

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE
ALIMENTOS**



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
Pseudelephantopus spicatus Y SU APLICACIÓN EN UN
PRODUCTO ATOMIZADO PARA FILTRANTES**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

VELA ROMERO, JOHAN GILBERTO

PROMOCIÓN 2007 - II

Tingo Maria - Perú

2010

F60

V38

Vela Romero, Johan G.

Determinación de la Capacidad Antioxidante del *Pseudelephantopus spicatus* y su Aplicación en un Producto Atomizado para Filtrantes. Tingo María 2010

84 h.; 14 cuadros; 15 fgrs.; 50 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

PSEUDELEPHANTOPUS SPICATUS / ANALISIS SENSORIAL / CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE / PROCESO - ATOMIZACIÓN / POLIFENOLES TOTALES /
TINGO MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO / PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 10 de Marzo de 2009, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Audiovisuales de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **VELA ROMERO, Johan Gilberto**, titulado:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL *Pseudelephantopus spicatus* Y SU APLICACIÓN EN UN PRODUCTO ATOMIZADO PARA FILTRANTES”

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **EXCELENTE**, en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 10 de Marzo de 2009

.....
Ing. M.Sc. Pedro A. Vejarano Jara
Presidente

.....
Ing. Eduardo Cáceres Almenara
Miembro

.....
Ing. Alfredo A. Garmona Ruíz
Miembro

.....
Ing. Jhony W. Vargas Solórzano
Asesor

DEDICATORIA

**A Dios, por darme la vida y acompañarme
en mi caminar para alcanzar muchas
metas y privilegios.**

**A mis padres, Winer y Neyba por su amor,
apoyo y comprensión en todo momento
para seguir adelante.**

**A mis hermanos, Paola y Renato,
y a toda mi familia por creer en mí y
por brindarme su apoyo y cariño.**

**A mi tía, Georgia por todo su amor, apoyo
incondicional y consejos que siempre me
brindó.**

**A Jessica, este amor sincero por ti,
se convirtió en una fuerza vencedora,
que pudo superar todos los obstáculos.**

AGRADECIMIENTO

- Al Ing. Jhony William Vargas Solórzano, asesor de mi tesis, por su valiosa colaboración y orientación desinteresada que hizo posible la culminación del presente trabajo de investigación.
- A la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA, por formarme como un buen profesional.
- Al Ph.D. Manuel Sandoval Chacón, por su asesoramiento, consejos, apoyo y la confianza que depósito en mí en todo momento para la culminación del presente trabajo de investigación.
- A los Docentes de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por todos los conocimientos brindados, quienes contribuyeron en mi formación profesional.
- A mis compañeros Helmut Calvay, Joel Sullón, Wilfredo Tello, Marlen Félix, David Hidalgo, Manuel Marinas, Marco Usquiano y Palomo, por brindarme su apoyo y motivación siempre y por todos los buenos momentos compartidos.
- A mi papá Gilberto y mamá Anita, por todo su apoyo incondicional que siempre me brindaron en los momentos más difíciles.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la culminación del presente trabajo de investigación.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspecto general del <i>Pseudelephantopus spicatus</i>	3
2.1.1 Taxonomía de la especie	3
2.1.2 Características fisiológicas de la planta.....	4
2.1.3 Antecedentes.....	5
2.2 Radicales libres.....	6
2.2.1 Oxidación y producción de radicales libres.....	6
2.3 Estrés oxidativo.....	14
2.3.1 Efectos al nivel fisiológico de la célula.....	15
2.4 Antioxidantes.....	15
2.4.1 Tipos de antioxidantes.....	17
2.5 Polifenoles.....	18
2.5.1 Flavonoides.....	21
2.6 Proceso de atomización.....	22
2.6.1 Descripción.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Lugar de ejecución.....	25
3.2 Materia prima.....	25
3.3 Materiales.....	26

3.3.1 Materiales de laboratorio.....	26
3.3.2 Equipos de laboratorio.....	26
3.3.3 Reactivos y soluciones.....	27
3.4 Métodos de análisis.....	28
3.4.1 Determinación de la capacidad antioxidante.....	28
3.4.2 Atomizado de la muestra.....	29
3.4.3 Determinación del Contenido de Polifenoles Totales.....	29
3.4.4 Cuantificación de Catequina mediante HPLC.....	29
3.5 Metodología experimental.....	31
3.5.1 Micropulverización del <i>Pseudelephantopus spicatus</i>	32
3.5.2 Preparación de los extractos.....	34
3.5.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante.....	35
3.5.4 Atomización de la muestra.....	40
3.5.5 Prueba de Polifenoles Totales.....	43
3.5.6 Cuantificación de Catequina mediante HPLC.....	45
3.5.7 Análisis sensorial.....	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1 Radical DPPH.....	50
4.1.1 Capacidad antioxidante de acuerdo a la fisiología de la planta.....	50
4.1.2 Capacidad Antioxidante con respecto a los tratamientos.....	52
4.2 Radical peróxilo.....	55
4.3 Extracto atomizado.....	59
4.4 Contenido de polifenoles totales.....	61

4.5 Cuantificación de catequina mediante HPLC.....	64
4.6 Análisis Sensorial.....	67
4.6.1 Atributo Sabor.....	67
4.6.2 Atributo olor.....	68
4.6.3 Atributo color.....	69
V. CONCLUSIONES.....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. ABSTRACT.....	73
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	84

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de polifenoles totales.....	20
2. Cantidades indicadas para la reacción entre la solución intermedia y del radical DPPH con respecto a las concentraciones finales.....	36
3. Cantidades indicadas para la reacción entre la solución intermedia y el radical peróxilo en las concentraciones finales.....	37
4. Cantidad de volúmenes adicionados para la obtención de cada una de las concentraciones.....	46
5. Capacidad de Inhibición expresado en IC ₅₀ (ug/ml) de los extractos acuosos y etanólicos frente al radical DPPH.....	50
6. Capacidad Antioxidante de los respectivos tratamientos expresado en IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH.....	52
7. Capacidad de Inhibición expresado en IC ₅₀ (ug/ml) de los extractos acuosos y etanólicos frente al radical peróxilo.....	55
8. Capacidad Antioxidante de los diferentes tratamientos expresado en IC ₅₀ ug/ml frente al radical peróxilo.....	57
9. Capacidad antioxidante de la muestra atomizada expresada en IC ₅₀	59
10. Contenido de Polifenoles de la muestra atomizado.....	61
11. Contenido de catequina de la muestra atomizada.....	64
12. Resultados del análisis estadístico con respecto al atributo sabor.....	67

13. Resultados de los análisis estadísticas con respecto al atributo olor.....	68
14. Resultados de los análisis estadísticas con respecto al atributo color.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Hábitat natural del <i>Pseudelephantopus spicatus</i>	4
2. Radical DPPH.....	10
3. Estructuras mayoritarias de flavonoides.....	22
4. Metodología experimental a seguir para la obtención del producto atomizado y sus adicionales pruebas antioxidantes y sensoriales.....	31
5. Operaciones seguidas para la obtención del producto micropulverizado.....	33
6. Diseño experimental para determinación del coeficiente de inhibición IC ₅₀ (ug/ml) de las muestras en estudio.....	39
7. Flujograma para la obtención del producto atomizado.....	41
8. Esquema de un atomizador en co-corriente.....	42
9. Flujograma para la obtención del contenido de polifenoles totales de la muestra atomizada.....	44
10. Imagen de las partes que componen el sistema HPLC.....	47
11. Diseño experimental para la prueba de análisis sensorial.....	49
12. Eficacia de los extractos frente al radical DPPH.....	50
13. Eficacia de los extractos frente al radical peróxilo.....	56
14. Cromatograma de la muestra estándar de Catequina.....	66
15. Cromatograma de la muestra atomizada analizada.....	66

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) – UNAS. Los objetivos fueron: Determinar la capacidad antioxidante en la raíz, hoja, tallo y parte aérea frente a los radicales DPPH y peróxilo mediante extracción acuosa y etanólica (50%); determinar el solvente con comportamiento más activo; realizar un proceso de atomización al órgano de la planta con mayor capacidad antioxidante; determinar el IC₅₀ (ug/ml) del producto atomizado; evaluar el contenido de polifenoles totales y cuantificación de catequina en el atomizado y realizar el análisis sensorial. La materia prima utilizada fueron plantas de *Pseudelephantopus spicatus*. Los resultados se expresaron como la media ± SEM, para el análisis estadístico se empleó el diseño bloque completo al azar (DBCA) con arreglo factorial y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). La capacidad antioxidante de la raíz, hoja, tallo y parte aerea mediante extracción acuosa frente al radical DPPH fue (276.271±0.564, 207.131±0.574, 400.131±0.574, 413.687±1.698 ug/ml) y al peróxilo (46.920±0.390, 251.599±1.076, 32.370±0.705, 357.149±0.734 ug/ml); la capacidad antioxidante mediante extracción etanólica (50%) frente al radical DPPH resultó (378.112±0.516, 418.654±1.950, 398.977±0.449, 124.246±1.260 ug/ml) y al peróxilo

(37.209±0.069, 104.322±1.710, 25.43±1.398, 39.17±0.833); el extracto etanólico (50%) fue el más activo; se realizó atomizado a la parte aérea; el valor IC₅₀ del producto atomizado (10,13±0.30 ug/ml); el contenido de polifenoles totales (68.08 mg eqCat/g); la cuantificación de catequina (6.34±1.034 mg cat/g); en el análisis sensorial, las pruebas del atributo sabor presento diferencia significativa mas no el color y olor.

I. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo generado mayormente por la contaminación ambiental, la disminución de la capa de ozono, el ritmo de vida apresurada y los malos hábitos alimentarios: exceso de comida chatarra, consumo de licor y cigarrillos se ha acrecentado enormemente en estos tiempos haciendo a las personas más proclives a sufrir enfermedades debido a que este estrés oxidativo ocasiona un desbalance entre los antioxidantes endógenos y radicales libres presentes en nuestro organismo. En el mismo sentido se ha descubierto que el uso de antioxidantes sintéticos a la larga tiene efectos nocivos para la salud lo que llevó un interés mayor por la búsqueda de antioxidantes de origen natural.

El *Pseudelephantopus spicatus* mejor conocido como mata pasto, oreja de chanco, lechugilla o lengua de perro es una maleza muy conocida en la Amazonia peruana especialmente por su carácter invasivo. La medicina tradicional casera en su mayoría la utiliza para aliviar los dolores asociados al riñón siendo ingerida en forma de decocto (bebida tipo té) aunque estudios recientes reportan actividad antiinflamatoria, antihemorrágica y antibacteriana.

Paralelamente a esto no existen registros sobre un posterior procesamiento de esta planta de manera que se pueda dar un valor agregado y

venderlo como un producto nutracéutico y de esta manera influya directamente en aliviar el estrés oxidativo y la socioeconomía de los habitantes de la zona.

En base a estos antecedentes se sugirió determinar la capacidad antioxidante de esta planta teniendo como objetivos específicos:

- Determinar la capacidad antioxidante expresado en IC_{50} ug/ml de la raíz, hoja, tallo y parte aérea frente a los radicales DPPH (1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl) y peróxido mediante extracción acuosa y etanólica al 50%.
- Determinar el solvente con comportamiento más activo.
- Realizar un proceso de atomización al órgano de la planta que reporte mayor capacidad antioxidante.
- Determinar el IC_{50} (ug/ml) del producto atomizado.
- Evaluar el contenido de polifenoles totales y cuantificación de catequina en el producto atomizado.
- Realizar el respectivo análisis sensorial a los atributos del sabor, color y olor al producto atomizado en forma de filtrante.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspecto general del *Pseudelephantopus spicatus*

2.1.1. Taxonomía de la especie

Según el USDA (2007) lo clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Traqueobionta
Superdivisión	:	Spermatophyta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Asteridae
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteracea
Género	:	<i>Pseudelephantopus</i> Rohr
Especie	:	<i>Pseudelephantopus spicatus</i> (Jux, ex Aubl.) C. F Baker
Nombre vulgar	:	mata pasto, lechuguilla, lengua de perro, oreja de Chancho.

2.1.2. Características fisiológicas de la planta

Esta planta es una hierba perenne, estolonífera, erecta, de hasta 80 cm de alto. Con tallos ramificados, velludos y foliosos hasta la inflorescencia. Hojas alternas, obovadas, atenuadas en la base en un pecíolo ensanchado y envainador, velludas en ambas cara, de 7-10 cm de largo por 3-4 cm de ancho. La planta es originaria de América Tropical distribuida desde El Caribe hasta el norte de Argentina. Prefiere suelos bajos húmedos y sombríos, también forma parte de la flora invasora de los cultivos del Oriente peruano (SAGASTEGUI y LEIVA, 1993).



Figura 1. Hábitat natural del *Pseudelephantopus spicatus*.

2.1.3. Antecedentes

- El extracto etanólico de toda la planta del *Pseudelephantopus spicatus* presentó una moderada capacidad antihemorrágica frente al veneno *Bothrops atrox venom* en el noreste de Colombia (OTERO *et al.*, 2001).
- El *Pseudelephantopus spicatus* es un esencial componente del *Theng-Khia-U* que es una medicina casera que se usa contra el edema, fiebre y neumonía. Además cita a partir del extracto metanólico de la parte aérea de esta planta se aislaron dos nuevos sesquiterpenos lactones: spicatolide C y el spicatocadinanolide A y de igual manera fueron aislados con los conocidos isómeros piptocarphol isomers además un eudismane tipo sesquiterpeno. Las estructuras y las relativas estequiometrias de los nuevos metabolitos fueron determinados por métodos espectroscópicos (ISSA *et al.*, 2006).
- Algunas enfermedades como la metamorfosis hepática y la necrosis del lóbulo central fueron tratadas con *Pseudelephantopus spicatus* dando como resultado una protección farmacológica moderada (LIN *et al.*, 1991).
- Un nuevo sesquiterpeno lactone fue obtenido a partir de el extracto de cloroformo del *Pseudelephantopus spicatus*. Esta estructura fue aislada en extenso por espectroscopia unidimensional (1D) y espectroscopia de masas 2D NMR. Este extracto mostró una moderada actividad antifúngica contra el *C. Albicans* and *A. Níger* y baja actividad contra el *T. menagrophytes*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeuriginosa*. Siendo inactivado en su totalidad frente al *B.subtilis* (RAGASA y RIDEOUT, 2001).

2.2. Radicales libres

2.2.1. Oxidación y producción de radicales libres

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies.

La doctora Gerschman (1954), citado por GARCÍA *et al.*, (2001); sugirió que los radicales libres eran agentes patógenos y estableció en este trabajo 3 postulados básicos:

- a. Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales de experimentación son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radiaciones ionizantes.
- b. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos.
- c. La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Los radicales libres producidos durante la respiración aerobia causan daño oxidativo que se acumula y resulta una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos en una interferencia en patrones de expresión génica y pérdida de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte.

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad

electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en su radical libre por quedar con un electrón desapareado iniciándose así a una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que este a su alrededor provocando un gran daño a moléculas y a membranas celulares. Las especies reactivas del oxígeno (EROS) son moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y son fácilmente convertidos a radicales, en la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Las especies oxigenadas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (radical libre) en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad (MOSQUERA *et al.*, 2005).

MICHAELIS (1939) propuso que la oxidación de todas las moléculas orgánicas bivalentes ocurre con la formación de un radical libre intermediario y fue capaz de mostrar por titulación oxidante la formación de las semiquinonas en la oxidación de las benzoquinonas y naftaquinonas de igual manera MICHAELIS (1946) describió la reducción univalente secuencial del

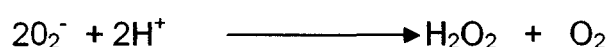
oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y de reducción total (BOVERIS, 2005).

Los radicales libres son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como en el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio o bien son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas. Los radicales libres son átomos o moléculas extremadamente reactivas, debido a que en el orbital más externo de su estructura tiene uno o más electrones sin aparear. Esta inestabilidad les confiere una avidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable. De esta forma pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente, cuando un radical libre inicial modifica una biomolécula después de transferir o capturar un electrón (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

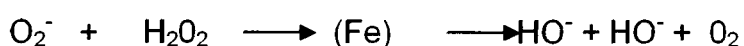
Los sistemas biológicos necesitan del oxígeno para su metabolismo energético. Aproximadamente 80% del Adenosin Trifosfato (ATP) que utilizamos se forma en las mitocondrias, donde se consume entre el 85% y 90% del oxígeno. En ellas, el oxígeno molecular disuelto entra a la cadena respiratoria para reducirse en agua, proceso en el que son generados en forma

sucesiva, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, especies de radicales derivadas del oxígeno.

El punto de partida del entendimiento y del conocimiento de los radicales libres en los sistemas biológicos esta dado por el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por McCORD y FRIDOVICH (1969). La enzima fue aislada por eritrocitos y se determinó que catalizaba la reacción:



La existencia de la superóxido dismutasa implicó el reconocimiento inmediato de la existencia fisiológica del radical superóxido, basado en la teoría de que la enzima implica la existencia del sustrato. Al mismo tiempo fue adquiriendo vigencia el "Dogma de Fridovich" donde las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa constituyen la defensa principal del células aerobias contra la toxicidad del oxígeno. Las dos enzimas poseen un efecto sinérgico al eliminar O_2^- y al H_2O_2 de los sistemas biológicos. El mecanismo molecular por el cual ambos productos de la reducción parcial del oxígeno ejercen su toxicidad biológica se explicó a) tomando reacciones descritas por FENTON e HABER y WEISS donde el O_2^- y el H_2O_2 disminuyen su acción toxica al convertirse en un radical hidroxilo y b) considerando la altísima reactividad química del OH^- que hace una abstracción de hidrógeno, una oxidación en cualquier colisión molecular con una biomolécula.



Las mitocondrias son la fuente fisiológica más importante de H_2O_2 intracelular. Las mitocondrias producen H_2O_2 a velocidades que dependen del estado metabólico mitocondrial. En el estado controlado y altamente reducido, la producción de H_2O_2 es máxima 2% y en el estado activo y más oxidado, la producción de H_2O_2 (0.1%) es mínima. En conclusión los tres intermediarios de la reducción parcial del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) pasaron a ser denominados conjuntamente EROS (especies reactivas oxigenadas) a favor de efectos biológicos semejantes este concepto favoreció el establecimiento del campo de la biología de los radicales libres (BOVERIS, 2005).

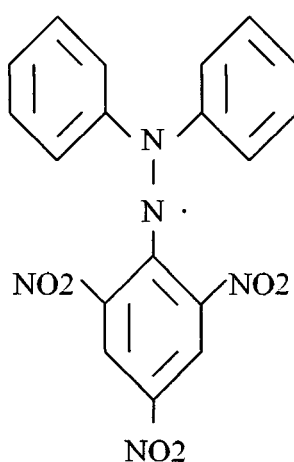


Figura 2. Radical DPPH

2.2.1.1. Fuentes endógenas de radicales libres

A. Autoxidación de Catecolamina

Otras fuentes de O_2^- y H_2O_2 son las enzimas oxidativas como la xantin oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa, que son enzimas que se activan en procesos fisiológicos que favorecen la producción

de metabolitos tóxicos del oxígeno, y los citocromos P-450 y pequeñas moléculas autooxidables como las catecolamina y las quinonas (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

El superóxido (O_2^-) formado por la oxidasa NADPH controla la producción de eritropeyina, participa en el control de la ventilación, en la relajación del músculo liso y en la traducción de señales de varios receptores membranales que activan funciones inmunes (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

B. Fagocitosis

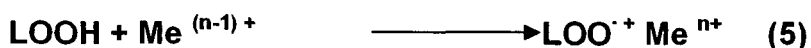
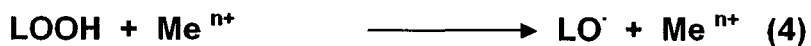
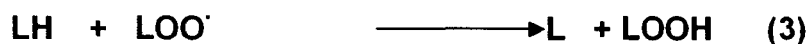
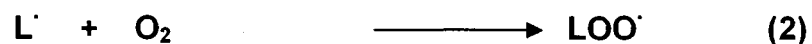
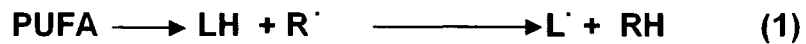
En el sistema inmunológico de los organismos, en especial las células fagocíticas, generan una importante cantidad de H_2O_2 , mediante NADPH oxidasa unida a membranas. Aunque las células no fagocíticas también generan H_2O_2 mediante NADPH oxidasa, esta es estructuralmente y genéticamente diferente, y su tasa de generación es apenas el 1% del generado por las células fagocíticas

Otra especie de oxígeno reactivo es el oxígeno singulete (1O_2), que puede generarse cuando los electrones que han sido excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones apareados del O_2 , los que cambian su sentido de giro y apareándose con el otro electrón (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

C. Peroxidación de lípidos

Esta reacción se origina a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerable al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado ($\text{R}\cdot$). Este último reacciona con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidropéroxidos ($\text{ROO}\cdot$) que propagan esta reacción en cadena. Se forman igualmente radicales alcoxílicos lipofílicos ($\text{RO}\cdot$). La peroxidación lipídica puede seguir propagándose en presencia de Me^{2+} metales de transición existentes en el plasma, los que son catadores.

Peroxidación lipídica iniciada por el radical ($\text{R}\cdot$)



(1) Fase de iniciación de la peroxidación lipídica provocada por el radical ($\text{R}\cdot$) el que reacciona con un grupo metileno del PUFA; (2) etapa de propagación; el oxígeno molecular reacciona con el radical carbonilo y forma rápidamente el radical lipoperóxido ($\text{LOO}\cdot$). Este puede sustraer un hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, análogo a (1); (3) reacción que termina la propagación formándose el producto estable de la lipoperoxidación, el

hidroperóxido lipídico (LOOH), pero implica la conversión de numerosas PUFAs en hidroperóxidos; (4) en presencia de metales de transición el hidroperóxido lipídico (LOOH) puede generar radicales capaces de reiniciar la lipoperoxidación lipídica por el ciclo redox de estos iones metálicos (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Una vez que a un fosfolípido se le arrebatara un electrón, este busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena. Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

D. Oxidación de proteínas

La exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en su estructura terciaria, que pueden acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica. Uno de los radicales más reactivos a la estructura de proteínas es el óxido nítrico (NO) (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

E. Oxidación de los carbohidratos

La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas. Los monosacáridos de la glucosa, una vez oxidados por los radicales libres producidos por metales en transición, pueden combinarse con los grupos carbonilo de las proteínas (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

F. Oxidación de ácidos nucleicos y nucleótidos

La interacción de los radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la formación de genes mutados y por ende de proteínas disfuncionales. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente el ión ferroso (Fe^{2+}), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), genera el hidroxilo (OH^\cdot) que modifica las bases del mismo hidroxilo y que puede atacar tanto purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

2.2.1.2. Fuentes exógenas de radicales libres

Las fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno en los organismos son antibióticos, medicamentos contaminantes, quimioterapia, la exposición a radiación ultravioleta e ionizante (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

2.3. Estrés oxidativo

Cuando el aumento del contenido intracelular de EROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Indica que el nivel del estrés oxidativo esta influenciado por mecanismos genéticos, el incremento de la formación de EROS es un mecanismo epigenético. Durante el desarrollo cambios en el nivel del estrés oxidativo programados genéticamente inducen a la formación de nuevas proteínas o a la supresión de determinados genes, por lo que es posible que en la fase adulta de la vida, modificaciones en el estrés oxidativo por factores epigenéticos, supriman también la expresión de determinados genes.

Se ha sugerido que el efecto del estrés oxidativo en la expresión génica sea a través de 2 mecanismos (CÉSPEDES *et al.*, 2000):

- Efecto directo sobre la producción y el procesamiento del ARN.
- Cambios en la distribución iónica de la célula.

2.3.1. Efectos al nivel fisiológico de la célula

Se ha observado recientemente que el procesamiento del ARN es alterado por exposición de la célula a sistemas generadores de radicales oxígeno. En organismos en desarrollo, en tejidos de individuos senescentes y en tejidos bombardeados con O^2 se ha encontrado ARN inmaduro en el citoplasma, lo que sugiere que los cambios asociados con el envejecimiento y el desarrollo pueden ser mediados por la generación y eliminación de ERO (CÉSPEDES *et al.*, 2000).

2.4. Antioxidantes

Antioxidante es toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), retarda

o previene la oxidación de este sustrato. El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se debilita su acción en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres (GARCÍA *et al.*, 2001).

Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que presentes en bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre no tóxico. Así cuando se incrementa la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar al ambiente rédox intra o extracelular (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en la sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad. Nuestro organismo esta constantemente luchando contra los radicales libres (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Los Antioxidantes son compuestos como ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides mientras que los radicales libres son aquellos como peróxidos, hidroperóxidos. Estos antioxidantes inhiben el mecanismo oxidativos que termina con la generación de enfermedades (PRAKASH, 2001).

2.4.1. Tipos de antioxidantes

Los tipos de antioxidantes se dividen en dos grupos principales:

A. Principales antioxidantes endógenos y tipo de radical que neutralizan

Superóxido Dismutasa; Enzima intracelular o extracelular responsable de remover los radicales superóxido. Necesita la presencia de cobre, magnesio, hierro y zinc.

Catalasa; Esta enzima presente en la peroxisomas remueve el peróxido de hidrogeno.

Glutación Peroxidasa; Esta enzima intracelular contiene selenio. Remueve los peroxilos.

Glutación; Poderoso antioxidante que protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol. Limita la actividad de los radicales superóxido aniónico, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete, radical de ácido graso y proteínas oxidadas.

Melatonina; Es un antioxidante potente que altera la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, glutación peroxidasa y glutation reductasa e inhibe la actividad de la sintasa de óxido nítrico. Se ha reportado que la melatonina es capaz de neutralizar el radical hidroxilo, radical peróxilo, oxígeno singulete, óxido nítrico y proteínas oxidadas.

Estrógenos; Neutralizan radicales libres lipofílicos, disminuyendo la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

B. Principales antioxidantes exógenos y tipo de radical que neutralizan.

Vitamina C; Antioxidante del plasma hidrosoluble, es un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera la vitamina E y es protector de los efectos del tabaco. Actúa específicamente con el radical superóxido aniónico y el radical hidroxilo.

Vitamina E; Principal antioxidante soluble de lípidos, previene la oxidación de grasas. Aumenta su acción en presencia de zinc. Actúa específicamente con el oxígeno singlete y el radical ácido graso poliinsaturado.

Vitamina A; Tiene una fuerte acción antioxidante que se reconoce especialmente por la neutralización del oxígeno singlete por un mecanismo de transferencia de energía del radical, formación de un triplete de vitamina A y posterior disipación de esta energía con regeneración de la vitamina A.

2.5. Polifenoles

Los Polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y constituyen un amplio grupo de sustancias químicas de numerosas especies de plantas. Su función principal en las plantas es de actuar como metabolitos esenciales frente al ataque de agentes patógenos, incluyendo bacterias, fungi y

virus, así como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de estas. En la actualidad se ha encontrado más de 8000 compuestos diferentes reportándose que los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (VILLANUEVA, 2003).

Los compuestos fenólicos o polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y tiene su origen en los derivados metabólicos de la ruta del shikímico y de los fenilpropanoides. La ruta del shikímico, que genera los fenilpropanoides y cumarinas, o la ruta del acetato que proporciona las fenonas más simples y varias quinonas. Además pueden generarse a través de una ruta metabólica intermedia que genera flavonoides, siendo este el grupo más importante y numero de compuestos fenólicos (PIÑEIRO, 2005).

Cuadro 1. Clasificación de polifenoles totales.

ESTRUCTURA	CLASE FENÓLICA
C_6	Fenoles
C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzoicos
C_6-C_2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Ácidos cinámicos, cumarinas, Isocumarinas y cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$ $C_6-C_2-C_6$	Benzofenonas, xantonas Estilbenos, antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides: flavononas, flavonoles, antocianidinas, chalconas, flavanoles auronas, flavonas e isoflavonas
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Bioflavonoides, biflavanos
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_3-C_6)$	Proantocianidinas

Fuente: (PINEIRO, 2005).

2.5.1. Flavonoides

Los flavonoides son un ejemplo de compuestos antioxidantes naturales que están ampliamente distribuidos en los alimentos vegetales presentes en la dieta normal humana y son un amplio grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que tienen en común el esqueleto 2-fenilcromano (C6-C3-C6). Esta estructura base puede presentar muchas sustituciones y variaciones que dan lugar a diversos tipos de flavonoides: flavanoles, flaonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas y charconas identificándose hasta la actualidad más de 4000 flavonoides siendo las principales fuentes dietéticas: cebollas, vino, manzana y el té (DE LUIS y ALLER, 2008).

Dentro de este grupo grande podemos encontrar distribuidos a las antocianinas, flavanoles, flavanonas, flavanoles, flaonas, isoflavonoides y chalconas. Este conjunto se caracteriza por poseer un flavonoide no unido a ninguna otra sustancia química al que se conoce como "aglicona". Por otro lado a los flavonoides unidos a cualquier tipo de azúcar se les llama "glicósidos" (PINEIRO, 2005).

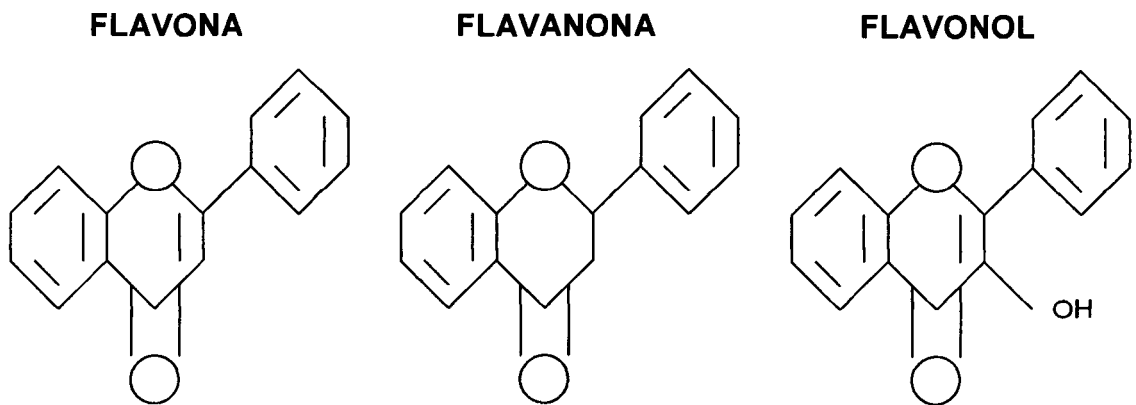


Figura 3. Estructuras mayoritarias de flavonoides.

2.6. Proceso de atomización

La atomización tiene por característica principal la formación de gotas y el contacto de estas con el aire. La etapa de atomización produce un rocío para una condición óptima de evaporación y por consiguiente un producto dentro de estas características técnicas. La atomización resulta de la rotura del seno del líquido en pequeñas gotas y las diferentes técnicas de atomización disponibles varían de acuerdo al tipo de energía utilizado para producir las gotas (BARBOSA- CANOVAS y VEGA, 2000).

El secado por aspersion se utiliza en una amplia gama de aplicaciones, desde productos farmacéuticos hasta alimentos y detergentes. Los materiales de la alimentación se hallan por lo general en forma líquida capaz de ser dispersada en forma de rocío. El fluido es atomizado o dispersado en forma de gotitas finas que se ponen en contacto inmediato con un flujo de aire o gas caliente, proporcionando estas gotitas una extensa área superficial

para la transferencia de calor y masa, por lo tanto el enfriamiento por evaporación y el tiempo de residencia corto mantienen una temperatura baja del producto. Básicamente, las pérdidas de calor sensible a partir del aire caliente proporciona el calor latente para evaporar el líquido del producto.

Ventajas

- Conserva la calidad y las propiedades funcionales del producto.
- Relativa simplicidad y facilidad de regulación del sistema.
- Utilización de energía comparable con la de otros métodos de secado.
- Conservación de la mayoría de los compuestos volátiles.

Desventajas

- Inversión inicial alta.
- Tamaño de la partícula difícil de controlar.
- Requiere una alimentación que pueda manejarse por medio de bombas.
- Problemas con la recuperación del producto y los polvos.

(SHARMA *et al.*, 2003)

2.6.1. Descripción

Las características y el funcionamiento del atomizador se detallan a continuación:

1. Un tanque de depósito contiene el producto que se va a secar.
2. Una bomba lleva el líquido del tanque a la cámara de secado.

3. Una tubería conecta la salida de la bomba con parte posterior del secador.
4. El atomizador o pulverizador es un disco giratorio sobre la boquilla aspersora a presión que dispersa el producto en partículas muy finas.
5. Cámara de secado, donde el líquido de las partículas de producto se evaporan en el aire circundante.
6. Un soplador fuerza aire a alta velocidad al interior de la cámara.
7. El aire del medio ambiente es calentado en una cámara normalmente a temperaturas de 150° C y 210° C.
8. El aire caliente es llevado a la parte superior del secador donde entra por arriba del disco giratorio.
9. La mezcla de producto secado deja el atomizador.
10. En la práctica comercial el polvo inicial se rehumedece con una corriente de aire húmedo y se vuelve a secar.
11. Aire caliente deja la cámara a través de un conducto.
12. Este aire al girar arroja las partículas del producto que aun contienen al exterior del ciclón donde choca contra las paredes del separador ciclónico y cae al fondo de la cámara.
13. El polvo se recolecto en un cilindro desprendible.
14. El aire más ligero se desplaza hacia el centro y sale a través de la parte superior del separador.

(SHARMA *et al.*, 2003)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó entre los meses de mayo a noviembre del 2008 en los ambientes del Centro de Investigaciones de Productos Naturales de la Amazonia Peruana (CIPNA) que pertenece al Centro de Investigaciones para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Este centro superior de estudio se encuentra a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Longitud Oeste y a 665 msnm, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco que presenta una temperatura y humedad relativa promedio de 24 °C y 89% respectivamente (RAMOS, 2002).

3.2. Materia prima

Se utilizó como materia prima a las plantas tiernas del *Pseudoelephantopus spicatus* las cuales fueron recolectadas en horas de la mañana de los alrededores de la Universidad Nacional Agraria de la Selva para posteriormente ser seleccionadas en raíz, hoja, tallo y parte aérea.

3.3. Materiales

3.3.1. Materiales de laboratorio

- Matracas de 100 y 250 ml
- Vasos de precipitación de 50 ml
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Micropipetas de 10-100 ul y 100-1000 ul
- Cubetas de poliestireno (1 cmx 1cm x 4.5 cm)
- Fiolas de 10, 25 y 50 ml
- Papel filtro
- Tips
- Gradilla
- Microtubos
- Microjeringas (50 ul)
- Filtro de membrana de 0.2 μ m marca Gelman

3.3.2. Equipos de laboratorio

- El HPLC utilizado resultó ser de marca Shimatzu Scientific, MD, USA; las características de la bomba, columna, detector, controlador fueron de los siguientes modelos: LC-10ATVP, PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5 μ m/ 250 X 46.0 MM, CTO - 10 AS VP, UV-VIS SPD-10AVVP, SCL-10AVP respectivamente. El inyector requerido tuvo una capacidad de 20 ul.

- Balanza analítica marca Sartorius (USA) con una sensibilidad de 0.0001 g.
- Espectrofotómetro de absorción molecular marca Termo Electrón Corporation, modelo genesys-6.
- pH marca ATC.
- Desionizador de agua marca Easy Pure II RF/UV.
- Baño maría Modelo YCW-OLOE GEMMYCO.
- Rotavapor Modelo R-300.
- Vortex marca Genie 2 Scientific Industries.
- Estufa.

3.3.3. Reactivos y soluciones

- 1,1 diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH).
- 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6- ácido sulfónico) (ABTS+).
- 2,2 – azobis (2 – amidopropano) hidrocloreto (ABAP).
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3).
- (+)- catequin 1 mM.
- Solución de fenol de Folin- Ciocalteu.
- Cloruro de sodio (NaCl) Q.P.
- Fosfato de sodio hepta hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Q.P.
- Fosfato de potasio (KH_2PO_4) Q.P.
- L (+) ácido ascórbico Q.P.
- Metanol (99.9% pureza) para HPLC.

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante

a) Prueba del Radical DPPH

Se utilizó el método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995) modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001). Esta prueba se fundamenta en la reducción del radical DPPH mediante un donador de hidrógeno que procedería de los tipos de extractos evaluados. Se hizo reaccionar 975 μ l del radical DPPH con 25 μ l de la muestra analizada en un espectrofotómetro a una absorbancia máxima de 515 nm, el cambio de coloración de azul a amarillo es un indicativo de la completa reducción del radical DPPH (SANDOVAL *et al.*, 2001). Los resultados se reportaron en función al Coeficiente de Inhibición (IC_{50}) expresado en μ g/ml.

b) Prueba del radical peróxilo

Se utilizó el método TRAP descrito por Bartoz *et al.*, (1998) modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001). Este método tiene como principio la inhibición de la peroxidación lipídica mediante el secuestro del radical peróxilo. Este radical tiene su origen a partir del radical ABTS. Las lecturas se registraron calibrando el espectrofotómetro a una absorbancia de 414 nm, el cambio en la coloración de verde oscuro a incoloro significa el secuestro integral del presente radical (SANDOVAL *et al.*, 2001). Los datos registrados fueron expresados mediante el Coeficiente de Inhibición (IC_{50}) en μ g/ml.

c) **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de IC₅₀ expresados en ug/ml fueron evaluados mediante el diseño en bloque completo al azar (DBCA) con arreglo factorial 4*2 (Anexo-I) siendo los niveles de significancia analizados de acuerdo a la prueba Tukey P < 0,01.

3.4.2. Atomizado de la muestra

Se utilizó el método reportado por SANDOVAL *et al.*, (1998); plantas medicinales. El objetivo principal del atomizado es la eliminación total del agua del alimento (SHARMA, *et al.* 2003).

3.4.3. Determinación del Contenido de Polifenoles Totales

Se realizó según el método de Folin-Ciocalteu reportado por SANDOVAL *et al.*, (2001). Esta prueba consiste en la lectura de la característica coloración azul que es causada por la reacción entre tugsato y molibdato en un medio básico (Na₂CO₃) acuoso a una absorbancia de 700 nm debido a que estos compuestos pueden ser identificados y cuantificados a esta longitud de onda (MARTÍNEZ, 2007). Los resultados se expresaron en equivalente de catequina/ g atomizado (eq.CAT/ g atomizado).

3.4.4. Cuantificación de Catequina mediante HPLC.

Esta prueba se realizo de acuerdo al método descrito por DING, *et al* (1999). La cuantificación del contenido de catequina se realizó en un ambiente a temperatura de 20°C mediante el sistema HPLC en fase reversa,

siendo separado por una gradiente. El eluente que se utilizo para este determinación consistió en agua, metanol y ácido acético en una proporción de 70:30:0.1 (v/v) respectivamente.

3.4.5. Análisis sensorial

Se utilizó la Prueba F de Snedecor Aplicada a una Categorización Cuantitativa Absoluta descrito por (UREÑA *et al.*, 1999). De esta manera se evaluó la intensidad de los atributos (color, olor y sabor).

3.5. Metodología experimental

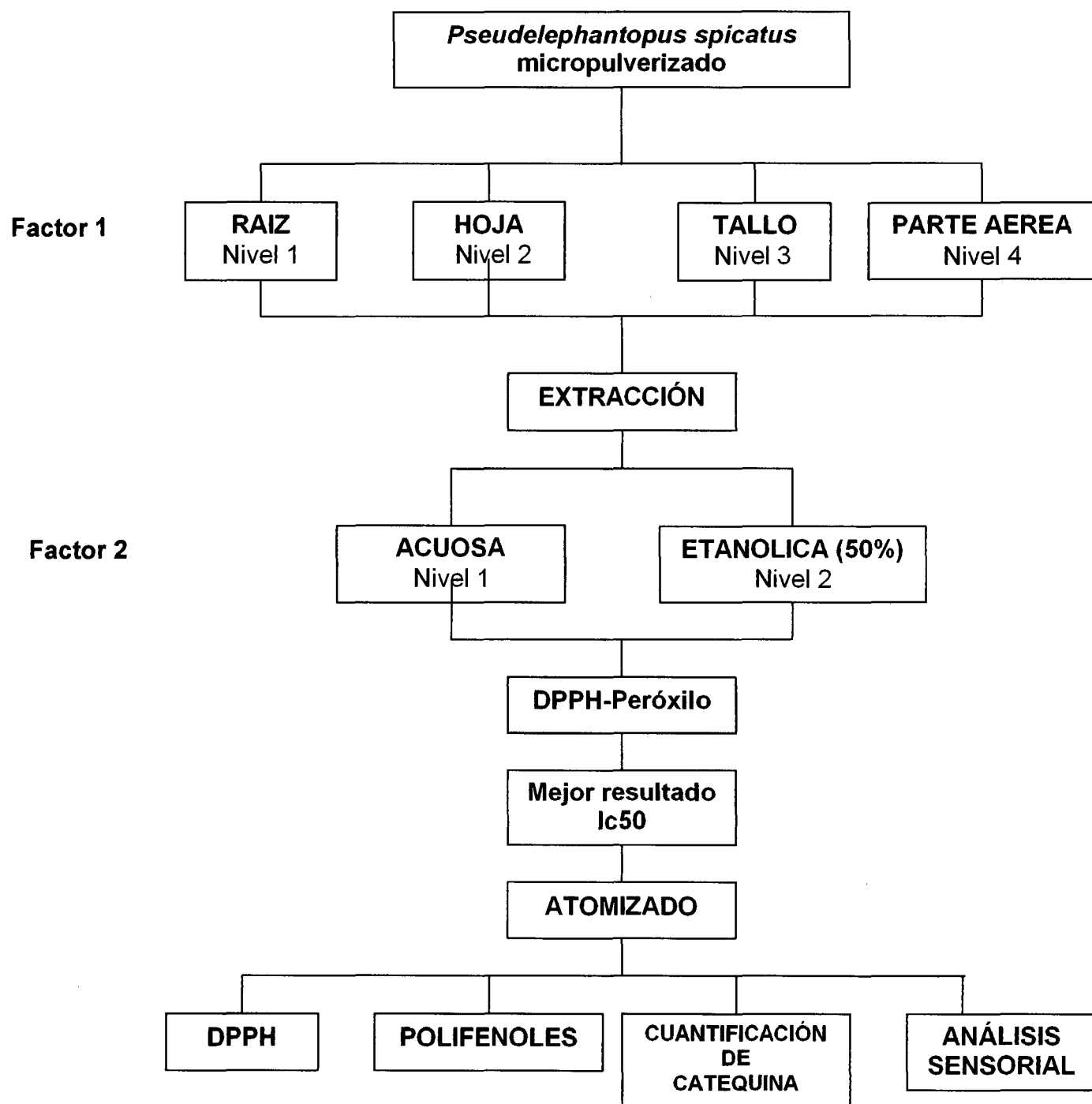


Figura 4. Metodología experimental a seguir para la obtención del producto atomizado y sus adicionales pruebas antioxidantes y sensoriales.

3.5.1. Micropulverización del *Pseudelephantopus spicatus*

Para obtener la micropulverización de las partes en estudio de esta planta se realizaron los siguientes pasos (Fig. 6):

- a) Acopio: Se recolectó a las plantas tiernas de esta especie. Las horas de recolección fueron de 7 a 9 la mañana.
- b) Selección: Se seleccionó cuidadosamente a la raíz, hojas, tallo y parte aérea de manera que no presenten daño mecánico con el objetivo de presentar un producto final de calidad.
- c) Lavado: Se hizo un lavado de cada una de las partes seleccionadas por inmersión en agua.
- d) Blanqueado: Las hojas recibieron un tratamiento térmico de 95 °C/ 10 segundos.
- e) Oreado: Las partes de la planta a estudiar fueron expuestas al medio ambiente por un tiempo de 1 a 2 horas.
- f) Secado: Esta operación consistió en poner las partes en estudio de la planta en la estufa a 65 °C/14-16 horas.
- g) Molienda: Se realizó utilizando un molino eléctrico.
- h) Envasado: Las partes de la planta en estudio se embolsaron cada una por separado para su almacenamiento a temperatura ambiente.

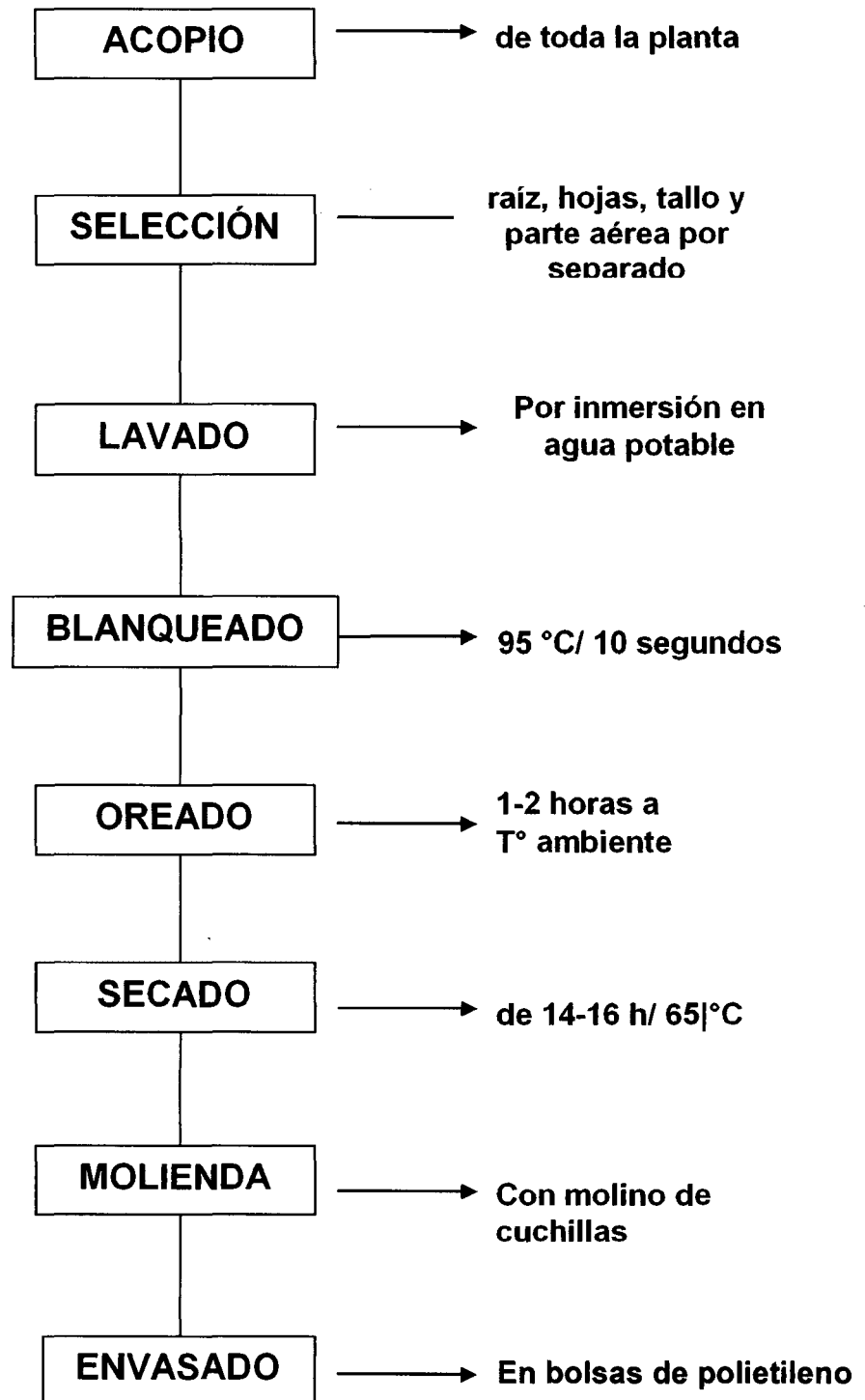


Figura 5. Operaciones seguidas para la obtención del producto micropulverizado.

3.5.2. Preparación de los extractos

Se realizaron dos tipos de extracciones y los solventes utilizados fueron: acuoso y etanólico (50%).

a) Extracto acuoso

- Se agregó 1 g de muestra seca en 10 ml de agua desionizada la cual resultó ser una solución de 100 mg/ml de concentración. Esta solución se sometió a temperatura de ebullición por un tiempo de 5 minutos.
- Seguidamente se filtró las muestras siendo el líquido filtrado adicionado en microtubos de 2000ul de capacidad que luego se centrifugo a 10000 rpm por un tiempo de 5 minutos a 4 °C.
- Finalmente se realizaron las diluciones respectivas para cada una de las pruebas de capacidad antioxidante.

b) Extracto etanólico (50%)

- En esta extracción se realizó de la misma forma que la anterior descrita con la diferencia de utilizar como solvente al etanol al 50% siendo el tiempo de maceración para este caso de 24 horas a temperatura ambiente.
- Posteriormente el sobrenadante se añadió en microtubos de 2000ul de capacidad para ser centrifugados a 10000 rpm por un tiempo de 5 minutos a 4 °C.
- Para finalmente realizar las diluciones respetivas para cada una de las pruebas de capacidad antioxidante.

3.5.3. Determinación de la Capacidad Antioxidante

a) Prueba del radical DPPH

Primeramente se pesó 0.008 gramos del radical DPPH para luego agregarlo a 20 ml de solución metanólica (96% pureza), obteniendo nuestra primera solución stock (1mM). Seguidamente esta mezcla fue sometida al vortex por un tiempo de 10 minutos con la finalidad de que tenga un adecuado homogenizado. A continuación se tomó 2 ml de esta primera solución stock y se añadió en 18 ml de metanol (96% pureza) resultando una segunda solución stock (100 uM). Paralelamente se preparó la solución estándar de las muestras teniendo un stock de 100 mg/ml. Para proseguir a la preparación de las siguientes concentraciones: 40, 12, 4, 1.2 y 0.4 mg/ml a las que llamaremos soluciones intermedias. Finalmente a partir de estas soluciones se tomó 25 ul para obtener las concentraciones finales de las muestras en estudio siendo 10, 30, 100, 300 y 1000 ug/ml las cuales fueron reaccionadas con la segunda solución stock del radical DPPH (100 uM) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Cantidades indicadas para la reacción entre la solución intermedia y del radical DPPH con respecto a las concentraciones finales.

Concentraciones (ug/ml)	Solución intermedia (ul)	*Radical DPPH (ul)	Volumen final (ul)
1000	25	975	1000
300	25	975	1000
100	25	975	1000
30	25	975	1000
10	25	975	1000

*Se encuentra a una concentración de 100uM.

La reacción se genero en una cubeta de poliestireno de (1cm x 1cm x 4.5cm) lugar donde se mezcló la cantidad de 25 ul de la muestra con 975 ul del radical DPPH para seguidamente proceder a su lectura cada 30 segundos por un tiempo de 10 minutos para lo cual se utilizó un espectrofotómetro de absorción molecular Termo Electrón Corporation calibrado a 515 nm. La capacidad de inhibición del radical DPPH se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = ((A_{\text{dpph}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{dpph}}) \times 100$$

Donde:

A_{dpph} = Absorbancia de radical DPPH

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra en estudio

b) Prueba del radical Peróxilo

Primeramente se preparó dos soluciones stock por separado conteniendo 0.225 mM de ABTS y 2 mM de ABAP las cuales fueron posteriormente adicionados en un buffer PBS conformado por 50 Mm de fosfato, 0.9% NaCL regulado a PH 7.4. Esta nueva solución fue sometida a tratamiento térmico, 70 °C por 20 minutos para seguidamente enfriarse sobre hielo. La relativa estabilidad del radical ABTS se da con la presencia del color verde. Paralelamente a esto se prepararon las respectivas soluciones intermedias que en este caso fueron de 12, 4, 1.2 y 0.04 ug/ml.

La inhibición del radical ABTS se determino a partir de la adición de 10 ul de cada una de las concentraciones de las soluciones intermedias disueltos en 990 ul de la solución stock del radical ABTS. (Cuadro 4).

Cuadro 3. Cantidades indicadas para la reacción entre la solución intermedia y el radical peróxilo en las concentraciones finales.

Concentraciones (ug/ml)	Solución Intermedia (ul)	Radical peróxil (ul)	Volumen final (ul)
300	10	990	1000
100	10	990	1000
30	10	990	1000

El decrecimiento en la absorbancia a 414 nm fue determinado con el registro de los datos cada 30 segundos por un tiempo de 10 minutos mediante el uso de un espectrofotómetro molecular Termo Electrón Corporation. El porcentaje de inhibición del radical ABTS fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición Peroxilo} = ((A_{\text{peroxilo}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{peroxilo}}) \times 100$$

Donde:

A_{peroxilo} = Absorbancia de radical peróxilo

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra en estudio

c) Coeficiente de Inhibición (IC₅₀)

Se determinó mediante el análisis de regresión del porcentaje (%) remanente de Inhibición versus la concentración de los extractos acuosos y etanólicos (50%) de cada una de las muestras en estudio necesarios para inhibir al 50% de radicales libres (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

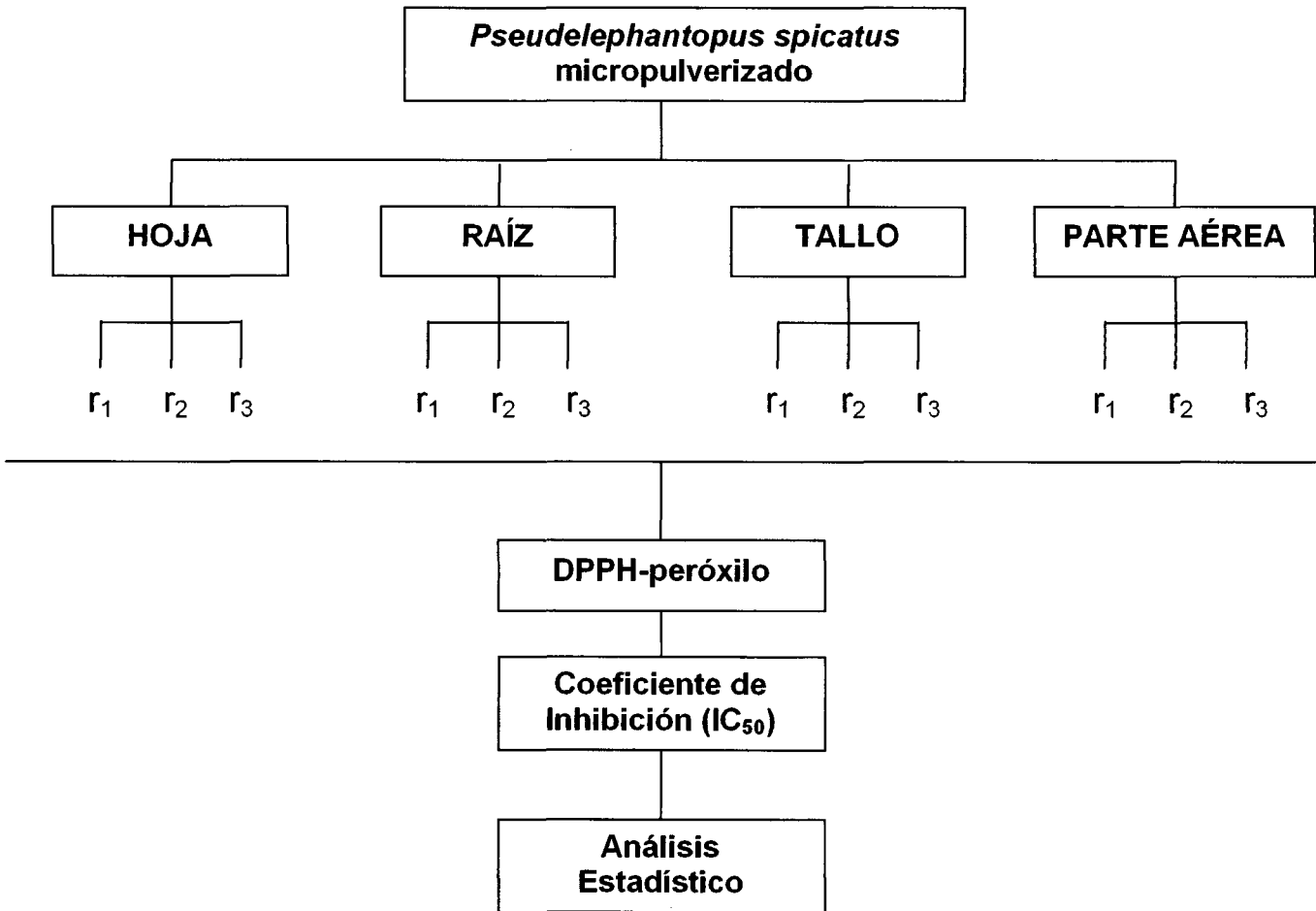


Figura 6. Diseño experimental para determinación del coeficiente de inhibición IC_{50} (ug/ml) de las muestras en estudio,

3.5.4. Atomización de la muestra

El proceso de atomización se describe a continuación:

- a) La parte aérea del *Pseudoelephantopus spicatus* fue secada a 65°C por un tiempo de 16 horas.
- b) Se procedió a realizar una molienda para lo cual se tuvo que utilizar un molino de martillo (acero inoxidable) con el objetivo de obtener una muestra homogénea de 0.5 cm de longitud.
- c) La proporción de muestra molida y agua fue de 1:10 respectivamente. Esta solución fue sometida a extracción acuosa por un tiempo de 75 °C por 6 horas.
- d) El material sólido fue desechado mientras que el extracto líquido seguidamente fue filtrado para obtener un tamaño granular de 150 micras en este caso se uso mallas de acero inoxidable.
- e) En el mismo sentido el extracto filtrado fue concentrado hasta obtenerse una relación de 10% sólidos totales

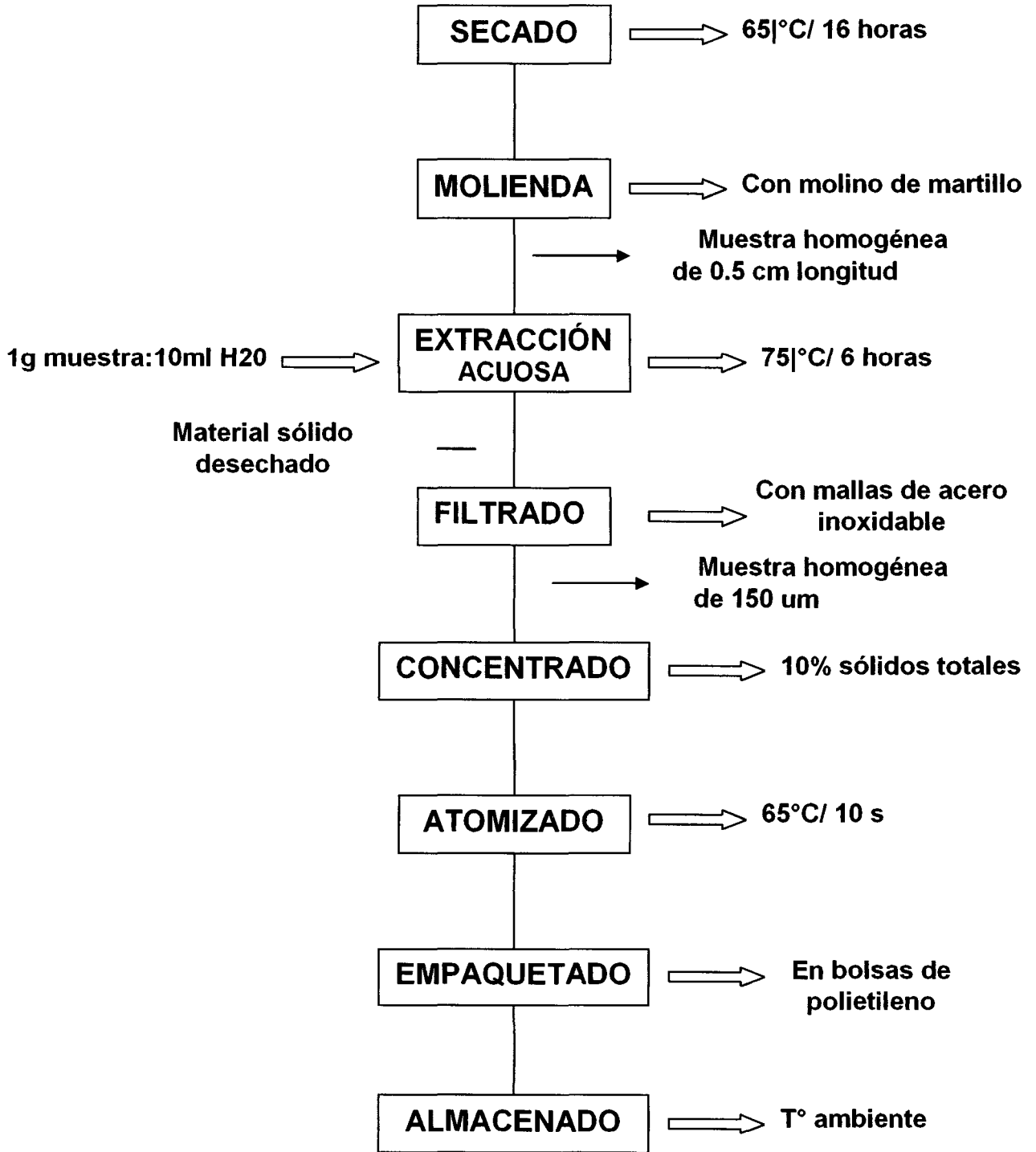


Figura 7. Flujograma para la obtención del producto atomizado.

A continuación se muestra la imagen de un atomizador en co-corriente con cada una de sus partes enumeradas, la explicación de estas se encuentra en la revisión bibliográfica referida a la misma.

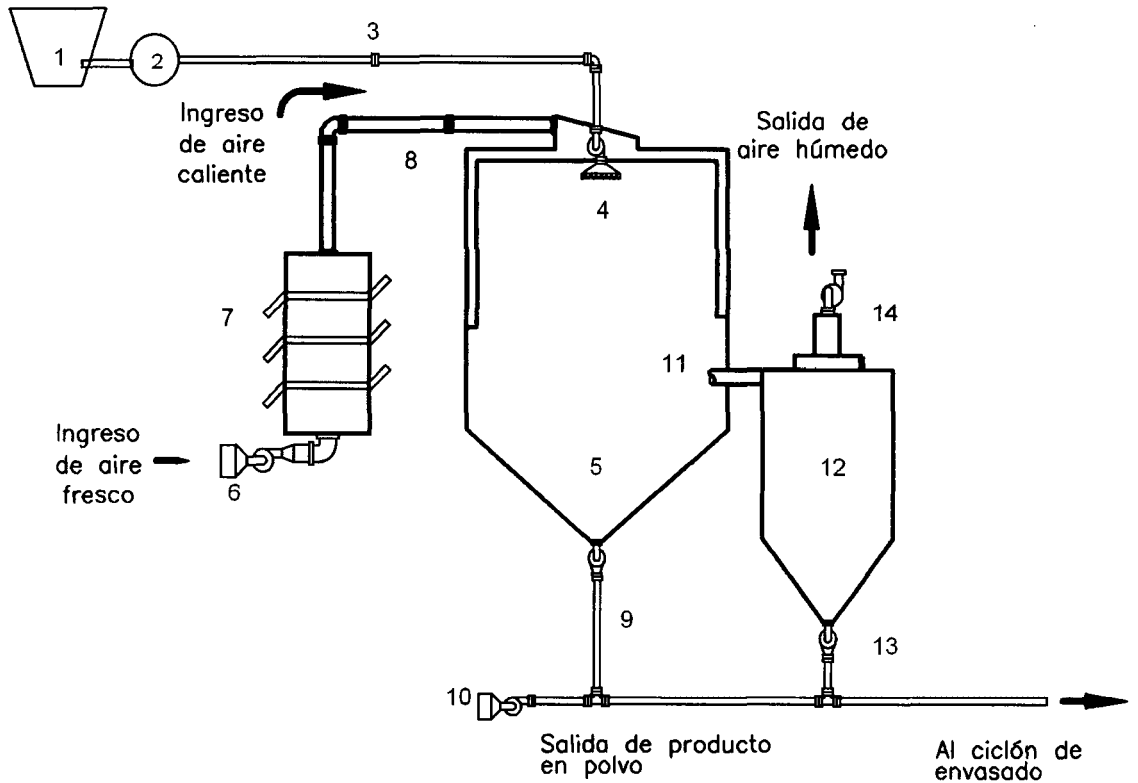


Figura 8. Esquema de un atomizador en co-corriente.

3.5.5. Prueba de Polifenoles Totales

La realización de esta prueba se explica detalladamente a continuación:

- a) Se preparó las siguientes soluciones stocks de (Na_2CO_3). al 20% en H_2O y (+)- catequina en metanol a 0.1 M a un volumen de 20 ml respectivamente para cada uno.
- b) Las concentraciones de catequina para la construcción de la curva estándar fue de 0, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 μM .
- c) Seguidamente se adicionó a cada tubo de ensayo 1.58 ml de agua destilada desionizada (H_2O), 300 μl de Na_2CO_3 y 20 μl del estándar (catequina).
- d) Luego se agregó 100 μl de solución de fenol Folin-Ciocalteu agitando ligeramente.
- e) Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente.
- f) Finalmente las absorbancias fueron registradas a 700 nm usando cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4.5 cm) en un espectrofotómetro (marca Genesys 10 UV/VIS).

Hay que recalcar que para el caso de los controles se agregó 20 μl de agua destilada desionizada (H_2O). En cuanto a los extractos se realizaron las diluciones necesarias con el objetivo de que la absorbancia se ubique en el rango de la curva estándar.

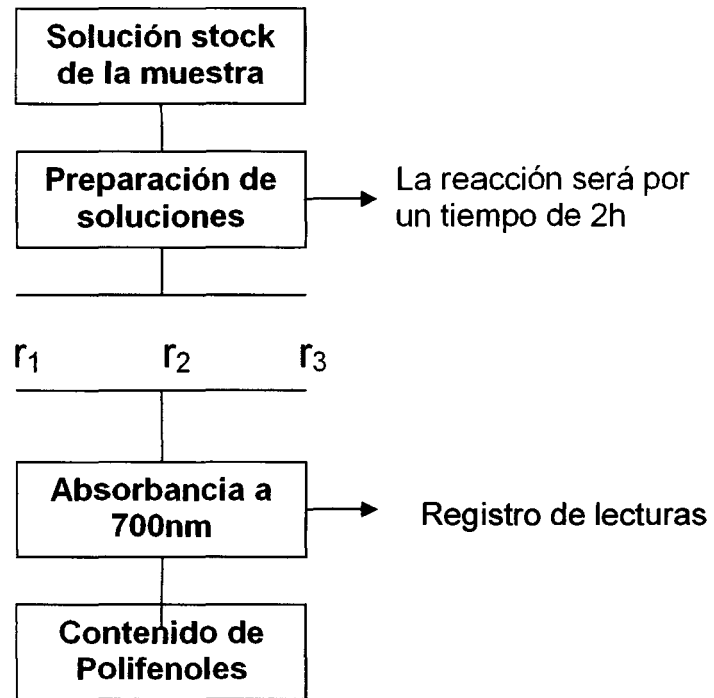


Figura 9. Flujograma para la obtención del contenido de polifenoles totales de la muestra atomizada.

3.5.6. Cuantificación de Catequina mediante HPLC

Esta prueba se divide en dos partes que se describen continuación:

a) Preparación de la muestra

Se agrego 1gr de la muestra atomizada a 10ml de agua desionizada resultando una solución stock de 100mg/ml. Esta solución se sometió a tratamiento térmico (temperatura de ebullición por un tiempo de 5 minutos).

Posteriormente se filtró con papel Whatman (20 μ m) y se centrifugó a (10000 r.p.m/10 min) a temperatura de 4°C. Se separo el sobrenadante nuevamente diluyendo 20 veces a partir la solución stock. Seguidamente esta segunda solución stock (5mg/ml) se filtro mediante una membrana de 0.45 μ m antes de ser inyectados al HPLC. Las alícuotas restantes se almacenaron a -20 °C para evitar el deterioro de las catequinas presentes en las muestras.

b) Preparación del estándar

La concentración de la muestra estándar de catequina que se utilizo fue de 1000 μ M esta se disolvió en agua de grado HPLC para posteriormente levantar la curva estándar, las concentraciones elegidas en este caso fueron de 50; 100; 200; 300 y 500 μ M. En el cuadro 8 se explica detalladamente la adición de los volúmenes respectivos para la obtención de cada una de estas concentraciones.

Cuadro 4. Cantidad de volúmenes adicionados para la obtención de cada una de las concentraciones.

Concentraciones uM (ug/ml)	*Catequina (ul)	Metanol HPLC (ul)	Volumen final (ul)
50	50	950	1000
100	100	900	1000
200	200	800	1000
300	300	700	1000
500	500	500	1000

*Se encuentra a una concentración de 1000uM.

El sistema HPLC trabajo en fase reversa a una temperatura ambiente mediante una separación por gradiente y los buffers utilizados en la fase móvil fueron agua, metanol y acido acético en una proporción de 70:30:0.1 (v/v) respectivamente. El volumen añadido de estándar o muestras al HPLC fue de 20 ul y se realizo mediante inyecciones. La absorbancia seleccionada para detectar el contenido de catequina fue de 270 nm.

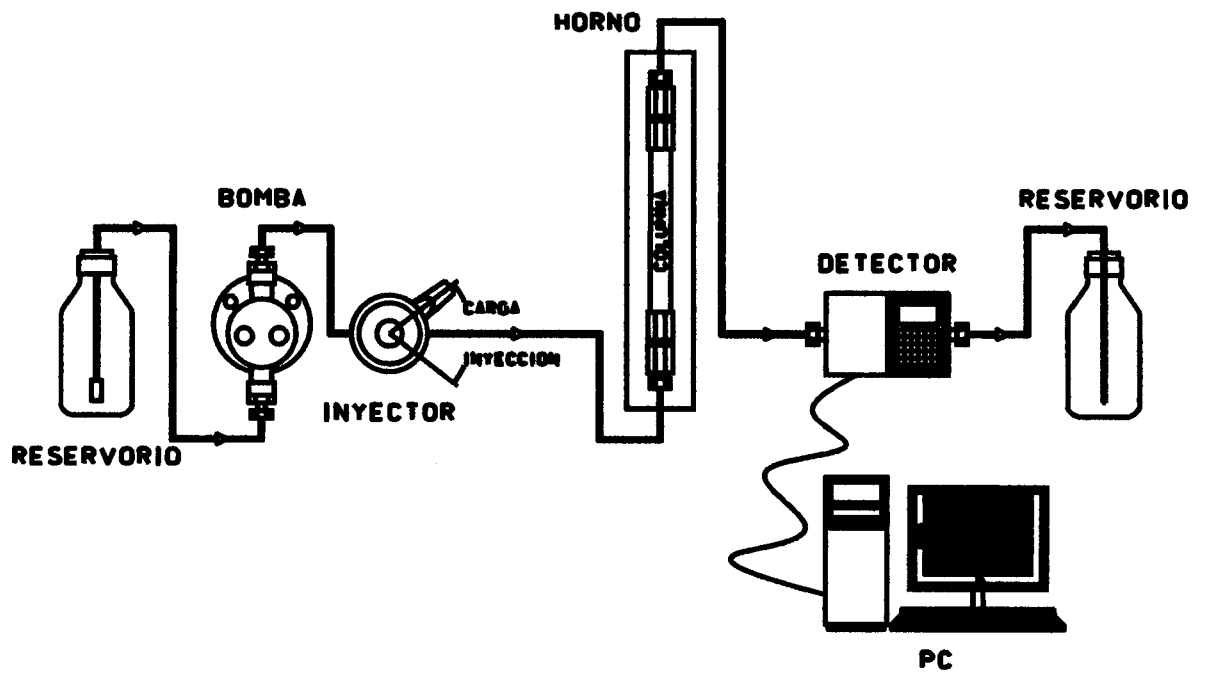


Figura 10. Imagen de las partes que componen el sistema HPLC.

3.5.7. Análisis sensorial

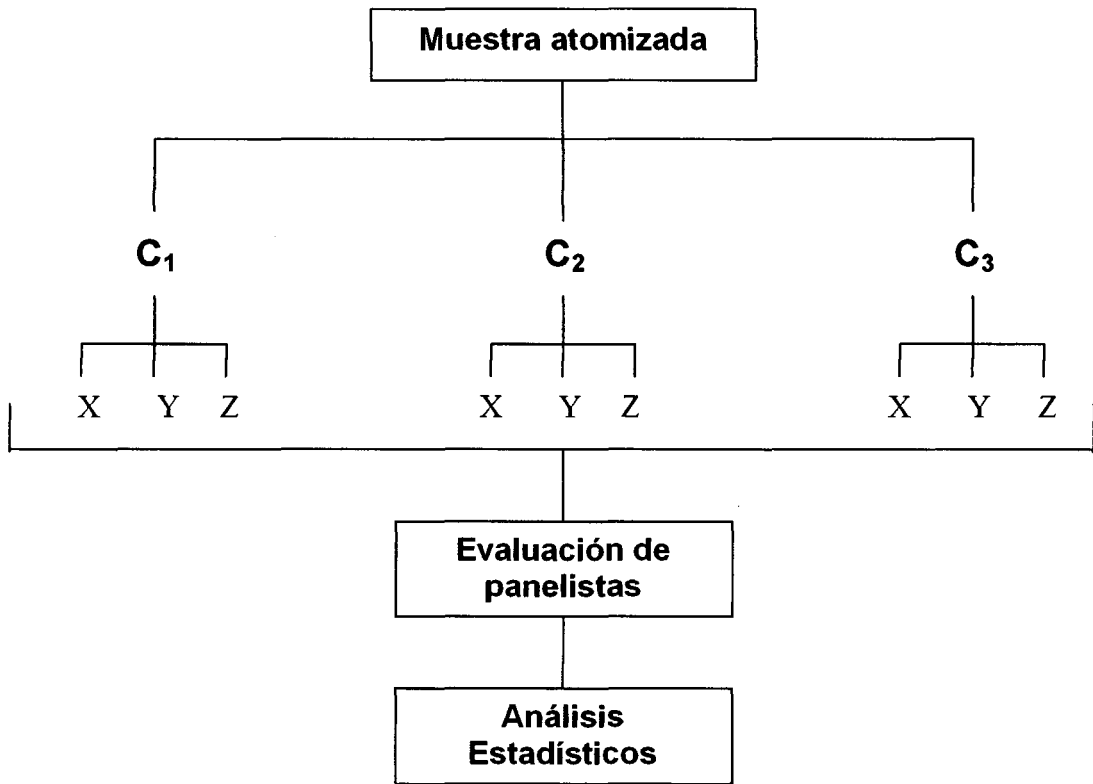
Se prepararon tres tipos de concentraciones: Las cuales fueron evaluadas por un total de 30 panelistas quienes determinaron la intensidad del sabor, color y olor de acuerdo a su juicio.

a) Preparación de la muestra

Primeramente se peso 150, 250 y 350 mg de la muestra atomizada para posteriormente adicionarlo en 100 ml de agua para consumo humano respectivamente. Estas soluciones nos dieron las concentraciones de 1.5, 2.5 y 3.5 mg/ml. Posteriormente se realizo un filtrado con el objetivo de separar algunas sustancias groseras y de esta manera tenga una mejor presentación frente a los panelistas.

b) Descripción de la prueba sensorial

La prueba de análisis sensorial a los tres atributos seleccionados tuvo lugar en el laboratorio de análisis sensorial en horas de la mañana. Se eligió un universo de 30 personas a las que se califico como panelistas no entrenados, a los cuales se les entrego una hoja de calificación (Anexo-V) para que dieran su veredicto. Los rangos establecidos fueron desde, me agrado muchísimo, me agrada mas o menos y me desagrada mucho con un puntaje de 10, 5 y 1 respectivamente.



X: olor
Y: sabor
Z: color
C₁:150mg/100ml
C₂:250mg/100ml
C₃:350mg/100ml

Figura 11. Diseño experimental para la prueba de análisis sensorial.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Radical DPPH

4.1.1. Capacidad antioxidante de acuerdo a la fisiología de la planta

Cuadro 5. Capacidad de Inhibición expresado en IC₅₀ (ug/ml) de los extractos acuosos y etanólicos frente al radical DPPH.

Partes de la Planta	Extracciones	
	Acuosa	Etanólica (50%)
Raíz	276.271±0.564 ^c	378.112±0.516 ^d
Hoja	207.131±0.574 ^b	418.654±1.950 ^f
Tallo	400.131±0.574 ^e	398.977±0.449 ^e
Parte aérea	413.687±1.698 ^f	124.246±1.260 ^a

El valor IC₅₀ es el promedio (n=3 + SE). Los superíndices diferentes indican la diferencia significativa p< 0.01

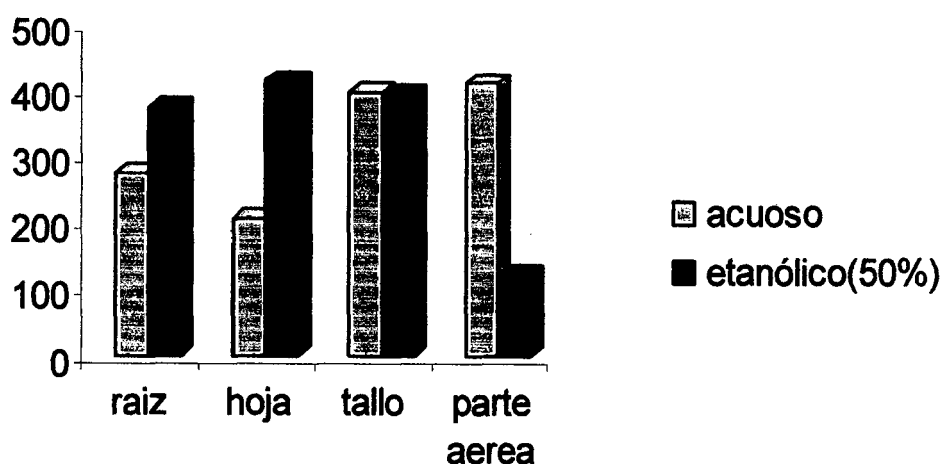


Figura 12. Eficacia de los extractos frente al radical DPPH.

Los resultados mostrados en el cuadro 5 y figura 12 señalan a la parte aérea mediante extracción etanólica (50%) como el fragmento con la mayor capacidad de inhibir al radical DPPH expresado en IC_{50} ($\mu g/ml$) y de acuerdo al análisis de varianza (Anexo-IIb) se puede advertir la presencia de diferencia significativa ($p < 0.01$) en cuanto a todas las secciones analizadas.

Es necesario acentuar que la parte aérea está conformado por la hoja y tallo, esta unión podría ser una la causa de su alto poder de inhibición siendo además la parte de la planta que tiene mayor exposición a luz solar, en ese sentido SALISBURY y ROSS, (2000) mencionan que la luz promueve la formación de flavonoides. POKORNY *et al.*, (2001) menciona que las hojas tienen un alto poder antioxidante debido a su contenido de flavonas y flavonoles que son los que capturan a los radicales libres aunque LARSON, (1998) indica que los mayores constituyentes son quercetina y myrectina, de igual manera todos estos grupos pertenecen al gran grupo de los Flavonoides al cual muchos autores lo señalan como el causante principal la capacidad antioxidante en varias especies de plantas.

Por otro lado una de las característica de esta planta es su rápida y predominante presencia en el lugar que se establece, esta singularidad podría darse a la presencia de galotaninos provenientes del ácido galico que tiene una capacidad alelopática de manera que inhibe el crecimiento de otras especies a su alrededor (SALISBURY y ROSS, 2000). En el mismo sentido se puede resaltar la presencia antioxidante de este mismo ácido ya que de acuerdo a GIAO *et al.*, (2009) el ácido gálico actúa protegiendo eficazmente a la bacteria

P22/ *Salmonella typhimurium* contra el daño oxidativo producido por el peróxido de hidrogeno.

Finalmente existen una variedad de pruebas antioxidantes a las que se les podría someter esta planta, una de ellas es la prueba de la capacidad de absorbanca del radical oxigeno mejor conocido por sus siglas en ingles como (ORAC) que es comúnmente aceptada para medir la capacidad antioxidante en nutraceuticos, farmaceuticos y alimentos procesados (HUANG *et al.* , 2002).

4.1.2. Capacidad Antioxidante con respecto a los tratamientos

Cuadro 6. Capacidad Antioxidante de los respectivos tratamientos expresado en IC₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH.

Tratamientos	Tipos de extracción	IC ₅₀ (ug/ml)
T1	raíz-extracto acuoso	276.271±0.564 ^c
T2	hoja-extracto acuoso	207.131±0.574 ^b
T3	tallo-extracto acuoso	400.131±0.574 ^e
T4	parte aérea-extracto acuoso	413.687±1.698 ^f
T5	raíz- extracto etanólico (50%)	378.112±0.516 ^d
T6	hoja- extracto etanólico (50%)	418.654±1.950 ^f
T7	tallo- extracto etanólico (50%)	398.977±0.449 ^e
T8	p. aérea- extracto etanólico (50%)	124.246±1.260 ^a

El valor IC₅₀ es el promedio (n=3 + SE). Los superíndices diferentes indican la diferencia significativa p< 0.01

Según el cuadro 7 y el análisis de varianza reportado en el Anexo-IId se puede afirmar la existencia de diferencia altamente significativa tanto para los diferentes tratamientos como para los tipos de solvente utilizados (Anexo-IIc). En consecuencia el tratamiento T8 correspondiente a la parte aérea se exhibió como la sección que posee la mayor capacidad de inhibir a los radicales DPPH y el solvente etanólico se comporto de manera mas activa. MURILLO *et al.*, (2007), menciona que la hoja del *Bauhinia Kalbreyeri* reporta un IC_{50} de 18,42 $\mu\text{g/ml}$ cabe subrayar que aunque esta hoja se extrajo también con etanol, en este caso se trabajo con el solvente en su más alto grado de pureza lo que podría influir en su valor de IC_{50} encontrado. Por otro lado la *Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook.f.exk.schum reporta valores IC_{50} de $48,378 \pm 5.291$; 50.12 ± 2.681 y $37,148 \pm 5.565$ $\mu\text{g/ml}$ para las horas de recolección de las 7 a.m., 12 p.m. y 5 p.m. respectivamente (DAZA, 2003). Estos resultados son superiores hasta 3.3 veces a la parte aérea del *Pseudelephantopus spicatus* demostrando que el solvente acetona/agua (70:30) resultó ser más activo, en el mismo sentido los pigmentos del *Attalea butyracea* extraídos con el solvente metanol reportaron un IC_{50} de 141.4 $\mu\text{g/ml}$ (GAVIRIA *et al.*, 2007). En este último caso nuestra muestra estudiada se comporto de manera más efectiva frente al radical DPPH.

Por lo visto los solventes etanólicos (50%) por lo general tienden a ser superiores en su actividad antioxidante frente a los acuosos. Este punto lo explica (MARTÍNEZ, 2007) quien menciona que los solventes mas polares (metanol, acetato y acetato de etilo) poseen la capacidad de donar hidrógenos con mucha facilidad influyendo directamente en su alta capacidad antioxidante.

En cuanto a los extractos acuosos el tratamiento T2 perteneciente a la parte de la hoja reporto un IC_{50} de 207.131 ± 0.574 ug/ml superior a los demás tratamientos pero inferior si lo comparamos con el mejor resultado IC_{50} de los extractos etanólicos (50%). Diversos autores mencionan que la parte de la hoja contiene una gran variedad de compuestos fenólicos pero es necesario advertir que las hojas al igual que las otras partes de la planta estudiadas fueron sometidas a un blanqueado y que la extracción acuosa se realizo a temperatura de ebullición por un tiempo de 10 minutos. Navarro *et al.*, (2006) mencionado por CARRIÓN, (2008) señala que las operaciones de escaldado, cocción y ebullición disminuyen el contenido de actividad y biodisponibilidad de los antioxidantes. En consecuencia se puede afirmar que los extractos acuosos están en desventaja frente a los etanólicos (50%).

Finalmente la absorbancia seleccionada para la prueba DPPH fue de 515nm diversas investigaciones reportan sus resultados en base esta longitud de onda. POKORNY, *et al.* (2001) menciona que el radical DPPH es captado a esta absorbancia indicando además que una serie de reacciones secundarias lentas van a influir para establecer el tiempo adecuado en la cual se va a determinar el IC_{50} . Este es un punto crítico en la investigación debido a que las diferentes muestras que reaccionan con este radical no se estabilizan al mismo tiempo. BRAND-WILLIAMS, *et al.* (1995) reporta en su investigación mediante este método que la muestra que se demoro mas en estabilizarse fue a 6 horas a partir del empiezo de la reacción. El tiempo en el cual se determino el IC_{50} para la presente investigación fue a 10 minutos, tiempo en el cual se estableció su máximo porcentaje de inhibición así como su respectivo valor IC_{50}

expresado en ug/ml para cada una de las partes en estudio. Sin embargo OZGEN, *et al.* (2006) manifiesta que con los compuestos estándares fenólicos, el tiempo de 10 minutos solo es un estimado y no hace representación al punto final de la oxidación. Ahora y volviendo al tema de la absorbancia MARTINEZ, *et al.* (2007) menciona que el radical DPPH absorbe a 515nm y disminuye esta absorbancia a partir de una reducción por un antioxidante proporcionando un índice para estimar la capacidad de este antioxidante para secuestrar a este radical.

4.2. Radical peróxido.

Cuadro 7. Capacidad de Inhibición expresado en IC₅₀ (ug/ml) de los extractos acuosos y etanólicos frente al radical peróxido.

Partes de la Planta	Extracciones	
	Acuosa	Etanólica (50%)
Raíz	46.920 ± 0.390 ^d	37.209 ± 0.069 ^{b c}
Hoja	251.599 ± 1.076 ^f	104.322 ± 1.710 ^e
Tallo	32.370 ± 0.705 ^{b e}	25.43 ± 1.398 ^a
Parte aérea	357.149 ± 0.734 ^g	39.17 ± 0.833 ^c

El valor IC₅₀ es el promedio (n=3 + SE). Los superíndices diferentes indican la diferencia significativa p < 0.01

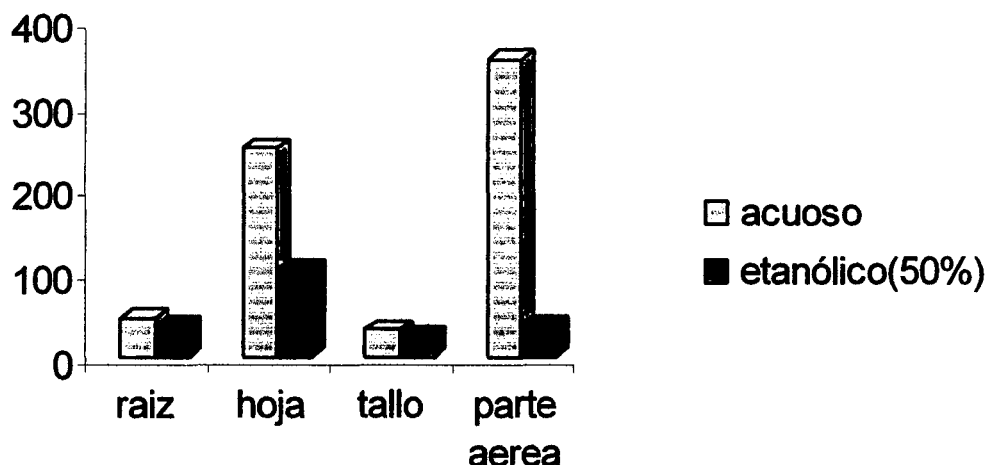


Figura 13. Eficacia de los extractos frente al radical peróxido.

Después de observar el Cuadro 8, la Figura 12 y los resultados del análisis de varianza (Anexo-IIIb) se puede anunciar a la parte del tallo como la sección de la planta que inhibió en mayor medida al 50% de los radicales peróxidos (IC_{50}) y también la existencia de diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en cuanto a las partes de la planta estudiadas respectivamente. Como se sabe la función principal del tallo es el de transporte de nutrientes (DEVLIN; 1980) pero si añadimos a esta situación la rigidez de la lignina en las paredes celulares del xilema y la formación de los anillos característicos de los flavonoides todo esto ocasionado por el estímulo de la luz (SALYSBURI y ROSS; 2000). Esto explica el paso de los nutrientes que llegan hasta la hoja y su alta capacidad de inhibición de radicales peróxido de esta parte de la planta. Además uno de los factores que influyen en la capacidad de una muestra es el lugar de donde se extrae así como el tiempo de la cosecha (OU *et al* ., 2002). Es necesario añadir que en la mayoría de los casos la parte seleccionada para el consumo de las personas es la raíz en forma de infusión y como se puede

apreciar en el cuadro 8 muy aparte de que exista diferencia significativa ($p < 0.01$) la variación entre los extractos acuosos y etanólicos (50%) no es demasiada amplia.

Cuadro 8. Capacidad Antioxidante de los diferentes tratamientos expresado en IC_{50} ug/ml frente al radical peróxilo.

Tratamientos	Tipos de extracción	IC_{50} (ug/ml)
T1	raíz-extracto acuoso	46.920 ± 0.390^d
T2	hoja-extracto acuoso	251.599 ± 1.076^f
T3	tallo-extracto acuoso	32.370 ± 0.705^b
T4	parte aérea-extracto acuoso	357.149 ± 0.734^g
T5	raíz- extracto etanólico (50%)	37.209 ± 0.069^{bc}
T6	hoja- extracto etanólico (50%)	104.322 ± 1.710^e
T7	tallo- extracto etanólico (50%)	25.43 ± 1.398^a
T8	p. aérea- extracto etanólico (50%)	39.17 ± 0.833^c

El valor IC_{50} es el promedio ($n=3 + SE$). Los superíndices diferentes indican la diferencia significativa $p < 0.01$

En lo que respecta a los tratamientos mostrados en el cuadro 8 se puede observar al T7 con la mayor capacidad de inhibir al 50% de radicales libres (IC_{50}) ug/ml seguido por el tratamiento T3 y T5 que son estadísticamente iguales añadiendo además que T5 y T8 tienen la misma igualdad estadística. Los resultados del análisis estadístico (Anexos-IIIc y III d) indican diferencia altamente significativa en cuanto a los métodos de extracción y tratamientos.

Como se puede apreciar en el cuadro 7 los solventes etanólicos (50%) vuelven a comportarse de manera mas activa frente a los acuosos.

MURILLO *et al.*, (2007) explica que la actividad antioxidante de algunos extractos polares se debe en parte a los grupos hidroxilos que contiene, los cuales ejercen su acción por donación de protones.

Por otro lado (VILLANUEVA, 2003) en sus estudios a los extractos acuosos de la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en sus tres estados: verde, pintón y maduro reporta valores IC_{50} de 12.21 ± 0.35 , 8.30 ± 0.85 y 14.39 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. De igual manera CARRIÓN (2008) reporta valores IC_{50} de $12,722 \pm 0.18$ y 11.375 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos acuoso y etanólico de la yema terminal de la guanábana, muestra originaria a partir de los 650 m.s.n.m que fue su primer nivel de análisis. Aunque estos resultados son superiores hay que tomar en cuenta que no existe una diferencia amplia con respecto al IC_{50} del extracto etanólico (50%) del tallo, mas aun si nuestra muestra estudiada es considerada como una maleza.

En sentido contrario la extracción acuosa nuevamente tiene un comportamiento menos efectivo frente a este radical, diversos estudios mediante este mismo tipo de extracción ratifican este comportamiento. PIÑEIRO (2005) en su investigación para la obtención de catequina mediante diversos tipos de solventes sometidas a una variedad de tratamientos térmicos reporta al solvente acuoso como el menos efectivo en cuanto a la obtención de este flavanol.

Aunque hay que recalcar que determinadas partes (raíz y tallo) sometidas a extracción acuosa reportan valores altos de IC_{50} . Estos resultados podrían tener su explicación en el tiempo del tratamiento térmico. Goh (2003)

citado por CARRIÓN (2008) indica que la liberación de antioxidantes en las hojas aumenta con el tiempo de calentamiento requiriéndose como máximo 15 minutos. El tiempo al que fue sometida las partes de nuestra planta en estudio fue de 10 minutos.

En cuanto a la absorbancia seleccionada para esta prueba SANDOVAL, *et al.* (2001) menciona que la oxidación producida por el radical ABTS tiene su máxima absorbancia a 414 nm. Por otro lado de acuerdo a las experiencias de trabajo en el laboratorio se puede afirmar que este radical es muy inestable además de reaccionar rápidamente al estar en contacto con la sustancias antioxidante. Según OZGEN, *et al.* (2006) la inestabilidad se debe al PH indicando que el PH 4.5 es el adecuado para determinar la capacidad antioxidante utilizando al radical ABTS. En lo referente a la rápida reacción Pokorny, *et al.*(2001) menciona que el ABTS es mas reactivo que el DPPH y que su reacción transcurre completamente en 1 minuto. Este tiempo de reacción podría estar influenciada por el tipo de muestra antioxidante, finalmente esta alta reactividad del presente radical influye directamente en la obtención del IC₅₀.

4.3. Extracto atomizado

Cuadro 9. Capacidad antioxidante de la muestra atomizada expresada en IC₅₀.

Muestra atomizado	IC ₅₀ (ug/ml)	% Inhibición
Parte aérea	10.31±0.31	89.90±1.63

El valor IC₅₀ es el promedio (n=3 + SE). El % de inhibición esta dado a 10ug/ml.

Como se observa en la figura 10, en el proceso de atomización la muestra después de ser sometida a una extracción acuosa es filtrada con el objetivo de separar los sólidos presentes y de esta manera el líquido restante ser conducido hacia el atomizador dando como resultado partículas muy finas y homogéneas.

BARBOSA-CANOVAS y VEGA-MERCADO (2000) mencionan que el producto que primeramente se encuentra en estado líquido es transformado en gotas y luego en partículas secas mediante un flujo de aire caliente. En el mismo sentido SHARMA *et al.*, (2003), indica que estas gotitas proporciona una extensa área superficial para la transferencia de calor y masa haciendo por lo tanto que el enfriamiento por evaporación, el tiempo de residencia corto mantienen una temperatura baja al producto dando como consecuencia un producto altamente concentrado en solutos. Esta teoría da la explicación del por que el IC_{50} obtenido del producto atomizado (10.13 ug/ml) según el cuadro10 y (Anexo-V) siendo su contenido IC_{50} similar al liofilizado de la *Uncaria Guianensis* pero siendo mayor con respecto *Uncaria Tomentosa* quienes reportan IC_{50} de 12.6 y 20.8 ug/ml respectivamente, ambas especies de uña de gato estudiadas por SANDOVAL *et al.*,. (2001).

4.4. Contenido de polifenoles totales

Cuadro 10. Contenido de Polifenoles de la muestra atomizado.

Muestra atomizado	Polifenoles (mg eqCat/g)
Parte aérea	68.08 ± 0.00

La mayoría de las especies vegetales poseen sustancias polifenolicas, la cantidad se puede deberse a la exposición a la luz. Se han realizado una serie de investigaciones para determinar la influencia de luz en la formación de los anillos A y B de los flavonoides llegándose a la conclusión de que la luz influye en la producción de ambos anillos (SALYSBURY y ROSS; 2000). Este mismo autor confirma esta versión al evaluar el contenido de polifenoles en manzanas expuestas al sol frente a las que estaban en la sombra, determino que la influencia de la luz es fundamental para la actuación de la enzima *chalcona sintasa* que es precursor de los anillos A y B, anteriormente mencionados.

Entonces llegamos a la conclusión de que la luz solo acelera la acción de la enzima *chalcona sintasa* pero no al origen de la formación de estos compuestos polifenólicos en las plantas. SALYSBURI y ROSS (2000) mencionan que estos compuestos se componen siguiendo la ruta del acido shikímico donde predominan dos compuestos fosforilados básicos. Aunque esta afirmación en cierta manera es refutada por PIÑEIRO, (2005) indicando que para la acumulación de estos compuestos polifenólicos como productos finales es necesario tener en cuenta los azucares naturales propios de la planta

que posteriormente van a seguir dos rutas bioquímicas, la del shikímico y acetato creándose una ruta intermedia entre ellas que es la que genera una gran cantidad de flavonoides. Ahora el mecanismo de absorción de estos compuestos antioxidantes esta aun en estudio. WALLE (2004), menciona que las reacciones biológicas de los flavonoides que se ingieren en la dieta en forma de glicósidos es altamente complejo y depende de un alto número de procesos.

Otro punto a resaltar es la temperatura de extracción porque de todas maneras influye en el contenido final de polifenoles totales sabiéndose que todos los productos de origen natural sufren la pérdida de sus compuestos bioactivos aunque también es necesario para la inhibición de algunas enzimas que van a degradar a los polifenoles (POKORNY *et al.*, 2001). En base a estos puntos PIÑEIRO (2005) señala que la temperatura de extracción es un factor crítico ya que esta es selectiva y además rompe la unión del analito a encontrar con la matriz.

El contenido de polifenoles totales encontrados en el producto atomizado fue 68 mg eq.CAT/g atomizado (Cuadro 11). RUIZ (2004) en sus estudios a la hierba Luisa (*Cymbopogon citratos staph*) reporta un contenido de 1.018 g de AGE/100g del mismo modo RAMOS (2005) encontró que el contenido de polifenoles totales del matico (*Piper aduncum*) recolectadas de seis diferentes lugares en la provincia de Leoncio Prado estuvo entre 2.44 ± 0.06 a 4.94 ± 0.05 mgcat/g seca mientras que CAMUSSONI y CARNEVALLI (2004) mencionan que el contenido promedio de polifenoles en los vinos tintos

argentinos es 1906 mgAGE/l. Observando todos estos resultados se puede afirmar que la muestra atomizada se presenta como un excelente poseedor de polifenoles frente a las especies de hierba luisa y matico pero siendo superado muy largamente por el contenido de los vinos tintos argentinos. Por otro lado MARTÍNEZ (2007) menciona que la cantidad de polifenoles totales encontrados en las semillas del *heliocarpus terebinthinaceus* reportaron una cantidad de: 111.59, 128.87, 65.18 mgAGE/g para los extractos con Acetato de Etilo, Acetona y Metanol respectivamente. Estos reportes indican que los extractos trabajados con los dos primeros solventes tienen en su haber una alta presencia de polifenoles totales llegando incluso a ser el doble con respecto a la muestra atomizada. MARTÍNEZ (2007) resalta a la acetona como el compuesto que tiene la capacidad de donar con mayor facilidad hidrógenos además de presentar una alta polaridad debido a su estructura.

En consecuencia es recomendable consumir alimentos con un alto contenido de polifenoles los cuales en su mayoría son frutas y vegetales.

Finalmente POKORNY *et al.*, (2001) menciona que la presencia de polifenoles en la dieta humana resulta de mucha importancia ya que aparte de ser un excelente captador de radicales libres se desempeña con mucha eficacia contra el dimero NF-KB que es el que controla la expresión de los genes en la arteriosclerosis. En consecuencia es recomendable consumir alimentos con un alto contenido de polifenoles los cuales en su mayoría son frutas y vegetales.

De igual manera que en las anteriores pruebas antioxidantes la longitud de onda a la cual se trabaja es fundamental. Diversos autores reportan sus investigaciones en base al contenido de polifenoles totales con una absorbancia entre 700 y 750 nm. MARTINEZ (2007) expresa que los polifenoles se oxidan fácilmente con el Molibdato formando oxido de Molibdeno el cual origina una coloración azul siendo detectado a una absorbancia de 750 nm. En nuestro caso la determinación del contenido de polifenoles fue a una absorbancia de 700 nm. Finalmente la cantidad de polifenoles esta relacionado directamente con los grupos hidroxilos que posee en su estructura el compuesto fenólico predominante (OZGEN, *et al.* 2008).

4.5. Cuantificación de catequina mediante HPLC

Cuadro 11. Contenido de catequina de la muestra atomizada.

Muestra atomizado	Catequina (mgCat/g)
Parte aérea	6.343± 0.013

Dato expresado de acuerdo al promedio de tres repeticiones

El cuadro reporta a la parte aérea atomizada mediante extracción acuosa con una cantidad de 6.343 ± 0.013 mg cat/ g atomizado. La *Uncaria Tomentosa* y *Guianensis* contienen $8,47 \pm 0.1$ y 5.53 ± 0.07 de mg cat/g liofilizado respectivamente para cada una de ellas (SANDOVAL *et al.*, 2001). Confrontando estos resultados se puede afirmar que el contenido de catequina de la muestra atomizada siendo aun considerada como una maleza es muy aceptable ya que se sitúa entre las dos especies de uña de gato.

Por otro lado LIN *et al.*, (1998) mencionado por RAMOS (2002) en sus estudios a varios productos de te verde chino y japonés resalta a *Bei-Jing Mo-Li-Hua* y *Osaka-Fu* con $22,18 \pm 0.97$ y 8.92 ± 0.86 mg catequina/100mg de hoja seca, siendo los de mayor y menor contenido de catequina respectivamente. La primera especie de te mencionada resulta ser superior respecto a la muestra atomizada mientras que en cuanto a la presencia de catequina en la segunda variedad se puede mencionar que su contenido es similar. En el mismo sentido las especies de te verde *Xin-yang-mao-jian* y *Yunnan-lu-cha* reportaron un excelente contenido de catequina con un total de 14.44 y 12, 69 mg / 100g de hoja seca frente a las demás variedades de te oolong y negro estudiadas CHEN *et al.*, (2001) mencionado por el mismo RAMOS (2002). Para este caso la muestra atomizada equiparándolo con los otros tipos de te oolong y negro ostenta una cifra superior de catequina siendo solamente sobrepasado por las dos especies de te verde.

Finalmente es necesario mencionar que una de las variantes que influyen en el contenido de catequina del extracto atomizado se puede deber a que el tratamiento térmico se realizó en presencia de oxígeno. (PIÑEIRO, 2005) menciona que las catequinas son compuestos fácilmente oxidables en presencia de oxígeno de igual manera agrega que la temperatura influye considerablemente sobre la selectividad que puede tener el fluido extractante.

Por otro lado cabe señalar que la absorbancia referente a esta prueba es más selectiva y específica. De acuerdo a DING, *et al.*(1999) la catequina se absorbió de una mejor manera a 210 nm y que a lecturas diferentes a esta, otros compuestos presentes en la muestra atomizado podrían

interferir para determinar el contenido final de esta especie de flavonoides. PINEIRO, (2005) se manifiesta de manera diferente indicando que la catequina tiene su máximo punto de emisión a 320 nm y de excitación a 290 nm.

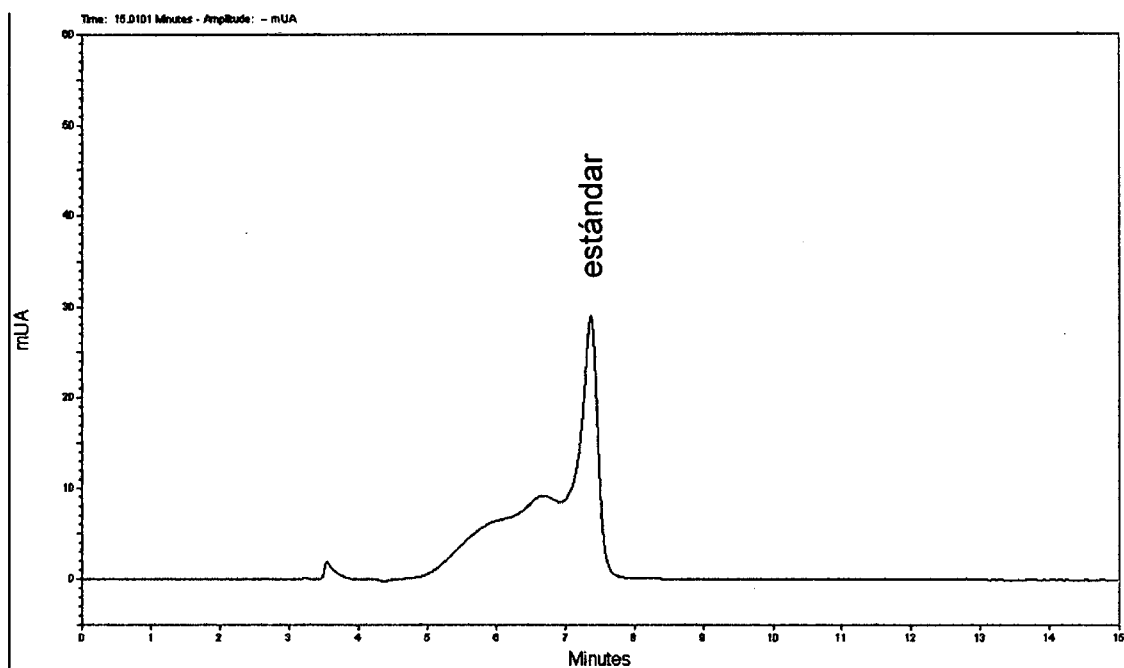


Figura 14. Cromatograma de la muestra estándar de Catequina.

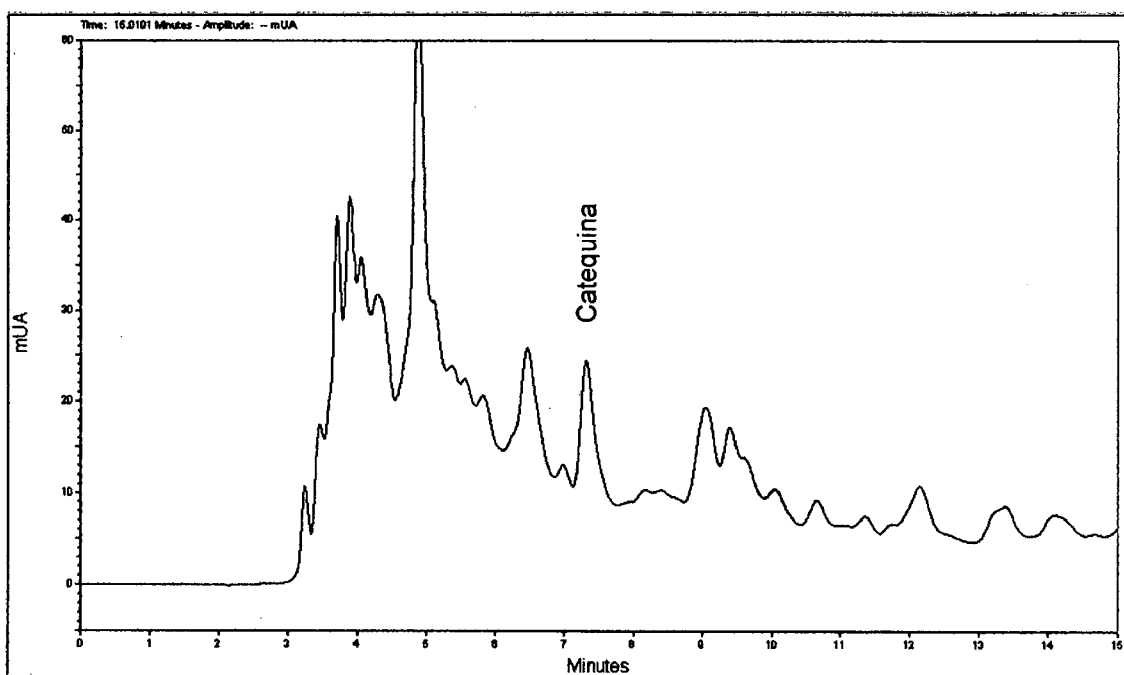


Figura 15. Cromatograma de la muestra atomizada analizada.

4.6. Análisis Sensorial

4.6.1. Atributo Sabor

Cuadro 12. Resultados del análisis estadístico con respecto al atributo sabor.

* Evaluaciones	Promedio
C₁ (1.5mg/ml)	6.647± 1.846^a
C₂ (2.5mg/ml)	6.093± 2.175^{ab}
C₃ (3.5mg/ml)	4.550± 3.617^b

* La formulación de las concentraciones se detallan en la metodología de análisis sensorial.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza (Anexo-IXa) mostraron diferencia significativa ($p < 0.01$) con respecto al promedio de las opiniones expresadas por el total de los panelistas mientras que los datos presentados en el cuadro 12 indican a las concentraciones C1 y C2 como estadísticamente iguales existiendo solamente diferencia entre C1 y C3. VARGAS (1999) encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a las diferentes mezclas de uña de gato y jarabe simple presentadas como bebida siendo las formulaciones con 0.05% de extracto concentrado y 58, 56% Brix las que se reportaron con mayor aceptabilidad por parte de los panelistas. Del mismo modo QUISPE (2003) menciona la existencia de diferencia altamente significativa para los diferentes tratamientos, reportándose como el mejor tratamiento a la sustitución con 60% de manteca de palma y 75% de agua. Por otro lado MIRANDA *et al.*, (2007) indica que la población encuestada devolvió un valor promedio de 6 correspondiente a la categoría “Me gusta mucho” en

cuanto a su bebida fermentada. Este valor es semejante a los tratamientos C1 y C2 según el cuadro 12 estando muy cerca del rango “Me gusta mas o menos”.

4.6.2. Atributo olor

Cuadro 13. Resultados de los análisis estadísticas con respecto al atributo olor.

* Evaluaciones	Promedio
C₁ (1.5mg/ml)	6.487± 2.935^a
C₂ (2.5mg/ml)	6.413± 2.249^a
C₃ (3.5mg/ml)	6.193± 2.466^a

* La formulación de las concentraciones se detallan en la metodología de análisis sensorial.

Los resultados presentados en el Anexo-IXb con respecto al análisis de varianza reportan la no presencia de diferencia significativa concerniente a este atributo. De igual manera ARCILA y MENDOZA; (2006) y QUISPE (2003) no encontraron diferencia significativa con respecto a los resultados conseguidos del integro de panelistas que evaluaron esta particular característica en sus trabajos sobre Elaboración de una bebida instantánea a base de semillas de amaranto y Helado con sustitución parcial de manteca de cerdo, respectivamente. Muy por el contrario RAMOS (2002) menciona la presencia de diferencia significativa para las diferentes formulaciones de una bebida a base de te verde y hierba luisa siendo la mezcla con la misma cantidad de ambos ingredientes como el de mayor acogida.

4.6.3. Atributo color

Cuadro 14. Resultados de los análisis estadísticas con respecto al atributo color.

* Evaluaciones	Promedio
C₁ (1.5mg/ml)	6.537±1.938^a
C₂ (2.5mg/ml)	6.242 ± 2.608^a
C₃ (3.5mg/ml)	6.447 ±3.102^a

* La formulación de las concentraciones se detallan en la metodología de análisis sensorial.

De acuerdo a RAMOS (2002) en lo que atañe a esta categoría evaluada reporta diferencia significativa ($p < 0.05$) para las diferentes formulaciones de una bebida a base de te verde y Hierba Luisa. Este resultado difiere de los datos conseguidos a partir del análisis de varianza (Anexo-IXc) en el cual declara la no existencia de diferencia significativa, en el mismo sentido QUISPE (2003) resalta la presencia de esta misma diferencia no significativa en lo correspondiente a su prueba de Elaboración de Helados con sustitución de manteca de cerdo en cuatro diferentes tratamientos. De igual manera ARCILA y MENDOZA (2006) mencionan igual significancia en lo concerniente a esta misma categoría evaluada en cuanto a sus diferentes formulaciones. Por otro lado el color distintivo de nuestra bebida expuesta resulto ser marrón RAMOS (2002) añade que este particular se debe a la oxidación de las catequinas.

V. CONCLUSIONES

- La capacidad antioxidante de la raíz, hoja, tallo y parte aérea expresada en IC_{50} ug/ml mediante extracción acuosa frente al radical DPPH fueron los siguientes: 276.271 ± 0.564 , 207.131 ± 0.574 , 400.131 ± 0.574 , 413.687 ± 1.698 ug/ml y en cuanto al peróxido fueron: 46.920 ± 0.390 , 251.599 ± 1.076 , 32.370 ± 0.705 , 357.149 ± 0.734 ug/ml respectivamente.
- Por otro lado la capacidad antioxidante expresada en IC_{50} ug/ml de las mismas muestras pero mediante extracción etanólica al (50%) frente al radical DPPH resultaron: 378.112 ± 0.516 , 418.654 ± 1.950 , 398.977 ± 0.449 , 124.246 ± 1.260 ug/ml y con respecto al radical peróxido se reportaron los siguientes: 37.209 ± 0.069 , 104.322 ± 1.710 , 25.43 ± 1.398 , 39.17 ± 0.833 respectivamente para cada una de ellas.
- El extracto etanólico (50%) se comportó como el más activo.
- Se realizó el proceso de atomizado a la parte aérea de la planta, eligiéndola por su fácil recolección y económica.
- El valor IC_{50} del producto atomizado fue de $10,13 \pm 0.30$ ug/ml.
- El contenido de polifenoles totales expresado en mg eq Cat/g atomizado fue 68.08.

- La cuantificación de catequina mediante el sistema HPLC fue de 6.34 ± 1.034 mg cat/g atomizado.
- En cuanto al análisis sensorial, las pruebas concernientes a los atributos de sabor, color y olor del producto atomizado expresaron diferencia significativa en cuanto al primer atributo y no presencia de diferencia significativa en cuanto a los restantes.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar el respectivo análisis toxicológico in vivo en animales de laboratorio (ratones y cuyes) para descartar la presencia de compuestos nocivos.
- Determinar la composición específica de otros compuestos polifenólicos mediante el sistema HPLC.
- Evaluar la capacidad antioxidante frente a otros radicales libres como el anión superóxido e hidroxilo.
- Evaluar la capacidad de retardar la oxidación lipídica en alimentos grasos.

VII. ABSTRACT

The present research was developed in the Research Center of Natural Products of the Amazonía (CIPNA) – UNAS. The objectives were to determine the antioxidant capacity in the root, leaf, stem and aerial part opposite to the radical DPPH and peróxilo by means of watery extraction and etanólica (50 %); determine the solvent with more active behavior; realize a process of atomization to the organ of the plant with best antioxidant capacity; determine the IC50 (ug/ml) of the atomized product; evaluate the content of total polyphenols and quantification of catequina in the atomized and to realize the sensory analysis. The used raw material they were plants of *Pseudoelephantopus spicatus*. The results were expressed as mean \pm SEM, for statistical analysis was used the design complete block at random (DBCA) with arrangement factorial and the Tukey test ($p < 0,05$). The antioxidant capacity of the root, leaf, stem and aerial part by aqueous by means of watery extraction opposite to the radical DPPH it was (276.271 \pm 0.564, 207.131 \pm 0.574, 400.131 \pm 0.574, 413.687 \pm 1.698 ug/ml) and the peróxilo (46.920 \pm 0.390, 251.599 \pm 1.076, 32.370 \pm 0.705, 357.149 \pm 0.734 ug/ml); the antioxidant capacity by extraction etanólica (50 %) opposite to the radical DPPH was (378.112 \pm 0.516, 418.654 \pm 1.950, 398.977 \pm 0.449, 124.246 \pm 1.260 ug/ml) and

the peróxido (37.209 ± 0.069 , 104.322 ± 1.710 , 25.43 ± 1.398 , 39.17 ± 0.833); the extract etanólico (50%) was the most active; It was realized atomized to the air part, atomized product IC50 value ($10,13 \pm 0.30$ ug/ml); the content of total poliphenols (6.34 ± 1.034 mg cat/g); the quantification of catequina (6.34 ± 1.034 mg cat/g); in the sensory analysis, the tests of the attribute flavor presented significant difference but not the color and smell.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARCILA, N., MENDOZA, Y. 2006. Elaboración de una bebida instantánea a base de amarantos (*Amarantus cruentus*) y su uso potencial en la alimentación humana. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Carabobo. Venezuela. Pág. 8, 9.
2. AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. Universidad de Concepción .Honduras .1-6 p.
3. BARBOSA-CÁNOVAS, G., VEGA-MERCADO, H. 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial acribia. Zaragoza-España. Pág. 165.
4. BRAND-WILLANS, E., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Laboratorio de Chimie des Subssantaces Naturalles-Departement Science de l'Aliment. France. Pág. 26.
5. BIBLIOTECA ENCARTA. 2005. [EN LINEA]: WWW.encarta.com/xilema.

6. BOVERIS, A. 2005. La Evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. Academia Iberoamericana de Farmacia. España .85-95p.
7. CAMUSSONI, G., CARNEVALI, E. 2004. Determinación comparativa del contenido de polifenoles en vinos tintos de origen argentino. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Mendoza. Argentina. Pág. 157
8. CÉSPEDES, M.E., Rodríguez, C.K., Lopez, J.N., CRUZ, N. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. Rev. Cubana Invest. Biomédica 19 (3):186-90 p.
9. DAZA, E. 2004. Tesis "Polifenoles Totales y capacidad antioxidante en *Calycophyllum Spruceanum* (Benth) Hook. f.exk.schum "Capirona". Tesis para optar el título de ingeniero en Recursos Naturales. Tingo María- Perú. Pág.33, 34, 37,38.
- 10.DE LUIS, D., ALLER, R.2008. Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. An. Med. Interna (Madrid) Vol. 25, Nº 3, pp. 105-107.
- 11.DEVLIN, R. 1980. Fisiología vegetal. Ediciones Omega. Barcelona España. Pág. 296-301.

12. DING, M., YANG, H., XIAO, S. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reverse-phase column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 849, (1999) 637-640.
13. ESPINOZA, N. 2005. Vigencia de las Universidades Públicas del Perú. Konigraf y Cia. S.A.C. Lima- Perú. Pág. 13, 15, 18.
14. ESTELO, Q. 2003. Tesis "Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante de dos especies de Chanca Piedra". Tesis para optar el Título de Ingeniero en Recursos Naturales .Tingo María-Perú. Pág. 35-39.
15. ESTRELLA. S. 2002. Actividad antioxidante del extracto Acuoso de cedron (*Aloysia tripartita*) en diferentes modelos in Vitro. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias Tingo María- Perú. 45p.
16. GARCIA, L., GARCIA, L., ROJO, D., SANCHEZ, E. 2001. Planta con propiedades Antioxidantes. *Rev. Cubana invest. Biomédica* 20(3):231-5p.
17. GAVIRIA, C., CIFUENTES, O., MONSALVE, C., ROJANO, B. 2007. Actividad Antioxidante de los Extractos Metanólicos de la *Attalea Butyracea*. *Scientia Et Technica*, /vol. XIII, 033.pp297-298.
18. GIAO, M., BORGES, A., GUEDES, C., HOGG, T., PINTADO, M., MALCATA, X. 2009. Determination of antioxidant capacity using the

biological system bacteriophage P22/ bacterium *salmonella typhimurium*. J. Agric. Food Chem. 57, 22-25.

19. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODIL, M., FLANAGAN, J., PRIOR, R. 2002. High-Troughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J. Agric. Food Chem. 50, 4437-4444.
20. ISSA, H.H., CHANG, S.M., YANG, Y.I., CHANG, F.R., Wu, Y.C. 2006. New sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Pseudoelephantopus spicatus*. Japón. Chem Pharm Bull (Tokyo); 54(11):1599-601pag.
21. LIN, C.C., Yen, M.H., Chiu, H.F. 1991. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (IV): The effects of *Elephantopus scaber* subsp. *Oblanceolata*, *E. mollis* and *Pseudoelephantopus spicatus*. Taiwan. Am J Chin Med, 19(1):41-50 pág.
22. MARTINEZ, J. 2007. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Extractos Orgánicos de Semillas de *heliocarpus terenbinthinaceus*. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Alimentos. Oaxaca-México. Pág. 34
23. MELCHOR, V. 2001 Procesamiento Tecnología ara la obtención de Te Verde; Determinación de su Actividad Antioxidante y Cuantificación de Flavanoles por HPLC. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María- Perú. Pág. 44-45.

24. MIRANDA, O; LUIS, P; ISELA, P; CEDEÑO, C ; SAM, L ; MARTÍ, L. 2007. Elaboración de bebida fermentada a partir de una bebida del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. Rev. Cubana invest. Nutr; 17(2):103-108.
25. MOSQUERA, O., Niño, J., Correa, Y., Buitrago, D. 2005. Estandarización del Método de captura de los radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Colombia. Scientia et Técnica año XI; N0 27.231-234 p.
26. MURILLO, E., LOMBO, O., TIQUE, M., MÉNDEZ, J. 2007. Potencial oxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). Universidad Del Tolima, facultad de ciencias, departamento de química, grupo de investigación de productos Naturales, Departamento de Biología y Ibaqué. Vol. 18. N°6. Tolima – Colombia PP 12-56
27. OTERO, R., NUNEZ, V., BARONE, J., FONNEGRA, R., JIMENEZ, S.L., OSORIO, R., SALDARRIAGA, M., DÍAZ, A. s/d. Snakebites and Ethnobotany in the Northwest región of Colombia. Part III: neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Colombia. J Ethnopharmacol, 73(1-2):233-41p.
28. OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J., DEEMER, E. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric

reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J. Agric. Food Chem. 50, 3122-3128.

29. OZGEN, M., WYZGOSKI, F., ARTEMIO, T., APARNA, G., MILLER, R., SCHEERENS, J., NEIL REESE, R., WRIGHT, S. 2008. Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. HortScience 43(7):2039-2047.

30. OZGEN, M., NEIL REESE, R., ARTEMIO, T., SCHEERENS, J., MILLER, R. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. J. Agric. Food Chem. 54, 1151-1157.

31. PINEIRO, Z., 2007. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Memoria para optar el grado de Doctora en Ciencias Químicas. Cádiz. España. Pág. 15, 17, 21, 160, 164, 182.

32. PRAKASH, A. 2001. Antioxidant Activity. Medallion laboratories Analytical Progress .Minnesota. 1-6 p.

33. POKORNY, J., NEDYALKA, Y; MICHAEL. G. 2001. Antioxidante de los alimentos. editorial Acribia. Zaragoza- España. Pág. 70.

34. QUISPE, J. 2003. Elaboración de helados con sustitución parcial de crema de leche y leche fluida por manteca de palma comercial y agua. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNAS. Tingo María. Perú. Pág. 92-94.
35. RAGASA, C., Rideout, J. 2001. An Antifungal Cadinanolide from *Pseudelephantopus spicatus*. Chem. Pharm. Bull. 49(10) 1359-1361p.
36. RAMOS, D. 2002. Tesis "Diseño y Evaluación de la capacidad antioxidante in Vitro de una bebida en base a te verde (*Camellia sinensis*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph)". Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María-Perú. Pág. 10, 15, 37, 64, 72.
37. RAMOS, M., 2005. Evaluación de la capacidad antioxidante del matico (*piper sp*) en el trópico. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María. Perú. Pág. 32.
38. REATEGUI, D. 2003. Composición Física Química y Actividad Antioxidante del Agua de dos Variedades de Coco (*Coco nucifera L*). Tesis para optar el Título de ingeniero en industrias Alimentarias. Tingo María-Perú. Pág. 58.
39. RUIZ, I. 2004. Tesis "Actividad antioxidante, Polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa (*Cympogogan citratus* Staph), y su

estabilidad en bebidas modelo". Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María-Perú. Pág. 52.

40. SAGASTEGUI, A., LEIVA, G. 1993. Flora Invasora de los Cultivos del Perú. Editorial Libertad. Trujillo- Perú. Pág. 295-297.
41. SANDOVAL, M., OKHAMA, N., ANGELES, F. 2001. Técnicas de Investigación para determinar la Actividad Antioxidativa y Antiflamatoria de Planta Medicinales de la Amazonia.
42. SALISBURY, F., CLEON, R. 2000. Fisiología de las Plantas 2. Bioquímica vegetal. Editorial Thompson .España. Pág. 463-469.
43. SHARMA, S., MULVANEY, S., RIZVI, S. 2003. INGENIERIA DE ALIMENTOS Operaciones Unitarias y Prácticas de Laboratorio. Editorial Limusa, S. A. México D.F. Pág. 205.
44. UNITED STATES DEPARTEMENT OF AGRICULTURE. 2007. [EN LINEA] WWW.usda.gov.
45. TSEI, C.C., LIN, C.C., 1999. Anti-inflammatory effects of Taiwan folk medicine "Teng-Khia-U" on carrageenan-and adjuvant-induced paw edema in rats. Taiwan. J. Ethnopharmacol, 64(1):85-9p.
46. UREÑA, P., ARRIGO, G. 1999. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Editorial Agraria. Lima. Perú. 139p.

47. VARGAS, J., 1999. Obtención de extracto de uña de gato (*Uncaria Tomentosa* WILL D.C) y su aplicación en una bebida carbonatada. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María. Perú. Pág. 105.
48. VELÁSQUEZ, P.M., Prieto, G.B., CONTRERAS, P.R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias 75 julio-setiembre. Mexico. 37-43p.
49. VILLANUEVA, J. 2001. Antiocianina, Acido Ascórbico, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camu Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K.). Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Tingo María- Perú. Pág. 47.
50. WALLE, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Biology & Medicin Vol.26. N°. 7. pp. 829-837.

VIII. ANEXOS

Anexo-I. Muestra del diseño en bloque completo al azar (DBCA) con arreglo factorial utilizado para las pruebas DPPH y peróxido.

a. Distribución de los factores y niveles para su codificación

Factor	Niveles	Símbolo	código
a	Raíz	1	a1
	Hoja	2	a2
	Tallo	3	a3
	Parte aérea	4	a4
b	Agua	1	b1
	Etanol (50%)	2	b2

b. Descripción del emparejamiento de los factores y niveles mediante su codificación.

Partes/solvente	Agua	Etanol (50%)
Raíz	a1b1	a1b2
Hoja	a2b1	a2b2
Tallo	a3b1	a3b2
Parte aérea	a4b1	a4b2

Anexo-II. Análisis estadístico con respecto a la prueba DPPH.

a. Análisis de varianza de acuerdo a las partes de la planta y solvente.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig
Parte	3	53025.23	17675.07	3809.89	**
Solvente	1	202,4029	202,4029	43,6283	**
Parte*solvente	3	208429,14	69476,38	14975,76	**
Error	16	74,228057	4,639253		
Total	23	261731,018			

b. Múltiple comparación de los promedio IC₅₀ para las partes de la planta.

Partes	Promedio	sig
Raíz	327.19	c
Hoja	312.66	b
Tallo	399.55	d
Parte aérea	268,97	a

c. Múltiple comparación de las medias de los tipos de extractos.

Solvente	Media	sig
Agua	324.1891	a
Etanol (50%)	329.9972	b

d. múltiple comparación de los tratamientos por IC₅₀.

Tratamiento	parte	extracción	IC ₅₀	sig
4*2	p. aérea	etanólica (50%)	124.25	a
2*1	hoja	etanólica (50%)	206.67	b
1*1	raíz	acuoso	276.27	c
1*2	raíz	etanólico (50%)	378.11	d
3*1	tallo	acuoso	398.98	e
3*2	tallo	etanólico (50%)	400.13	e
4*1	p. aérea	acuoso	413.69	f
2*2	hoja	etanólico (50%)	418.65	f

Anexo-III. Análisis estadístico con respecto a la prueba peróxido.

a. Análisis de varianza de acuerdo a las partes de la planta y solvente.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig
Parte	3	141422,641	47140,880	15864,099	**
Solvente	1	87089,8114	87089,811	29307,926	**
Parte*solvente	3	97326,5044	32442,168	10917,611	**
Error	16	47,5447133	2.9715445		
Total	23	325886,501			

b. Múltiple comparación de los promedio IC₅₀ para las partes de la planta.

Partes	Promedio	sig
Raíz	42,066	b
Hoja	177,960	c
Tallo	28,9	a
Parte aérea	198,159	d

c. Múltiple comparación de las medias de los tipos de extractos.

Solvente	Media	sig
Agua	172,0106	a
Etanol (50%)	51,53258	b

d. múltiple comparación de los tratamientos por IC₅₀.


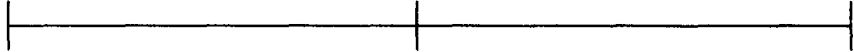

Tratamiento	parte	extracción	IC ₅₀	sig
3*2	tallo	etanólico (50%)	24,43	a
3*1	tallo	acuoso	32,37	b
1*2	raíz	etanólico (50%)	37,208	bc
4*2	p. aérea	etanólico (50%)	39,17	c
1*1	raíz	acuoso	46,92	d
2*2	hoja	etanólico (50%)	104,321	e
2*1	hoja	acuoso	251,599	f
4*1	p. aérea	etanólico (50%)	357,149	g

Anexo-IV. Hoja de calificación para la prueba de análisis sensorial.

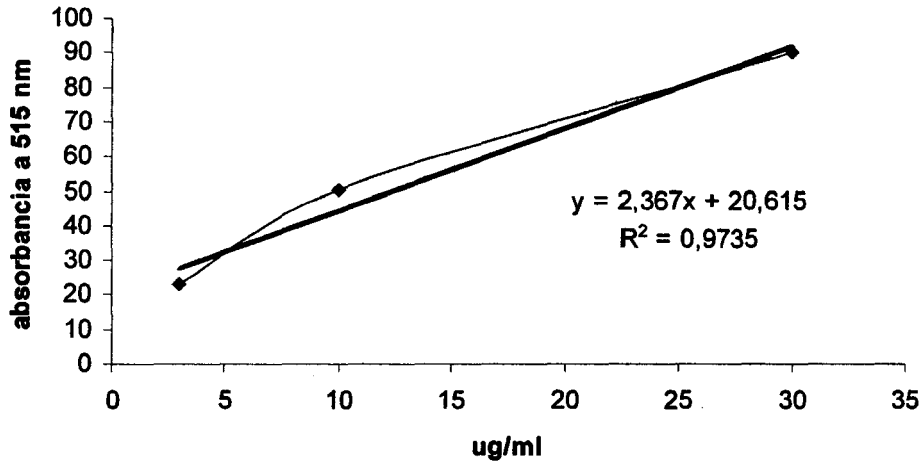
Nombre del juez: _____ Fecha: _____

Muestra evaluada: *bebida filtrante a partir del atomizado del Pseudoelephantos spicatus*

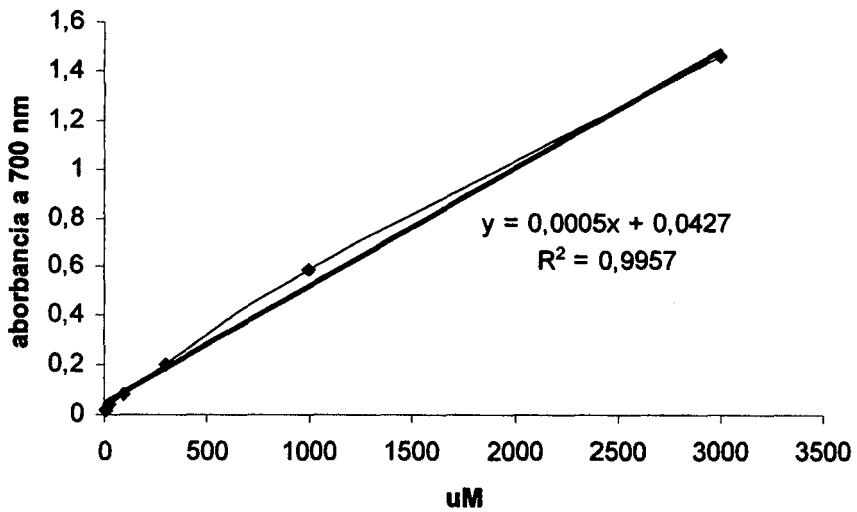
Marque con un aspa (X) sobre la línea de acuerdo a su juicio para cada uno de acuerdo a los atributos organolépticos

Escala	Me desagrada Muchísimo	Me agrada mas o menos	Me agrada muchísimo
Sabor			
Olor			
Color			

Anexo V. Curva para el cálculo del coeficiente de Inhibición IC_{50} de la muestra atomizada.

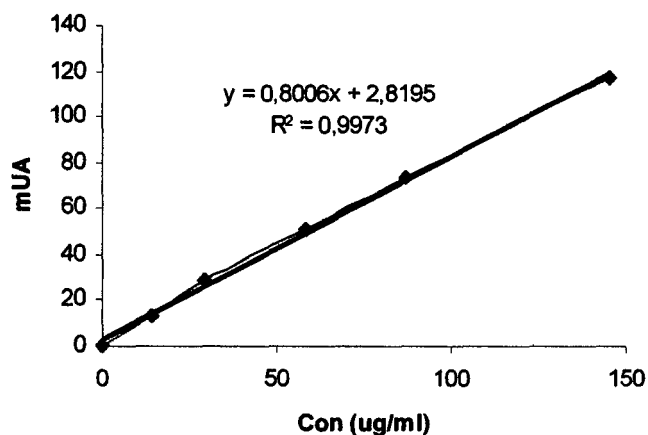
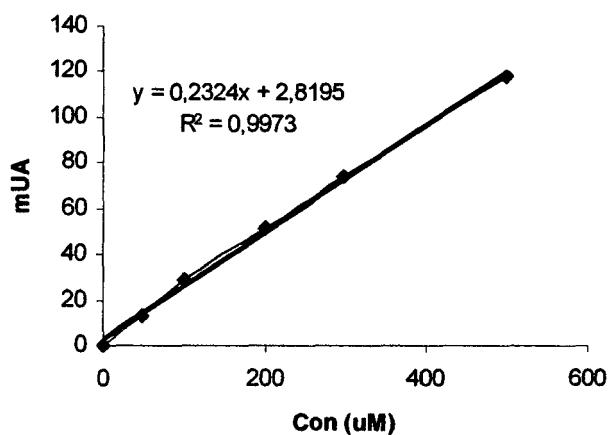


Anexo-VI. Curva de calibración para cuantificar polifenoles totales.



Anexo-VII. Curva de calibración para la cuantificación de catequina mediante el sistema HPLC.

Curva de calibración Estándar					
Niveles	uM	ug/ml	Área	mUA	tr
0	0	0	0	0	0
1	50	14.515	173175	13.284	7.363
2	100	29.03	377015	28.978	7.362
3	200	58.06	662806	51.256	7.360
4	300	87.09	934858	73.440	7.358
5	500	145.15	1520176	117.249	7.362



Análisis de catequina de la parte aérea atomizada

Muestra atomizada	F.D.	Área	mUA	tr	mgCat/gatom
Acuoso-01	15	243839	36.700	7.192	6.3478
Acuoso-02	15	245998	36.785	7.19	6.3637
Acuoso-03	15	255400	36.543	7.187	6.3184
Promedio					6.3433
SD					0.0230
SE					0.0132

Anexo-VIII. Análisis de varianza con respecto a las pruebas de análisis sensorial.

a. atributo sabor.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig
Tratamiento	2	70.840	35.420	5.0054	0.0087
Error experimental	87	615.643	7.0764		
Total	89	686.489			

b. atributo olor.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig
Tratamiento	2	1.3982	0.6991	0.1061	0.8994
Error experimental	87	573.068	6.5869		
Total	89	574.466			

c. atributo color.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig
Tratamiento	2	1.3715	0.6857	0.1019	0.9032
Error experimental	87	585.387	6.7285		
Total	89	586.756			