La especie *Brosimum rubescens*, es utilizado en la medicina tradicional como antiartrítico, antirreumático, fortificante, para combatir los descensos, la hemorragia y la sífilis, la madera debido a su maleabilidad es usado en artesanía. (Brack, 1999).

Gottlieb (1972), afirma que además de los usos tradicionales anteriores agrega que los nativos amazónicos brasileros lo utilizaba como anticonceptivo, antihemorrágico, tónicos y para tratar fiebres posiblemente causada por malaria.

Arzubialdes (2009), reporta la obtención y caracterización de colorantes naturales con un alto porcentaje de pureza presentes en la especie *Brosimum rubescens* (palisangre) para ser usado en la industria alimentaria, textil, cosmético y otros.

2.1.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS

Silva y Silva (1991) evaluaron la cantidad aproximada de componentes estructurales y macromoleculares presentes en el aserrín de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre) como celulosa (56,6%), hemicelulosa (25,2%), lignina (33,0%), y de metabolitos secundarios (22,23%).

Estudios químicos de sus metabolitos secundarios indicaron que los extractos del aserrín de palisangre contienen mucha xantiletina y otras cumarinas en cantidades relativamente pequeñas como luvangetina.
(Pozzetti y Bernadi 1971), brosiparina, 7-demetilsuberosina y brosiprenina. (Hayasida *et al*, 2008).

Alba *et al.* (1997), reportaron un estudio fitoquímico parcial de los extractos etanólico de madera, hojas y corteza de la especie *Brosimum rubescens* (Moraceae) de las cuales se aislaron tres cumarinas xantiletina (1), suberosina (2) y 7-demetil-suberosina (3) además 2 triterpenos, acetato de lupeol (4) y lupeol (5), su estructura fue elucidada por resonancia magnética nuclear ^{1}H y ^{13}C.

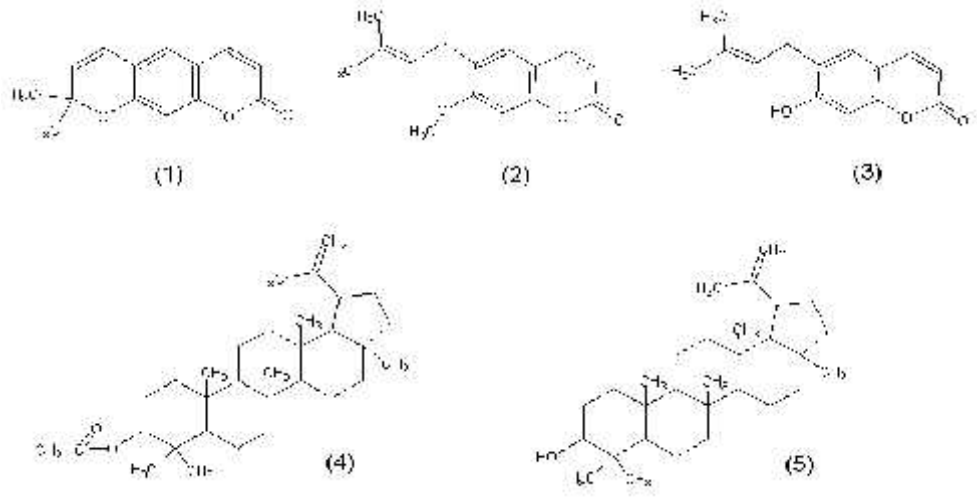


FIGURA N° 02. Cumarinas Aisladas del *Brosimun rubescens,* Alba (1997).

Hayasida (2008), reportó estudios fitoquímicos previos con los residuos se adhieren al *(Brosimum rubescens*), identificó un alto contenido de xantiletina, una cumarina con potencial biológico, continuando sus estudios con aserrín de esta especie, aislaron e identificaron los triterpenos 3β-acetoxi-olean-12-eno-28-al y β-sitosterol en extractos de hexano y metanol de la madera de la planta, la estructura del triterpeno se determinó basado

en los espectros de RMN 1D de la (^{1}H y ^{13}C) y 2D (HSQC y HMBC), así como la comparación con datos de la literatura.

Ha sido reportado que las cumarinas tiene una alto potencial biológico, que incluye la actividad antiplaquetario (Teng *et al*. 1992), antifúngicos (Godoy *et al.,* 2005) y el herbicida (Anaya *et al.* 2005).

TABLA 01. Compuestos obtenidos de la especie *Brosimum rubescens Taubert.*

Compuestos	Extracto
Alcaloide	**++**
Saponinas	**-**
Esteroides	**-**
Triterpenos	**++**
Taninos	**+++**
Fenoles	**-**
Flavonoides	**++**
Quinonas	**+++**
Lactona	**++**
Aminas y Aminoácidos	**-**
Cumarinas fija	**++**
Cumarinas volátiles	**+**

Fuente: Arzubialdes (2009).

2.1.5 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

Loizeau *et al* (1990), estudiaron el palisangre demostrando que desde el punto de vista médico es eficaz para la contención de las hemorragias. La xantiletina presente en el género *Brosimum* es una piranocumarina que presenta actividad antiplaquetaria. (Teng, 1992), y anticancerígena (Gljnatilau y Kingston, 1994); presenta potencial herbicida e inhibe el crecimiento de hongos simbióticos. El interés en esta cumarina es también para uso como intermediario en la síntesis de compuestos biológicamente activos, descrito por Magiatis *et al.* (1998) que en la búsqueda de drogas antitumorales en productos naturales, sintetizo derivados más potentes contra determinados tipos de células leucémicas (L-1210).

Según Diawara y Trumble (1997), las furanocumarinas aisladas de la especie *Brosimum* son utilizadas desde épocas remotas para el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como psoriasis, vitíligo, leucodermia, micosis, dermatitis y eczemas.

Alba *et al* (1997) determinaron la eficacia *in vitro* de los extractos etanólicos de madera, hojas, corteza y de algunos metabolitos secundarios reportados en el tamizaje fitoquímico de la especie *Brosimum rubescens* (Moraceae) contra *Plasmodium falciparum*. El extracto etanólico de la madera es el que mejor actividad antimalárica presenta y se sabe que la xantiletina no es la responsable de dicha actividad.

Se describe el aislamiento y la elucidación estructural de nuevas fraccionamientos natural tipo Diels−Alder, llamado palo de sangre A−E, procedente de una planta tradicional del Perú conocido como “palo de sangre” (*Brosimum rubescens*). Las estructuras tipo Diels−Alders, consiste en un derivado de chalcona y una prenilcumarina, las cuales fueron elucidadas a través del análisis de espectroscopia 2D NMR. Alguno de estos compuestos mostró una potente actividad inhibitoria de 5α-dihidrotestosterona (DHT) sobre el receptor andrógeno formando un

complejo del DHT-receptor causando una enfermedad andrógeno dependiente. (Shirota *et al.*, 1997).

El screening fitoquímico del extracto etanólico del tallo *B. rubescens* evidenció la presencia de cumarinas, quinonas y taninos, además de flavonoides y triterpenos; para el estudio de la actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de macrodilución para hongos filamentosos se utilizó cepas de *Trichosporum rubrum* ATCC 28188 y *Trichosporum mentagrophytes* ATCC 24953. En ambos casos la fracción de baja polaridad evidenció mayor actividad antifúngica que el extracto etanólico contra dermatofitos. El fraccionamiento del extracto etanólico del tallo *B. rubescens* permitió inferir que el responsables de la actividad se debe a los fitocomplejos, pero no a las fracciones frente a *T. rubrum* ATCC 28188. (Fachín *et al.,* 2012).

Se determinó una mezcla de quinonas naftoquinonas y antraquinonas α- y β-hidroxilados, también una mezcla de flavonoides tipo chalconas y auronas; y colorante en polvo, llegando a determinar que hay una mezcla de flavanoides del tipo flavonas (Arzubialdes, 2009).

2.1.6 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

De acuerdo a la literatura la xantiletina es una piranocumarina con actividades biológicas, como antitumoral y antibacteriana. Por tratarse de un producto natural abundante que se encuentra en diversas especies de plantas pertenecientes a las familias Rutaceae, Umbeliferaceae y Moraceae, resaltándose que la especie *Brosimum rubescens*, una planta del género *Brosimum* (Moraceae); la xantiletina está presente en abundancia. La xantiletina fue sometida a algunas modificaciones moleculares y subsecuentemente el producto natural y sus derivados clorados tuvieron una actividad larvicida frente a *Artemia salina*. (Pouliquen *et al*., 2005).

2.1.7 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchior en 1964, la clasificación taxonómica de *Brosimum rubescens* Taubert es la siguiente:

REINO	: Plantae.
SUB REINO	: Tracheobionta.
SUPER DIVISION	: Spermatophyta.
DIVISIÓN	: Magnoliophyta.
CLASE	: Magnoliopsida.
SUB CLASE	: Rosalidae.
ORDEN	: Rosales.
FAMILIA	: MORACEAE.
GÉNERO	: *Brosimum.*
ESPECIE	: *Brosimum rubescens* Taubert.
NOMBRE VULGAR	: Palisangre (Perú) (Pinedo, Rengifo, Cerrutti, 1997; Brack, 1999; Brako y Zarucchi, 1993; Schultes y Raffauf, 1992; Brack, 1995), muirapiranga, Pau-Rainha (Brasil). (Magiatis *et al*, 1998).

2.1.8 USO TRADICIONAL

Su madera es adecuada para manufacturar muebles de lujo, madera, escaleras, pisos, instrumentos musicales, faquires decorativos y objetos de adorno, entre otros.

La especie *Brosimum rubescens*, es utilizada en medicina tradicional como antiartrítico, antirreumático, fortificante, para combatir los descensos, la hemorragia y la sífilis, la madera debido a su maleabilidad es usado en artesanía. Además de los usos tradicionales anteriores, los nativos amazónicos brasileros lo utilizaban como anticonceptivo, antihemorrágico, tónico y para tratar la fiebre posiblemente causada por malaria. (Bracko y Zarucchi *et al*., 1993).

2.1.9 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se distribuye se encuentra a partir de Centroamérica (Panamá) hasta la región amazónica (Brasil, Perú, Colombia y las Guayanas), mayormente debajo de los 700 msnm. (Vásquez, 1997; Encarnación, 1983).

2.2 ANTIOXIDANTES

2.2.1 DEFINICÓN

Los antioxidantes son considerados como compuestos capaces de retrasar o prevenir los procesos de autooxidación. De acuerdo con el Código de Regulaciones Federales del USDA, "los antioxidantes son sustancias utilizadas para conservar los alimentos al retardar el deterioro, la rancidez o decoloración debido a la oxidación (Dziezak, 1986). Se ha sugerido que un antioxidante ideales para la calidad alimentaria debe ser seguro, no imparte color, olor o sabor, ser eficaz a bajas concentraciones, ser fácil de incorporar, estable mantenerse después del procesamiento, ser estable en el producto acabado y disponible a bajo costo (Coppen, 1983).

La principal justificación para el uso de un antioxidante es para extender la vida útil de los productos alimenticios, reducir los desechos y las pérdidas nutricionales al inhibir y retrasar la oxidación. Sin embargo, los antioxidantes no pueden mejorar la calidad de un producto alimenticio ya oxidado (Sherwin, 1978; Coppen, 1983).

Estos engloba un vasto grupo de fitoquímicos, que presentan en su estructura un anillo aromático con por lo menos un hidroxilo (Rice -Evans, 1996; Wang *et al*, 1996) y que, por poseer esta configuración, actúan como agentes reductores capaces de interrumpir la reacción de oxidación por dos maneras: por la donación de electrones o átomos de hidrogeno a los radicales libres, convirtiéndolos en productos estables, o por su

complejación con metales presentes en el medio (Sauté - García *et al*., 1997; Villano *et al*., 2007).

2.2.2 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

2.2.2.1 FRUTAS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES

Las frutas en general, además de presentar importante fuente de vitaminas, minerales y fibras, poseen compuestos con actividad antioxidante (Melo *et al*., 2008), dentro de los cuales se destacan los compuestos fenólicos. Actualmente el consumo de frutas viene aumentando en virtud de su valor nutritivo y de sus efectos biológicos a la salud (Kuskoski *et al*., 2006;). Las frutas poseen compuestos como vitamina C y E, carotenoides, clorofila y fitoquímicos, como compuestos fenólicos, flavonoides, glucósidos y taninos (Pellegrini *et al*., 2007), que poseen relación con la prevención de ciertas dolencias y enfermedades cardiovasculares y circulatorias (Stoclet *et al*, 2004) debido a su efecto antioxidante. Dietas ricas en frutas y vegetales están asociadas a un reducido riesgo de dolencias crónicas (Hertog *et al*., 1997; Hollman *et al*, 1996).

Algunos componentes existentes en las frutas pueden actuar como estimuladores del sistema inmunológico, moduladores de síntesis de colesterol y de la reducción de la presión sanguínea (Lampe, 1999); la ingestión de frutos silvestres provoca un impacto positivo en la salud del corazón, además de auxiliar en el combate de ciertas dolencias cardiovasculares, neurodegenerativas, envejecimiento, obesidad y de ciertos tipos de cáncer, tales como del esófago y gastrointestinal (Seeram, 2008).

Es fundamental tener conocimiento que el valor de los compuestos antioxidantes presentes en las frutas es influenciado por diversos factores como cultivar, factores genéticos, estadios de maduración, condiciones climáticas y por el suelo. Además de eso, los compuestos bioactivos también son muy susceptibles a las reacciones de oxidación que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Robards, 1999).

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

Las frutas de coloración rojo/azul son consideradas las más importantes fuentes de compuestos fenólicos en dietas alimentarias, porque presentan cantidades significativas de derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico como las antocianinas, los flavonoides, las catequinas y los taninos (hidrolizables o condensados) haciendo que muchos de estos compuestos demuestren efectos biológicos como acción antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y vasodilatadora (Degáspari y Waszczynskyj, 2004).

Actualmente, las bayas son intensamente estudiadas (Schreckinger *et al*., 2010) siendo comprobado que las mismas poseen una vasta gama de polifenoles como antocianinas fenólicos y taninos, además de compuestos nutritivos como los carotenoides y vitamina C (Kähkönen *et al*, 2001).

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

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

2.2.2.2 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES FENÓLICOS EN ALIMENTOS

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

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

Los antioxidantes naturales procedentes de fuentes dietéticas incluyen compuestos fenólicos y polifenólicos, entre otros. El mecanismo por el cual estos antioxidantes ejercen sus efectos puede variar dependiendo de las características de composición de los alimentos, incluyendo sus componentes menores. Además, los efectos beneficiosos para la salud de los alimentos vegetales que consume se han atribuido, en parte, a la presencia de compuestos fenólicos, que se asocian con contrarrestar el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas, así como un

número de otras enfermedades degenerativas. Esto se logra mediante la prevención de la oxidación de lípidos, la mutación de unión y el ADN cruz de proteínas y, en etapas posteriores, el daño tisular. Aunque los compuestos fenólicos y algunos de sus derivados son muy eficientes en la prevención de la autooxidación, sólo unos pocos compuestos fenólicos se permite actualmente como antioxidantes alimentarios. Las principales consideraciones para la aceptabilidad de estos antioxidantes son su actividad y la toxicidad y / o carcinogenicidad potencial. Los antioxidantes fenólicos aprobados han sido ampliamente estudiados, pero la toxicología de sus productos de degradación aún no está claro.

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

2.3 ALIMENTO NUTRACEUTICO

Es aquel que contiene compuestos que se ha demostrado que tienen efectos positivos en nuestra salud y que incrementan nuestra calidad de vida. Es cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o la parte de un alimento que provee un beneficio para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedad. Son productos de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida.

Los alimentos nutracéuticos previenen las principales enfermedades crónicas degenerativas que son los infartos, embolias, hipertensión, diabetes, cánceres hormona dependientes (glándulas mamarias, próstata, tiroides, etc.) (Delgado y Paredes, 2003)

2.3.1 LOS ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS SE DIVIDEN EN TRES GRUPOS

- **NUTRIENTES** **:** Estos son los azúcares y las grasas.
- **COMPUESTOS QUÍMICOS** **:** Fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos y omega3.
- **PROBIÓTICOS** **:** microorganismos benéficos (lácteos).

(Delgado y Paredes, 2003)

2.3.2 CRITERIOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

- Ser productos de origen natural.
- Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes
- Que aporten efectos beneficiosos para la salud:

  a. Mejora de una o más funciones fisiológicas.
  b. Acción preventiva y/o curativa.
  c. Mejora de la calidad de vida.

- Que aporte estabilidad temporal.
- Con análisis de estabilidad y toxicología.
- Análisis químicos.

- Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas. (Serna, 2000)

2.3.3 PRODUCTOS QUÍMICOS Y COLORANTES COMO NUTRACÉUTICOS

Tradicionalmente los alimentos son evaluados por su valor nutricional, que se asocia con aquellos componentes que son esenciales para mantener la vida de un organismo. Por lo tanto, los componentes de los alimentos han sido clasificados como macro y micronutrientes. Sin embargo, desde la antigüedad, se ha conocido que los alimentos pueden contener otras sustancias, lo cual puede producir efectos no deseados. Los macronutrientes constituyen alrededor del 99% de la dieta total y el otro 1% se corresponde con micronutrientes; micronutrientes son esenciales para el uso de macronutrientes.

Las vitaminas, compuestos orgánicos complejos presentan de forma natural en el tejido vegetal y animal, son cofactores en la regulación de muchos procesos metabólicos. Los minerales juegan un papel importante en el mantenimiento de la función muscular y nerviosa, la regulación del balance de agua y el metabolismo, la mineralización del esqueleto, y la transformación de la energía. Como ejemplo, el cromo está involucrado en el metabolismo de la glucosa, cobalto en el sistema inmunológico, el cobre en el metabolismo del hierro y el hueso y el desarrollo del tejido elástico, manganeso como cofactor de enzimas tales como la superóxido dismutasa, y zinc en el transporte de dióxido de carbono y en la utilización de vitamina A. los alimentos y las enfermedades muestran una relación fuerte, y ahora está claro que el exceso de cualquier nutriente en la dieta se asocia con efectos patológicos. Esto ha sido claramente evidente con la relación entre la alimentación y el cáncer.

Los alimentos naturales pueden estar contaminados con micotoxinas, y pueden contener otros compuestos carcinógenos (por ejemplo, glioxal, metilglioxal, diacetilo, derivados de hidrazina, alquilbencenes, alcaloides, fenólicos, y saponinas); la mayoría de los mutágenos y compuestos carcinógenos son naturales y se originan principalmente de las plantas o se producen durante el almacenamiento y procesamiento de alimentos. Sin

embargo, los productos vegetales son también la fuente principal de compuestos con propiedades para la salud beneficiales: la vitamina C inhibe la formación de nitrosaminas, la vitamina A está implicada en el proceso de la visión y un gran número de procesos metabólicos, y el selenio es un elemento importante que bloquea la promoción y la progresión del cáncer.

Durante la primera mitad del siglo 20, los científicos de alimentos se centraron en la nutrición y estrategias de comprensión de modificar los alimentos para corregir deficiencias nutricionales. Al comienzo del siglo 20, nutricionales enfermedades deficiencia, como el raquitismo, el escorbuto, el beriberi y la pelagra, recurrentes, se pensaba que eran las enfermedades infecciosas. A principios de 1900, los científicos descubrieron que el alimento contiene vitaminas y minerales esenciales, y que la falta de estas sustancias en la dieta causó la enfermedad. A modo de ejemplo, se estableció por la tradición que el consumo de hígado era un remedio para la ceguera nocturna; sin embargo, su componente activo, la vitamina A, no era químicamente definido hasta 1913. Ciertamente, la pobreza sigue siendo la corriente de las principales causas del hambre, la malnutrición, la enfermedad y la muerte.

La desnutrición crónica mata a cerca de 12 millones de niños al año. Además, hay niños y adultos con nutrientes crónica aguda y subaguda deficiencias, tales como hierro, zinc y vitamina A, lo que puede dar lugar a deterioro físico o mental permanente. En la segunda mitad del siglo 20 y tirado por las economías más avanzadas, la atención se centró en las cuestiones de la sobrealimentación y para la modificación de los alimentos para corregir los problemas de salud pública asociados.

Hoy en día, se acepta que la funcionalidad de los componentes de alimentos va más allá de la nutrición y la sensación de satisfacción y llega a la modulación de los sistemas fisiológicos (inmunológico, endocrino, nervioso, circulatorio y digestivo). De hecho, más del 90% de la población de Estados Unidos ahora cree que las frutas, verduras y cereales contienen sustancias naturales que pueden ayudar a prevenir y tratar las enfermedades e incluso cáncer. Y un poco más de 50% piensa que los

alimentos pueden reemplazar algunos medicamentos. Esta tendencia también se ha observado en todo el mundo; la nutrición es ahora percibida como una herramienta para la prevención de enfermedades y para el auto-tratamiento de las condiciones de salud específicos.

La noción de la dieta y la salud no es nueva y se remonta a Hipócrates; esta idea fue aplicada por la publicidad en torno a las afirmaciones hechas por Nobel- Premio Linus Pauling en la década de 1970, que las megadosis de al menos diez veces la cantidad diaria recomendado (RDA) de ácido ascórbico podría prevenir o curar el resfriado común, gripe y el cáncer, y puede haber estimulado el interés público en el uso de suplementos de vitaminas para mejorar la salud. Esta propuesta fue apoyada más tarde, cuando se descubrió que las vitaminas C, E y ß-caroteno juegan un papel en la protección de las células del daño oxidativo de los radicales libres.

Además, los estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en frutas y verduras y abundante en nutrientes antioxidantes y otras sustancias, reduce el riesgo de enfermedad coronaria y ciertos tipos de cáncer. El enfoque holístico de los alimentos como medicina, y viceversa, que se inició en el 1970 está recibiendo renovada atención. Cuestiones nutricionales destacan la relación entre la dieta y las enfermedades crónicas y cáncer. En otras palabras, nos estamos moviendo más allá de la prevención de las enfermedades carenciales en la promoción de una salud óptima, longevidad y calidad de vida. (Sikorski, 1997).

2.4 COMPUESTOS FENOLICOS

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

especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo. (Lock, 1994)

Según Bruneton (2001) afirma que el elemento estructural fundamental que los caracteriza es la presencia de al menos un núcleo bencénico que contiene como mínimo un grupo hidroxílico, libre o formando parte de otra función: éter, éster, heterósido. Una definición exclusivamente química de los fenoles es insuficiente para la caracterización de los compuestos fenólicos vegetales: ya que incluirá metabolitos secundarios que contienen estos elementos estructurales, pero que de manera manifiesta pertenece a grupos fItoquímicos perfectamente diferenciados. Esto ocurre con numerosos alcaloides (boldina, morfina, etc.) y bastantes terpenos (timol, gosipol, carnosol) que poseen en su estructura, núcleos bencénicos e hidroxilos fenólicos. Por lo tanto es necesario introducir un criterio biosintético para delimitar este grupo de compuestos.

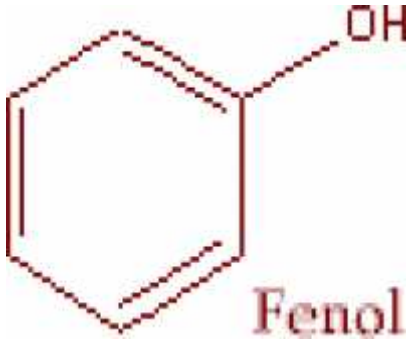


FIGURA Nº 03. Estructura del fenol.

En la naturaleza, la síntesis de un núcleo aromático la realizan únicamente vegetales y microorganismos. Los organismos animales los reciben, sea por su alimentación o a través de una simbiosis, para elaborar metabolitos

que les son dispensables y que poseen este elemento estructural (aminoácidos, vitaminas, pigmentos, toxina, etc.).

Los compuestos fenólicos de los vegetales proceden de las dos grandes vías de la aromagenesis:

- La vía más frecuente es la que, vía sikimato (ácido sikímico), conduce a partir de osas a la formación de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) y después, por desaminación de estos últimos, a la de ácidos cinámicos y de sus numerosísimos derivados: ácido benzoico, acetofenonas, lignanos y ligninas, cumarinas, etc.

- La otra vía parte del acetato y conduce a la formación de poli-β-cetoésferes de longitud variable-poliacetatos-que producen, por ciclación (condensación aldólica o reacción de claisen), compuestos normalmente policíclicos: cromonas, isocumarinas, orcinoles, depsidos, depsidonas, xantonas, quinonas, etc.

La pluralidad estructural de los compuestos fenólicos debida a este doble origen biosintético se ve acrecentada por la posibilidad, muy frecuente, de la participación simultánea del sikimato y del acetato en la elaboración de compuestos de origen mixto (flavonoides, *lato sensu*, estilbenos, pironas, xantonas, etc.). También es posible la participación de una vía elemental-el mevalonato-, aunque sea menos frecuente: derivados mixtos del sikimato y del mevalonato, como algunas quinonas o como las furano- y piranocumarinas o, compuestos mixtos acetato/nevalonato es que el caso de los cannabinoides. A veces, los tres precursores participan en la formación de la misma estructura: esto ocurre, por ejemplo con los rotenoides.

Se admite clásicamente que los derivados de aminoácidos que conservan el atomo de nitrógeno son alcaloides o sustancias relacionadas (aminas aromáticas, betalaínas). De la misma forma, algunos mono-, sesqui y diterpenos pueden encontrarse parcialmente insaturados y poseer un

hidroxilo fenólico: se les considera como terpenos ya que la aromatización no es más que un fenómeno secundario.

La gran diversidad estructural de los compuestos fenólicos hace difícil la presentación conjunta de los métodos que permitan su extracción y aislamiento, de los procesos implicados en su biosíntesis, de sus propiedades físico-químicas y biológicas. Estos compuestos y las drogas que los contienes se abordaran por tanto, estableciendo grupos constituidos en función de su origen biosintético, siguiendo el siguiente esquema:

- ✓ sikimatos (derivados del ácido sikímico) y drogas que los contienen:
  - Derivados del 1-fenilpropano,
  - Derivados por extensión del 1-fenilpropano.

- ✓ poliacetatos (compuestos que resultan sobre todo de la ciclación de un poli-β-cetoéster) y drogas que los contienen.

2.4.1 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos en la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez- Valverde *et al.,* 2000).

Existen varias técnicas analíticas para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos que incluyen técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la

de líquidos de alta resolución (HPLC) (Escarpa y González, 2001), y también se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez-Valverde *et al.,* 2000).

2.4.2 TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y hasta hoy en día son usados frecuentemente para la determinación de polifenoles (Escarpa y González, 2001). Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez-Valverde *et al.,* 2000) y el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, esta técnica llegó a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin- Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.

Swain y Goldstein (1964), utilizaron diversos métodos espectrofométricos, y en base a la utilización, recomendaron el ensayo de Folin-Ciocalteu como el reactivo más conveniente para la determinación espectrofotométrica de polifenoles totales (Escarpa y González, 2001). En base a lo recomendado, se resolvió utilizar en la determinación de fenoles en los extractos de *E. precatoria y E. Oleracea.*

2.4.3 ENSAYOS ULTRAVIOLETA

Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima (Martínez-Valverde *et al.,* 2000).

A continuación se fundamenta los métodos utilizados en el presente trabajo para la determinación de antioxidantes fenólicos.

2.4.4 COMPUESTOS FENOLICOS EN ALIMENTOS

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

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

actúan como antialimentaria y antipatógeno (Butler, 1992). La contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de alimentos de origen vegetal también es bien reconocida. Además, los compuestos fenólicos funcionan como antibióticos, pesticidas naturales, sustancias de la señal para el establecimiento de simbiosis con rizobios, atrayentes para los polinizadores, agentes de protección contra la radiación ultravioleta (UV), materiales para hacer las paredes celulares impermeables al gas y agua aislante y como materiales estructurales para dar a las plantas estabilidad.

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

2.4.5 COMPUESTOS FENÓLICOS DE BEBIDAS

Bebidas populares en el mundo son el té, el café, el cacao, cerveza, zumos de fruta y vino; todas estas bebidas contienen compuestos fenólicos. El contenido de compuestos fenólicos en las bebidas depende de la especie, grado de madurez y de procesamiento y los factores climáticos de los materiales de partida.

2.4.6 TÉ

Té ha sido cultivada y consumida en China y Asia durante más de 2000 años. Bebida de té se prepara mediante la elaboración de la cerveza las hojas de la planta Camellia sinensis (Balentine et al., 1997; Harbowy y Balentine, 1997; Ukers, 1994; Wilson y Clifford, 1992). Aproximadamente el 20% de la producción mundial del té es en forma de té verde producto obtenido mediante la inactivación rápida (calentamiento en seco o vapor) de la oxidasa fenol (fenolasa) presentes en las hojas de té. La falta de la oxidación enzimática de compuestos fenólicos da el té verde su color claro y astringencia característica. Tés rojos y amarillos se semifermentan productos con algunas de las características del té verde y té negro. Fenoles de oolong y tés Pounchong son 70 y 30% oxida, respectivamente (Balentine et al., 1997).

El té negro es una de las bebidas más populares en el mundo y es tradicionalmente hecha de rubor que comprende la yema apical con dos o tres hojas. Producción del té negro implica seis etapas:

- Lave se arrancó a diferentes intervalos, dependiendo de la temporada, para obtener la mejor composición química posible (Sanderson, 1964). Depilarse puede realizarse mediante máquinas cosechadoras de mano o utilizando.
- Flush se seca en un proceso llamado fulminante. Durante este período una serie de cambios químicos se lleva a cabo (Graham, 1983).
- hojas de té secas se enrollan para interrumpir el tejido, lo que provoca una descomposición celular y proporciona condiciones requeridas para la oxidación de los polifenoles en la vacuola celular por las enzimas oxidativas té.
- hojas de té rotas se fermentan a temperatura ambiente en presencia de oxígeno y humedad alta. Durante este proceso de polifenoles en el té sufrir oxidación no enzimática y enzimática, lo que lleva a la formación de teaflavinas y terubiginas (Robertson, 1992).
-

2.4.7 VINO

Los compuestos fenólicos son componentes importantes de vino., contribuyen a las características sensoriales, tales como color, sabor, astringencia y dureza de vino directamente o mediante la interacción con proteínas, polisacáridos, u otros compuestos fenólicos (Lee y Jaworski, 1987, García-Viguera et al, 1997). Las características sensoriales del vino están influenciados por la variedad de uva, el proceso de vinificación, la degradación y la polimerización de compuestos fenólicos durante el envejecimiento del vino (Auw *et al*., 1996; Zoecklein *et al*., 1997). Estas reacciones están influenciados por la temperatura de almacenamiento (Gómez-Plaza *et al*., 2000; Somers y Evans, 1986; Somers y Pocock, 1990) y la duración (Dallas y Laureno, 1994a, 1994b).

2.5 ANÁLISIS PARA ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

2.5.1 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

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

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton et al., 1999). Inicialmente, fue aplicado al análisis de 19 proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al

residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco *et al.,* 2009).

$$\textbf{Folin: Mo (VI)(amarillo)} + e^{-}(de\ AH) \rightarrow Mo(V)(azul)$$
$$\lambda max = 765\ nm$$

Reactivo de Folin. En el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e^{-} donado por un antioxidante.

En el ensayo F-C original, se usa el buffer de carbonato para ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 min aproximadamente a temperatura ambiente. Aunque es un tiempo demasiado extenso y dificulta la implementación de un análisis de rutina, aún es utilizado por algunos investigadores. En diferentes trabajos se ha variado concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, buscando una reducción significativa del tiempo necesario para llegar a un estado estacionario. Magalhães *et al*., (2010) adaptó el método, en el cual se varia la alcalinidad, al reemplazar el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio logrando disminuir el tiempo de reacción a 4 min y conseguir resultados altamente confiables. Al final se debe tener muy presente la concentración alcohólica en la mezcla, puesto que según Singleton *et al.*, (1999) el incluir solventes diferentes al agua en las muestras, algunas veces puede interferir la formación de la solución azul.

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

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

2.6 DETERMINACION DE FLAVONOIDES

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

flavonoides y expresando los resultados en mg de quercetina/100 g de muestra.

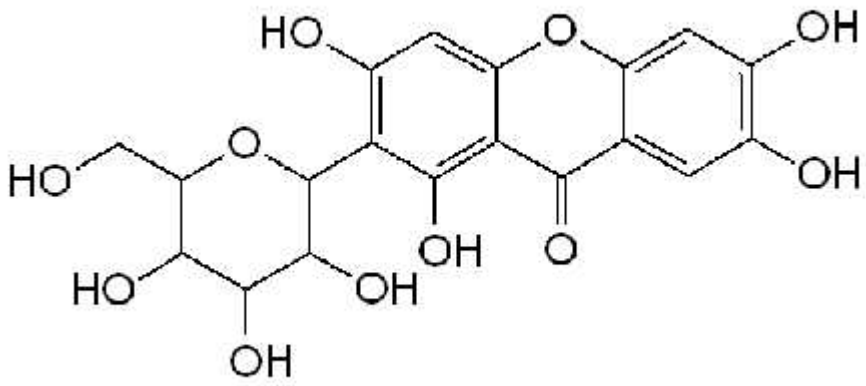


FIGURA N° 04: Estructura de La quercetina. Sotero y García (2009).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950. Los flavonoides 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. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas baja densidad de la oxidación.

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de destoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras.

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

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasa o de jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxiflavonas.

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistema aromático y conjugado.

Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen y/o del extracto hidrolizado.

La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscopia con compuestos estándares o con la literatura. (Lock, 1994).

2.6.1 ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES

La capacidad de los polifenóles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. 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 minerales 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. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias. (Gryglewki, *et* al., 1987).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C.

- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

La capacidad antioxidante de los flavonoides depende, entre otros factores, de su capacidad de eliminar el hierro, y de hecho se ha comprobado recientemente en células U937 tratadas con el agente tóxico terbutilhidroperóxido que aun a muy bajas concentraciones son capaces de evitar la rotura y la oxidación del ADN y que una parte importante de su potente acción protectora está relacionada directamente con su lipofilicidad. (Sestili, *et* al., 2002).

2.6.2 ESTRUCTURA DE FLAVONOIDE.

Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (Figura 05) y están arreglados bajo un sistema C_6-C_3- C_6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en casi de existir es llamado anillo C.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glucósidos; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezclas es más frecuente el estudio de estos compuestos bajo la forma de agliconas para lo cual los extractos deben hidrolizarse previamente. (Lock, 1997).

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central (Figura 06). De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc. (Martínez, 2005).

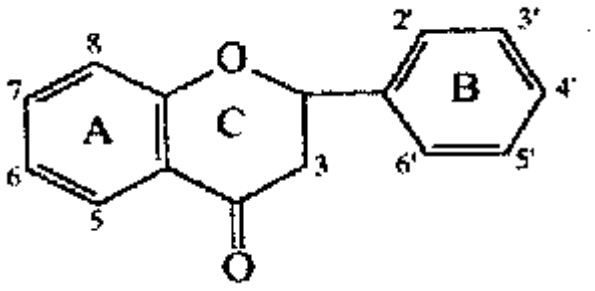
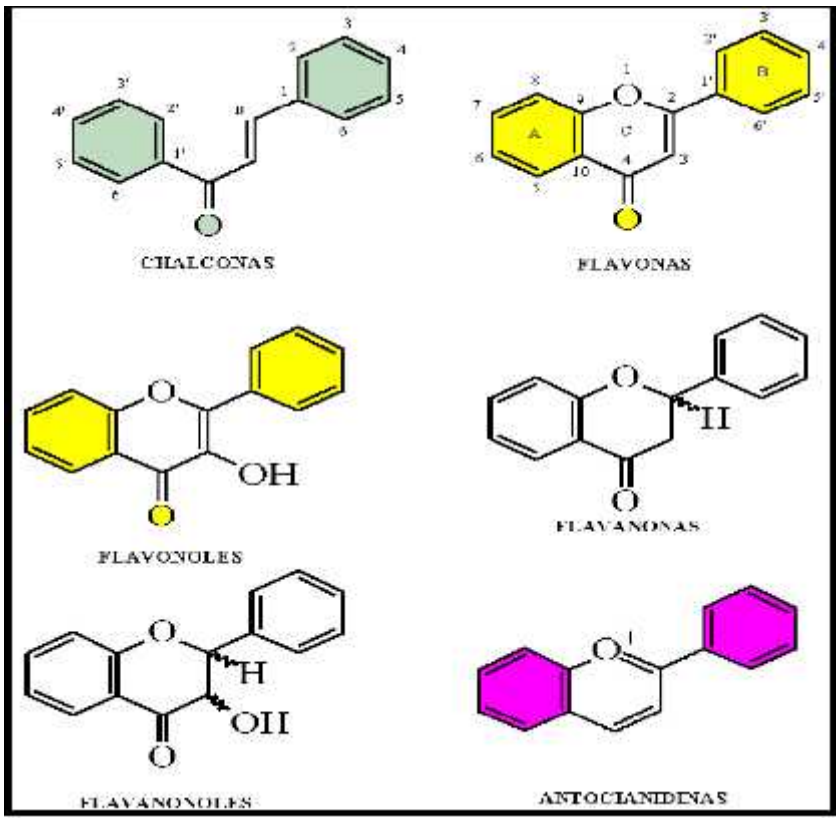


FIGURA 05. Núcleo básico de un flavonoide (Martínez, 2005)



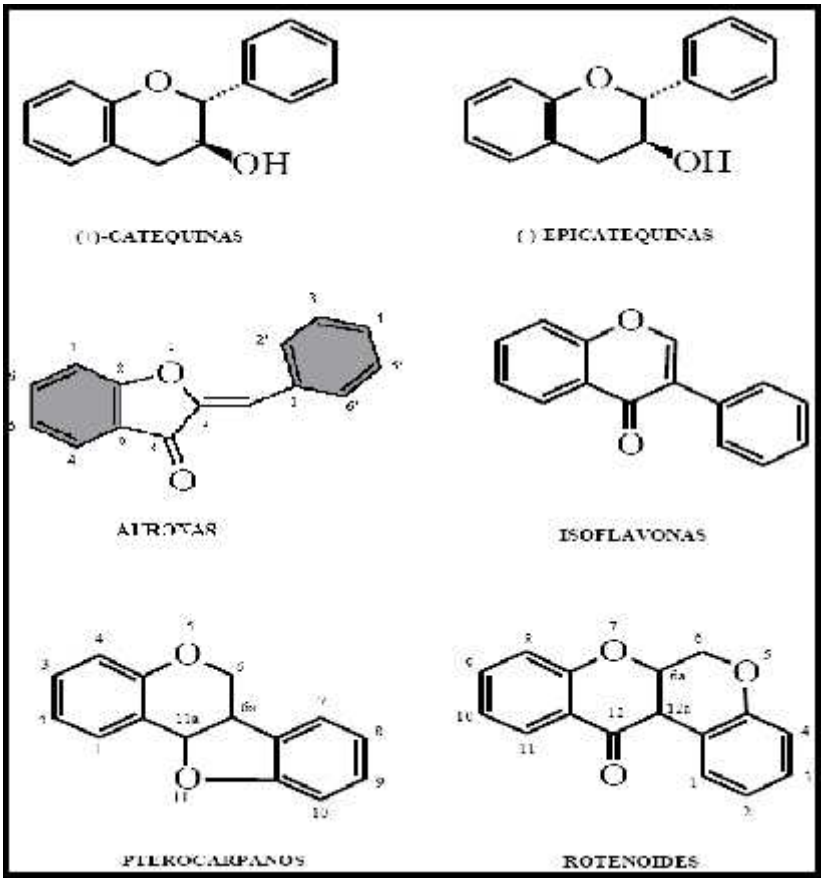


FIGURA 06. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides (Martínez, 2005).

2.6.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Los solventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol para glucósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como el éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden de lipofílico; ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua, aunque en este último caso se presenta la desventaja de su alto punto de ebullición y presión de vapor que dificultan luego el ser removido rápida y completamente de extracto. (Lock, 1997).

2.7 DETERMINACION DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas (del griego *anthos* = flor; *kyanos* = azul oscuro) son flavonoides (tipo flavanos) comúnmente encontrado en la naturaleza, más tarde se descubrió que no solo el color azul, sino también el púrpura, violeta y magenta, y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de plantas, se deben a pigmentos químicamente similares a los antocianinas.

Antocianidinas + azúcares = antocianinas

Las antocianinas está basadas químicamente en una única estructura aromática, la cianidina para la aglicona, y todas ellas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por metilación o por glicosidación. Son intensamente coloreadas y solubles en agua.

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria; pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, con cambios en el procesamiento y almacenaje de la materia prima con pérdidas de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados.

Son sensibles a las variaciones de pH, a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilo de color rojo, a pH 8 es color violeta y a pH 11 es de color azul. Las antocianinas juegan un rol importante en la producción de vinos, siendo la “enocianina” responsable del color que se utilizan para intensificar el color de los vinos y en colorantes de alimentos como jugos, jamones y licores.

Su función en las plantas el ser atractores de insectos y pájaros para los procesos de polinización y diseminación de semillas, son antioxidantes, fotoprotectores (reduce la fotoinhibición), mecanismo de defensa (antifeed), cumple una función ecológica (fenómeno de la simbiosis).

Durante el proceso de alimentos, los productos son puestos en condiciones drásticas (alta temperatura, cambios de pH, presencia de luz) y las antocianinas son destruidas. Las altas temperaturas incrementan la presencia de azúcares, pH, ácido ascórbico y otros aditivos, afectando grandemente el factor de destrucción y las antocianinas se degradan en forma exponencial, formándose las chalconas y productos incoloros y después degradados a colores marrones.

Se conoce también degradación por enzimas y ataque no enzimáticos, polimerización. La presencia de otros compuestos puede contribuir a la estabilidad de las antocianinas.

La actividad biológica está asociado como un potente antioxidante, previene la oxidación del ácido ascórbico con la captura de los radicales libres; tiene actividad inhibitoria de las enzimas oxidativas de esa manera reduce el riesgo de cáncer y enfermedades del corazón.

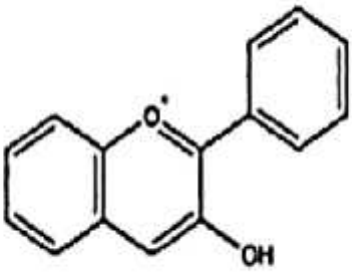


FIGURA 07. Estructura molecular de las antocianinas.

2.7.1 ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD

Las antocianinas están consideradas en el grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C_6-C_3-C_6 y el mismo origen biosintético, pero absorben fuertemente en la región visible del espectro.

Hay 6 antocianinas comunes, siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo-naranja se deben a la pelargonina, mientras que los colores violeta y azul a la delfinidina.

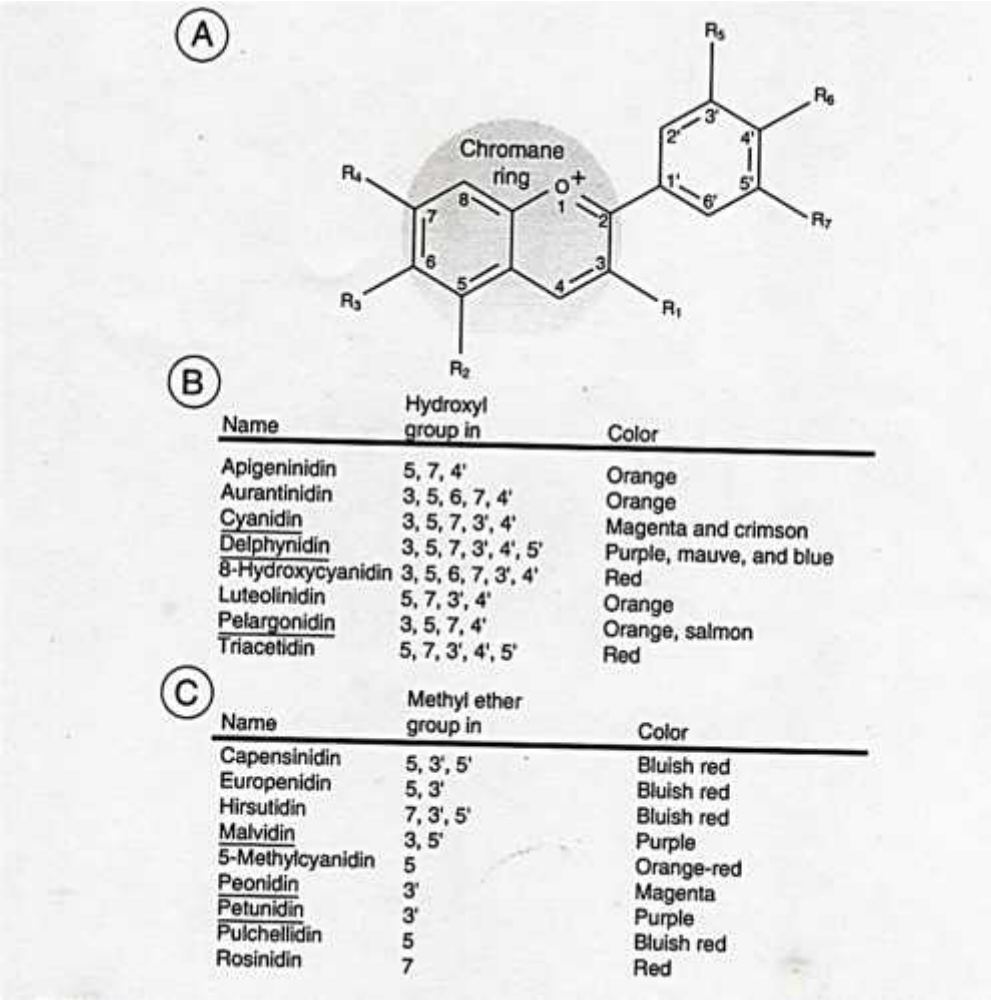
Los azúcares presentes comúnmente está la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa y como disacáridos a la rutinosa, sambubiosa, soforosa, gentiobiosa y latirosa.

Las antocianinas aciladas están siendo descritas con mayor frecuencia en los últimos años, como sustituyentes alifáticos, aromáticos y azúcares; siendo los principales grupos acilantes los ácidos fenólicos como *p*-cumárico, cafeíco, ferúlico o sinápico y algunas veces los ácidos acéticos, malónico y *p*-hidroxibenzoico preferentemente en el azúcar del C-3.

2.7.2 LOS ESTUDIOS HAN DEMOSTRADO QUE:

- Las antocianidinas son menos estables que las antocianinas, y menos solubles en agua, por lo que se asume que la glicosidación confiere estabilidad y solubilidad al pigmento.
- A mayor grado de hidroxilación, decrece generalmente la estabilidad de la antocianina, mientras que un incremento en el grado de metoxilación o del grado de glicosilación, tienen el efecto opuesto (los diglicósidos son más estables que los monoglicósidos a la decoloración durante el almacenamiento, al tratamiento del color y la exposición de la luz.
- La naturaleza del resto azúcar influye en la estabilidad.
- La presencia de por lo menos dos grupos acilo estabiliza a la antocianina probablemente por la presencia del sistema aromático en el grupo acilo.
- En presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina 3-glicosidadas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para la antocianidinas-3,5-diglicosadas lo es a pH 4.0-5.0.
- Las antocianinas son generalmente inestables cuando se exponen a la luz UV o a la luz visible.
- La presencia de ácido ascórbico produce decoloración de la antocianina, probablemente por la indirecta oxidación por el peróxido de hidrogeno que se forma durante la oxidación aeróbica del ácido ascórbico.

- Las concentraciones altas de azúcar (> 20%) o de jarabe para preservar las frutas o jugo de frutas, tiende a ejercer un efecto protector sobre la antocianina.
- La co-pigmentación intermolecular de las antocianinas, esto es, la formación de complejos con proteínas, taninos, y otros flavonoides como quercetina y rutina, aumentan la estabilidad y el color de las antocianidinas.



Name	Hydroxyl group in	Color
Apigeninidin	5, 7, 4'	Orange
Aurantinidin	3, 5, 6, 7, 4'	Orange
Cyanidin	3, 5, 7, 3', 4'	Magenta and crimson
Delphynidin	3, 5, 7, 3', 4', 5'	Purple, mauve, and blue
8-Hydroxycyanidin	3, 5, 6, 7, 3', 4'	Red
Luteolinidin	5, 7, 3', 4'	Orange
Pelargonidin	3, 5, 7, 4'	Orange, salmon
Triacetidin	5, 7, 3', 4', 5'	Red

Name	Methyl ether group in	Color
Capensinidin	5, 3', 5'	Bluish red
Europenidin	5, 3'	Bluish red
Hirsutidin	7, 3', 5'	Bluish red
Malvidin	3, 5'	Purple
5-Methylcyanidin	5	Orange-red
Peonidin	3'	Magenta
Petunidin	3'	Purple
Pulchellidin	5	Bluish red
Rosinidin	7	Red

FIGURA 08. Estructura básica pigmentos de la antocinidina. (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002)

2.7.3 EXTRACCION Y AISLAMIENTO

El método usual es por maceración con una solución de HCl al 1% en metanol (etanol para alimentos), la solución obtenida se concentra al vacío a una temperatura menor a 30 °C y luego se cromatografía en papel (whatman 3), usando diferentes sistemas de elución.

Además de la metodología usual de extracción, es conveniente considerar lo siguiente:

- La extracción puede realizarse también en frio con solventes no acidificados, como metanol 60%, n-butanol, etilenglicol, propilenglicol, acetona, mezcla de acetona/metanol/agua, o simplemente con agua a ebullición; en todos estos casos la antocianina puede extraerse en la forma original presente en la planta.
- Como medio ácido puede utilizarse además de HCl, ácidos orgánicos débiles como el ácido fórmico y ácido tartárico.
- El uso de etanol conteniendo 200 a 2000 ppm de SO_2 incrementa el rendimiento de extracción, resultando un extracto que posee hasta dos veces el poder tintóreo en comparación al uso de etanol solamente.

2.7.4 IDENTIFICACION

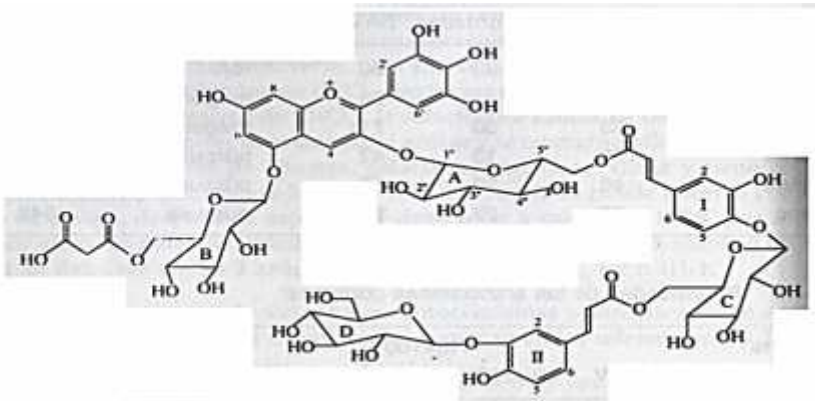
Se identifican por valores de Rf y sus propiedades de absorción en la región visible. Las antocianinas simples en solución ácida (0.1% HCl en MeOH) tienen dos máximos de absorción principales, una en la región visible entre 465 y 550 nm y otra más pequeño en el UV, alrededor de los 275 nm.

Las antocianinas aciladas exhiben una absorción débil adicional entre 310 y 335 nm, rango en que puede determinarse el tipo de acilación aromática involucrada.

La glucosilación de antocianidina en la posición C-3 generalmente resulta en un desplazamiento del λ_{max}, mientras que la sustitución en el C-5 produce un hombro en la curva de absorción a 440 nm.

La adición de solución alcohólica al 5% de tricloruro de aluminio produce un desplazamiento batocrómico del máximo en el visible de 15 a 35 nm, cuando hay O-hidroxilo libre.

La utilización de las técnicas IR y RMN no es muy usual, salvo la necesidad de determinar nuevas estructuras; como es el caso de las antocianinas aciladas últimamente reportadas.



delfinidin 3-0- (6-0- trans-4-0- (6-0- (trans-3-0- (ß-D-glucopiranosil) -cafeil) -ß-D-glucopiranosil) cafeil) -ß-D-glucopiranosido) -5-0- ((6-0-malonil) -ß-D-glucopiranosido)[10], $C_{60}H_{66}O_{36}$

conformado por delfinidina (1) + glucosa (4) + ácido cafeico (2) + ácido malónico (1)

λ_{max} (0,1% HCl-MeOH) 546, 320, 282 nm

RMN-^{1}H (CF_3CO_2D:DMSO-d_6 1:9, 400 MHz), δppm

H-4	8,77 (s)
H-6	6,98 (s.a.)
H-8	7,09 (s.a.)
H-2'	7,75 (s)
H-6'	7,75 (s)

* Se está señalando los valores de RMN-^{1}H solamente de las antocianidinas; el lector pod encontrar en las referencias bibliográficas los valores correspondientes a los azúcares otros grupos sustituyentes.

FIGURA 09. Valores espectroscópicos para algunas antocianinas asiladas. (Lock, 1997)

2.7.5 DISTRIBUCIÓN

Las antocianinas se encuentran principalmente en los frutos y flores de las angiospermas y generalmente como mezcla de ellas

Las mayores fuentes alimenticias pertenecen a la familia de Vitaceae (uva) y Rosaceae (fresa, cereza, manzana, pera, etc.), Oleaceae (olivo negro), Cruciferaceae (calabaza roja, repollo morado), Solanaceae (tomacillo, papas, camotes), etc.

La distribución de las antocianinas en las partes comestible de las plantas se resume como sigue:

- Las antocianinas basadas cianidina ocurren más frecuentemente.
- El porcentaje de ocurrencia de las anoticianinas es aproximadamente de 50% con cianidina, de 12%, para cada una, con pelargonidina, peonidina y definidita, y de 7%, cada una con petunidina y malvidina.
- Como glicósidos, los 3-glicosidos tienen una ocurrencia 2,5 veces mayor que los 3,5-diglicósidos, siendo el más común el cianidin-3-glucósido.
- Algunas antocianinas notablemente aciladas, 3,5- y 3,7-diglicósidadas, son particularmente estables en ciertas flores azules sin necesidad de copigmentación con metales complejos. (Jackman y Smith, 1992).

2.8 DETERMINACIÓN DE TANINOS

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

vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente.

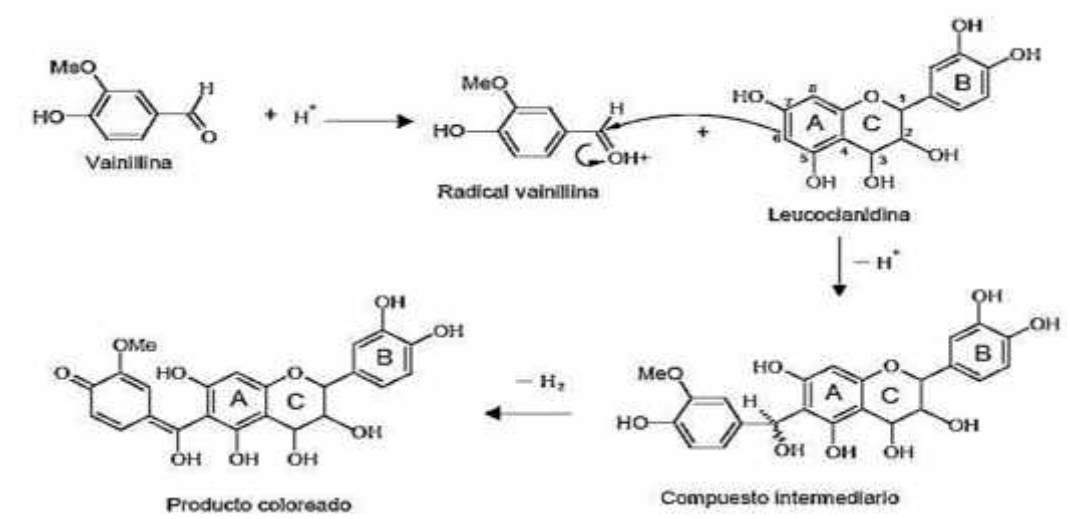


FIGURA N° 10: Mecanismo de reacción de vainillina con taninos, Shahidi y Naczk (1995).

El ensayo de la vainillina en metanol es más sensible para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 µg con precisión y exactitud mayores a 1 µg cuando la concentración óptima de reactantes y disolventes son elegidos (Shahidi y Naczk, 1995).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza (Figura 10). La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es

excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles (Shahidi y Naczk, 1995).

2.8.1 CATEQUINAS

Las catequinas son bioflavonoides, teniendo como estructura básica un núcleo de flavón unido mediante un enlace β-glucosídico a un azúcar. Son moléculas que poseen un alto poder antioxidante, logrando proteger a nuestras células de los radicales libres y el estrés oxidativo. Las catequinas, entre otros flavonoides, son generadas por las plantas en su formación, como protección contra factores ambientales dañinos, como por ejemplo los insectos, los hongos, la radiación, la luz ultravioleta e incluso

predadores herbívoros. Algunos de estos factores de protección están constituidos por auténticas fitotoxinas, mientras que otros son antioxidantes que en recientes investigaciones han demostrado que son 100 veces más efectivas que la vitamina C y 25 veces más potentes que la vitamina E (en cuanto a su poder antioxidante) (Montana, 2012)

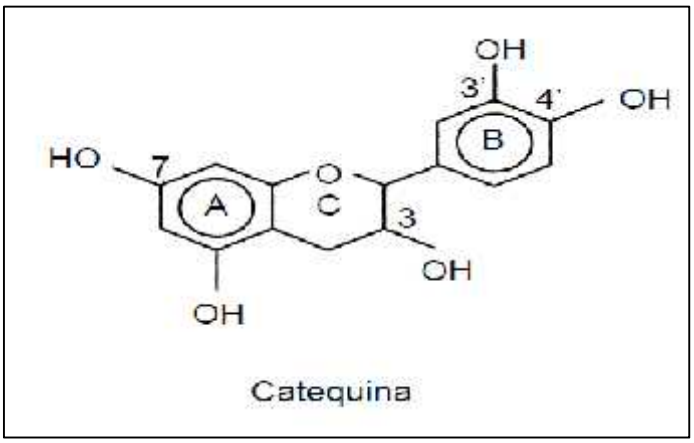


FIGURA Nº 11: catequina. (Martínez-Flores *et al.* 2002)

2.8.2 PROANTOCIANIDOLES

Son taninos condensados cuya nomenclatura esta inicialmente basada en el nombre del antocianidol que se forma cuando el polímero se trata en caliente con un ácido (procianidol, prodelfinidol, propelargonidol), El elemento estructural básico de estos polímeros es un flavan-3-ol: catecol y epicol. (Bruneton, 2001).

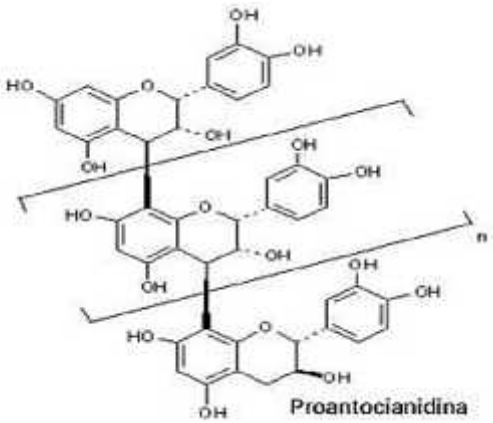


FIGURA Nº 12: proantocianidinas. **(**Bruneton, 2001).

2.8.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TANINOS

Numerosos taninos, sobre todo los taninos hidrolizables, inhiben la peroxidación lipídica inducida por ADP y ácido ascórbico sobre mitocondrias hepáticas de rata *in vitro,* son (sobre todo los esteres HHDP de la glucosa) captadores de radicales libres, inhibidores de la formación del ion superóxido y algunos de ellos, inhibidores de la lipoxigenasa – pero no de la ciclooxigenasa- de los granulocitos peritoneales de rata. Algunos de ellos poseen un efecto inhibidor de la autoxidación del linoleato de metilo. *In vivo*, la geraniína disminuye la concentración sérica de lípidos peroxidados en ratas.

Recordemos que los flavonoides y proantocianidoles antioxidantes del zumo de uva y el vino son considerados por muchos autores, los principales responsables del efecto preventivo sobre enfermedades cardiovasculares que podría conducir un consumo moderado del vino tinto. (Bruneton, 2001)

2.8.4 MECANISMO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN TANINOS. LA ACTIVIDAD DE LOS TANINOS EN PLANTAS SE DEMOSTRÓ COMO SIGUE:

1. La supresión de la oxidación del ácido ascórbico por bloqueo Ca o por su actividad de eliminación de radicales, por ejemplo, Geraniin.
2. Inhibición de la peroxidación de lípidos inducida por ADP y ácido ascórbico o por ADP y NADPH, e. G, pedunculagina, Isotech en, el análogo monomérico catequina. (-) epigalocatequina galato y Geraniin.
3. Los eliminadores de radicales libres que tienen una acción inhibidora significativo en tetracloruro de carbono y galactosamina citotoxicidad hepática, por ejemplo, compuestos fenólicos regaliz.

2.9 ENSAYO DEL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO) (Berset *el al.*, 1994)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH● para aceptar un átomo de hidrógeno

(H●) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 8, el

color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH● ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la 16 literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha et al., 2012).

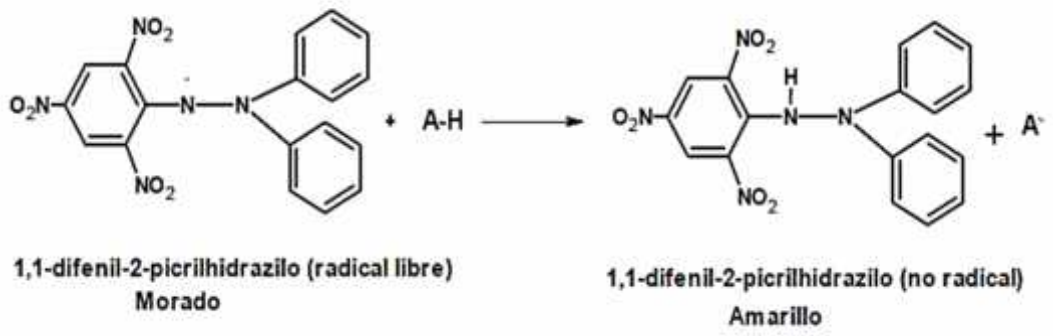


FIGURA Nº 13: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el Antioxidante (Alam *et al*., 2012).

2.9.1 LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DPPH● SE HAN PRESENTADO DE DIFERENTES MANERAS

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial

de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH● usado (Deng *et al*., 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH: es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC50 que van en un rango de 1.15 min (Ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).

- La reacción cinética entre el DPPH: y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC_{50}.

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

2.10 ESPECTROFOTOMETRIA

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

$$\lambda v = c$$

Donde λ es la longitud de onda (cm), v es la frecuencia y c es la velocidad de luz (3 x 10^{10} cm/s). Las unidades de la longitud de onda son generalmente nanómetros, pero también pueden utilizarse Angstroms, milimicras o centímetros.

Muestra los intervalos de longitudes de onda para las diversas categorías de radiaciones electromagnéticas.

1 Å = 10^{-10} m

1 nm = 10^{-9} m

1 µm = 10^{-6} m

1 cm = 10^{-2} m

TABLA Nº 02. Clasificación de la radiación Electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas. (Miller, 2003).

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

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

2.10.1 PARÁMETROS DE MEDICIÓN

2.10.1.1 LA TRANSMITANCIA (T)

Es la relación entre la intensidad de radiación transmitido por una muestra (I) y la intensidad de radiación que incide sobre la muestra (I0), medidos ambos en la misma posición del espectro y con la misma rendija, T = I / I0 Se supone que el haz es de radiación paralela y que incide sobre las superficies planas y paralelas de la muestra, formando ángulos rectos. (Manfred, 1999)

2.10.1.2 LA ABSORBANCIA (A)

Es el logaritmo en base diez del recíproco de la transmitancia (T), en el que el disolvente puro es el material de referencia; esto es, A = log10 1/T = - log10 T. Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorbancia o emisión de energía EMR a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlaces, rotaciones moleculares y transición de electrones entre orbitales de átomos y moléculas.

La espectrofotometría de absorción de infrarrojos es adecuada para análisis orgánicos, pues los enlaces en alquenos, ésteres, alcoholes y otros grupos funcionales tienen fuerzas muy diferentes y absorben la radiación de infrarrojos en una gran variedad de frecuencias o energías. Esta absorción se refleja en el espectrógrafo en forma de picos. No se deben tomar medidas de absorbancias muy bajas o muy altas puesto que disminuye la exactitud del método. La absorbancia es adimensional y generalmente se presenta con mínimo tres decimales, algunos instrumentos permiten obtenerla con cuatro decimales. (Manfred, 1999)

2.10.1.3 LONGITUD DE ONDA

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

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

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

2.10.1.4 ÍNDICE DE ABSORBANCIA

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

$$\eta i = c/vi$$

2.10.1.5 CURVA ESPECTRAL

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

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

Los espectrofotómetros deben permitir efectuar la comparación entre la señal obtenida por una mezcla que no contiene el analito y otra que si lo tiene para poder tener la señal de esa diferencia. Así el registro de la variación del coeficiente de absortividad molar, de la absorbancia A, o de la transmitancia T, en función de la longitud de onda origina el "espectro" o curva espectral de una sustancia química que indica las características de absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda. Generalmente la curva espectral se presenta como “Absorbancia vs longitud de onda” y el espectro se denomina espectro de absorción, o en función de la transmitancia, denominándose espectro de transmisión. (Manfred, 1999)

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS.

3 MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, en la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto.

MADERA Y HOJAS DEL *Brosimum rubescens* (palisangre)

La madera del *Brosimum rubescens*, fueron obtenidos en los diferentes puntos de ventas artesanales de la ciudad de Iquitos. Las hojas fueron recolectadas del Arboretum “El Huayo” ubicada en el caserio puerto Almendra S 03°49'53.5" y W 073°22'26.6", de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNAP, distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región Loreto. Después de ser adquiridos la madera y hojas, fueron seleccionados, lavados en agua potable e hipoclorito de sodio, enjuagados con agua tratada, posteriormente la madera y hojas fueron transferidas al laboratorio para ser procesados y analizados.

3.1 EQUIPOS

Los equipos utilizados en el trabajo de investigación se muestran en la Tabla N° 03

TABLA N° 03: Equipos y Materiales usados en la tesis.

N°	EQUIPOS/MATERIALES	MARCA	MODELO	PROCEDENCIA
01	BALANZA ANALITICA Max= 320 g	SARTORIUS	CP324S	ALEMANIA
02	ESPECTOFOTÓMETRO UV- VISIBLE	THERMO SPECTRONIC	GENESYS 6	USA
03	VORTEX	MCR	VM - 1000	-
04	CAMPANA EXTRACTORA	C4	CEX 180	COLOMBIA
05	MICROPIPETAS 10 - 100 µl	11120618	DragonLab	EEUU
06	CELDAS DE CUARZO UV-VISIBLE	-	-	-
07	ROTAVAPOR	BÜCHI	R - 205	ALEMANA
08	ESTUFA DE AIRE CALIENTE	HOT AIR OVEN	DSO-500D	TAIWAN
09	REFRIGERADOR	-	-	-
10	BALANZA DE PLATILLOS CAP. 1 KG	-		-
11	PROBETAS 10 ML	-	-	-
12	PROBETAS 100 ML	-	-	-
13	PROBETAS 250 ML	-	-	-
14	PIPETA VOLUMETRICAS 1 ML	-	-	-
15	EMBUDOS	-	-	-
16	BURETA 25 ML	-	-	-
17	BURETA 50 ML	-	-	-
18	MATRAZ ERLENMEYER	-	-	-
19	MORTERO Y PILON	-	-	-
20	FIOLAS 10 ML COLOR AMBAR	-	-	-
21	MATRAZ AFORADO 50 ML	-	-	-
22	CRISOLES	-	-	-
23	PIPETA GRADUADA 50 ML	-	-	-

3.2 REACTIVOS

Los reactivos utilizados se muestran en la Tabla N° 04.

TABLA N° 04: Reactivos usados en la tesis

N°	REACTIVO	% PUREZA	MARCA
01	HIDRÓXIDO DE SODIO A.C.S.	97	SPECTRUM
02	NITRATIO DE ALUMINIO	-	SPECTRUM
03	ÁCIDO FORMICO	95-97	MERCK
04	FOLIN CIOCALTEU	-	MERCK
05	ACIDO GALICO	99.9	MERCK
06	VAINILLINA	99	SIGMA ®
07	CARBONATO DE SODIO ANHIDRO A.C.S.	99.87	QUIMICA MEYER ®
08	ETANOL AR	99.7 – 100	LOBACHEMIE
09	METANOL ABSOLUTO	≥ 99.7	MERCK
10	ACIDO FORMICO	98-100	MERCK
11	ACIDO CLORHIDRICO	37	SIGMA ®
12	CLORURO DE POTASIO	99.5	SIGMA ®
13	ACETATO DE SODIO	99.5	MERCK
14	ACETATO DE POTASIO	99	LOBACHEMIE
15	DPPH	93	MERCK

3.3 TIPO Y DISEÑO MUESTRAL

Para el análisis de estudio el método a emplearse es descriptivo experimental, se utilizó un diseño por conveniencia tanto para la madera como para la hoja:

F1 = Tipo de extracción.

A = Etanol.

F2 = Metabolito secundario.

1 = Fenoles totales.

2 = Antocianinas.

3 = Flavonoides.

4 = Taninos

Por lo tanto se tendrá lo siguiente:

4 x 1 = 4 **tratamientos**

4 x 3 = 12 **experimentos** por cada muestra (madera y hoja)

3.4 DISEÑO MUESTRAL

TIPO DE EXTRACCION	METABOLITO SECUNDARIO			
	fenoles totales	**Antocianinas**	**Flavonoides**	**Catequinas y proantocianidoles**
ETANOL	1	2	3	4

3.5 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.5.1 POBLACIÓN

Todos las especies de *Brosimun rubescens (*palisangre) que se encuentran en la Provincia de Maynas.

3.5.2 MUESTRA

El desecho de la madera del *Brosimun rubescens* (palisangre) fue obtenido en los diferentes puestos artesanales de la ciudad de Iquitos y las hojas recolectadas y seleccionadas de una especie que se encuentra en el Haboretum “El Huayo”.

3.6 PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

La Figura 14, muestra el flujograma para la obtención de los extractos y posterior análisis:

Materia prima. La materia prima fue comprada en el mercado artesanal de Iquitos, que fue de 3150 g de madera residual y hoja 930 g que fue reducida en una carpintería obteniéndose 3075 g en forma de viruta, posteriormente molida y 402 g (hoja) de *Brosimum rubescens (*palisangre), fueron seleccionados y eliminando aquellas que no tenían las condiciones para el análisis. Las hojas eliminadas fueron aquellas que contenían hongos, secos y de color marrón.

Pesado. Se realizó el pesado de la madera seca (200g) y hoja seca pulverizada (100g) para obtener datos exactos de rendimiento.

Maceración. A la viruta y la hoja pulverizada se le adiciono etanol absoluto (99.7º) con 1% ácido fórmico hasta enrazar en un recipiente de vidrio, dejando macerar por 4 días protegido de luz, para evitar la descomposición de los antioxidantes presentes por acción radical de los electrones libres presentes en la luz.

Concentración. El disolvente fue removido a 60ºC, -700 mbar de presión reducida en un rotavapor a 60 rpm, se completó la eliminación del disolvente residual secado a temperatura ambiente y exenta de luz.

Molido. El extracto seco fue molido en un mortero con pilón obteniéndose 14g (madera) y 4g (hoja) en forma de polvo, que fue envasado en bolsas de aluminio trilaminado para evitar el contacto con la luz.

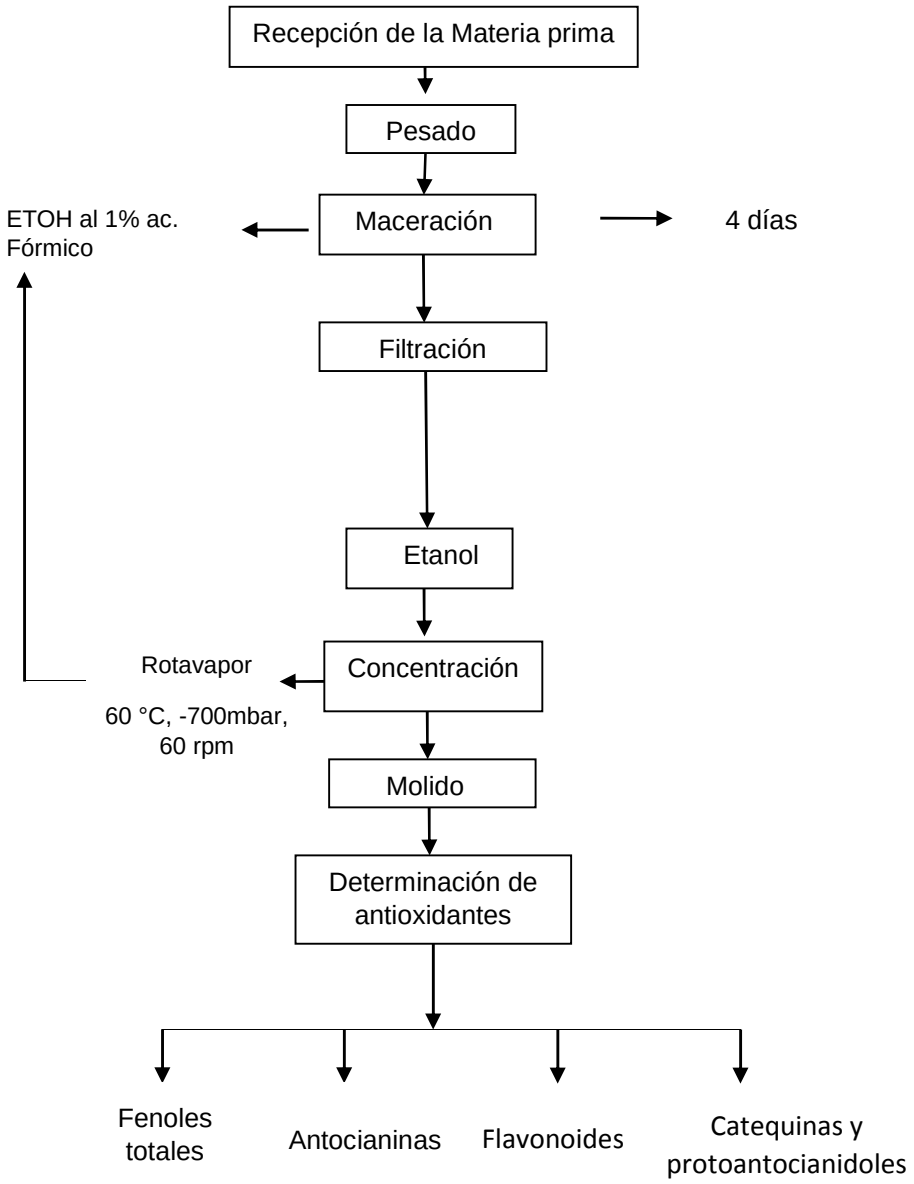


FIGURA N° 14: Obtención del extractos de la madera y hojas de *Brosimum rubescens* (palisangre).

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

3.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

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

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

Prepa*ración de la solución de DPPH*: Se preparó la solución stock de 1mMol de DPPH en metanol al 95%, a partir de la esta se preparó la solución de trabajo de 0.1 mMoles de DPPH (también usado como blanco). Se agregó a una cubeta de poliestireno de 1 ml 0.025 µl de cada una de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y se agregó 0.975 µl de 0.1 mMol de DPPH. Posteriormente fueron realizadas las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda (λ) de 517 nm, leídas a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos y realizadas por triplicado.

La inhibición del secuestro del radical DPPH por soluciones crecientes de los extractos, fue determinada por la expresión siguiente.

$$\textbf{inhibición de DPPH}, \% = [(\mathbf{Ac} - \mathbf{Am})/\mathbf{Ac}]\ \mathbf{x}\ \mathbf{100}$$

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

3.8 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

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

3.9 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

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

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

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

3.10 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, POR EL MÉTODO pH-DIFERENCIAL

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

3.10.1. PROCEDIMIENTO

Se prepararon dos diluciones de las muestras, una con el Buffer de cloruro de potasio pH 1 y otra con el Buffer de acetato de sodio pH 4.5, llevándolas a un volumen de 3 ml, se esperó 15 minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de λ = 400 a 700 nm, esperando una absorbancia de la muestra entre 0.1 y 1.2 y utilizando como blanco agua destilada.

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

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

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

Antocianina monomérica (mg/ 100 g) = (A * PM * FD * 100) / (ε * L)

Donde:

A = absorbancia

PM = Peso molecular, 449.2 g/mol

FD = Factor de dilución

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

L = Longitud de la celda.

3.11 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

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

Flavonoides totales (mg/ 100 g) = (Abs * FD * 100) / (ε * W)

Abs = absorbancia

FD = Factor de dilución

ε = coeficiente de extinción molar

W = Peso de la muestra

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

3.12 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

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

3.13 DETERMINACIÓN TANINOS

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

3.14 ANALISIS DE LOS DATOS

Los espectrogramas y los datos obtenidos de los UV-Vis, fueron interpretados de acuerdo a la teoría de la actividad antioxidante, fenoles totales, antocianinas, flavonoides, taninos (catequinas y proantocianidoles); los datos numéricos fueron procesados en la hoja de cálculo Excel 2010.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

La Figura 14, muestra el flujograma para la obtención del extracto etanólico de madera y hoja de *Brosimum rubescens (*palisangre).

4.1 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES Y TANINOS DE LA MADERA DE LA ESPECIE *Brosimum rubescens* (palisangre)

4.1.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH

Se acondicionó el espectrofotómetro UV-Vis para determinar la actividad antioxidante por el ensayo $DPPH^{+}$, el rango de longitudes de onda varía entre los 515 y 540 nm (Murillo *et al.,* 2007); para la determinación se a midió a 517 nm donde presenta su máxima absorción. La solución de $DPPH^{\bullet}$ se preparaba minutos antes de realizar el análisis ya que tiende a degradarse rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Molyneux, 2004), La reducción del DPPH se muestra en la siguiente reacción: (Brand-Williams *et al*, 1995, Brand-Williams y Berset, 1997)

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH - H + A\bullet$$

$$DPPH^{\bullet} + R\bullet \rightarrow \mathrm{DPPH} - \mathrm{R}$$

4.1.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTES DE LA MADERA DE *Brosimum rubescens (*Palisangre).

En la Tabla N° 05 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de la madera del *Brosimum rubscens* (palisangre) y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexos Nº 01, 02 y 03), en la Tabla N° 06 se encuentra el porcentaje de inhibición

con las debidas concentraciones donde la actividad antioxidante superior al 25% se encuentra en concentraciones de 0.25 mg/ml.

TABLA N° 05. Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a la madera *Brosimum rubscens* (palisangre).

Número de Lecturas	Promedio Solución DPPH(1mM) A°	Extracto etanólico *Brosimum rubescens* (Palisangre) (muestra-seca)					
		Concentraciones					
		5 mg/ml A°	0.5 mg/ml A°	0.25 mg/ml A°	0.1 mg/ml A°	0.05 mg/ml A°	0.01mg/ml A°
1	0.161	0.114	0.071	0.169	0.129	0.157	0.186
2	0.161	0.121	0.062	0.152	0.124	0.158	0.186
3	0.160	0.078	0.046	0.114	0.126	0.157	0.186
4	0.160	0.096	0.044	0.123	0.126	0.157	0.187
5	0.160	0.108	0.038	0.108	0.124	0.156	0.186
6	0.160	0.107	0.033	0.106	0.123	0.156	0.186
7	0.160	0.108	0.029	0.099	0.122	0.155	0.186
8	0.160	0.108	0.025	0.095	0.121	0.155	0.186
9	0.160	0.108	0.022	0.091	0.120	0.155	0.186
10	0.160	0.107	0.019	0.088	0.120	0.154	0.186
Promedio	0.160	0.105	0.039	0.115	0.124	0.156	0.186
orcentaje de Inhibición, %		**34.23**	**75.69**	**28.56**	**22.89**	**2.66**	**-16.18**

TABLA N° 06. Porcentaje de inhibición de la madera del *Brosimum rubscens* (palisangre).

MUESTRA madera del *Brosimum rubescens* (palisangre)						
CONCENTRACIONES [mg / ml]	5	0.5	0.25	0.1	0.05	0.01
PROMEDIO DE ABSORCION (Aº)	0.105	0.039	0.115	0.124	0.156	0.186
% DE INHIBICIÓN	34.23	75.69	28.56	22.89	2.66	-16.18

En la Figura N° 15, se puede observar el comportamiento de la actividad antioxidante de la madera en ella se puede determinar que la concentración inhibitoria mínima de 25% de actividad antioxidante es aproximadamente a 0.22 mg/ml y la máxima concentración es a 0.5 mg con un porcentaje de actividad de 75.69%, sin embargo al aumentar la concentración del extracto la actividad sufre un descenso considerable. La elevada actividad antioxidante se debe a la alta presencia de taninos, quinonas, en cantidad media de flavonoides, alcaloides, triterpenos, cumarinas fijas y lactonas; y en pequeña cantidad de cumarinas volátiles como se muestra en la Tabla N° 01. (Arzubialdes, 2009)

Los efectos de la concentración de los antioxidantes sobre la razón de autoxidación dependen de muchos factores, incluye la estructura del antioxidante, condiciones de oxidación, y la naturaleza de la muestra a ser oxidada (Shahidi y Naczk, 2004). A veces los antioxidantes fenólicos pierden su actividad a mayores concentraciones y comportarse como prooxidantes (Gorden, 1990), esto puede ser el caso del extracto etanólico de la madera del *Brosimum rubescens (*palisangre), ya que sufre un descenso considerable en la actividad antioxidante a mayor concentración.

Según Tovar (2013), determinó la actividad antioxidante de la parte aérea de 30 plantas que pertenecen a 8 familias en Colombia, en ella considera como extracto activo a aquel que muestra un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25%; valor que se usó como referencia considerando que equivale a la mitad de la actividad antioxidante presentada por la hidroquinona, ya que utilizó a este como control positivo, similar al trabajos nuestro.

Rosales-Castro *et al.* (2006), reporta la capacidad de captura del radical ABTS fue de 49.48% a 57.44%, similares al que presentó el estándar catequina (57.92%) de las cortezas de *Pinus cooperi, P. engelmannii, P. leoiophylla y P. teocote.* Así mismo, Vargas y Encinas (2003) determinaron la actividad atrapadora de radicales libres (AARL) de la corteza de *Pinus caribaea* var. hondurensis Mor. de los extractos más polares como éter diétilico, acetona, metanol, etanol y agua tienen mayor AARL. Los flavonoides, fenilpropanoides y taninos, han sido reportados como

precursores de múltiples actividades biológicas entre las que se cuenta su acción antioxidante (Rice-Evans *et al.,* 1996; Pietta, 2000; Gorinstein *et al.,* 2004; Soobrattee *et al.,* 2005; Dasgupta y De, 2007).

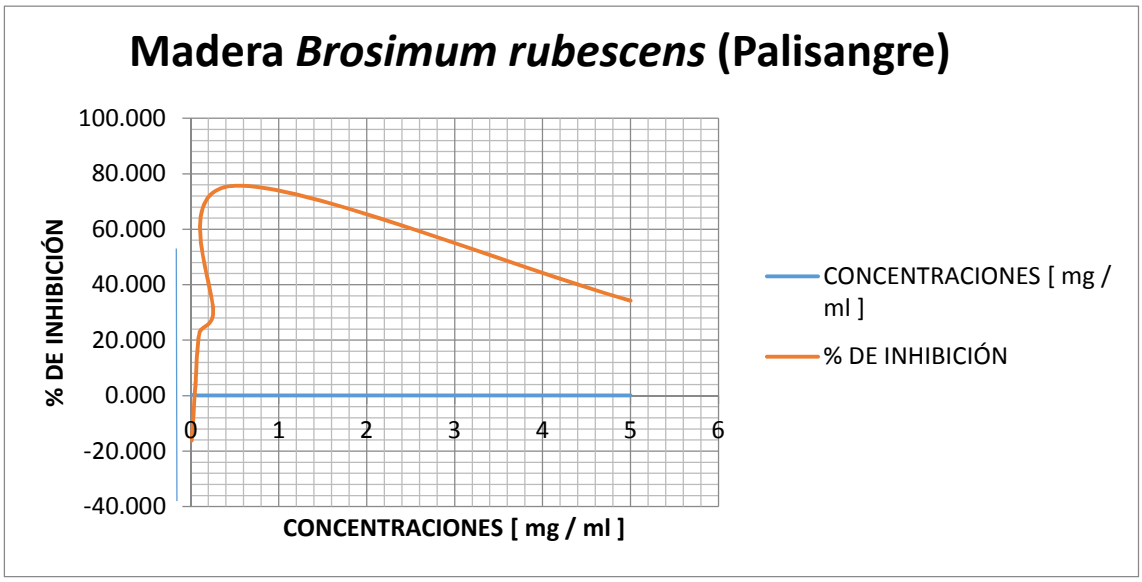


FIGURA N° 15 Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de la madera del *Brosimum rubscens* (palisangre).

4.1.3 EVALUACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LA MADERA DE *Brosimun rubescens (*Palisangre*)*

Los fenoles totales de la madera y de la hoja fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva patrón del ácido gálico obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura Nº 16, donde la concentración del ácido gálico que va a concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/ml (y= 10.315x + 0.0221; R^2 = 0.9967) y la absorbancia respectiva medida a una λ = 765 nm.

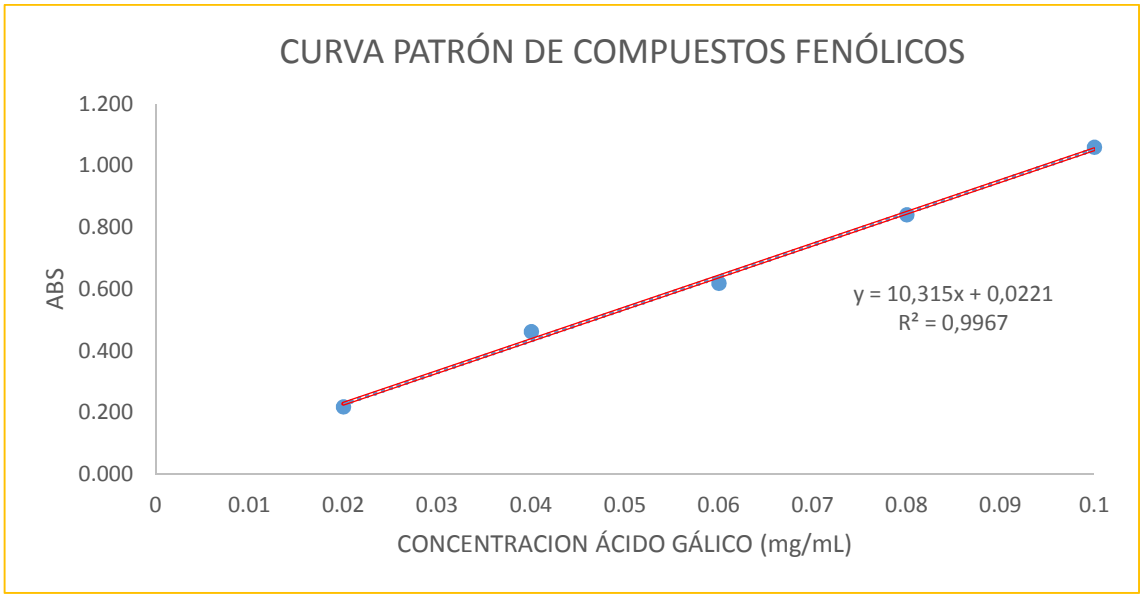


FIGURA Nº 16. Curva padrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales.

TABLA Nº 07. Contenido de fenoles totales de la madera de *Brosimun rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	Masa Alìcuota de extrato	Masa Alìcuota de extracto	Volumen enrazado 1	alìcuota (ml)	Volumen enrazado 2	fator de diluciòn	Alícota en el tubo	lectura en el Espectofotòmetro	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentraciòn FT	Media FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)		(mL)	Abs.765 nm	mgEAG/mL	mgEAG	mgEAG/mg Alicuota extrato seco	mgEAG/100 g muestra original	mgEAG/100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c	d	e	f=e/d	g	h	i= @	j = i* c	k= j / a	j = h/a		
palisangre 1	extrato 1	R1	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.178	0.015	0.151	1.511	105.797		
		R2	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.178	0.015	0.151	1.511	105.797	106.024	0.392
		R3	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.179	0.015	0.152	1.521	106.476		
palisangre 2	extracto 1	R1	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.131	0.011	0.106	1.056	73.902		
		R2	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.131	0.011	0.106	1.056	73.902	74.128	0.392
		R3	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.132	0.011	0.107	1.065	74.581		

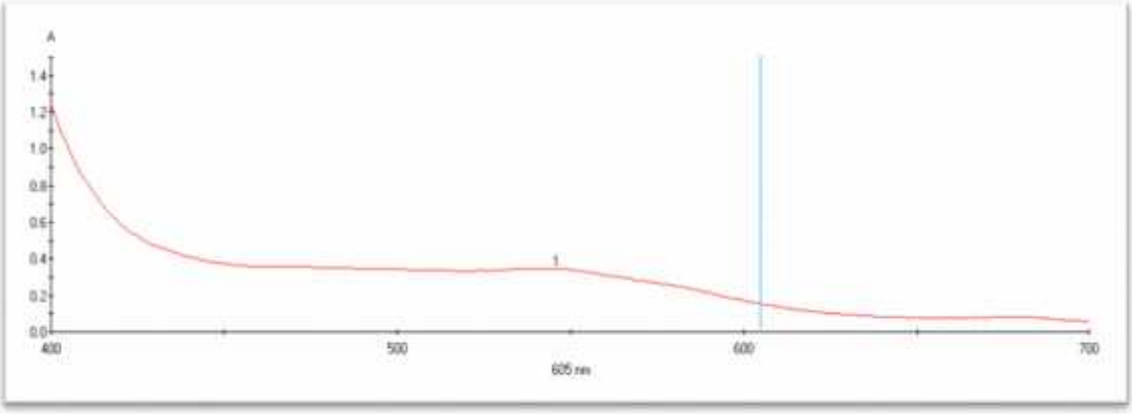
En la Tabla Nº 07 se muestra la forma de calcular y el contenido de fenoles totales en la madera en ella se puede observar el valor 106,024 ± 0,392 mg EAG/100 g muestra original, siendo un promedio de las mediciones (ver anexo Nº 07), no existen trabajos anteriores para esta especie, sin embargo, se encontraron presencia de fenoles totales de 491 a 604 mg/g

en cortezas de *Pinus cooperi, P. engelmannii, P. leoiophylla y P. teocote*. (Rosales-Castro *et a*l., 2009).

4.1.4 EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LA MADERA DE *Brosimum rubescens (*palisangre*)*

En las Figuras Nº 17 y Nº 18, se muestra el espectro de absorción a pH 4.5 y pH 1.0 del extracto etanólico de la madera de palisangre hecho por un barrido de absorción a λ de 400 a 700 nm, en ella se puede observar absorciones en forma de hombro entre λ de 530 a 560 nm y de 490 a 510 nm respectivamente, indicativos claro de presencia de antocianinas.

FIGURA Nº 17. Absorción del extracto etanólico de la madera de *Brosimum rubescen (*palisangre) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.



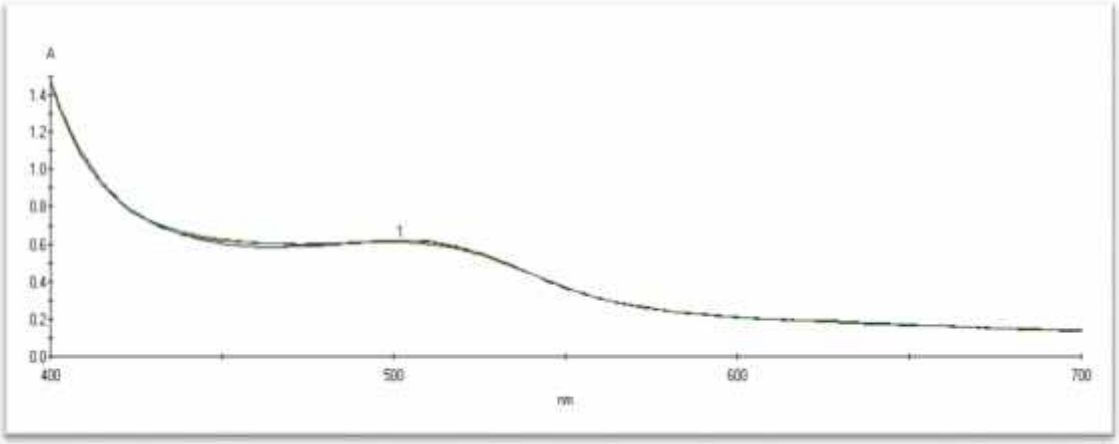


FIGURA Nº 18. Absorción del extracto etanólico de la madera de *Brosimum rubescens* (palisangre de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

En la Tabla Nº 08, se muestra las absorbancias de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm que aparecen en la Figura 18 por triplicado (Ver cuadro Nº 09 del anexo) de la madera del *Brosimum rubescens (*palisangre) a pH 1 y pH 4.5 y valores fijos a 700 nm a los pHs, la cantidad promedio obtenido de antocianinas aplicando la formula descrita en la metodología fue de 34.367 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original.

TABLA Nº 08. Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en la madera del palisangre.

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	ABS = λ Vis-máx pH 1	ABS = λ Vis-máx nm pH 4.5	ABS = 700 nm pH 1	ABS = 700 nm pH 4.5	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentraciòn de Antocianinas	Media Antocianinas	SD
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol		L/cm*mol	cm	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	
palisangre 1	extrato 1	R1	0.4740	0.4390	0.0400	0.0470	0.0420	449.2	3.0	26,900.0	1.0	14.7284		
		R2	0.4730	0.4300	0.0400	0.0530	0.0560	449.2	3.0	26,900.0	1.0	19.6379	19.9886	5.4440
		R3	0.4740	0.4370	0.0400	0.0760	0.0730	449.2	3.0	26,900.0	1.0	25.5994		
palisangre 2	extrato 1	R4	0.6110	0.4560	0.1470	0.0810	0.0890	449.2	3.0	26,900.0	1.0	31.2102		
		R5	0.6220	0.4710	0.1420	0.0770	0.0860	449.2	3.0	26,900.0	1.0	30.1582	34.3663	6.3992
		R6	0.6180	0.4380	0.1340	0.0730	0.1190	449.2	3.0	26,900.0	1.0	41.7305		
palisangre 3	extrato 1	R7	0.5690	0.4380	0.0730	0.0460	0.1040	449.2	3.0	26,900.0	1.0	36.4704		
		R8	0.5710	0.4380	0.0730	0.0520	0.1120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	39.2758	51.1988	23.1234
		R9	0.5660	0.3460	0.0730	0.0750	0.2220	449.2	3.0	26,900.0	1.0	77.8502		

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

4.1.5 EVALUACION DE FLAVONOIDES DE LA MADERA DE *Brosimum rubescens* (Palisangre*)*

Los flavonoides presentes en la madera de la especie *Brosimum rubescens* fue determinado por absorción a λ=374 nm y se consignan los datos en la Tabla Nº 09, obteniendo 24.48 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original.

TABLA Nº 09. Determinación de flavonoides de la madera del *Brosimum rubscens* (palisangre).

Tipo de la muestra	Código	repeticiòn	ABSORBANCIA	PM	FD	ε	L	Concentraciòn de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
			374 nm	g/mol		L/cm*mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
palisangre 1	extrato 2	R1	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
		R2	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50	24.48	0.02
		R3	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
palisangre 2	extrato 1	R4	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
		R5	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50	24.48	0.02
		R6	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
palisangre 3	extrato 1	R7	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
		R8	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50	24.48	0.02
		R9	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		

Según investigaciones del Departamento de Fisiología de la Universidad de León y del Hospital de León, la contribución de los flavonoides al potencial antioxidante de la dieta humana es importante. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima en unos 23 miligramos al día, teniendo en cuenta que el consumo medio de sustancias antioxidantes tan valoradas como la vitamina C es de entre 70-100 miligramos al día y el de la vitamina E, de entre 7-10 miligramos diarios, se puede considerar como relevante la contribución de los flavonoides como antioxidantes a la dieta. (Eroski, 2014). Se desconoce trabajos anteriores similares para esta especie, sin embargo, otros trabajos efectuados en cortezas de *Pinus cooperi, P. engelmannii, P. leoiophylla y P. teocote*, encontraron entre 259 mg/g a 385 m/g de antocianinas. (Rosales-Castro *et a*l., 2009).

Los flavonoides ejercen su efecto antioxidante por neutralización de todo tipo de radicales por oxidación incluyendo peróxidos y radicales hidroxilos por quelación. La potente actividad antioxidante de flavonoides, su habilidad para capturar radicales hidroxilos puede ser la función más

importante de los flavonoides y ser la verdadera razón de la acción en el cuerpo. (Merfot *et al*., 1996)

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

4.1.6 EVALUACION DE TANINOS DE *Brosimum rubescens* (palisangre)

Las catequinas y proantocianidoles también conocidos como taninos condensados, fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva estándar de taninos obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura Nº 19, donde las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml (y= 0.01063x + 0.00961; R^2 = 0.9964) y la absorbancia respectiva medida a una λ = 500 nm, esta curva fue empleada para la determinación de taninos en la madera y las hojas.

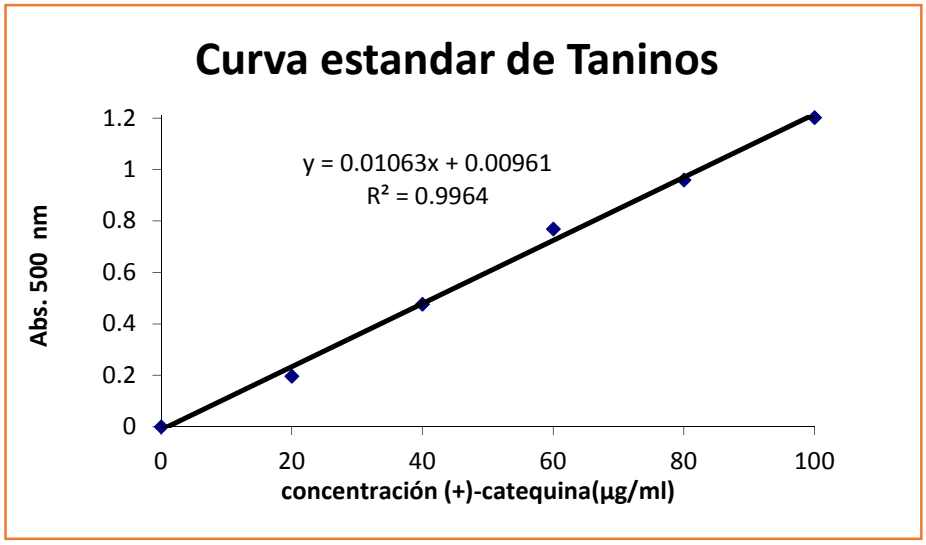


FIGURA Nº 19. Curva estándar de taninos para cálculo de Taninos.

La determinación de la presencia de taninos se muestra en el tabla Nº 10 con un valor de 160 mg (+)-catequina/100g de muestra original, confirmando la abundante presencia detectado en el abordaje fitoquímico de los taninos son compuesto muy común en este tipo de especies en forma de árboles. Se encontró taninos en *P. leiophylla* (283 mg/g) y *P. cooperi* (186 mg/g) (Rosales-Castro *et a*l., 2009).

Comparando las cantidades de taninos (160 mgEAG/100 g de muestra original) y de flavonoides (24.48g quercitina/100g muestra original) podemos afirmar la presencia mayoritaria en la corteza de flavonoides del tipo flavonoles, flavanonas, etc., o chalconas y auronas tal como lo reporta Arzubialdes y Alva (2009) y en menor cantidad de compuestos tipo flavan-3-oles (taninos condensados).

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

TABLA Nº 10. Contenido de Catequinas y proantocianidoles de la madera de *Brosimun rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	Massa Alìcuota de extrato seco	Massa Alìcuota de extrato seco	Volumen enrazadoo 1	Alícota en el tubo	lectura en el espectofoto metro	concentraciòn taninos	concentraciò n taninos	concentraciò n taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	Media concentraciò n taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(mL)	Abs.765 nm	µg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alicuota extrato seco	mg (+)-catequina/ 100 g Amostra original	mg (+)-catequina/ 100 g Amostra original	
			a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g* c	i= h / b	j = h/a		
palisangre 1	extrato 1	R1	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276		
		R2	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276	160.276	-
		R3	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276		

4.2 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES Y TANINOS DE LA HOJA DE LA ESPECIE *Brosimum rubescens* (palisangre)

4.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA HOJA CON EL MÉTODO DEL DPPH

En la tabla N° 11 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de las hojas del palisangre y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexos Nº 04, 05 y 06), en la tabla N° 12 se encuentra el porcentaje de inhibición con las debidas concentraciones donde la actividad antioxidante superior al 25%, donde a una concentración de 0.5 mg/ml tiene una inhibición de 45.03%.

TABLA Nº 11. Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a las hojas del ***Brosimum rubescens*** (palisangre).

Número de Lecturas	Promedio Solución DPPH(1mM) A°	Extracto etanólico de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) (muestra-seca)					
		Concentraciones					
		5 mg/ml A°	0.5 mg/ml A°	0.25 mg/ml A°	0.1 mg/ml A°	0.05 mg/ml A°	0.01 mg/ml A°
1	0.161	0.013	0.123	0.241	0.268	0.311	0.263
2	0.161	0.002	0.117	0.224	0.258	0.311	0.266
3	0.160	-0.003	0.101	0.219	0.257	0.310	0.262
4	0.160	-0.005	0.100	0.210	0.256	0.310	0.262
5	0.160	-0.006	0.089	0.205	0.253	0.309	0.262
6	0.160	-0.005	0.082	0.200	0.251	0.309	0.261
7	0.160	-0.005	0.077	0.197	0.250	0.309	0.260
8	0.160	-0.005	0.070	0.195	0.249	0.308	0.260
9	0.160	-0.005	0.064	0.193	0.248	0.308	0.259
10	0.160	-0.005	0.059	0.190	0.247	0.308	0.259
Promedio	0.160	-0.002	0.088	0.208	0.254	0.309	0.262
Porcentaje de Inhibición, %		101.44	45.03	-29.49	-58.34	-93.03	-63.17

TABLA Nº 12. Porcentaje de inhibición de las hojas del ***Brosimum rubescens*** (palisangre).

Muestra de la hoja *Brosimum rubescens* (palisangre).						
CONCENTRACIONES [mg / ml]	5	0.5	0.25	0.1	0.05	0.01
PROMEDIO DE ABSORCION (Aº)	-0.002	0.088	0.208	0.254	0.309	0.262
% DE INHIBICIÓN	101.44	45.03	-29.49	-58.34	-93.03	-63.17

En la Figura N° 20, se puede observar el comportamiento de la actividad antioxidante de las hojas en ella se puede determinar que la concentración inhibitoria mínima de 25% de actividad antioxidante es aproximadamente a 0.2 mg/ml y que la actividad inhibitoria a medida que aumenta la concentración del extracto.

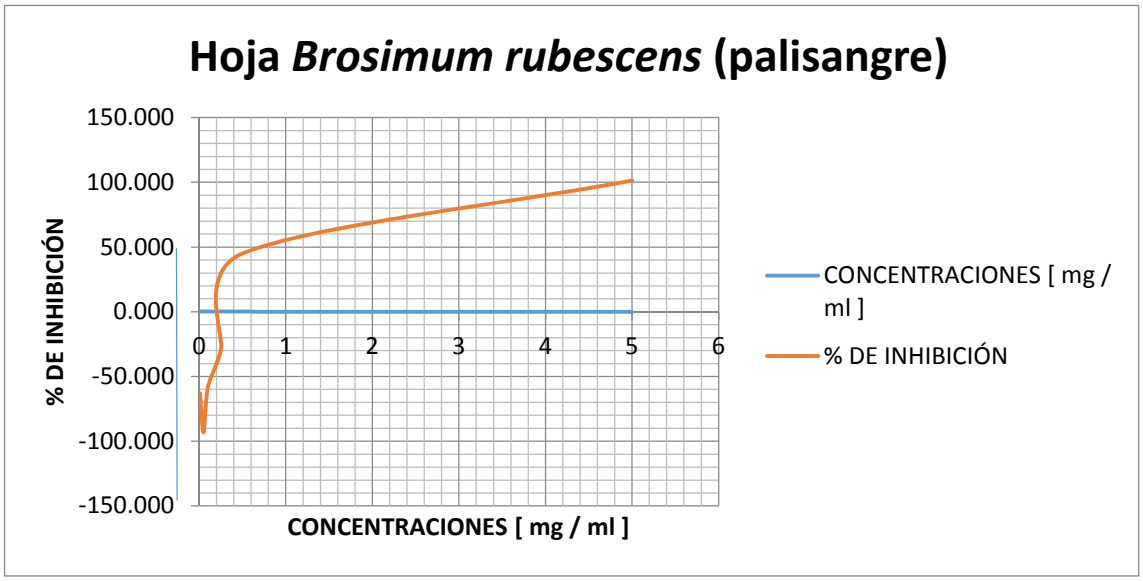


FIGURA N° 20. Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de las hojas del *Brosimum rubescens* (palisangre).

4.2.2 EVALUACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LA HOJA DE *Brosimun rubescens (*Palisangre*)*

En La tabla Nº 13 se muestra la forma del cálculo de la presencia del contenido de fenoles totales en la hoja con un valor 190,168 ± 0,0 mg EAG/100 g muestra original obtenido del valor promedio de las mediciones, no existen trabajos anteriores para esta especie.

TABLA Nº 13 Contenido de fenoles totales de la hoja de *Brosimun rubescens* (palisangre).

Tipo de la muestra	Código	repetição	Masa Alìcuota de extracto seco	Masa Alìcuota de extracto	Volumen enrazado 1	fator de diluciòn	Alícota no tubo	lectura en el espectofotòmetro	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentración FT	Media FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(mL)	Abs.765 nm	mgEAG/mL	mgEAG	mgEAG/mg Alìcuota extracto seco	mgEAG/100 g muestra original	mgEAG/100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c	f=e/d	g	h	i= @	j = i* c	k= j / a	j = h/a		
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168	190.168	0.000
		R2	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168		
		R3	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168		

4.2.3 EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LA HOJA DE *Brosimum rubescens (*palisangre*)*

En las Figuras Nº 21 y Nº 22, se muestra el espectro de absorción a pH 4.5 y pH 1.0 del extracto etanólico de la hoja de palisangre hecho por un barrido de 400 a 700 nm, en ella se puede observar pequeños picos pero siguiendo una forma decreciente de la absorción.

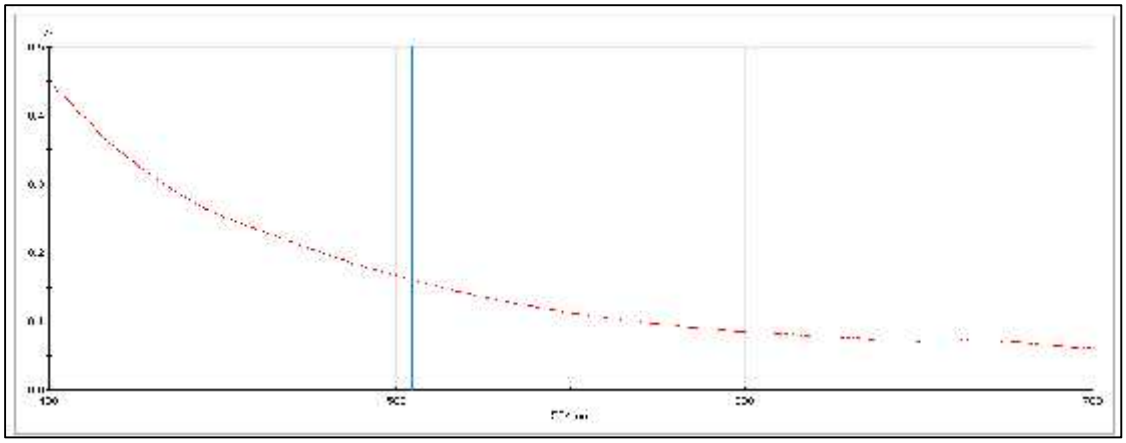


FIGURA Nº 21. Absorción del extracto etanólico de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.

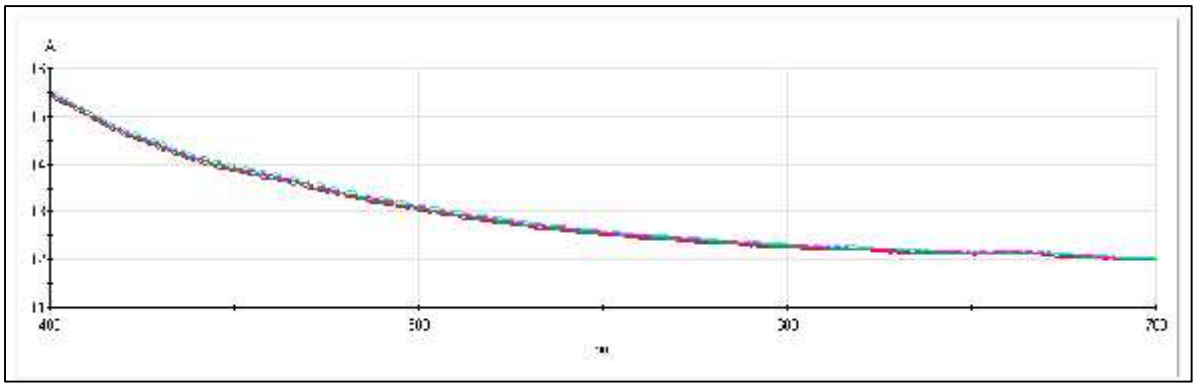


FIGURA Nº 22. Absorción del extracto etanólico de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

En la tabla Nº 14 , se observan las absorbancias por triplicado de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm (Ver anexo Nº 14) de la hoja del palisangre a pH 1 y pH 4.5 y valores fijos a 700 nm a los pHs, el promedio obtenido de antocianinas aplicando la formula descrita en la metodología fue de 0.9227 ± 0.046 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original, este valor refleja claramente la mínima cantidad de antocianinas en la hoja, corroborando el comportamiento en la figuras anteriores.

TABLA Nº 14. Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en la hoja del ***Brosimum rubescens*** **(**palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	ABS = λ Vis-máx pH 1	ABS = λ Vis-máx nm pH 4.5	ABS = 700 nm pH 1	ABS = 700 nm pH 4.5	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentraciòn de Antocianinas	Media Antocianinas	SD
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol		L/cm*mol	cm	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1690	0.1220	0.0790	0.0430	0.0110	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.8747	0.9277	0.0459
		R2	0.1690	0.1210	0.0790	0.0430	0.0120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.9542		
		R3	0.1700	0.1220	0.0790	0.0430	0.0120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.9542		

4.2.4 EVALUACION DE FLAVONOIDES DE LA HOJA DE *Brosimum rubescens* (Palisangre*)*

Los flavonoides presentes en las hojas de la especie *Brosimum rubescens* fue determinado por absorción a λ= 374 nm y calculado mediante la aplicación de la formula mostrada en la metodología, en el tabla Nº 15 consignan los datos obtenidos, en la cual obtenemos 0.6 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original (600 mg quercetina/100g muestra original).

TABLA Nº 15. Determinación de flavonoides de la madera del *Brosimum rubescens (*palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	ABSORBANCIAS 415 nm	PM	FD	ε	L	Concentraciòn de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm*mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
palisangre 1	extrato 2	R1	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06	0.06	-
		R2	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06		
		R3	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06		

4.2.5 EVALUACION DE TANINOS DE LA HOJA DE *Brosimum rubescens* (Palisangre)

La determinación de la presencia de taninos se muestra en el tabla Nº 16 con un valor de 4.24 ± 0,0 mg (+)-catequina/100g de muestra original, confirmando la poca concentración de los taninos en las hojas del palisangre.

TABLA Nº 16. Contenido de Catequinas y proantocianidoles de la hoja de *Brosimun rubescens* (palisangre)

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	Masa Alìcuota de extracto seco	Masa Alìcuota de extracto seco	Volumen Enrazado 1	Alícota en el tubo	lectura en el espectofotòmetro	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	Media concentraciòn taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(mL)	Abs.765 nm	µg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alìcuota extracto seco	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g* c	i= h / b	j = h/a		
palisangre 1	extrato 1	R1	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.031	2.012	0.002	0.060	1.059	4.236	4.236	0.000
		R2	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.031	2.012	0.002	0.060	1.059	4.236		
		R3	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.031	2.012	0.002	0.060	1.059	4.236		

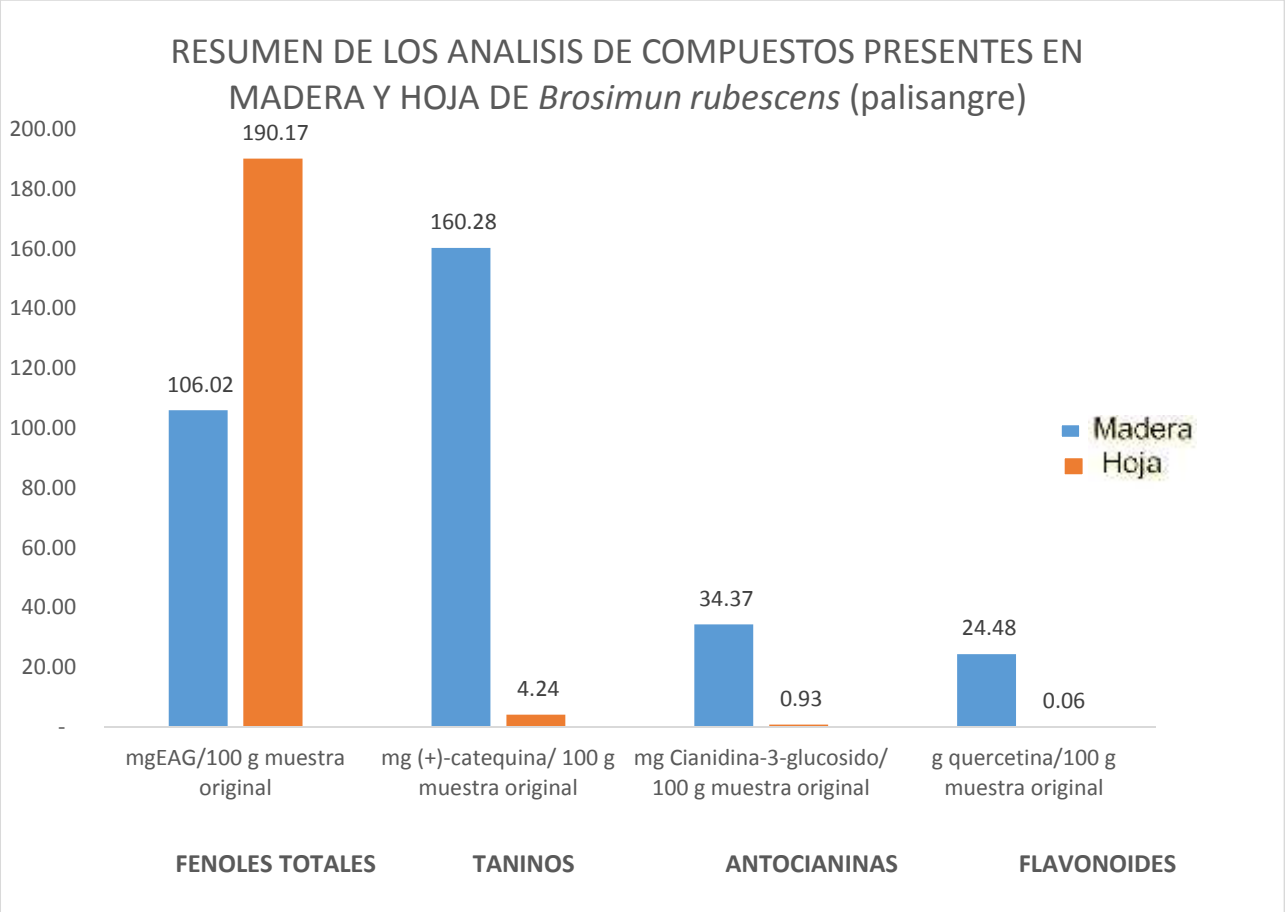
4.3 COMPARACION ENTRE LA MADERA Y HOJA DEL PALISANGRE

En la tabla Nº 17 y Figura Nº 23, se compara la Actividad Antioxidante (AA) y la presencia de compuestos de fenoles totales, taninos, antocianinas y flavonoides de la madera y la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre), si la concentración mínima para la AA es de 22 mg de extracto/ml y 20 mg de extracto/ml, los responsables de dicha actividad no son los mismos compuestos, ya que en la madera es compartida por fenoles totales, taninos y antocianinas, es básicamente responsable los flavonoides, en cambio en las hojas la presencia de los fenoles totales serían los responsables de la AA.

TABLA Nº 17. Comparación de la actividad antioxidante y/o compuestos presentes.

MUESTRA *Brosimum rubescens*	AA AL 25 % (mg/mL)	concentraciòn FT		concentraciòn taninos		Concentraciòn de Antocianinas		Concentraciòn de Flavonoides	
		mgEAG/100 g muestra original	±	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	±	mg Cianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	±	g quercetina/100 g muestra original	±
Corteza	0.22	106.02	0.39	160.28	-	34.37	6.40	24.48	0.02
Hojas	0.2	190.17	0.00	4.24	0.00	0.93	0.05	0.06	-

FIGURA Nº 23. Cuadro comparativo de compuestos fenólicos presentes en la madera y hojas de *Brosimum rubescens* (Palisangre).



La presencia de las cumarinas mayoritarias presentes en la madera como 7-hidroxicumarina, 7-demetilsuberosina y la xantiletina, además de 7,8-dihidroxicumarina, brosiparina, brosiprenina y luvangetina, Braz-Filho *et al*., (1972), podrían formar parte de la AA ya que estructuralmente tienen un fenol en su estructura. No hay reportes de aislamiento de compuestos de las hojas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES

La madera y las hojas del *Brosimum rubescens* (palisangre), muestran altos niveles de Actividad Antioxidante, en la madera se encuentra mayormente compuestos de fenoles totales (106,024 ± 0,392 mg EAG/100 g muestra original), antocianinas (34.367 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original), flavonoides (24.48 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original) y taninos (160 mg (+)-catequina/100g de muestra original).

En las hojas del *Brosimum rubescens (*palisangre) solo se encontraron en cantidades representativos los fenoles totales (190,168 ± 0,0 mg EAG/100 g muestra original) y en concentraciones pequeñas los taninos (4.24 ± 0,0 mg (+)-catequina/100g de muestra original) y en cantidades no representativas las antocianinas (0.9227 ± 0.046 mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original) y flavonoides (0.6 ± 0.02 g quercetina/100g muestra original).

Los responsables de la Actividad Antioxidante de la madera en orden decreciente serían los flavonoides, taninos, fenoles totales y antocianinas; en el caso de las hojas el responsable sería los fenoles totales.

A mayor concentración de extracto etanólico de la madera, decrece la actividad antioxidante y podría tener un comportamiento de prooxidante, sin embargo, ese comportamiento no se da en las hojas del *Brosimum rubescens* palisangre.

El uso en pequeñas cantidades del extracto etanólico en polvo podría ser usado como nutraceútico o alimento funcional ya que muestra un alto poder antioxidante, beneficioso para la salud humana.

6. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (IC_{50}), para determinar la cantidad a ser usado para su consumo directo de los extractos de la madera y la hoja.

Debido a la variedad de especies utilizadas en la etnomedicina por el poblador amazónico se debe continuar con las investigaciones en otras especies de plantas.

Diseñar presentaciones para su consumo del extracto de palisangre considerando la cantidad mínima inhibitoria en forma de saches en polvo, bebidas gasificadas, bebidas alcohólicas, etc.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

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

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

ANAYA, A. L.; RUBALCAVA, M.M.; ORTEGA, R.C.; SANTANA, C.G.; MONTERRUBIO, P.N.S.; BAUTISTA, B.E.H.; RACHEL, M.R. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. Phytochemistry, 66 (4): 487-494

ARZUBIALDES G.K. 2009. Obtención y caracterización de colorantes naturales a partir de la especie brosimum *rubescens* taubert (palisangre). Trabajo Final de Carrera. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Industrias Alimentarias.

AUW, J.M., BLANCO, V., O'KEEFE, S.F., AND SIMS, C.A. 1996. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. *Am. J. Enol Vitic.,*47:279–286.

BALENTINE, D.A., WISEMAN, S.A., AND BOUWENS, L.C.M. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 37:693–704.

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

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

BRACK, A. 1999. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Cusco- Perú. 556 p.

BRACK. E. A. 1995. El Oro Verde del Perú - Plantas nativas y Desarrollo 246p.

BRAKO L, ZARUCCHI J. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and *Gymnosperms* of Perú. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 45.

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

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

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

BRAZ FILHO R, FARIAS MAGALHÃES A, GOTTLIEB O.R.1972. Coumarins from *Brosimum rubescens*. Phytochemistry Vol.11. p 3307-3310.

BRUNENTON, J. 2001. Farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales. 2ª Ed. Zaragoza-España. Editorial; Acribia S.A.. 1099 p.

BUTLER, L.G. 1992. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins, in *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties and Significance,* Hemigway, R.W. and Laks, P.E., Eds., Plenum Press, New York, 693–698.

CICCO N., LANORTE M.T., PARAGGIO M., VIGGIANO M., LATTANZIO V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal; 91: 107–110.

COPPEN, P.P. 1983. El uso de antioxidantes, en rancidez en los Alimentos, Allen, JC y Hamilton, RJ, Eds., Applied Science Publishing Company, Londres, 67-87

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

DALLAS, C. AND LAURENO, O. 1994A. Effects of SO2 on the extraction of individual anthcyanins and colored matters of three Portuguese grape varieties during wine making, *Vitis,* 33:41–47.

DALLAS, C. AND LAURENO, O. 1994B. Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of young Portuguese red table wine. *J. Sci. Food Agric.,*65:477–485.

DASGUPTA, N., DE, B. 2007. Antioxidants Activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry.* 101: pp. 471-474.

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

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

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

DIAWARA, M.M.; TRUMBLE, J. T. Linear Furanocoumarins. In: D'MELLO, J. P. (Ed). Handbook of Plant Fungal Toxicants. New York; CRC Press, 1997. Cap.12, p.175-189

DZIEZAK, J. D. 1986. Preservatives: Antioxidants. Food Technology, *40*, 94–102.

ENCARNACIÓN. 1983. Dermatofitos. Actualidades en Micología Médica (2ª ed.). México, Facultad de Medicina UNAM, 2004: 109-142.

EROSKI CONSUMER [sede web]*. © Fundación EROSKI, Todos los derechos reservados [acceso el 22 de Diciembre de 2014] Flavonoides en los alimentos, por Elena Piñeiro: 2 de septiembre de 2008; disponible en: http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2008/09/02/179692 .php

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

FACHIN-ESPINAR M., LOPEZ-DEL AGUILA J. P., ARZUBIALDES K., GUTIERREZ W., ALVA ALENGUER. 2012. Actividad Antifúngica del extracto Etanólico de *Brosimum rubescens* (palisangre). Cienc. Amaz. Vol. 2.Nº2. pp.100-107.

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

FOLIN, C; CIOCALTEAU, V. 1927. Tirosine and Typtophan determination in proteins. J. Biol. Chem. 73, 627-650.

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

GARCIA-VIGUERA, C., BAKKER, S., BELLWORTHY, S.J., READER, H.P., WATKINS, S.J., AND BRIDLE, P. 1997. The effect of some processing variables on noncoloured phenolic compounds in port wines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch A.*, 205:321–324.

GENTRY. 1988. Changes in plant communidady diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. Ann. Missouri Bot. Gard., (75): 1-34,

GLJNATILAU, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. 1994. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. Journal of Natural Products, 57, (4): 518-520.

GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.M.; GUERREIRO, G.; ROCHA W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCCI-JR, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES J.B.; PAGNOCCA F.C. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. Journal of the Brazilian Chemical Society, 16(3B): 669-672

GOMEZ-PLAZA, E., GIL-MUNOZ, R., LOPEZ-ROCA, J.M., AND MARTINEZ, A. 2000. Color and phenolic compounds of young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *J. Agric. Food hem.,* 48:736–741.

GORDEN, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. **In** B. J. F. Hudson (Ed.), Food antioxidants (pp. 1-18). Amsterdam, Netherlands: Elservier.
GORINSTEIN S., CVIKROVA M., MACHACKOVA I., HARUENKIT R., PARK Y.-S., JUNG S.-T., YAMAMOTO K., MARTINEZ A. L., KATRICH E., TRAKHTENBERG, S. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits *Food Chemistry.* 84: pp. 503-510.

GOTTLIEB R., LEAO DA SILVA M., SOARES MAIA J. 1972. Distribution of coumarins in Amazonian Brosimum species. Phytochemistry. 3479 - 3480

GRAHAM, H. 1983. Tea. **in** Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 22, Grayson, M. and Eckroth, D., Eds., John Wiley & Sons, New York, 628–44.

GRYGLEWKI RJ, KORBUT R, ROBAK J Y SWIES J. 1987. El mecanismo de la acción antitrombótica de flavonoides. Biochem Pharmacol, 36: 317-322.

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

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

HARBOWY, M. AND BALENTINE, D.A. 1997. Tea chemistry. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.,* 16:415–480.

HAYASIDA, W., DE SOUSA A., LIMA M. P., DO NASCIMIENTO C. C., FERREIRA A. G. 2008 Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. Acta Amaz., vol. 38, Nº4, pp. 749-752.

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

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

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

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

JACKMAN R. L., SMITH J.L. 1992. Anthocyanins and betalains in HENDRY G.A.F., HOUGHTON J.D. Editores. Natural Food Colorants. 1ra. Edición. New York. USA. pp. 183-241

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

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

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

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

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

LEE, C.Y. AND JAWORSKI, A.W. 1987. Phenolic compounds in white grape grown in New York. Am. J. Enol. Vitic., 38:277–281.

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

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

LOCK O. 1997. Colorantes Naturales. Primera Edición. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. pp. 137-163.

LOIZEAU, P. A; SPICHIGER, RODOLPHE. 1990. Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, p. 17-85. IIAP-PUB.033.

MAGALHÃES L.M., SANTOS F., SEGUNDO M.A., REIS S., LIMA J. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. Talanta; 83: 441–447.

MAGIATIS, P.; MELLIOU, E.; SKALTSOUNIS, A.L.; MITAKU, S.; LÉONCE, S.; RENARD, P.; PIERRÉ, A.; ATASSI, G. 1998. Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of the seselin and xanthyletin series. Journal of Natural Products, 61 (8): 982-986.

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

MARTÍNEZ A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. 76 p

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

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

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

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G; NASCIMENTO, R.J. 2008. Capacidade antioxidante de frutas. Revista Brasíleira de ciências Farmacêuticas, Sao Paulo, v 44, n 2, p. 193-201, abr./jun.

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

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

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

MONTANA. 2012. Las Catequinas. Boletín Técnico nº 2. Acceso 17.11.2015. montana.com.pe/boletines/alimentos/02/**catequinas**.html

OJHA H., MISHRA K., CHAUDHURY N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry**;** 130: 1036–1043.

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

PIETTA, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Reviews; J.Nat. Prod*. 63: pp. 1035-1042.

PINEDO, PM, RENGIFO SE, CERRUTTI ST. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana; Estudio de Uso y Cultivo. PNUD. FIDA. TCA. IIAP. Iquitos, Perú

POULIQUEN Y.B.M, A, DE SOUZA L, GILVANDETE M. P. S., ARRIAGA C.M.C, DE MATTOS M.C. 2005. Estudo da toxicidade de produtos obtidos da reação da xantiletina com hipoclorito de sódio sobre *artemia salina*. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará. Brasil.

POZZETTI, G. L., BERNADI A. C., 1971. Contribuição ao Estudo Químico do *Brosimum gaudichaudii* Trécul, Rev. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, v. 3, n. 2, p. 215-223.

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

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

REYNEL, C; PENNINGTON, T; PENNINGTON, R; FLORES, C; DAZA, A. 2003. Arboles útiles de la Amazonia Peruana y sus usos, un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Ilustraciones C. Reynel,

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAPAGANDA, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol. Med., 20, 933-956.

ROBERTSON, A. 1992. The chemistry and biochemistry of black tea production: the nonvolatiles, in Tea: Cultivation to Consumption, Wilson, K.C. and Clifford, M.N., Eds., Chapman & Hall, London, 553–601.

ROSALES-CASTRO M., GONZALES-LAREDO R.F., ROCHA-GUZMAN, N.E., GALLEGOS-INFANTE, J.A., PERALTA-CRUZ J., KARCHESY J.J. 2009. Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifénolicos de cortezas de Pinus cooperi, P. engelmannii, P. leiophylla y P. teocote. Madera y Bosques, 15(3): 87-105.

ROSALES-CASTRO M., PEREZ-LOPEZ, M.E., PONCE-RODRIGUEZ M.C. 2006. Propiedades antiradicales libres y antibacterianas de extractos de corteza de pino. Madera y Bosques. 12(1): 37-49.

SANDERSON, G.W. 1964. The chemical composition of fresh tea flush as affected by clone and climate. *Tea Q.,* 35:101–110.

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

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINOMEN, M.; FRANKEL, E.N. 1997. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Easton, v. 45, n. 9, p. 3362-3367.

SCHRECKINGER, M. L.: LOTTON, J.; LILA M. A.; GONZALES DE MEJIA, E. 2010. Berries Form America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. Journal of Medicinal Food, Larchmont, v. 13, p. 233-246.

SCHULTES R.E., RAFFAUF R.F. 1992. The healing forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia, Vol.2. Ed. Dioscorides Press. Portland Oregon.

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

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

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

SERNA S.S. 2000. Alimentos nutracéuticos futuro de nuestra alimentación. SENM (Sociedad Española de Nutracéutica Médica).

SESTILI P, DIAMANTINI G, BEDINI Y COLS. 2002. Planta derivado fenólico compuestos impiden que el ADN de una sola hebra de rotura y la citotoxicidad inducida por terc-butilo a través de una plancha-quelante mecanismo. Biochem J. 364: 121-128

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

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

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

SHAHIDI, F., & NACZK, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals (pp. 1-558). Boca Raton, FL: CRC Press.

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

SHIROTA, O.; TAKIZAWA, K.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; HAYASHI, T.; YANAGAWA, T. 1997. Antiandrogenic natural Diels-Alder-type adducts from *Brosimum rubescens***.** (Oct 1997) National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan. Journal of natural products (USA). v. 60(10) p. 997-1002.

SIKORSKI, Z.E. 1997. Propiedades químicas y funcionales de los componentes alimenticios. Technomic, Chicago, IL.

SILVA, A.C.; SILVA, M.B.C. 1991. Influência da anatomia e química nas propriedades da madeira. Edição UTAM, 17p.

SINGLETON V.L., ORTHOFER R.O., LAMUELA-RAVENTOS R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods Enzymol; 299: 152–178.

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

SOMERS, T.C. AND POCOCK, F. 1990. Evolution of red wines. III. Promotion of the maturation phase.Vitis, 29:109–121.

SOMERS, T.C. AND POCOCK, K.F. 1986. Phenolic harvest criteria for red vinification. *Aust. Grapegrower Winemaker,* 268:24; 26–7; 29–30.

SOOBRATTEE, N. A., NEERGHEEN, V. S., LUXIMAN-RAMMA, A. O., AUROMA, C. & BAHORUM, T. 2005. Phenolics as potencial antioxidants therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. 579: pp. 200-213.

SOTERO S. V. E., GARCIA DE SOTERO D. E. 2009. Manual de análisisQuímico de Alimentos, 1° Edición, Edit, CONCYTEC, Iquitos-Perú, Pág. 7-8.

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

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

TENG, C.M.; LI, H.L.; WU, T.S.; HUANG, S.C.; HUANG, T.F. 1992. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. Thrombosis Research, 66 (5): 549-557.

TOVAR J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Trabajo de Grado. Facultad de Tecnología - Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 150 p.

UKERS, W.H. 1994. Tea in the beginning, in *All about Tea,* Hyperion Press, Westport, CT, 1–22.

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

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

VÁSQUEZ R. 1997. Florula de las Reservas Biológicas de Iquitos-Perú; 1ra ed. Missouri Botanical Garden-USA.

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

VILLANO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA PADILLA, M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyfhenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta, New York, v. 71, n. 1, p. 230-235.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Easton, v. 44, n. 3, p. 701-705.

WILSON, K.C. AND CLIFFORD, M.N. 1992. Tea: Cultivation and Consumption, Chapman & Hall, London.

ZOECKLEIN, B.W., JASINSKI, Y., AND MCMAHON, H. 1997. Effect of fermentation, aging, and aging *sur Lie* on total and phenol-free Riesling (*Vitis vinifera* L.) glycosides. *J. Food Composition Anal.,*11:240–248.

ANEXO

ANEXO Nº 01. Absorbancias del extracto de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (1 mM) A°	Extracto etanólico Palisangre (muestra-seca) primera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.079	0.073	0.169	0.127	0.158	0.187
2	0.161	0.121	0.062	0.157	0.125	0.158	0.187
3	0.160	0.076	0.047	0.116	0.126	0.157	0.186
4	0.160	0.097	0.044	0.122	0.126	0.157	0.187
5	0.160	0.101	0.038	0.108	0.124	0.156	0.187
6	0.160	0.107	0.034	0.107	0.123	0.156	0.186
7	0.160	0.107	0.029	0.099	0.122	0.155	0.186
8	0.160	0.108	0.026	0.095	0.122	0.155	0.186
9	0.160	0.108	0.022	0.091	0.120	0.155	0.186
10	0.160	0.107	0.019	0.088	0.120	0.154	0.186
Promedio A°	0.160	0.101	0.039	0.115	0.124	0.156	0.186
Porcentaje de Inhibición, %		36.81	75.38	28.00	22.79	2.44	-16.50

ANEXO Nº 02. Absorbancias del extracto de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (100uM) A°	Extracto etanólico Palisangre (muestra-seca) segunda lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.181	0.071	0.169	0.130	0.157	0.186
2	0.161	0.121	0.062	0.152	0.124	0.158	0.187
3	0.161	0.077	0.046	0.114	0.126	0.157	0.186
4	0.160	0.096	0.044	0.124	0.126	0.157	0.187
5	0.160	0.107	0.038	0.108	0.124	0.156	0.186
6	0.160	0.108	0.033	0.106	0.123	0.156	0.186
7	0.160	0.108	0.029	0.099	0.122	0.155	0.186
8	0.160	0.108	0.025	0.095	0.121	0.155	0.186
9	0.160	0.108	0.022	0.091	0.121	0.155	0.186
10	0.160	0.107	0.019	0.088	0.120	0.154	0.186
Promedio A°	0.160	0.112	0.039	0.115	0.124	0.156	0.186
Porcentaje de Inhibición, %		30.07	75.73	28.51	22.83	2.68	-16.16

ANEXO Nº 03. Absorbancias del extracto de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (100 uM) A°	Extracto etanólico Palisangre (muestra-seca) tercera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.081	0.069	0.169	0.130	0.157	0.186
2	0.161	0.120	0.062	0.148	0.124	0.158	0.185
3	0.160	0.082	0.046	0.111	0.126	0.157	0.186
4	0.160	0.094	0.044	0.124	0.125	0.157	0.187
5	0.161	0.116	0.038	0.108	0.124	0.156	0.186
6	0.160	0.107	0.033	0.105	0.123	0.156	0.186
7	0.160	0.108	0.028	0.099	0.122	0.155	0.186
8	0.160	0.108	0.025	0.094	0.121	0.155	0.186
9	0.160	0.107	0.022	0.091	0.120	0.154	0.186
10	0.160	0.107	0.019	0.088	0.120	0.154	0.186
Promedio A°	0.160	0.103	0.039	0.114	0.124	0.156	0.186
Porcentaje de Inhibición, %		35.72	75.92	29.07	22.96	2.74	-16.03

ANEXO Nº 04. Absorbancias del extracto de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lectura	Solución DPPH (1 mM) A°	Extracto etanólico de la hoja del Palisangre (muestra-seca) primera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.014	0.125	0.243	0.268	0.311	0.265
2	0.161	0.002	0.108	0.225	0.259	0.311	0.266
3	0.160	-0.003	0.103	0.219	0.258	0.310	0.262
4	0.160	-0.005	0.100	0.210	0.257	0.310	0.262
5	0.160	-0.006	0.089	0.205	0.253	0.309	0.262
6	0.160	-0.005	0.082	0.201	0.251	0.309	0.262
7	0.160	-0.005	0.077	0.198	0.250	0.309	0.260
8	0.160	-0.005	0.070	0.195	0.249	0.308	0.260
9	0.160	-0.005	0.064	0.193	0.248	0.308	0.259
10	0.160	-0.005	0.059	0.190	0.247	0.308	0.259
Promedio A°	0.160	-0.002	0.088	0.208	0.254	0.309	0.262
Porcentaje de Inhibición, %		101.44	45.19	-29.94	-58.75	-93.31	-63.56

ANEXO Nº 05. Absorbancias del extracto de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (100 uM) A°	Extracto etanólico de la hoja del palisangre (muestra-seca) segunda lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.014	0.122	0.241	0.269	0.311	0.263
2	0.161	0.003	0.122	0.224	0.258	0.311	0.266
3	0.161	-0.003	0.100	0.219	0.257	0.310	0.262
4	0.160	-0.004	0.100	0.211	0.256	0.310	0.262
5	0.160	-0.006	0.089	0.205	0.253	0.310	0.262
6	0.160	-0.005	0.082	0.200	0.251	0.309	0.261
7	0.160	-0.005	0.077	0.197	0.250	0.309	0.260
8	0.160	-0.005	0.070	0.195	0.249	0.308	0.260
9	0.160	-0.005	0.064	0.193	0.248	0.308	0.259
10	0.160	-0.005	0.059	0.191	0.247	0.308	0.259
Promedio A°	0.160	-0.002	0.089	0.208	0.254	0.309	0.261
Porcentaje de Inhibición, %		101.31	44.79	-29.51	-58.33	-93.01	-63.07

ANEXO Nº 06. Absorbancias del extracto de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre) con el método DPPH.

Número de lecturas	Solución DPPH (100 uM) A°	Extracto etanólico de la hoja del palisangre (muestra-seca) tercera lectura					
		Concentraciones					
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.1 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0.161	0.012	0.123	0.240	0.268	0.312	0.262
2	0.161	0.002	0.121	0.224	0.258	0.310	0.267
3	0.160	-0.004	0.099	0.219	0.257	0.311	0.262
4	0.160	-0.005	0.100	0.210	0.256	0.310	0.262
5	0.161	-0.005	0.089	0.204	0.252	0.309	0.262
6	0.160	-0.005	0.082	0.200	0.251	0.309	0.261
7	0.160	-0.005	0.076	0.197	0.250	0.309	0.260
8	0.160	-0.005	0.070	0.195	0.249	0.308	0.260
9	0.160	-0.005	0.063	0.192	0.248	0.308	0.259
10	0.160	-0.005	0.058	0.190	0.246	0.308	0.259
Promedio A°	0.160	-0.003	0.088	0.207	0.254	0.309	0.261
Porcentaje de Inhibición, %		101.56	45.04	-29.20	-58.14	-93.01	-63.07

ANEXO Nº 07. Determinación de fenoles totales madera del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repetición	Masa Alìcuota de extracto seco	Masa Alìcuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	alìcuota (ml)	Volumen enrasado 2	factor de dilución	Alícota en el tubo	**lectura en el espectrofotòmetro**	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(ml)		(mL)	**Abs.765 nm**	mgEAG/mL	mgEAG	**mgEAG/mg alícuota extracto seco**	**mgEAG/100 g muestra original**	mgEAG/100 g muestra original	
			a	**b = a*1000**	**c**	**d**	**e**	**f=e/d**	**g**	**h**	**i= @**	**j = i* c**	**k= j / a**	**j = h/a**		
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1000	100.00	100.00			1.000	0.200	0.245	0.022	2.161	21.609	151.265	156.468	4.518
		R2	0.1000	100.00	100.00			1.000	0.200	0.256	0.023	2.268	22.676	158.730		
		R3	0.1000	100.00	100.00			1.000	0.200	0.257	0.023	2.277	22.773	159.409		
palisangre 2	extracto 2	R1	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.178	0.015	0.151	1.511	105.797	106.024	0.392
		R2	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.178	0.015	0.151	1.511	105.797		
		R3	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.179	0.015	0.152	1.521	106.476		
palisangre 3	extracto 3	R1	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.131	0.011	0.106	1.056	73.902	74.128	0.392
		R2	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.131	0.011	0.106	1.056	73.902		
		R3	0.1000	100.00	100.00	1.000	10.000	10.000	0.200	0.132	0.011	0.107	1.065	74.581		

ANEXO Nº 08. Determinación de antocianinas madera del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de amuestra	**Código**	**repetición**	**ABS = λ Vis-máx pH 1**	**ABS = λ Vis-máx nm pH 4.5**	**ABS = 700 nm pH 1**	**ABS = 700 nm pH 4.5**	**A = (a-c)-(b-d)**	**PM**	**FD**	**ε**	**L**	**Concentración de Antocianinas**	**Media Antocianinas**	**SD**
			(a)	**(b)**	**(c)**	**(d)**		**g/mol**		**L/cm*mol**	**cm**	**mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original**	**mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original**	
palisangre 1	extracto 1	R1	0.4740	0.4390	0.0400	0.0470	0.0420	449.2	3.0	26,900.0	1.0	14.7284	19.9886	5.4440
		R2	0.4730	0.4300	0.0400	0.0530	0.0560	449.2	3.0	26,900.0	1.0	19.6379		
		R3	0.4740	0.4370	0.0400	0.0760	0.0730	449.2	3.0	26,900.0	1.0	25.5994		
palisangre 2	extracto 1	R4	0.6110	0.4560	0.1470	0.0810	0.0890	449.2	3.0	26,900.0	1.0	31.2102	34.3663	6.3992
		R5	0.6220	0.4710	0.1420	0.0770	0.0860	449.2	3.0	26,900.0	1.0	30.1582		
		R6	0.6180	0.4380	0.1340	0.0730	0.1190	449.2	3.0	26,900.0	1.0	41.7305		
palisangre 3	extracto 1	R7	0.5690	0.4380	0.0730	0.0460	0.1040	449.2	3.0	26,900.0	1.0	36.4704	51.1988	23.1234
		R8	0.5710	0.4380	0.0730	0.0520	0.1120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	39.2758		
		R9	0.5660	0.3460	0.0730	0.0750	0.2220	449.2	3.0	26,900.0	1.0	77.8502		

ANEXO Nº 09. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	Aº	λ(nm)	Aº
502	0.4740	509	0.4390
502	0.4730	508	0.4300
502	0.4740	546	0.4370
499	0.6110	510	0.4560
505	0.6220	499	0.4710
502	0.6180	513	0.4380
502	0.5690	508	0.4380
502	0.5710	508	0.4380
502	0.5660	546	0.3460

ANEXO Nº 10. Determinación de flavonoides madera del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de amostra	Código	repeticiòn	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm*mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
palisangre 1	extracto 2	R1	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48	24.48	0.02
		R2	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50		
		R3	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
palisangre 2	extracto 1	R4	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48	24.48	0.02
		R5	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50		
		R6	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		
palisangre 3	extracto 1	R7	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48	24.48	0.02
		R8	0.911	302.236	10.00	78.66	1.00	24.50		
		R9	0.910	302.236	10.00	78.66	1.00	24.48		

ANEXO Nº 11. Determinación de Catequinas y Proantocianidoles de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repetición	Masa Alícuota de extracto seco	Masa Alícuota de extracto seco	Volumen enrasado 1	Alícuota en el tubo	**lectura espectrofotometro**	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(mL)	**Abs.765 nm**	µg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina/mL	mg (+)-Catequina	**mg (+)-catequina/g alicuota extracto seco**	**mg (+)-catequina/ 100 g muestra original**	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	
			a	**b = a*1000**	**c**	**e**	**f**	**g = @**	**g = @**	**h = g* c**	**i= h / b**	**j = h/a**		
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276	160.276	-
		R2	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276		
		R3	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.253	22.897	0.023	2.290	22.897	160.276		
palisangre 2	extracto 1	R4	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.201	18.005	0.018	1.800	18.005	126.033	126.033	-
		R5	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.201	18.005	0.018	1.800	18.005	126.033		
		R6	0.1000	100.00	100.00	0.200	0.201	18.005	0.018	1.800	18.005	126.033		

ANEXO Nº 12. Determinación de fenoles totales de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de la muestra	Código	repetição	Masa Alìcuota de extracto seco	Masa Alìcuota de extracto	Volumen enrazado 1	fator de diluciòn	Alícota no tubo	**lectura en el espectofotòmetro**	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentraciòn FT	concentração FT	Media FT	DS
			(g)	(mg)	(ml)		(mL)	**Abs.765 nm**	mgEAG/mL	mgEAG	**mgEAG/mg Alìcuota extracto seco**	**mgEAG/100 g muestra original**	mgEAG/100 g muestra original	
			a	**b = a*1000**	**c**	**f=e/d**	**g**	**h**	**i= @**	**j = i* c**	**k= j / a**	**j = h/a**		
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168	190.168	0.000
		R2	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168		
		R3	0.1260	126.00	100.00	1.000	0.200	0.640	0.060	5.990	47.542	190.168		

ANEXO Nº 13. Determinación de antocianinas de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	**Código**	**repeticiòn**	**ABS = λ Vis-máx pH 1**	**ABS = λ Vis-máx nm pH 4.5**	**ABS = 700 nm pH 1**	**ABS = 700 nm pH 4.5**	**A = (a-c)-(b-d)**	**PM**	**FD**	**ε**	**L**	**Concentraciòn de Antocianinas**	**Media Antocianinas**	**SD**
			(a)	**(b)**	**(c)**	**(d)**		**g/mol**		**L/cm*mol**	**cm**	**mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original**	**mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original**	
palisangre 1	extracto 1	R1	0.1690	0.1220	0.0790	0.0430	0.0110	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.8747	0.9277	0.0459
		R2	0.1690	0.1210	0.0790	0.0430	0.0120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.9542		
		R3	0.1700	0.1220	0.0790	0.0430	0.0120	449.2	3.0	26,900.0	1.0	0.9542		

ANEXO Nº 14. Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Absorbancia			
pH 1		pH 4.5	
λ (nm)	Aº	λ(nm)	Aº
489nm	0.183 A	508nm	0.121 A
502nm	0.167 A	504nm	0,124 A
500nm	0.176 A	518nm	0,111 A
496nm	0.187 A	504nm	0.125 A
510nm	0.169 A	508nm	0.122 A
512nm	0.169 A	510nm	0.121 A
504nm	0.170 A	493nm	0.122 A
511nm	0.176 A	493nm	0.139 A
504nm	0.189 A	501nm	0.131 A

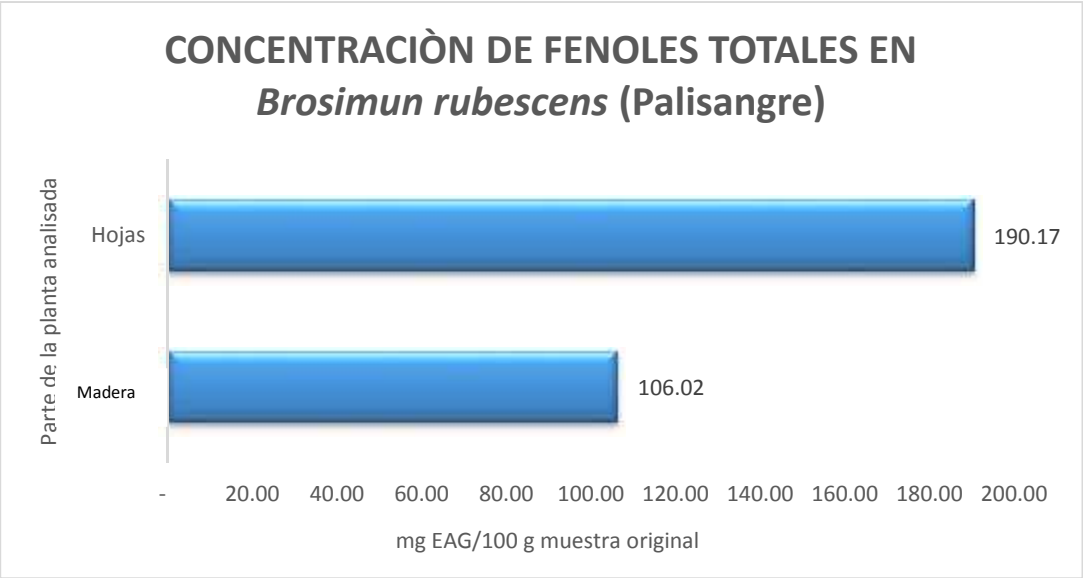
ANEXO Nº 15. Determinación de flavonoides de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	ABSORBANCIAS 415 nm	PM	FD	ε	L	Concentraciòn de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm*mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
palisangre 1	extrato 2	R1	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06	0.06	-
		R2	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06		
		R3	0.007	302.236	1.00	78.66	1.00	0.06		

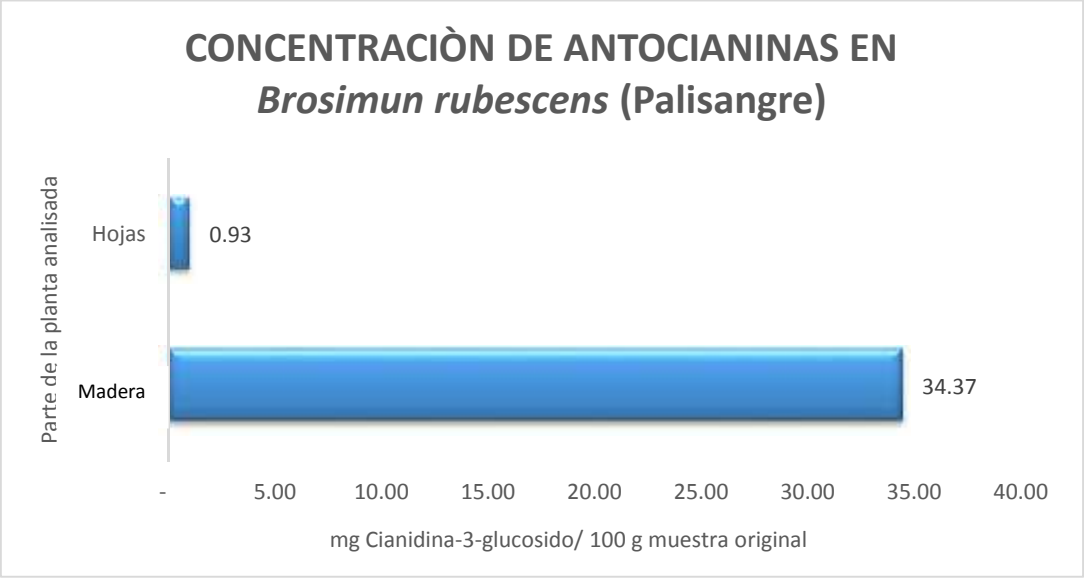
ANEXO Nº 16. Determinación de Catequinas y protoantocianidoles de la hoja del *Brosimum rubescens* (palisangre).

Tipo de muestra	Código	repeticiòn	Masa Alìcuota de extracto seco	Masa Alìcuota de extracto seco	Volumen Enrazado 1	Alícota en el tubo	**lectura en el espectofotòmetro**	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	concentraciòn taninos	Media concentraciòn taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(mL)	**Abs.765 nm**	µg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina	**mg (+)-catequina/g alicuota extracto seco**	**mg (+)-catequina/ 100 g muestra original**	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	
			a	**b = a*1000**	**c**	**e**	**f**	**g = @**	**g = @**	**h = g* c**	**i= h / b**	**j = h/a**		
palisangre 1	extrato 1	R1	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.031	2.012	0.002	0.060	1.059	4.236		
		R2	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.031	2.012	0.002	0.060	1.059	4.236	22.655	31.902
		R3	0.0570	57.00	30.00	0.200	0.310	28.259	0.028	0.848	14.873	59.492		

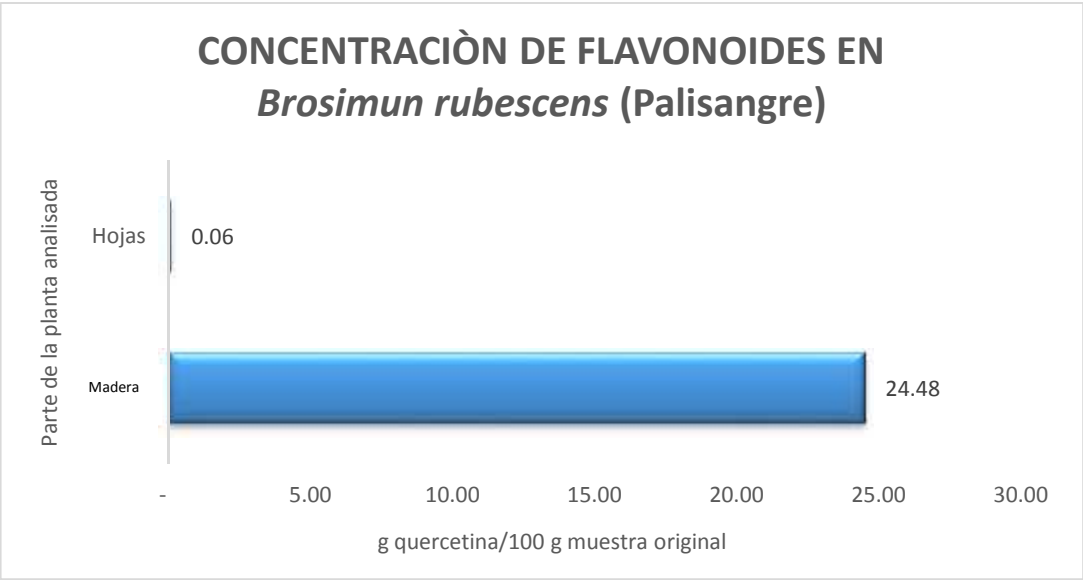
ANEXO Nº 17. Comparación de fenoles totales del *Brrosimum rubescens* (palisangre*)*.



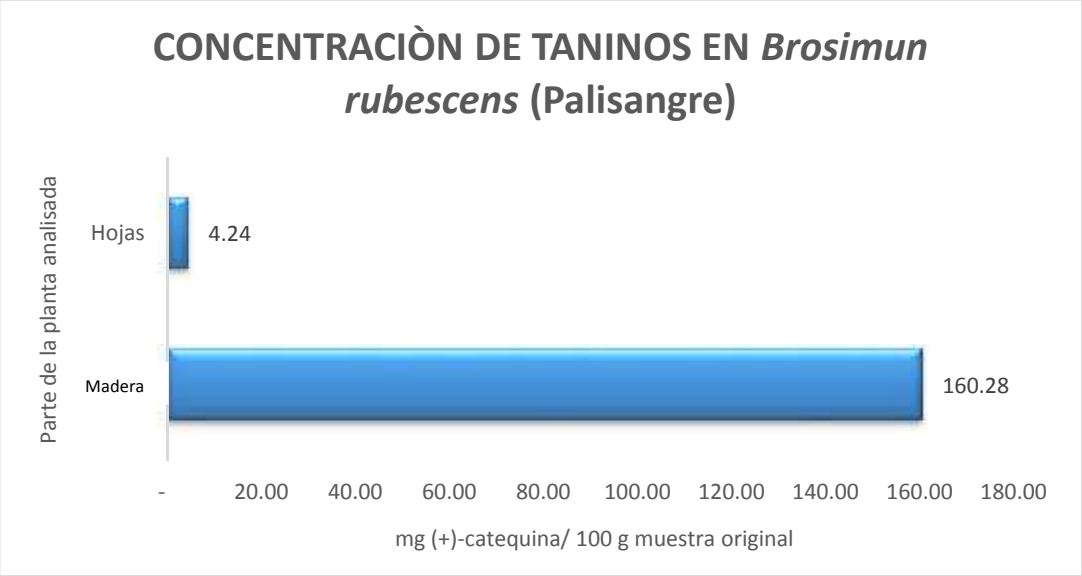
ANEXO Nº 18. Comparación de antocianinas del *Brrosimum rubescens* (palisangre*)*.



ANEXO Nº 19. Comparación de flavonoides del *Brrosimum rubescens* (palisangre*).*



ANEXO Nº 20. Comparación de taninos del *Brrosimum rubescens* (palisangre*).*



ANEXO Nº 21. Muestra de la viruta de la madera de *Brosimun rubescens* (palisangre)

ANEXO Nº 22. Muestra de la hoja de *Brosimun rubescens* (palisangre)

ANEXO Nº 23. Obtención de los extractos de la madera y hoja del *Brosimun rubescens* (palisangre).

ANEXO Nº 24. Elaboracion del método de DPPH en la madera y hoja de *Brosimun rubescens* (palisangre).