

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS TECNOLOGÍA**  
**E INGENIERIA DE ALIMENTOS**



**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ACUOSO, ETANOLICO  
Y ELABORACION DE UNA BEBIDA FUNCIONAL DE HOJAS DE  
CASHAUASCA (*Serjania cf. rubicaulis Benth*).**

**Tesis:**

**Para Optar el Título de:**

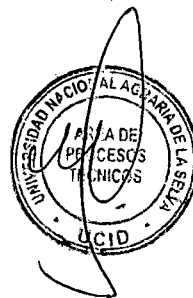
**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**CAMASCA PIÑAN, OMAR**

**PROMOCIÓN 2010 - I**

**Tingo María – Perú**

**2012**



**Q02**

**C22**

**Camasca Piñan, Omar**

Capacidad antioxidante de los extractos acuoso, etanólico y elaboración de una bebida funcional de hojas de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth). Tingo María 2012

78 páginas; 13 cuadros; 11 fgrs.; 76 ref.; 30 cm.

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

**1. APICAL**

**2. BASAL**

**3. ANTIOXIDANTE**

**4. BEBIDA**

**5. CASHAHUASCA**

**6. FITOQUÍMICO**



**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 04 de julio de 2012, a horas 6:30 p.m. en la Sala de Grados 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. **CAMASCA PIÑAN, Omar**, titulada:

### **“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ACUOSO, ETANOLICO Y ELABORACION DE UNA BEBIDA FUNCIONAL DE HOJAS DE CASHAHUASCA (*Serjania cf. rubicaulis* Benth)”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **BUENO**; 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 de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 05 de julio de 2012

.....  
Ing. M.Sc. Gunter Daza Rengifo  
Presidente

.....  
Ing. Lauriano Zavaleta de La Cruz  
Miembro

.....  
Ing. Jaime Basilio Atencio  
Miembro

.....  
Dr. Pedro Peláez Sánchez  
Asesor

## **DEDICATORIA**

A **Dios** todo poderoso por darme la vida y la salud; a mi padre **Eugenio**

**C. Camasca Escalante** por ser un ejemplo de superación y guía en  
cada momento de mi existencia.

A mi madre y amiga **Mirza Piñan Rodriguez,**

con todo mi amor, por apoyarme

incondicionalmente y por sus consejos durante el

proceso de mi carrera profesional.

A mis hermanos: **Pedro Luis, Grimanesa, Ugo Gerson y Mirza**

**Gabriela** por su cariño y que nuestra unidad nunca se rompa; a mis tios

**Elda y F. Hugo Escalante Pelaez** por ser un ejemplo a seguir.

## **AGRADECIMIENTO**

- Al Dr. Pedro Pablo Pelaez Sanchez, Asesor, por su valiosa colaboración en la investigación y su apoyo incondicional en la culminación de la tesis.
- Al Ing. Davy W. Hidalgo Chávez, por sus orientaciones, enseñanzas durante el desarrollo y redacción de la tesis.
- A la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez, por su apoyo y enseñanzas durante la investigación.
- Al técnico Carlos Salazar, por el apoyo incondicional durante el proceso de la investigación.
- A los Ing. Gabriel Kant Panduro, Evil Vargas Piñan, Magaly Canal Salazar y María de Guadalupe Díaz por su ayuda durante el desarrollo de la investigación.
- A mis amigos, Alicia Palomino, Frank Mejia, Pierina Hurtado, Victor Mora, Evert Vasquez, Candy Rios, Roberto Del castillo, Adrian Sevillano y a todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.

## RESUMEN

La presente investigación permitió desarrollar el conocimiento científico de hojas de Cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth), planta que crece en la amazonía peruana. Los objetivos fueron caracterizar química y fitoquímicamente, evaluar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos, etanólicos y elaborar una bebida funcional. El análisis de capacidad antioxidante se determinó por el métodos de BRAND-WILLIAMS et al. (1995). En el análisis estadístico se empleó el DCA con arreglo factorial 3A2B, con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) y el software STATGRAPHICS centurión XV. II. La composición química fue variada, la hoja apical presento los mayores contenidos de humedad (78,53 %), proteína (22,38 %), grasa (4,44 %) y carbohidratos (49,73 %); la hoja medio presento el mayor contenido de fibra (26,37 %) y la hoja basal presento el mayor contenido de ceniza (8,63 %). La composición fitoquímica en los tres estadíos fue similar, presentando alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, quinonas y glicosidos. El extracto acuoso de la hoja, del estadío medio, presento la mejor capacidad antioxidante frente al radical DPPH con  $IC_{50}$   $25,25 \pm 0,010$   $\mu\text{g/mL}$ , AAI  $1,545 \pm 0,0006$   $\mu\text{g DPPH}/\mu\text{g}$  muestra y para el catión  $ABTS^{\circ+}$  con  $IC_{50}$   $19,98 \pm 0,005$   $\mu\text{g/ml}$ , TEAC  $715,42 \pm 0,26$   $\mu\text{mol trolox/g}$  muestra. La bebida funcional de 125,00 mg/ml, fue la mejor calificada en los atributos sensoriales olor y color, además obtuvo un contenido de polifenoles totales  $89,64 \pm 1,16$  mg AG/100 ml,

caracterizándose por tener una capacidad antioxidante mayor en 114,45 frente al radical DPPH y 144,64 frente al radical ABTS<sup>o+</sup>, considerando el valor IC<sub>50</sub> respectivamente.

**Palabras Claves:** Apical, basal, antioxidante, bebida, cashahuasca, fitoquímico.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos generales de la cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth).....	3
2.1.1 Morfología.....	3
2.1.2 Taxonomía.....	5
2.2 Compuestos bioactivos .....	5
2.2.1 Metabolitos secundarios frecuentes en las plantas .....	6
2.3 Antioxidantes .....	7
2.3.1 Clasificación de los antioxidantes .....	8
2.3.1.1 Antioxidantes endógenos .....	8
2.3.1.2 Antioxidantes exógenos.....	8
2.3.2 Función de los antioxidantes .....	12
2.4 Radicales libres .....	12
2.4.1 Determinación de la capacidad antioxidante .....	13
2.4.1.1 Prueba del radical 1,1 difenil - 2 - picril – hidrazil (DPPH).....	13
2.4.1.2 Prueba del TEAC o radical 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS <sup>o+</sup> ).....	14



2.4.2	Determinación de los polifenoles totales .....	17
2.4.2.1	Prueba Folin - Ciocalteu .....	17
2.5	Alimentos funcionales con efecto antioxidante .....	18
III	MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1	Lugar de ejecución .....	21
3.2	Material biológico.....	21
3.3	Equipos, materiales y reactivos .....	22
3.3.1	Equipos de laboratorio.....	22
3.3.2	Materiales de laboratorio .....	23
3.3.3	Reactivos y solventes.....	24
3.4	Métodos de análisis.....	24
3.4.1	Análisis químico.....	24
3.4.2	Análisis fitoquímicos .....	25
3.4.3	Evaluación de la capacidad antioxidante.....	25
3.4.4	Caracterización de la bebida funcional obtenida por la hoja de la cashahuasca.....	25
3.4.4.1	Análisis sensorial .....	25
3.4.4.2	Caracterización fisicoquímica .....	25
3.4.4.3	Cuantificación de polifenoles totales .....	26
3.5	Metodología experimental .....	26
3.5.1	Caracterización química de la hoja de cashahuasca.....	26
3.5.2	Caracterización fitoquímica de la hoja de cashahuasca .....	26
3.5.2.1	Preparación de la hoja de cashahuasca para el estudio fitoquímico .....	26

3.5.2.2	Preparación del extracto etanólico .....	27
3.5.2.3	Ensayos preliminares .....	27
3.5.2.4	Análisis cromatograficos.....	27
3.5.3	Preparación de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de cashahuasca.....	27
3.5.4	Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas de cashahuasca. ....	29
3.5.4.1	Capacidad de Inhibición del radical 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH).....	29
3.5.4.2	Capacidad de inhibir el catión 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS <sup>o+</sup> ) .....	30
3.5.5	Elaboración de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca con mejor capacidad antioxidante .....	32
3.5.6	Caracterización de la bebida funcional.....	34
3.5.6.1	Análisis sensorial.....	34
3.5.6.2	Caracterización fisicoquímica .....	34
3.5.6.3	Determinación de la curva estandar de polifenoles totales .....	34
3.5.6.4	Cuantificación de polifenoles totales .....	35
3.6	Diseño experimental.....	36
3.6.1	Determinación de hojas con mejor caracterización química.....	36
3.6.2	Determinación de hojas con mejor capacidad antioxidante.....	37
3.6.3	Elaboración de la bebida funcional.....	38

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
4.1 Caracterización química de la hoja de cashahuasca.....	39
4.2 Caracterización fitoquímica de la hoja de cashahuasca.....	42
4.2.1 Determinación de solubilidad en los extractos de hojas de cashahuasca .....	42
4.2.2 Análisis del tamizaje fitoquímico de la hoja de cashahuasca .....	43
4.2.3 Análisis cromatográfico de la hoja de cashahuasca .....	46
4.3 Evaluación de la capacidad antioxidante en los extractos de hojas de cashahuasca .....	47
4.3.1 Inhibición del radical 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH).....	47
4.3.2 Inhibición del radical catión 2,2- azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS <sup>o+</sup> ).....	52
4.4 Caracterización de la bebida funcional.....	55
4.4.1 Evaluación sensorial de la bebida funcional.....	55
4.4.2 Análisis fisicoquímico de la bebida funcional.....	56
4.4.3 Cuantificación de polifenoles totales en la bebida funcional.....	59
4.4.4 Evaluación de la capacidad antioxidante en la bebida funcional .....	60
V CONCLUSIONES.....	62
VI RECOMENDACIONES.....	64
VII ABSTRACT .....	65
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
IX ANEXOS.....	78



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Clases de compuestos fenólicos .....	10
2. Estructura de los compuestos más comunes .....	11
3. Resultados del análisis químico de la hoja de cashahuasca en los tres estadios.....	41
4. Resultados de solubilidad en los extractos de las hojas de cashahuasca en tres estadios.....	42
5. Resultados del tamizaje fitoquímico de la hoja de cashahuasca en los tres estadios.....	44
6. Inhibición de radicales libres de DPPH (IC <sub>50</sub> ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios .....	48
7. Determinación del AAI en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.....	50
8. Determinación del IC <sub>50</sub> del radical ABTS <sup>•+</sup> en la hoja de cashahuasca en tres estadios.....	52
9. Determinación del TEAC en las hojas de cashahuasca en tres estadios.....	54
10. Evaluación del olor, color y sabor de la bebida funcional a diferentes concentraciones .....	55
11. Resultados del análisis fisicoquímico en la bebida funcional.....	58

12. Determinación de la curva estándar de ácido gálico .....	59
13. Determinación de la capacidad antioxidante en la bebida funcional. ....	61
14. ANVA del análisis de humedad .....	79
15. ANVA del análisis de proteína.....	79
16. ANVA del análisis de grasa .....	79
17. ANVA del análisis de fibra.....	80
18. ANVA del análisis de ceniza.....	80
19. ANVA del análisis de carbohidratos .....	80
20. ANVA de la capacidad de inhibir el radical DPPH (IC <sub>50</sub> ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios .....	81
21. ANVA del Índice de actividad antioxidante (AAI) en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios .....	81
22. ANVA de la capacidad de inhibir el radical ABTS <sup>o+</sup> (IC <sub>50</sub> ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios .....	81
23. ANVA de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.....	82
24. ANVA de la evaluación del olor de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth).....	82
25. ANVA de la evaluación del color de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth).....	83
26. ANVA de la evaluación del sabor de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth).....	83
27. Escala hedónica para la evaluación sensorial de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth). ....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Cashahuasca ( <i>Serjania cf. rubicaulis</i> Benth).....	4
2. Flujo general para la elaboración de la bebida funcional.....	33
3. Diseño experimental para determinación de hojas con mejor caracterización química.....	36
4. Diseño experimental para determinación de hojas con mejor capacidad antioxidante.....	37
5. Diseño experimental para la elaboración de la bebida funcional.....	38
6. Cromatografía en capa delgada de la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.....	47
7. Comportamiento del IC <sub>50</sub> con el radical DPPH en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.....	49
8. Comportamiento del AAI en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.....	51
9. Comportamiento del IC <sub>50</sub> con el radical ABTS <sup>o+</sup> en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.....	53
10. Comportamiento del TEAC en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.....	54
11. Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.....	60

## I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, dado el rechazo mundial que están teniendo los productos sintéticos funcionales por las reacciones adversas que provocan en los pacientes, lo cual unido a la contaminación ambiental que genera su fabricación, hace que los científicos y tecnólogos acudan a los productos naturales obtenidos a partir de plantas con el fin de enfrentar los retos que demanda la necesidad de productos alimenticios funcionales que ayuden a mejorar la alimentación de la población en los diferentes países (ROIG, 1988).

La composición química y fitoquímica de una planta es el punto de partida para evaluar su capacidad funcional y valor nutritivo. La composición en diversas sustancias químicas de la planta de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth) puede variar de acuerdo con la proporción de componentes o principios activos que lo conforman, las condiciones climáticas, la edad y/o altura de corte y en función del cultivar utilizado.

La literatura es bastante escasa en cuanto a informaciones sobre la composición química acerca de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth). Actualmente se tiene referencias empíricas de que el extracto acuoso de esta planta posee capacidad antioxidante y actividad terapéutica, para disolver cálculos renales.

Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in*



*in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento; consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas con actividad de un radical libre; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

Teniendo en cuenta lo enunciado y no existiendo investigaciones relacionadas con el tema, menos aún vinculadas a determinar las propiedades funcionales de las partes de esta planta, hojas, tallo, raíz; el presente estudio incursionó en la investigación de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas considerando sus estadíos apical, medio y basal, y su aplicación como bebida funcional; para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar químicamente la hoja de cashahuasca.
- Caracterizar fitoquímicamente la hoja de cashahuasca.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos.
- Elaborar una bebida funcional.

## II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos generales de la cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth)

LEON (2000) manifiesta que es una planta común en bosques húmedos y muy húmedos, pantanos y márgenes de ríos. Está estrechamente relacionada con *S. mexicana* (L.) Willd., de México y con *S. brachycarpa* A. Gray ex Radlk., del norte de México.

#### 2.1.1 Morfología

Hojas biternadas, a veces 2 ó 3 pinnadas, frecuentemente reducidas cerca de la inflorescencia, pecíolo no alado, raquis alado; folíolos elípticos, ovados, obovados u oblongos, (1,5) 3,5 - 14 cm de largo y 2 - 6 cm de ancho, a menudo reducidos en la inflorescencia, agudos a acuminados en el ápice, margen entero o escasamente dentado cerca del ápice, subcoriáceos a coriáceos, glabros. Tirsos en las axilas de las hojas o tirsoides terminales, 6,5 - 12 cm de largo, el terminal hasta 30 cm de largo, densamente puberulentos, flores 2,5 - 3,5 mm de largo; sépalos densamente blanco - tomentosos.

Tallo acostillado, torcido y tortuoso, con 3 costillas, de 2,4 cm de diámetro, nudos poco evidentes, ligeramente prominentes y alternos; entrenudos 10 cm de largo. Con espinas caulinares, solitarias, cónicas, bicornes y tortuosas, de 10 - 15 cm de largo, distribuidas irregularmente en el entrenudo.

Corteza rugosa por numerosas lenticelas, de color café verdoso.

Lenticelas pequeñas y alargadas axialmente, con abertura vertical, abundantes y dispersas, de color café. Muesca café claro a rosa, con borde grueso café rojizo claro o naranja claro.

Ramas jóvenes tallos verdes a rojizos, lisos, triangulares a hexagonales; hojas alternas, compuestas de 5 folíolos, con máx al cortarlas y zarcillos bífidos.

Sección transversal, xilema de color café amarillento claro con numerosos poros pequeños, visibles. Médula pequeña en tallo central, café. Corteza delgada, de 1 - 2 mm de grosor, rosa claro con granulaciones que se tornan a naranja. El tallo cuenta con un eje central y tres laterales; el borde del xilema central es crenado o arrosado por 3 - 4 pequeñas cuñas. Fenología florece de abril a octubre, fructifica de enero a julio.



**Figura 1.** Cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).

Fruto ovado - cordado, 1,7 - 2,7 cm de largo y 2 cm de ancho, glabro, frecuentemente con nervios prominentes, sólo ligeramente contraído abajo de los cocos, cocos fuertemente comprimidos, división entre los cocos angosta y laxa (LEON, 2000).

### 2.1.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica para la cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth) es la siguiente:

- Reino: *Plantae*.
- Filo: *Magnoliophyta*.
- Clase: *Magnoliopsida*.
- Orden: *Sapindales*.
- Familia: *Sapindaceae*.
- Género: *Serjania*.
- Especie: *Serjania cf. rubicaulis*.
- Autor Epiteto: Benth.
- Nombre común: Cashahuasca.

Fuente: Herbario San Marcos-UNMSM, Sistema de clasificación de CRONQUIST (1988).

## 2.2 Compuestos bioactivos

Según CRUZ (2008), se les conoce como fitoquímicos, compuestos que pueden tener efectos fisiológicos en el cuerpo, capaces de cambiar funciones básicas de la célula en un nivel metabólico cuando el cuerpo se puede ver afectado por alguna enfermedad.

LOCK (1988) manifiesta que los fitoquímicos pueden actuar de diferentes maneras para reducir el riesgo de enfermedades: reducen la formación de la arteroesclerosis, porque actúan como antioxidantes, incrementan la actividad de las enzimas que destruyen carcinógenos o suprimen enzimas que forman o activan carcinógenos ya que los fitoquímicos pueden modificar la expresión genética de las enzimas; estimulan el sistema inmune para responder a células anormales; interfieren en la estimulación hormonal de algunos cánceres; reducen el riesgo de infección porque actúan como agentes antimicrobiales. Muchas de estas funciones tienen implicaciones para el desarrollo de enfermedades del corazón, cáncer y otras enfermedades. El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo en las plantas medicinales, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (UV, IR, RMN, EM).

### **2.2.1. Metabolitos secundarios frecuentes en las plantas**

CRUZ (2008) menciona que los fitoquímicos no están clasificados como nutrientes, ya que son sustancias indispensables para generar energía o construir estructuras. No obstante, existe la evidencia de que los fitoquímicos pueden desempeñar otras funciones importantes relacionadas con la prevención de enfermedades.

Los constituyentes químicos se agrupan según su origen biosintético común, y así podemos mencionar a los terpenos y esteroides, flavonoides, cromenos y benzofuranos, cumarinas, quinonas, alcaloides entre

otras. A continuación se muestran los fitoquímicos más importantes y se describen sus funciones:

- Carotenoides: en estos se incluyen el beta-caroteno y el licopeno. Pueden actuar como antioxidantes (LOCK, 1988).
- Alcaloides: son sustancias básicas, que se caracterizan por poseer uno o más átomos de nitrógeno en un sistema heterocíclico. Poseen actividad farmacológica significativa usualmente sobre el sistema nervioso central (CRUZ, 2008).
- Flavonoides: muchos pueden actuar como antioxidantes; ligar nitratos en el estómago previniendo la conversión a nitrosaminas e inhibir la proliferación de células (LOCK, 1988).
- Saponinas: pueden interferir con la replicación del ADN, prevenir la multiplicación de células cancerígenas y estimular las respuestas inmune (LOCK, 1988).

### **2.3 Antioxidantes**

AVELLO y VALDIVIA (2009) menciona que un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad.

Según CUBERO *et al.* (2002), los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de inactivarse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva.

SIES (1997) menciona que estos compuestos prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color.

Deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita prevenir la acumulación de elementos pro - oxidantes (HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1985).

### **2.3.1 Clasificación de los antioxidantes**

#### **2.3.1.1 Antioxidantes endógenos**

Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos actúan a nivel intracelular. Existen tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CTL) y glutatión peroxidasa (GPX) (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000).

Según KRINSKI (2000), las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otras.

#### **2.3.1.2 Antioxidantes exógenos**

GORMAZ (2005) manifiesta que los extractos naturales están constituidos por diversos compuestos de naturaleza química diferente como polifenoles, isoprenoides, compuestos tiólicos, ácido ascórbico y polisacáridos que en conjunto contribuyen, bajo diferentes mecanismos ejercer la actividad antioxidante.

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, cinc, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes (KRINSKI, 2000).

#### - **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y protegen frente a organismos patógenos, predadores e incluso radiación ultravioleta. También contribuyen a las características organolépticas de los alimentos de origen vegetal, al intervenir en gran medida, en el color natural y en el sabor que éstos poseen (MARTINEZ - VALVERDE *et al.*, 2000; BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (ROBBINS, 2003; KAHKONEN *et al.*, 2001).



### - Estructura química y clasificación

MARTINEZ - VALVERDE *et al.* (2000) menciona que estructuralmente los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo aromático, bencénico, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales. La naturaleza de los fenoles varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos.

En el Cuadro 1 se muestran los tipos de compuestos fenólicos de las plantas:

**Cuadro 1.** Clases de compuestos fenólicos.

Clase	Estructura
Fenoles simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzoicos	C6 – C1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C6 – C2
Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides	C6 – C3
Naptoquinonas	C6 – C4
Xantonas	C6 – C1 – C6
Antraquinonas	C6 – C2 – C6
Flavonoides, isoflavonoides	C6 – C3 – C6
Lignanós, neolignanós	(C6 – C3)2
Biflavonoides	(C6 – C3 – C6)2
Ligninos	(C6 – C3)n
Taninos condensados	(C6 – C3 – C6)n

Fuente: BALASUNDRAM *et al.* (2006).

**Cuadro 2.** Estructura de los compuestos más comunes.

Ácidos benzoicos		Ácidos cinámicos	
Ácido gálico	R1 = R2 = R3 = OH	Ácido cafeico	R1 = R2 = H; R3 = R4 = OH
Ácido protocatéuico	R1 = H; R2 = R3 = OH	Ácido ferúlico	R1 = R2 = H; R3 = OH; R4 = OCH3
Ácido vanillico	R1 = H; R2 = OH; R3 = OCH3	Ácido p-cumárico	R1 = R2 = R4 = H; R3 = OH
Ácido siríngico	R1 = R3 = OCH3; R2 = OH	Ácido sinápico	R1 = H; R2 = R4 = OCH3; R3 = OH

Fuente: BALASUNDRAM *et al.* 2006.

### - Flavonoides

HAVSTEEN (1983) menciona que los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.

Según MARTINEZ *et al.* (2002), los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico).

### - Vitamina C o ácido ascórbico.

SHEKELLE (2003) manifiesta que es un importante antioxidante hidrosoluble que actúa potenciando el efecto de otros

antioxidantes tal como sucede con la vitamina E y el selenio. No se sintetiza en el organismo, por lo que debe ser aportada por la dieta. Sus principales funciones son neutralizar el oxígeno singlete ( $O_2$ ), capturar radicales hidróxilos y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada de vitamina E una vez que ha reaccionado con un radical libre (RL). Actúa de forma sinérgica con la vitamina E, y se ha comprobado que se absorbe mejor si se encuentra en una formulación que contenga vitamina E.

### **2.3.2 Función de los antioxidantes**

El antioxidante al reaccionar con el radical libre, le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico, que en algunos casos, puede volver a su estado inicial mediante la actuación de otros antioxidantes (SIES y STAHL, 1995).

GONZÁLES - TORRES *et al.* (2000) manifiesta que los antioxidantes tienen acción potencialmente benéfica para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales.

Pueden actuar previniendo la formación de radicales libres, interceptando el ataque de las mismas, captando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, facilitando la reparación del daño provocado y manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes (HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1985).

## **2.4 Radicales libres**

Según AVELLO y VALDIVIA (2010), 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 para aparear su electrón libre, la molécula que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado. Iniciándose así 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 esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (FINKEL y HOLBROOK, 2000).

MURILLO (2006) menciona que los procesos de oxidación producen radicales libres que pueden interferir en los procesos normales y dañar las células corporales causando estrés oxidativo. El estrés oxidativo, se define como el desbalance entre la producción de radicales libres y la cantidad de antioxidantes presentes en el ambiente intracelular (ELEJALDE, 2001 e INOE *et al.*, 2001). Muchas sustancias tóxicas son capaces de producir radicales libres y de disminuir nuestra defensa antioxidante.

## **2.4.1 Determinación de la capacidad antioxidante**

### **2.4.1.1 Prueba del radical 1,1 difenil - 2 - picril - hidrazil (DPPH)**

Según LEBEAU *et al.* (2000), el DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, solo puede disolverse en medio orgánico, presenta un pico de absorbancia a 515 nm. Es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de

secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidante. El principio del método del DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrogeno proveniente de un fenol donador (ejemplo compuesto fenólicos) para generar el compuesto de finilpicrihidrazina y un radical fenoxil. En este proceso, la reacción desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm.

Este método, desarrollado por BRAND - WILLAMS *et al.* (1995), se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH<sup>•</sup>, se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH 100  $\mu$ M (3,9 ml) disuelto en metanol al 80 %, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0,1 ml de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra ( $A_0$ ) y pasados los 30 y 60 minutos ( $A_f$ ). La concentración de DPPH<sup>•</sup> en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu$ M/g de muestra peso fresco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08 - 1,28 mM en disolución de metanol al 80 %, se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC.

#### **2.4.1.2 Prueba del TEAC o radical 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>)**

Según KUSKOSKI *et al.* (2005), el ABTS<sup>o+</sup> tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también

electroquímica. Con el  $ABTS^{o+}$  se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. El radical  $ABTS^{o+}$  tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico. Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical  $ABTS^{o+}$  es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable; a pesar de esto los valores de actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. La absorbancia medida por el método  $ABTS^{o+}$  es determinada a los 1 y 7 minutos; los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical  $ABTS^{o+}$  no se completa hasta pasado 1 minuto.

El ensayo TEAC ("Trolox Equivalent Antioxidant Capacity") o ensayo del ABTS [2,2 - azinobis - (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonic acid)] se basa en la inhibición por los antioxidantes del radical catiónico verde - azulado  $ABTS^{o+}$  [2,2 - azinobis - (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonate)], cuyo espectro muestra un máximo de absorción a las longitudes de onda 415, 645, 734 y 815 nm. De todas ellas, las longitudes de onda empleadas más frecuentemente son 415 y 734 nm (PRIOR *et al.*, 2005). Como patrón se emplea el compuesto denominado Trolox (6 - hydroxy - 2, 5, 7, 8 - tetramethychroman - 2 - carboxylic acid), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración.

SANCHEZ - MORENO (2002) menciona que en la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical  $ABTS^{o+}$  y

lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el  $ABTS^{0+}$  se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste.

El método original descrito por MILLER *et al.* (1993) emplea metamioglobina y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el  $ABTS^{0+}$  para generar el radical  $ABTS^{0+}$ . La muestra a analizar se añade antes de la formación del  $ABTS^{0+}$  por lo que se trata de un ensayo de inhibición. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales (PRIOR *et al.*, 2005).

La modificación que propone RE *et al.* (1999), implica la producción directa del cromóforo azul/verde  $ABTS^{0+}$  por la reacción entre  $ABTS^{0+}$  y peroxodisulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión preformado en el medio de reacción convierte esta técnica en una estrategia de decoloración. El grado de decoloración se puede medir a diferentes longitudes de onda, como se ha comentado, siendo la habitual la absorbancia a  $\lambda = 734$  nm e indica el porcentaje de inhibición del radical  $ABTS^{0+}$  como capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje de inhibición determina la actividad antioxidante como función de la concentración y del tiempo en comparación con la reactividad relativa del patrón estándar, Trolox, bajo las mismas condiciones.

Este método espectrofotométrico es válido para el estudio de antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos o sanguíneos, compuestos puros y extractos alimentarios (SANCHEZ - MORENO, 2002).

## **2.4.2 Determinación de los polifenoles totales**

### **2.4.2.1 Prueba Folin - Ciocalteu**

PRIOR *et al.* (2005) manifiestan que el método Folin - Ciocalteu usado actualmente fue propuesto por Singleton y Rossi en el año 1965. Este ensayo es una modificación de un método desarrollado en 1927 por Folin y Ciocalteu empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los fenoles con mayor especificidad ( $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$  y  $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ ). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de un compuesto con coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Aunque se trata de un método simple, preciso y sensible, es un procedimiento criticado ya que existen diversas sustancias de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), el ácido úrico ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ), algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares, aminos aromáticas y algunas sales inorgánicas.



No obstante, a pesar de estos inconvenientes, el ensayo de los fenoles totales se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante (SCHLESIER *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2002).

El ensayo Folin - Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos de productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox (el reactivo Folin es una mezcla de ácido fosfotúngstico y de ácido fosfomolibdico que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno), por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total, como el ensayo TEAC ("Trolox Equivalent Antioxidant Capacity") o el ORAC ("Oxygen Radical Antioxidant Capacity") (PRIOR *et al.*, 2005).

## **2.5 Alimentos funcionales con efecto antioxidante**

El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad. Es decir, son alimentos que además de cumplir su misión básica y fundamental, alimentar, tienen otra función, principalmente asociada con la salud.

Según CHASQUIBOL (2003), se podría definir como cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivo

contiene componentes adicionales que favorecen la salud, capacidad física y el estado mental de la persona.

Un alimento funcional es el que tiene una apariencia similar a la de un alimento convencional, se consume como parte de una dieta normal y además de su función nutritiva básica, se ha demostrado que presenta propiedades fisiológicamente beneficiosas y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas (MAZZA, 2000).

RAFTER (2002) menciona que en los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de alimento funcional. Así, con un consumidor cada vez más interesado en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos "nuevos alimentos".

Se trata, además, de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales. Un alimento puede hacerse funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones:

- Eliminar componentes perjudiciales presentes en el alimento (p. ej. alérgenos).
- Incrementar la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados, o incrementar la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que está demostrado su efecto beneficioso.

- Añadir un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (p. ej. prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).
- Sustituir un componente, generalmente un macronutriente (p. ej. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso.
- Incrementar la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Según ROBERFROID (2002), estos efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente con el objetivo de validarlos y para poder aprobar las declaraciones nutricionales en su etiqueta.

LARROSA *et al.* (2002) manifiesta que una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox del organismo. Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta.

De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y concentrados para su uso como suplementos, alimentos nutracéuticos o como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales (PSZCZOLA, 2003).

### **III MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de ejecución**

El trabajo de investigación se ejecutó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María, ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, con una temperatura entre 17 °C y 32 °C, con 82 % de HR. Se trabajó en los laboratorios del centro de investigación para el desarrollo biotecnológico de la amazonía (CIDBAM), centro de investigaciones de productos naturales de la amazonia (CIPNA), laboratorio de análisis de alimentos, laboratorio de química, laboratorio de nutrición, laboratorio de análisis sensorial y los laboratorios de productos naturales del instituto de ciencias farmacéuticas y recursos naturales de la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2 Material biológico**

Las hojas de la cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth) fueron obtenidas de la zona del papayal grande, cuyas coordenadas son: UTM 18 L: 8978869 N, 388468 E y una altitud de 685 m., carretera Tingo María - Castillo Grande a 7,24 Km., distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco. El material biológico fue cosechado en tres estadios de hoja apical, medio y basal; estas fueron trasladadas al laboratorio para su acondicionamiento y posterior análisis.

La identificación taxonómica fue realizada en el museo de historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La ubicación sistemática fue ratificada mediante constancia N° 09-USM-2012, siendo determinada por el Blgo. Severo Baldeón Malpartida.

### **3.3 Equipos, materiales y reactivos**

#### **3.3.1 Equipos de laboratorio**

- Balanza analítica OHAUS galaxy 160 sensibilidad 0.0001g Germany.
- Balanza sartorius model TE1502S.
- Estufa barnstead / lab - line.
- Lampara UV caution ultra-violet radiation.
- Cocina eléctrica de plataforma barnstead / thermolyne. U. S. A.
- Refrigeradora icebeam door cooling LG GR-5392QLC.
- Desionizador de agua modelo D 7035 (Barnstead) Germany.
- Espectrofotómetro genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) U. S. A.
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SI™) U. S. A.
- Centrifuga modelo MIKRO R22 (HettichZentrifugen) Germany.
- Baño maría modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, U. S. A.).
- Digestor de proteína. digest automat K-438 BÜCHI labortechnik. AG.

- Equipo soxhlet, gerhardt. Germany.
- Bureta automatica.
- Horno mufla LABOR mőszeripari müvek temperatura regulable de 250 °C a 900 °C.
- Secador cilíndrico LABOR mőszeripari müvek temperatura regulable de 40 °C a 250 °C.
- Refractómetro LABOR MIN, Hungria.
- Campana extractora.

### **3.3.2 Materiales de laboratorio**

- Tubos de plástico con tapa de 15 y 20 ml.
- Cubetas de poliestireno, Gene Mate(1cm x 1cm x 4.5cm).
- Tubos de ensayo Pyrex U. S. A.
- Microtubos (1.5 – 2.0 ml.)
- Vasos de precipitación (1000 ml., 500 ml., 100 ml., 50 ml., 10 ml.).
- Fiolas (1000 ml., 500 ml., 100 ml., 50 ml., 10 ml.).
- Gradillas.
- Probetas de 10, 100 y 500 ml.
- Tips de 200 y 1000 ul.
- Micropipetas regulables de 10 - 100 µl y de 100 - 1000 µl.
- Matraces erlenmeyer de 50 y 250 ml. Kimax U. S. A.
- Campana de desecación con perlas de silicagel.
- Crisoles de porcelana, cap. 50 ml. Haldenwanger Berlín.

- Papel filtro watman N° 42.
- Espátulas metálicas.

### **3.3.3 Reactivos y solventes**

- Metanol al 96 %.
- Agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).
- 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH), 90 %. Sigma Chemical.
- 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácidosulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>), 98%. Sigma Chemical.
- Persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) p.a. Sigma Chemical.
- Folin - ciocalteus, merck. Germany.
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) p.a. ISO. Scharlau.
- Hexano p.a. merck. Germany.
- Acido sulfúricos 95 - 97% p.a. merck. Germany.
- Hidróxido de sodio (NaOH) en lentejas p.a. ISO. merck. Germany.
- Ácido clorhídrico fumante 37 % p.a. merck. Germany.

## **3.4 Métodos de análisis**

### **3.4.1 Análisis químico**

- Humedad, método 23.003 (AOAC, 1997).
- Proteína, método 991.29 (AOAC, 1997).
- Grasa, método 935, 60 (AOAC, 1997).
- Fibra, método 930.20 (AOAC, 1997).

- Cenizas, método 942.50 de calcinación directa (AOAC, 1997).
- Carbohidratos, se determinó por diferencia de los demás componentes del análisis químico (HART y FISHER, 1991).

### **3.4.2 Análisis fitoquímico**

Se determinó por los métodos en el estudio de productos naturales, (LOCK DE UGAZ, 1988).

### **3.4.3 Evaluación de la capacidad antioxidante**

- Inhibición del radical 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH), método de inhibición del radical DPPH, descrito por Brand - Williams (*et al.* (1995), Modificado por SCHERER, R.; GODOY, (2009).
- Capacidad de inhibir el catión 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>), método descrito por PELLIGRINI *et al.* (1999).

### **3.4.4 Caracterización de la bebida funcional obtenida por la hoja de cashahuasca**

#### **3.4.4.1 Análisis sensorial**

Se utilizó análisis afectivo "medida del grado de satisfacción", con este análisis se determinó la aceptabilidad por parte del consumidor (UREÑA, 1999).

#### **3.4.4.2 Caracterización fisicoquímica**

- Densidad, método indicado por (INDECOPI, 1974).
- Determinación del color, se evaluó con el colorímetro Konica Minolta CR 400 según el método del CieLab.



- Acidez, método indicado (AOAC, 1995).
- Sólidos solubles, método indicado (INDECOPI, 1974).
- pH, método 973.193 AOAC (1964).

#### **3.4.4.3 Cuantificación de polifenoles totales**

Método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN Y CIOCALTEU *et al.* (1927), modificado por SANDOVAL *et al.* (2001).

### **3.5 Metodología experimental**

#### **3.5.1 Caracterización química de la hoja de cashahuasca**

Se realizó el análisis químico de las hojas de la cashahuasca, siguiendo los métodos ya descritos en el ítem métodos de análisis (3.4.1). Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) y en los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### **3.5.2 Caracterización fitoquímica de la hoja de cashahuasca**

##### **3.5.2.1 Preparación de la hoja de cashahuasca para el estudio fitoquímico**

- Recolección, se realizó en función a los estadios de hoja apical, medio y basal.
- Desección, las hojas de cashahuasca se desecaron en estufa con sistema de ventilación a una temperatura de 60 °C por 48 horas.
- Molienda, se utilizó molino de cuchillas, obteniéndose un polvo fino (tamiz n° 1mm).

### **3.5.2.2 Preparación del extracto etanólico**

Se pesó 100 g del polvo seco de cada estadio de hoja; se añadió 400 ml de alcohol a 96° y se acondiciono a temperatura ambiente; se agitó dos veces al día por un tiempo de un minuto durante 4 días, luego se filtró y se concentró en la estufa a 40 °C para obtener al final un extracto seco.

### **3.5.2.3 Ensayos preliminares**

- Prueba de solubilidad, se realizó en solventes de polaridad creciente y estos son los siguientes: n - hexano, acetona, diclorometano, metanol, etanol y agua destilada.
- Tamizaje fitoquímico, se realizó por el método descrito en el ítem métodos de análisis (3.4.2) empleándose pruebas o técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los metabolitos secundarios.

### **3.5.2.4 Análisis cromatográficos**

En la cromatografía en capa fina se utilizó placas con silica gel y como sistema de solventes: metanol - diclorometano (1:4) v/v, presentándose tres manchas a luz UV 254 y 365 nm, luego se realizó la cromatografía en escala preparativa y fueron reveladas con los reactivo de tricloruro, ácido sulfúrico 50 % y el reactivo de warnep.

### **3.5.3 Preparación de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de cashahuasca.**

Se realizó la preparación de los extractos acuosos y etanólicos, una vez obtenida la hoja de cashahuasca en el laboratorio, estas fueron

lavadas y separadas de acuerdo a los estadíos de la hoja (apical, medio y basal), se secaron en una estufa con sistema de ventilación a una temperatura de 60 °C por 48 horas, para ser molidos con la finalidad de obtener una mejor extracción.

- **Extracto acuoso**, se procedió a tomar 5 g de cada muestra de las hojas, a cada una se adicionó 50 ml de agua destilada (concentración de 100 mg/ml), se sometió a ebullición por 5 minutos, se filtró y se llevó al rotavapor donde se obtuvo la droga vegetal determinando la primera concentración la cual fue separada en microtubos, luego se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. A partir de esta concentración se prepararon las demás concentraciones.
- **Extracto etanólico**, se procedió a tomar 5 g de cada muestra de las hojas y a cada una de ellas se adicionó 50 ml de etanol al 96 % (concentración de 100 mg/ml), se dejó macerar por un periodo de 48 horas, se filtró y se llevo al rotavapor donde se obtuvo la droga vegetal determinando la primera concentración la cual fue separada en microtubos, luego se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. A partir de esta concentración se prepararon las demás concentraciones.

### **3.5.4 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas de cashahuasca**

#### **3.5.4.1 Capacidad de Inhibición del radical 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH)**

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH, se usó el reactivo 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH) el que se disolvió en metanol al 96 %, este radical libre (DPPH) es estable y se utilizó como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidante. El principio del método DPPH consistió en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (extractos) para generar el compuesto difenyl picryl hidrazine y una especie radical. En este proceso, la reacción desarrolló un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia. Con concentraciones del extracto acuoso de las hojas apical (47,70; 76,32; 114,90; 143,10 ug/ml), medio (9,54; 28,62; 47,70; 66,78 ug/ml) y basal (9,54; 28,62; 47,70; 66,78 ug/ml); y concentraciones del extracto etanólico de las hojas apical (28,62; 85,86; 124,02; 181,26 ug/ml), medio (28,62; 57,24; 85,86; 124,02 ug/ml) y basal (47,70; 76,32; 114,90; 143,10ug/ml). La reacción se generó en una cubeta de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm), con un volumen de 25 µl de muestra y 975 µl de radical DPPH. Luego inmediatamente se procedió a la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro, las lecturas se registraron a 515 nm por espacio de 10 minutos. El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue calculado con la siguiente ecuación:

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

**Dónde:**

**Ac:** Absorbancia de los controles.

**Am:** Absorbancia de la muestra en función del tiempo (10 minutos).

La actividad antioxidante fue expresados en  $IC_{50}$  para ello se planteó concentración vs porcentaje de inhibición con las cuales se obtuvo una curva de ajuste del tipo lineal sobre la cual se determinó el valor del  $IC_{50}$ . También se calculó el índice de actividad antioxidante (AAI) con la siguiente ecuación:

$$AAI = \text{concentración final del DPPH (ug.ml}^{-1}) / IC_{50} \text{ (ug.ml}^{-1})$$

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar con arreglo factorial (DCA), 3A2B con tres repeticiones y en los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### **3.5.4.2 Capacidad de inhibir el catión 2,2 - azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>)**

Según la metodología desarrollada por PELLIGRINI *et al.* (1999) el radical ABTS<sup>o+</sup> se formó tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (140 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS<sup>o+</sup> se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1.2. Con

concentraciones del extracto acuoso de las hojas apical (4,77; 9,54; 28,62; 47,70 ug/ml), medio (4,77; 9,54; 28,62; 47,70 ug/ml) y basal (4,77; 9,54; 28,62; 47,70 ug/ml); y concentraciones del extracto etanólico de las hojas apical (9,54; 38,16; 57,24; 76,32 ug/ml), medio (9,54; 28,62; 47,70; 66,78 ug/ml) y basal (28,62; 47,70; 66,78; 85,86 ug/ml). La reacción se generó en una cubeta de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm), con un volumen de 10 µl de muestra y 990 µl del radical ABTS<sup>o+</sup>. La disminución de la absorbancia fue registrada a 734 nm por espacio de 5 minutos. El porcentaje de inhibición del radical fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición ABTS}^{o+} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

**Dónde:**

**Ac:** Absorbancia de los controles.

**Am:** Absorbancia de la muestra en función del tiempo (5 minutos).

La actividad antioxidante fue expresados en IC<sub>50</sub> para ello se ploteó concentración versus porcentaje de inhibición con las cuales se obtuvo una curva de ajuste del tipo lineal sobre la cual se determinó el valor del IC<sub>50</sub>.

También se calculó la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) con la siguiente ecuación:

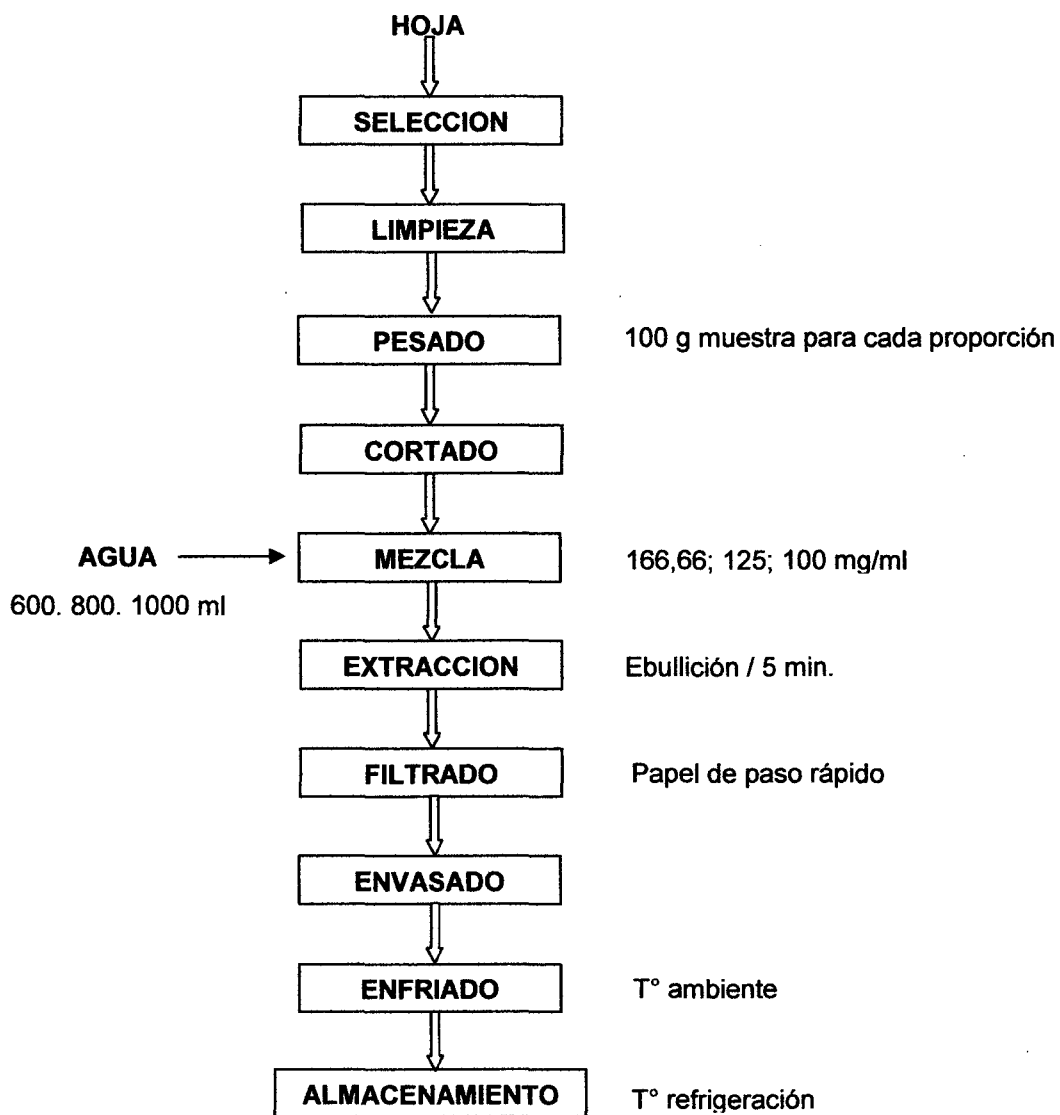
$$\text{TEAC} = \text{Pendiente curva Antioxidante} / \text{Pendiente curva Trolox}$$

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar con arreglo factorial (DCA), 3A2B con tres repeticiones y en los niveles donde exista significación estadística se aplicó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3.5.5 Elaboración de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca con mejor capacidad antioxidante**

Las operaciones realizadas para el proceso de elaboración de la bebida funcional, se indican en el flujograma de la Figura 2, las hojas con mejor capacidad antioxidante fueron cosechadas y llevadas al laboratorio, la descripción se realiza a continuación:

- **Selección**, se realizó con la finalidad de eliminar aquellas hojas que presentaban defectos.
- **Limpieza**, se realizó con la finalidad de eliminar materia orgánica.
- **Pesado**, se realizó con una balanza analítica de precisión, donde se pesó 100 g de hoja en tres proporciones.
- **Cortado**, se realizó con tijeras con la finalidad de reducir el tamaño de las hojas y aumentar la superficie de contacto.
- **Mezcla**, la bebida funcional se evaluó a 3 concentraciones diferentes adicionando agua destilada en 600, 800, 1000 ml en cada proporción de hoja pesada; obteniendo concentraciones de 166,66; 125; 100 mg/ml.
- **Extracción**, las diferentes concentraciones se sometió a ebullición por un tiempo de 5 minutos.
- **Filtrado**, se realizó con papel whatman pasada rápida con la finalidad de separar las trazas de hojas y poder obtener un extracto limpio.



**Figura 2.** Flujo general para la elaboración de la bebida funcional.



- **Envasado**, se realizó el envasado del producto en botellas de vidrio de color ámbar.
- **Enfriado**, se realizó el enfriado del producto a temperatura ambiente.
- **Almacenamiento**, se realizó en refrigeración, con la finalidad de prolongar la vida útil del producto.

### **3.5.6 Caracterización de la bebida funcional**

#### **3.5.6.1 Análisis sensorial**

Se realizaron los análisis sensoriales mediante el análisis afectivo “medida de grado de satisfacción” (UREÑA, 1999), se utilizó la escala hedónica presentada en el Cuadro 27 (Anexo - III). Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) y en los niveles donde exista significación estadística se aplicó la prueba de tukey ( $p < 0,05$ ).

#### **3.5.6.2 Caracterización fisicoquímica**

Se realizó en la bebida funcional que obtuvo mayor grado de satisfacción, esta caracterización fisicoquímica considero lo siguiente: Densidad, color, acidez, sólidos solubles y pH; siguiendo los métodos descritos en el ítem métodos de análisis (3.4.4.).

#### **3.5.6.3 Determinación de la curva estándar de polifenoles totales**

Para determinar la curva estándar se preparó una solución stock de 10 ml de ácido gálico a una concentración de 1,88 mg/ml, a partir de esta solución stock se prepararon concentraciones de 0,564; 0,186; 0,056; 0,018; 0,006 mg/ml, cada dilución se preparó por triplicado. En cada tubo de ensayo se adicionó 1580  $\mu$ L agua destilada, 20  $\mu$ l de las soluciones estándar

diluida, 100  $\mu$ L de solución del fenol folin - ciocalteu y finalmente 300  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 %. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y luego se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS, a una longitud de onda de 700 nm. Con los resultados obtenidos se graficó absorbancia vs concentración y se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

#### **3.5.6.4 Cuantificación de polifenoles totales**

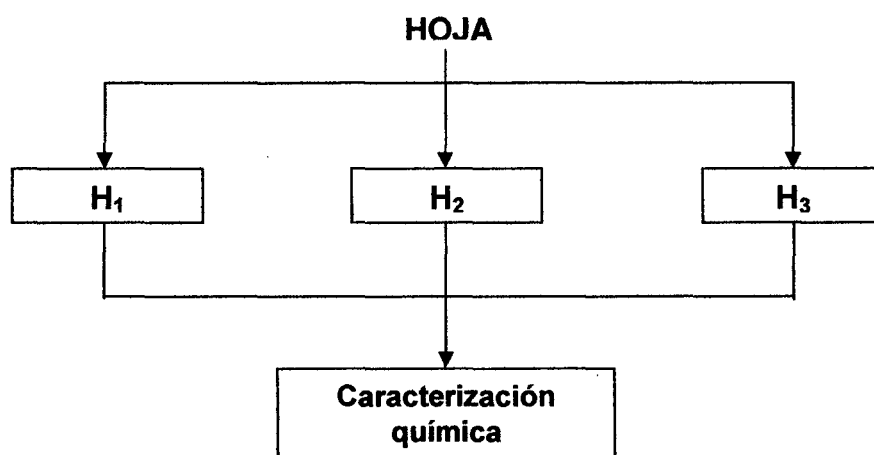
Para la cuantificación de polifenoles totales se utilizó la bebida funcional a una concentración (15 mg/ml). En un tubo de ensayo se colocó 1580  $\mu$ l de agua destilada, 20  $\mu$ l de muestra, 100  $\mu$ l de solución de fenol folin - Ciocalteu y finalmente 300  $\mu$ l de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20 %; para completar la reacción se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente. Luego se monitoreo la absorbancia a 700 nm y en base a la curva patrón se determinó la cuantificación de polifenoles expresado en mg de ácido gálico/ml de muestra.

También se evaluó la funcionalidad de la bebida en la dilución seleccionada, mediante la evaluación de los radicales DPPH y ABTS<sup>o+</sup>.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa STATGRAPHICS centurión XV. II.

### 3.6 Diseño experimental

#### 3.6.1 Determinación de hojas con mejor caracterización química

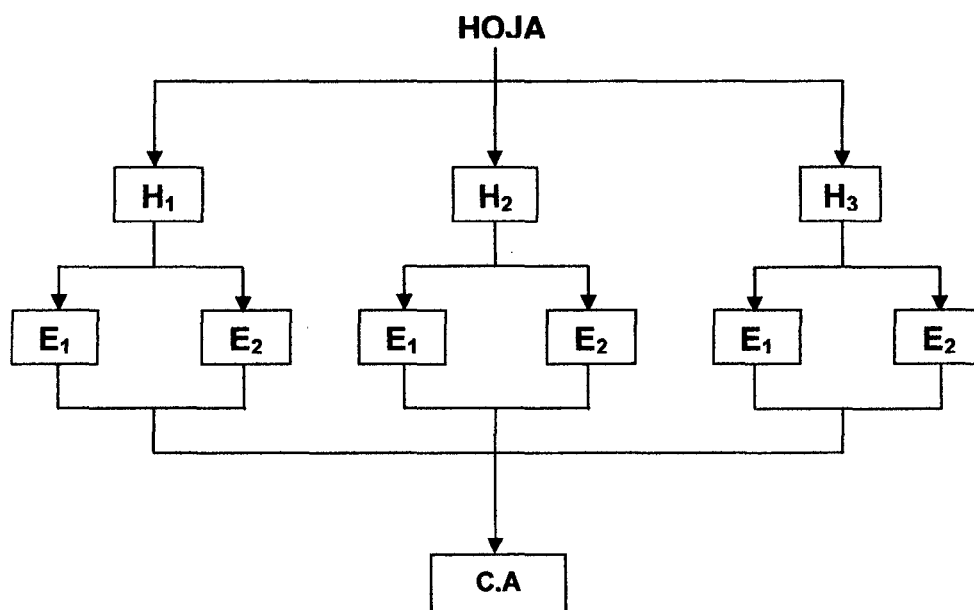


Dónde:

- $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$ : Estadios de la muestra.
- Caracterización química: (humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas y carbohidratos).

**Figura 3.** Diseño experimental para determinación de hojas con mejor caracterización química.

### 3.6.2 Determinación de hojas con mejor capacidad antioxidante

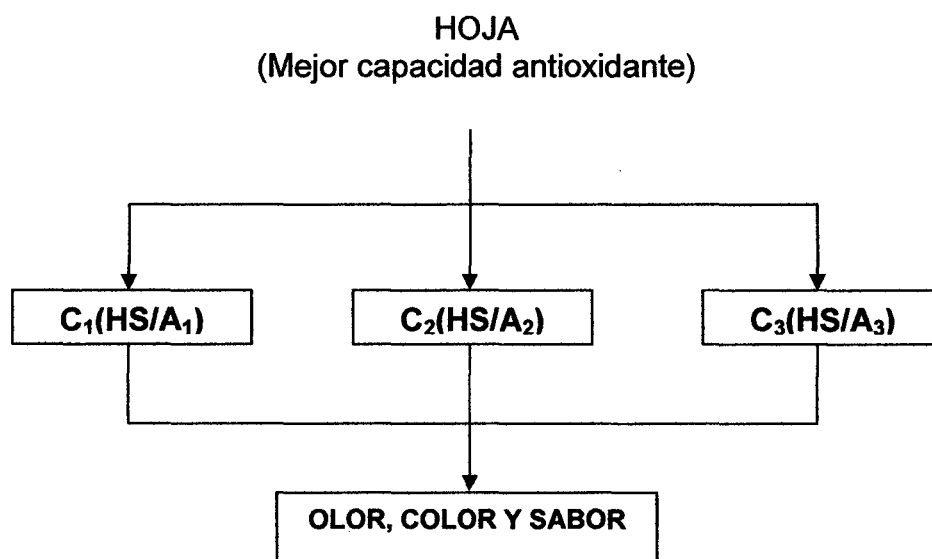


Dónde:

- H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>: Estadíos de la muestra.
- E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>: Extracto acuoso y etanólico.
- C.A.: Capacidad antioxidante (DPPH, ABTS<sup>o+</sup>).

**Figura 4.** Diseño experimental para determinación de hojas con mejor capacidad antioxidante.

### 3.6.3 Elaboración de la bebida funcional



Dónde:

- **C<sub>1</sub>**: Concentración (166,66 mg/ml).
- **C<sub>2</sub>**: Concentración (125 mg/ml).
- **C<sub>3</sub>**: Concentración (100 mg/ml).
- **HS**: Hoja seleccionado.
- **A<sub>1</sub>**: 600 ml de agua.
- **A<sub>2</sub>**: 800 ml de agua.
- **A<sub>3</sub>**: 1000 ml de agua.

**Figura 5.** Diseño experimental para la elaboración de la bebida funcional.

## IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Caracterización química de la hoja de cashahuasca

Los resultados del análisis químico de la hoja de cashahuasca en los tres estadios, en % de base húmeda y base seca se presentan en el Cuadro 3.

El análisis estadístico de la caracterización química entre los estadios de las hojas de cashahuasca determinó que existen diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ).

Según los resultados del porcentaje de humedad, el estadio de hoja apical contiene un mayor porcentaje de humedad con  $78,53 \pm 0,01$ , a comparación con las hojas de (*Lippia origanoides* h.b.k.) orégano que contiene menor porcentaje de humedad con 58,3241 % (HENAO, 2009), pero con las hojas de kutzu (*Pueraria phaseoloides*) 73,20 % de humedad (ESPINOZA, 1993) siendo de inferior porcentaje con respecto a este estadio.

Según los resultados del porcentaje de proteína, el mayor contenido se encontró en el estadio de hoja apical con  $22,38 \pm 0,08$ , pero en comparación con las hojas de kutzu (*Pueraria phaseoloides*) que tiene 26,98 % de proteína, es superior a los tres estadios analizados (ESPINOZA, 1993), también en comparación con la hoja de coca que contiene el 20,288 % de proteína, es inferior al estadio de hoja apical pero superior al medio y basal (PENNY, 2009).

Según los resultados del porcentaje de grasa, el mayor contenido se encontró en el estadio de hoja apical con  $4,44 \pm 0,004$ , comparando el alto

contenido de grasa frente a los tres estadios, la hoja de yuca (*Manihot esculenta crantz*) con un 6,8 % de grasa (GIRALDO, 2006), mientras que las hojas stevia (*Stevia rebaudiana*) tienen un contenido de grasa de 2,17 %, de similar porcentaje que el estadio de hoja medio, pero inferior al basal y apical (RODRIGUEZ, 2010).

Según los resultados del porcentaje de fibra, el estadio de hoja medio presento el mayor porcentaje de fibra con  $26,37 \pm 0,02$  %, el contenido de fibra en las hojas de yuca (*Manihot esculenta crantz*) es el 11 %, inferior a los tres estadios (GIRALDO, 2006), pero en comparación de las hojas de kutzu (*Pueraria phaseoloides*) que tiene 33,99 % de fibra, es superior a los estadios analizados (ESPINOZA, 1993).

Según los resultados del porcentaje de ceniza, se encontró un mayor porcentaje en el estadio de hoja basal  $8,63 \pm 0,09$ ; en comparación de la hoja de achiote (*Bixa orellana* Linneo) que tiene 7,18 % de ceniza, con menor porcentaje con el estadio de hoja mencionado (DE LA CRUZ, 2005), el contenido de cenizas en las hojas de yuca (*Manihot esculenta crantz*) es de 10,9 %, superior a los tres estadios (GIRALDO, 2006).

Según los resultados del porcentaje de carbohidratos, se observa que el estadio de hoja apical presenta mayor contenido de carbohidratos con  $49,73 \pm 0,10$  %, en comparación con las hojas de stevia (*Stevia rebaudiana*) el contenido de carbohidratos es de 58,5 % mayor que los tres estadios estudiados (RODRIGUEZ, 2010), mientras que las hojas de kutzu (*Pueraria phaseoloides*) contienen 28,88 % de carbohidratos siendo inferior a los estadios analizados (ESPINOZA, 1993).

**Cuadro 3.** Resultados del análisis químico de la hoja de cashahuasca en los tres estadios.

Determinaciones	Estadio de hoja					
	Apical		Medio		Basal	
	BH <sup>1</sup>	BS <sup>2</sup>	BH <sup>1</sup>	BS <sup>2</sup>	BH <sup>1</sup>	BS <sup>2</sup>
Humedad (%)	78,53 ± 0,01 <sup>c</sup>	-----	74,85 ± 0,02 <sup>b</sup>	-----	72,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	-----
Proteína (%) (N x 6.25)	4,80 ± 0,02	22,38 ± 0,08 <sup>c</sup>	4,69 ± 0,02	18,64 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,08 ± 0,03	14,72 ± 0,01 <sup>a</sup>
Grasa (%)	0,95 ± 0,00	4,44 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,54 ± 0,00	2,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,04	2,84 ± 0,01 <sup>b</sup>
Fibra (%)	3,66 ± 0,00	17,12 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,63 ± 0,04	26,37 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,17 ± 0,00	25,85 ± 0,00 <sup>b</sup>
Ceniza (%)	1,36 ± 0,03	6,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,02	7,82 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,03	8,63 ± 0,09 <sup>c</sup>
Carbohidratos (%) <sup>3</sup>	10,7 ± 0,03	49,73 ± 0,10 <sup>c</sup>	11,32 ± 0,02	45,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	13,31 ± 0,05	47,97 ± 0,13 <sup>b</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística (p<0,05).

<sup>1</sup> % Base húmeda, <sup>2</sup> % Base seca, <sup>3</sup>Por diferencia



## 4.2 Caracterización fitoquímica de la hoja de cashahuasca

### 4.2.1 Determinación de solubilidad de los extractos de hojas de cashahuasca

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de solubilidad realizado en los extractos de hojas de cashahuasca en los estadios apical, medio y basal.

**Cuadro 4.** Resultados de solubilidad de los extractos de las hojas de cashahuasca en tres estadios.

Sustancia	Estadio de hoja		
	Apical	Medio	Basal
n-Hexano	-	-	-
Acetona	-	+	+
Diclorometano	-	+	++
Metanol	++	+	++
Etanol	++	++	++
Agua destilada	-	+	-

(-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Soluble, (+++) muy soluble

Se observó solubilidad en metanol y etanol, deduciéndose que los componentes químicos mayoritarios dentro de las hojas de cashahuasca son de estructura y naturaleza polar, teniendo también como antecedente los estudios realizados en la hoja de *Vallea stipularis* L.f. (Chuillur) el cual tiene la misma solubilidad (BONILLA, 2007).

#### 4.2.2 Análisis del tamizaje fitoquímico de la hoja de cashahuasca

El tamizaje fitoquímico permitió determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos de las hojas. En el Cuadro 5 se muestra los resultados del tamizaje fitoquímico realizado en extractos alcohólico de las hojas de cashahuasca en los estadios apical, medio y basal, mostrando una alta variabilidad de compuestos presentes destacando entre estos: alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, quinonas y glicosidos.

Existe presencia de alcaloides en las hojas de los tres estadios, en poca cantidad (+), comparado con la hoja de oregano (*Lippia origanoides* h.b.k.) que es de moderada cantidad (++) (HENAO, 2009) y también considerando la hoja de insulina (*Justicia chlorostachya*) (++) , que tiene moderada presencia de este metabolito (PINO, 2007).

El análisis fitoquímico de hojas de cashahuasca permitió comprobar también la presencia de flavonoides en la especie, ya que en los tres estadios de hojas evaluados se obtuvieron resultados positivos con la reacción de Shinoda y del ácido clorhídrico. Esto indica la presencia de flavonoides tipo flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, isoflavonoide y leucoantocianidinas. El estadio de hoja apical presentó poca presencia (+) a comparación del estadio de hoja medio y basal donde hay moderada presencia (++) de estos tipos de flavonoides; las hojas estudiadas presentaron menor contenido que las hojas de insulina (*Justicia chlorostachya*) (+++), que tienen abundante presencia de estos metabolitos secundarios (PINO, 2007); de igual modo las hojas de oregano (*Lippia origanoides* h.b.k.) (+++), teniendo abundante presencia de este metabolito (HENAO, 2007).

**Cuadro 5.** Resultados del tamizaje fitoquímico de la hoja de cashahuasca en los tres estadíos.

METABOLITOS	Estadío de hoja		
	Apical	Medio	Basal
Alcaloides (Dragendorff)	+	+	+
Alcaloides (Mayer)	+	+	+
Flavonoides (Shinona(Mg/HCl))	+	++	++
Fenólicos (Cloruro Ferrico)	+++	+++	+++
Taninos (Gelatina)	+	+	+
Aminoacidos (Ninhidrina)	-	-	-
Quinonas (Burtranger(NaOH))	+	+	+
Glicosidos (Molish( $\alpha$ naftol/ $H_2SO_4$ ))	++	++	++

(-) Ausente, (+) Poco, (++) Moderado, (+++) Abundante

El análisis de los compuestos fenólicos dentro de los tres estadíos de la hoja de cashahuasca indicó abundante presencia (+++), teniendo una

similar presencia de este metabolito secundario comparando con la hoja de *Vallea stipularis* L.f. (Chuillur) (BONILLA, 2007), pero en comparación con la hoja de maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) que tiene moderada presencia de este metabolito (++) (CUENTAS, 2008).

El extracto alcohólico de las hojas de cashahuasca dentro de los tres estadios mostraron precipitación con el reactivo gelatina - sal, indicando que en este órgano se concentran los taninos producidos por la planta, y el precipitado produce coloración verde tras la adición de cloruro férrico, se infiere que estos taninos son del tipo catéquico o condensados. Sin embargo, la reducida cantidad de precipitado (+) obtenido indica una baja concentración de taninos en las muestras, presentando un contenido menor que en las hojas de (*Lepidium peruvianum* Chacón) maca (++)), la cual tiene moderada presencia de estos metabolitos secundarios (CUENTAS, 2008). Mientras que el contenido es similar al obtenido con las hojas de (*Pterisvittata* L.) helecho (+) que tiene también una baja concentración de este metabolito secundario (ACOSTA, 2010).

Se determinó la presencia de quinonas dentro de los tres estadios en la hoja de cashahuasca, pero en poca cantidad (+), en comparación con la hoja de orégano (*Lippia organoides* h.b.k.) que contiene abundante presencia de este metabolito secundario (+++) (HENAO, 2009); pero presentó mayor contenido que las hojas de (*Lepidium peruvianum* Chacón) maca (-) que no tiene presencia de este metabolito (CUENTAS, 2008).

Se encontró moderada presencia (++) de glicosidos dentro de los tres estadios de la hoja de cashahuasca, tenido poca presencia (+) de este

metabolito en la hoja de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala*) (WAISEL, 2003); pero presentó un contenido menor que las hojas de *Valleestipularis L.f.* (*Chuillur*) que tuvo abundante (+++) presencia de este metabolito (BONILLA, 2007).

#### **4.2.3 Análisis cromatográfico de la hoja de cashahuasca**

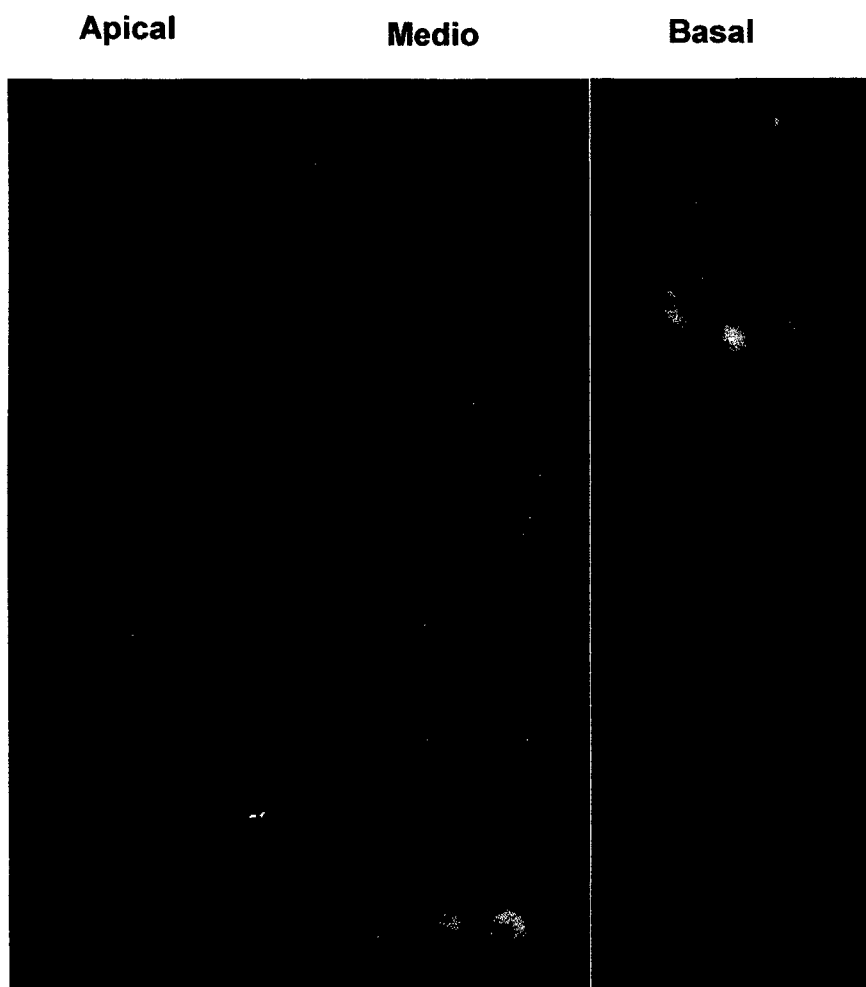
En la cromatografía en capa fina se utilizó placas con silicagel y como sistema de solventes: metanol - diclorometano (1:4) v/v, presentándose tres manchas a luz UV 254 y 365 nm, luego se realizó la cromatografía en escala preparativa para luego ser reveladas, dando como resultado:

Se determinó la presencia de compuestos fenólicos, con el reactivo tricloruro al calentarse la placa, resultando positivo obteniendo pequeñas manchas negras en las tres placas, presentándose en mayor proporción en el origen, caracterizándose por ser metabolitos pesados (BONILLA, 2007).

También se determinó la presencia de flavonoides al emplearse el reactivo ácido sulfúrico al 50 %, al observarse en la luz UV a 365 nm resultando positivo, observándose una coloración de celeste a amarillo claro, el rojo se intensificó y en el origen el color amarillo es de menor a mayor intensidad, indicando la presencia de este metabolito; determinando 5 posibles flavonoides. Estos resultados se presentaron en las tres placas debido a la presencia de metabolitos similares (LOCK DE UGAZ, 1988).

Al utilizarse el reactivo warnep se determinó la presencia de alcaloides (coloración marrón es positivo), dando una coloración amarillenta para anaranjada, a diferencia del origen que tuvo la coloración marrón, esto se

determino en las tres placas, en conclusión si hay presencia de alcaloides pero en mínima cantidad (HENA O, 2009).



**Figura 6.** Cromatografía en capa delgada de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

### **4.3 Evaluación de la capacidad antioxidante en los extractos de hojas de cashahuasca**

#### **4.3.1 Inhibición del radical 1,1 diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH)**

Para determinar la capacidad antioxidante en los extractos de las hojas de cashahuasca en sus tres estadios; se evaluó frente al radical DPPH,

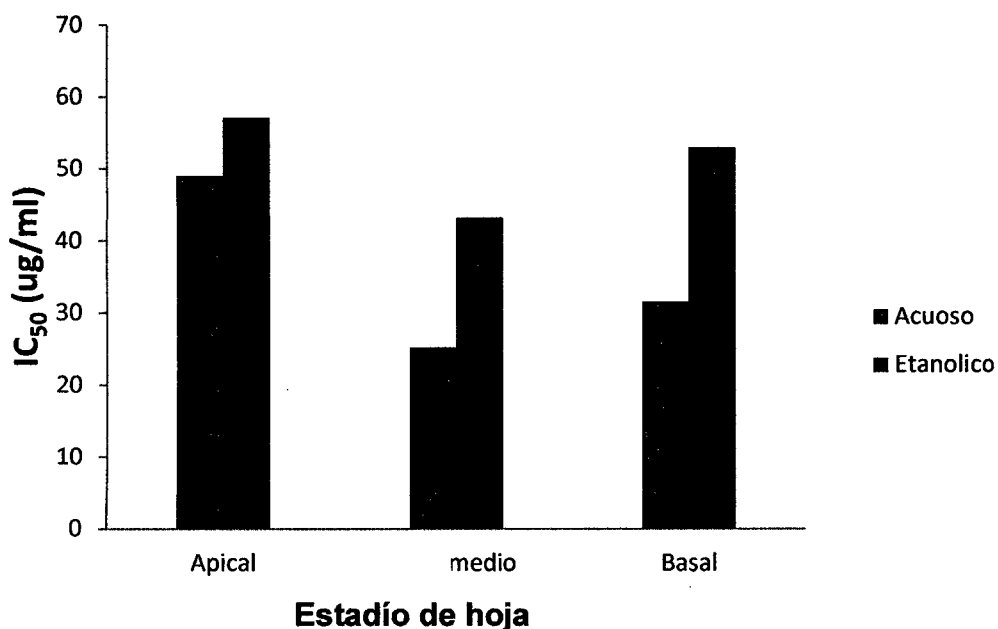
se presentan a continuación en el coeficiente de inhibición al 50 % ( $IC_{50}$ ) e índice de actividad antioxidante (AAI):

Los resultados de la prueba de DPPH fueron expresados en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) para los diferentes estadios de hojas apical, medio y basal como se muestra en el Cuadro 6 y Figura 7 los valores encontrados fueron analizados estadísticamente y se determinó que existe diferencia altamente significativos (Cuadro 20 del anexo II); calculado los promedios según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) se encontró que el mejor tratamiento corresponde al estadio de hoja medio del extracto acuoso con  $IC_{50}$   $25,25 \pm 0,010 \mu\text{g/ml}$ , comparado con el estadio de hoja apical del extracto etanólico  $IC_{50}$   $57,16 \pm 0,016 \mu\text{g/ml}$  y los demás estadios.

**Cuadro 6.** Inhibición de radicales libres de DPPH ( $IC_{50}$ ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

Determinaciones		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
APICAL	Acuoso	$49,01 \pm 0,004^d$
	Etanólico	$57,16 \pm 0,016^f$
MEDIO	Acuoso	$25,25 \pm 0,010^a$
	Etanólico	$43,18 \pm 0,011^c$
BASAL	Acuoso	$31,51 \pm 0,006^b$
	Etanólico	$52,90 \pm 0,009^e$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM,  $n=9$ ) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Comportamiento del IC<sub>50</sub> con el radical DPPH en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.

En comparación con la hoja de maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) del extracto en agua destilada tiene un IC<sub>50</sub>  $75,29 \pm 0,016$  µg/ml, que es de menor capacidad antioxidante frente a nuestra hoja (CUENTAS, 2008). También se comparó con los extractos hidroalcolicos de hojas de yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. Y Endl.) H. Robinson) de las diferentes accesiones procedentes de Cajamarca tuvieron valores IC<sub>50</sub> 50,7 a 110,3 µg/ml, siendo la de mayor potencial en la captación de radicales de DPPH las de las hojas de cashahuasca (AMAO, 2011). Pero cuando se comparó con el extracto metanolico de las hojas de achiote (*Bixa Orellana* L.) mostro un IC<sub>50</sub> 22,36 µg/ml en la prueba de DPPH, es decir mostro una actividad atrapadora de radicales libres mejor que las hojas de casahuasca (SHILPI J. y COL, 2006).



Los resultados de la prueba del índice de actividad antioxidante (AAI) fueron expresados en ( $\mu\text{g DPPH/ } \mu\text{g Muestra}$ ) para los diferentes estadios de hojas apical, medio y basal como se muestra en el cuadro 7 y figura 8 los valores encontrados fueron analizados estadísticamente y se determinó que existe diferencia altamente significativos (Cuadro 21 del anexo II); calculado los promedios según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

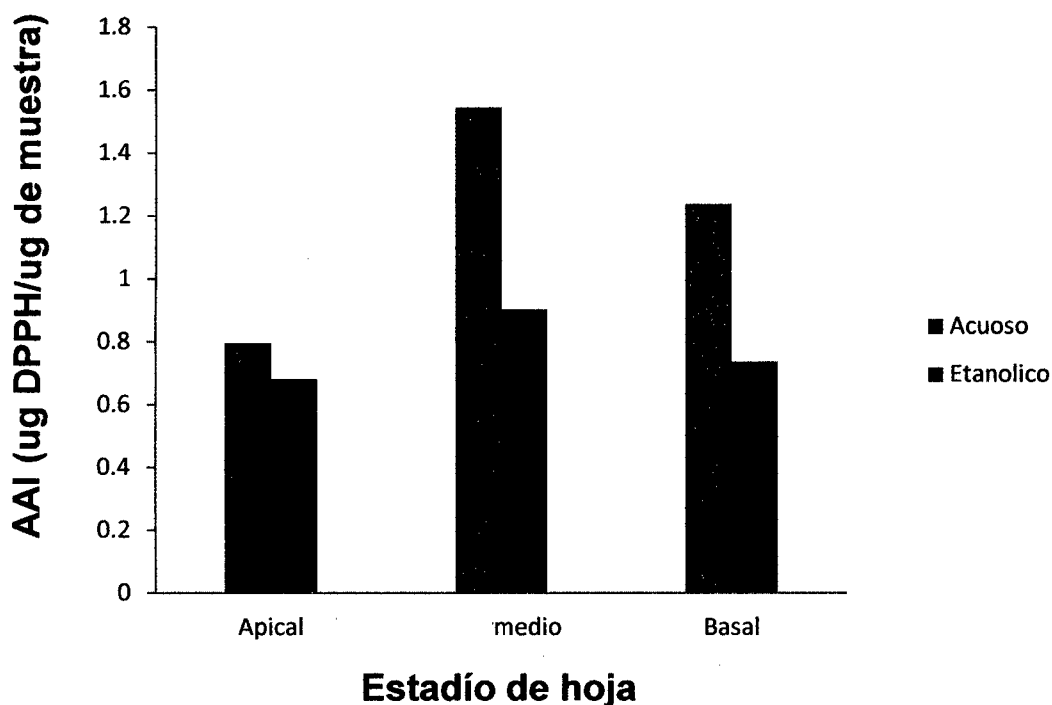
**Cuadro 7.** Determinación del AAI en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

Determinaciones		AAI ( $\mu\text{g DPPH/ } \mu\text{g Muestra}$ )
APICAL	Acuoso	$0,796 \pm 0,00006^d$
	Etanólico	$0,682 \pm 0,0002^f$
MEDIO	Acuoso	$1,545 \pm 0,0006^a$
	Etanólico	$0,903 \pm 0,0002^c$
BASAL	Acuoso	$1,238 \pm 0,0002^b$
	Etanólico	$0,737 \pm 0,0001^e$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM,  $n=9$ ) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).

SAHGGAL (2009) menciona que el AAI se clasifica como actividad antioxidante pobre cuando el  $\text{AAI} < 0,5$ ; moderada cuando la actividad antioxidante del AAI es entre  $0,5 - 1,0$ ; potente actividad antioxidante cuando el AAI es entre  $1,0 - 2,0$ , y muy fuerte cuando el  $\text{AAI} > 2,0$ ; entonces se encontró que el mayor y mejor tratamiento corresponde al estadio de la hoja medio del extracto acuoso con AAI de  $1,545 \pm 0,0006 \mu\text{g DPPH / } \mu\text{g Muestra}$  (siendo un antioxidante potente), comparado con el estadio de la hoja apical del extracto

etanolico con un AAI de  $0.682 \pm 0,0002 \mu\text{g DPPH}/ \mu\text{g Muestra}$  y los demás estadios.



**Figura 8.** Comportamiento del AAI en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

Comparado con otras muestras así como las dos macro algas rojas *Hypnea musciformis* y la *Gracilaria mamillaris* tienen un AAI de 1,18 y 1,20; un valor medio que es comparable al de otros antioxidantes determinados por este método (ROZO, 2010). También comparándole con la planta *M.deppeana*, el extracto de acetato de etilo, el extracto alcohólico y el extracto hexano mostró que el índice mayor actividad antioxidante (AAI) es 1,9; 1,6 y 0,9 respectivamente, frente a nuestra muestra este tiene similitud (DOMINGUEZ, 2009).

Este método fue elegido debido a que proporciona un valor constante, independiente de la concentración del DPPH y la muestra utilizada.

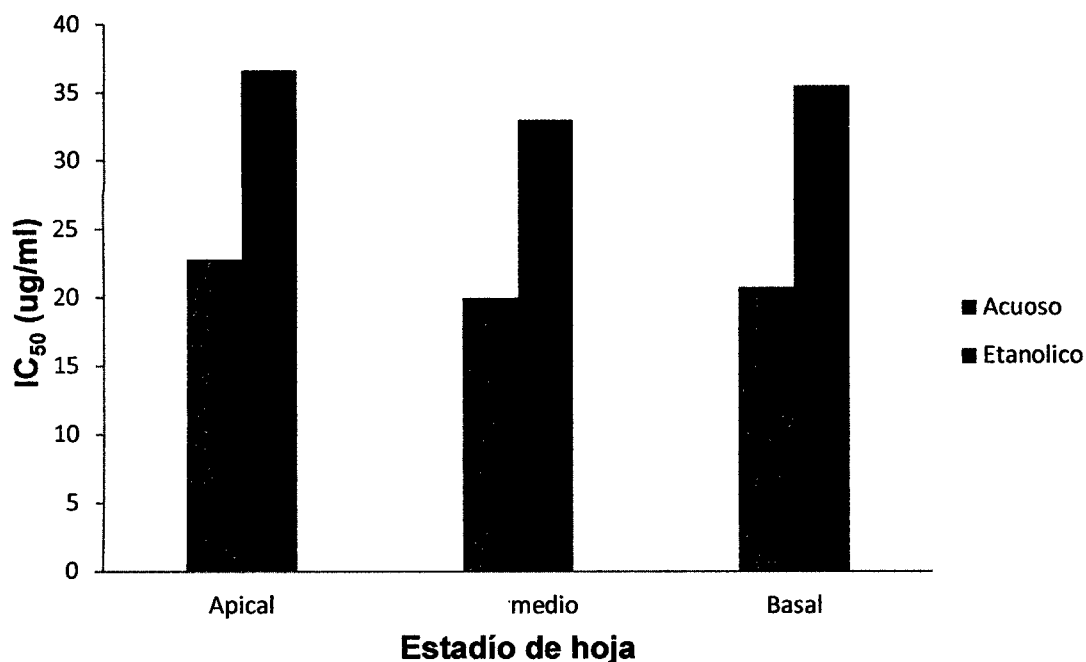
#### 4.3.2 Inhibición del radical catión 2,2- azinobis (3 - etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>)

Los resultados de la evaluación de la capacidad secuestrante del catión ABTS<sup>o+</sup> se observa en el Cuadro 8 y Figura 9, realizado el análisis estadístico se encontró que existe diferencia altamente significativo (Cuadro 22 del anexo II) entre los estadíos de hojas apical, medio y basal. Comparando los promedios de los tratamientos mediante la prueba de tukey ( $p < 0,05$ ) se encontró que el estadío de hoja que ejerció efecto sobre la capacidad de inhibir el catión ABTS<sup>o+</sup>, siendo el mejor del estadío de hoja medio del extracto acuoso con  $IC_{50} 19,98 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$ .

**Cuadro 8.** Determinación del  $IC_{50}$  del radical ABTS<sup>o+</sup> en la hoja de cashahuasca en tres estadíos.

Determinaciones		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
APICAL	Acuoso	$22,80 \pm 0,007^c$
	Etanólico	$36,66 \pm 0,002^f$
MEDIO	Acuoso	$19,98 \pm 0,005^a$
	Etanólico	$32,97 \pm 0,014^d$
BASAL	Acuoso	$20,71 \pm 0,050^b$
	Etanólico	$35,50 \pm 0,012^e$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM,  $n=9$ ) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).



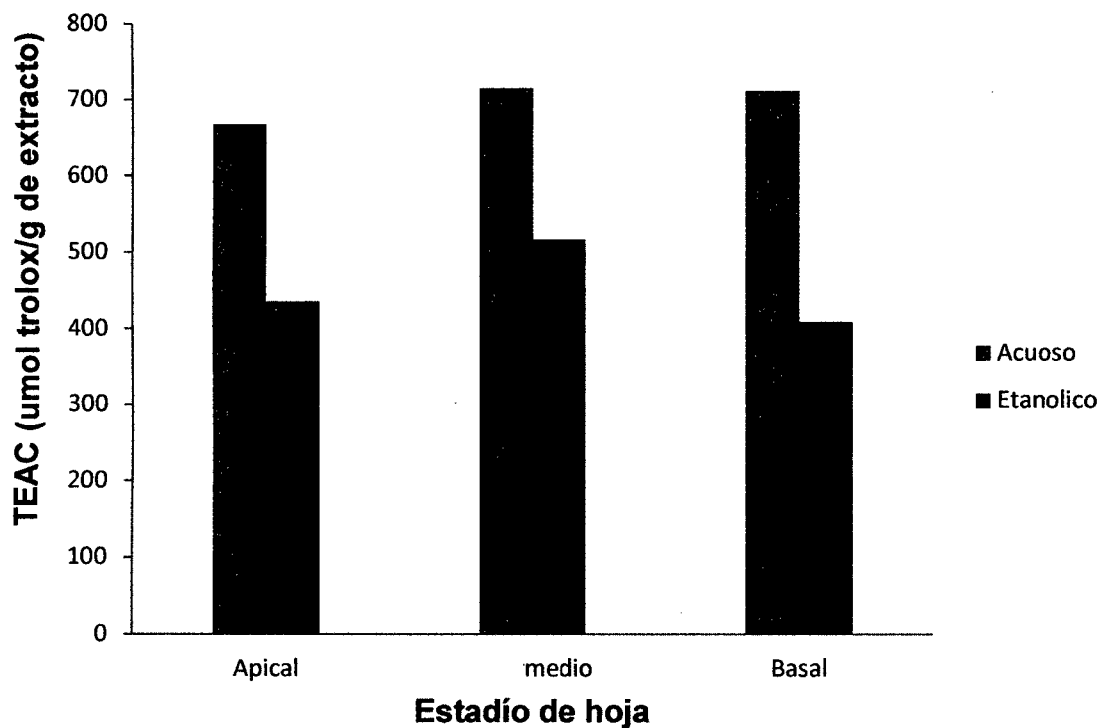
**Figura 9.** Comportamiento del  $IC_{50}$  con el radical  $ABTS^{0+}$  en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

Los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) se observa en el Cuadro 9 y Figura 10, realizado el análisis estadístico se encontró que existe diferencia altamente significativo (Cuadro 23 del anexo II) entre los estadios de hojas apical, medio y basal. Comparando los promedios de los tratamientos mediante la prueba de tukey ( $p < 0,05$ ) se encontró que el estadio de hoja que ejerció mayor capacidad antioxidante fue el estadio de hoja medio del extracto acuoso con  $TEAC 715,42 \pm 0,26 \mu\text{mol de trolox / g muestra}$  y la de menor capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) fue la del estadio de hoja basal del extracto etanolico con  $409,20 \pm 0,07 \mu\text{mol de trolox/ g muestra}$ .

**Cuadro 9.** Determinación del TEAC en la hoja de cashahuasca en tres estadios.

Determinaciones		TEAC( $\mu\text{mol}$ de trolox/ g muestra)
APICAL	Acuoso	$667,39 \pm 0,11^c$
	Etanólico	$436,09 \pm 0,13^e$
MEDIO	Acuoso	$715,42 \pm 0,26^a$
	Etanólico	$516,91 \pm 1,92^d$
BASAL	Acuoso	$711,05 \pm 0,36^b$
	Etanólico	$409,20 \pm 0,07^f$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM, n=9) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Comportamiento del TEAC en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

De acuerdo a los resultados referidos la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de la hoja de cashahuasca del estadio medio extracto acuoso, comparado con la hierbas chinas que regulan la circulación sanguínea como *caulis Spatholobus suberectus* (1990 TEAC  $\mu\text{mol/g}$ ) y *radix Sanguisorba officinalis* (1940 TEAC  $\mu\text{mol/g}$ ), la capacidad antioxidante de la cashshuasca es inferior a estas dos hierbas, pero con mejor capacidad antioxidante frente a la *fructus Ziziphus jujuba* (40 TEAC  $\mu\text{mol/g}$ ) (LIAO, 2008). También en comparación con las hojas de *Polocarpus alvaradoi* controla la glaucoma, enfermedad de la vista (1510 TEAC  $\mu\text{mol/g}$ ), teniendo mejor capacidad antioxidante que la cashahuasca (CONSTANZA, 2007).

#### 4.4 Caracterización de la bebida funcional

##### 4.4.1 Evaluación sensorial de la bebida funcional

Los resultados de la evaluación sensorial de la bebida funcional se presentan en el siguiente cuadro a través de la prueba de Friedman:

**Cuadro 10.** Evaluación del olor, color y sabor de la bebida funcional a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración			
	(mg/mL)	Olor	color	Sabor
C <sub>1</sub>	166,66	5,70 ± 0,24 <sup>b</sup>	6,23 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,63 ± 0,33 <sup>b</sup>
C <sub>2</sub>	125,00	6,10 ± 0,25 <sup>ab</sup>	6,73 ± 0,21 <sup>a</sup>	5,80 ± 0,26 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub>	100,00	6,33 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,32 <sup>a</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).

En la evaluación del olor el análisis de varianza (Cuadro 24 del anexo III), nos indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones, el C<sub>1</sub> y el C<sub>2</sub> son estadísticamente iguales, C<sub>2</sub> y el C<sub>3</sub> no tienen diferencia estadística, pero entre el C<sub>1</sub> y el C<sub>3</sub> si hay diferencia significativa.

En la evaluación de color el análisis de varianza (Cuadro 25 del anexo III), indica que no hay diferencia significativa entre las concentraciones.

En la evaluación del sabor el análisis de varianza (Cuadro 26 del anexo III), nos indica que si existe diferencia significativa en las concentraciones, entre el C<sub>1</sub> y el C<sub>2</sub> si hay diferencia significativa, C<sub>2</sub> y el C<sub>3</sub> son estadísticamente iguales, pero entre el C<sub>1</sub> y el C<sub>3</sub> también hay diferencia significativa.

En conclusión la mejor concentración elegida por los panelistas según el análisis estadístico es la C<sub>2</sub> (125,00mg/ml).

#### **4.4.2 Análisis fisicoquímico de la bebida funcional**

De acuerdo a los resultados del análisis fisicoquímico de la bebida funcional presento:

Densidad de 0,9853 g/cc, comparada con las bebidas de zumo y leche comerciales tienen mayor densidad entre 1,017 - 1,062 g/L (ZULUETA, 2009), también comparando con la bebida hidratante a base de lactosuero tiene mayor densidad entre 1,017 - 1,023 g/L (CHOEZ, 2010), y también comparando con la bebida funcional del fruto de ayrampu (*Berberis sp.*) que tiene mayor densidad 1,015 g/cc. (CCATAMAYO, 2011).

Color, Según la escala de CieLab ( $L^* a^* b^*$ ) los parámetros  $L^* 53.57 \pm 0,11$  (luminosidad) contiene alta luminosidad esto quiere decir que es claro,  $a^* -1,53 \pm 0,03$  (coordenada verde - rojo) tiene un tono más verde que rojo y  $b^* 6,24 \pm 0,09$  (coordenada azul - amarillo) tiene más azul que amarillo, comparado con la bebida funcional a base de beta glucano de cebada  $L^* 20,12 - 21,28$  tiene menor luminosidad por lo tanto es más oscuro,  $a^* 1,28 - 1,65$  tiene más rojo que verde,  $b^* 9,84 - 10,55$  tiene más amarillo que azul (AHMAD, 2011). Comparando con las bebidas de zumo y leche comerciales tiene entre un  $L^* 53,05 - 80,62$  contienen luminosidad muy claras,  $a^* -13,56 - 20,76$  tiene ambos tonos,  $b^* 13,25 - 62,76$  tiene más amarillo que azul (ZULUETA, 2009). También comparando con la bebida funcional a base de borrojo tiene entre un  $L^* 52,80 - 61,20$  contienen luminosidad claras,  $a^* -2,12 - 1,27$  contienen tonos más verde que rojo,  $b^* 8,20 - 14,70$  tiene más amarillo que azul (SALAMANCA, 2010).

La acidez de la bebida funcional de la cashahuasca es de  $0.039 \% \pm 0,05$ , comparandola bebida funcional a base de borrojo contiene mayor acidez entre  $0,71 - 1,77 \%$ , esto se debe a que la bebida también está a base de yogur (SALAMANCA, 2010), también comparando con una bebida hidratante a base de lacto suero tiene mayor acidez entre  $0,3872 - 0,4096 \%$  (CHOEZ, 2010), y también comparando con la bebida funcional a base de beta glucano de cebada que tiene mayor acidez entre  $1,49 - 1,53\%$  (AHMAD, 2011).

El brix de la bebida funcional de la cashahuasca es de  $1,002 \pm 0,001$ , comparando con la bebida funcional a base de borrojo contiene mayor °Brix entre  $16 - 24$ , esto se debe a que la bebida también está a base de miel



(SALAMANCA, 2010), también en comparación con la bebida funcional del fruto de ayrampu (*Berberis sp.*) que tiene 15 °Brix mayor que la cashahuasca, esto se debe a la adición de azúcares (CCATAMAYO, 2011). Y también comparando con la bebida hidratante a base de lacto suero tiene mayor °Brix entre 4,0 - 5,0 (CHOEZ, 2010).

El pH de la bebida funcional de la cashahuasca es de  $5.30 \pm 0,003$  comparando con la bebida hidratante a base de lacto suero tiene menor pH entre 3,3 - 3,7 (CHOEZ, 2010), comparando con la bebida funcional a base de borrojo contiene una menor pH entre 3,68 - 4,05 (SALAMANCA, 2010), y también comparando con la bebida funcional del fruto de ayrampu (*Berberis sp.*) que tiene un pH 3, menor que la bebida de cashahuasca (CCATAMAYO, 2011).

Los resultados del análisis fisicoquímico en la bebida funcional se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 11.** Resultados del análisis fisicoquímico en la bebida funcional.

Determinaciones	Bebida funcional
Densidad(g/cc)	$0,9853 \pm 0,00003$
Color	L* $53.57 \pm 0,11$
	a* $-1,53 \pm 0,03$
	b* $6,24 \pm 0,09$
Acidez titulable (%)	$0,039 \pm 0,05$
°Brix	$1,002 \pm 0,001$
pH	$5,30 \pm 0,003$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM, n=3).

#### 4.4.3 Cuantificación de polifenoles totales en la bebida funcional

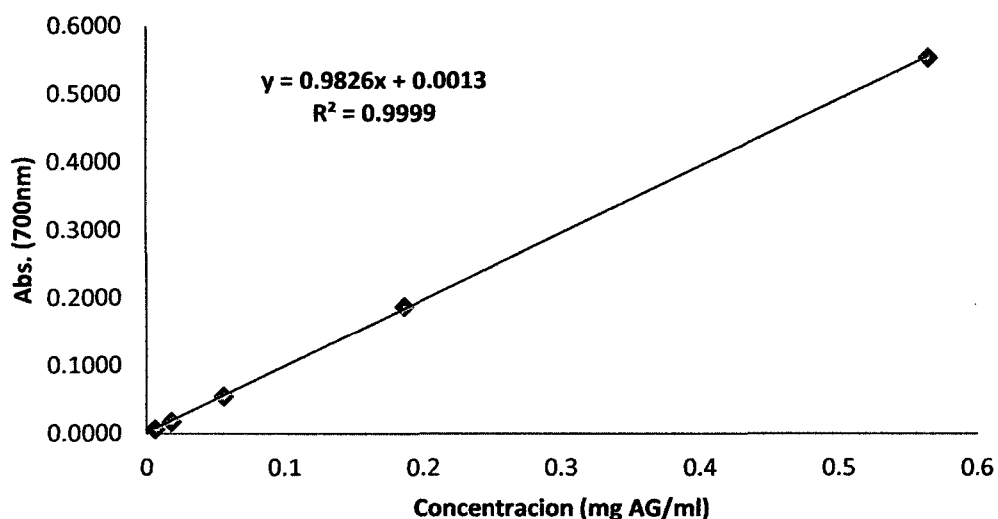
Para realizar la cuantificación de polifenoles totales se elaboró una curva estándar en base a ácido gálico cuyas concentraciones fueron 0,564; 0,186; 0,056; 0,018; 0,006 mg/ml; los resultados se presenta en el Cuadro 12 y Figura 11, se puede apreciar el diagrama de dispersión de las absorbancias, obteniendo una ecuación matemática de dos variables y un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9999$ .

**Cuadro 12.** Determinación de la curva estándar de ácido gálico.

Concentraciones mg CAT/mL	Absorbancia (700 nm)			
	R1	R2	R3	Promedio
0,564	0,557	0,554	0,552	0,5543
0,186	0,189	0,187	0,188	0,1880
0,056	0,057	0,054	0,055	0,0553
0,018	0,018	0,017	0,018	0,0177
0,006	0,007	0,006	0,007	0,0067

La cuantificación de polifenoles se realizó en la bebida funcional, utilizando la curva estándar en base a ácido gálico, dando como resultado  $89,64 \pm 1,16$  mg AG/100 ml bebida funcional, teniendo mayor contenido de polifenoles a comparación con MURILLO (2002) que reporta 33 - 68 mg/100 ml en bebidas de té (HI-C Limón, Dos Pinos Tea, Tropical Melocotón y Tropical Limón) pero no especifica el estadio de las hojas. Comparando con las bebidas de zumo y leche comerciales encontrándose concentraciones de  $26,5 \pm 0,02$  mg AG/100 ml a  $99,8 \pm 0,04$  mg AG/100 ml dichas concentraciones difieren significativamente según las condiciones de almacenamiento, esto quiere decir

que la bebida funcional de cashahuasca se encuentra dentro de los rangos y con buen contenido de polifenoles (ZULUETA, 2009), también comparando la bebida funcional a base de borjo contiene polifenoles entre 36 - 108 AG/100 ml, la bebida funcional de la cashahuasca también está dentro de estas concentraciones (SALAMANCA, 2010).



**Figura 11.** Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

#### 4.4.4 Evaluación de la capacidad antioxidante en la bebida funcional

Para determinar la capacidad antioxidante de la bebida funcional, se evaluó frente al coeficiente de inhibición al 50 % ( $IC_{50}$ ) del estadio de hoja medio de los extractos acuosos del DPPH y el  $ABTS^{ot}$  con la concentración de la bebida funcional.

En el Cuadro 13 se presenta los resultados de la capacidad antioxidante en la bebida funcional, que en radical DPPH y ABTS<sup>o+</sup> frente a la concentración de la bebida funcional, esto quiere decir que la bebida funcional de la cashahuasca es 114,45 y 144,64 número de veces mayor que la concentración del IC<sub>50</sub> parte medio del extracto acuoso, respectivamente.

**Cuadro 13.** Determinación de la capacidad antioxidante en la bebida funcional.

Radical	Concentración (µg/ml)	Concentración (µg/ml)	
		Bebida funcional	Nº de veces
DPPH	25,25	2890	114,45
ABTS <sup>o+</sup>	19,98	2890	144,64

## V CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y discusiones se establecieron las siguientes conclusiones:

- La composición química en la hoja de cashahuasca fue variada, la hoja apical presento los mayores contenidos de humedad 78,53 %, proteína 22,38 %, grasa 4,44 % y carbohidratos 49,73 %; la hoja media mostró el mayor contenido de fibra 26,37 % y la hoja basal mostró el mayor contenido de ceniza con 8,63 %.
- La composición fitoquímica en los tres estadios de la hoja de cashahuasca, fueron similares, se determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, quinonas y glicosidos.
- El extracto acuoso de la hoja del estadio medio presento la mejor capacidad antioxidante frente al radical DPPH con un  $IC_{50}$   $25,25 \pm 0,010$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ , AAI  $1,545 \pm 0,0006$   $\mu\text{g DPPH} / \mu\text{g muestra}$  y para el catión  $ABTS^{o+}$  con un  $IC_{50}$   $19,98 \pm 0,005$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ , TEAC  $715,42 \pm 0,26$   $\mu\text{mol trolox/g muestra}$ .
- La bebida funcional de 125,00 mg / ml, fue la mejor calificada en los atributos sensoriales olor y color con el valor "me gusta poco" y en el sabor "no me gusta ni me disgusta", además obtuvo un contenido de polifenoles totales  $89,64 \pm 1,16$  mg AG / 100 ml, caracterizándose por tener una capacidad antioxidante mayor en 114,45 frente al radical DPPH

y 144,64 frente al radical ABTS<sup>o+</sup>, considerando el valor IC<sub>50</sub> respectivamente.

## VI RECOMENDACIONES

- Realizar la cuantificación de los compuestos fitoquímicos de la hoja de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).
- Realizar estudios toxicológicos de la planta de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth), porque poseen sustancias tóxicas en diferentes proporciones.
- Evaluar los componentes bioactivos y la capacidad antioxidante en otras partes de la planta de cashahuasca como por ejemplo tallos, raíces, etc.
- Evaluar la capacidad antioxidante de la cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth) empleando análisis por HPLC.
- Obtener un producto atomizado a partir del extracto acuoso de la hoja de cashahuasca para su aplicación en productos alimenticios.

## VII ABSTRACT

### **“Antioxidant capacity of aqueous and ethanol extracts, development of a functional drink cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth) leaves”**

This research led to the development of scientific knowledge of the Cashahuasca sheets (*Serjania cf. Rubicaulis* Benth), a plant that grows in the Peruvian amazon. The objectives were to characterize chemical and fitoquímicamente, evaluate the antioxidant capacity of the aqueous extracts, ethanolic and develop a functional beverage. The analysis of antioxidant capacity was determined by the method of Brand-Williams et al. (1995). The statistical analysis used DCA 3A2B factorial arrangement, with the Tukey test ( $p < 0,05$ ) and STATGRAPHICS Centurion XV software. II. The chemical composition was varied, the apical leaf had the highest moisture content (78,53%), protein (22,38%), fat (4,44%) and carbohydrates (49,73%), the half sheet presented the highest fiber content (26,37%) and basal leaf presented the highest ash content (8,63%). The phytochemical composition in the three stages was similar, presenting alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, tannins, quinones and glycosides. The aqueous extract of the leaf, the middle stage, presented the best antioxidant capacity against DPPH radical with  $IC_{50}$   $25,25 \pm 0,010$  mg / mL, AAI  $1,545 \pm 0,0006$   $\mu$ g DPPH /  $\mu$ g sample and for the cation  $ABTS^{\circ+}$  with  $IC_{50}$   $19,98 \pm 0,005$   $\mu$ g / ml, TEAC  $715,42 \pm 0,26$   $\mu$ mol trolox / g sample. The functional beverage of 125,00 mg / ml, was the best qualified in



the sensory attributes odor and color, and obtained a total polyphenol content of  $89,64 \pm 1,16$  mg AG/100 ml, characterized by having a higher antioxidant capacity at 114,45 against DPPH radical and 144,64 versus ABTS<sup>°+</sup> radical , whereas the IC<sub>50</sub> value respectively.

**Key words:** Apical, basal, antioxidant, drink, cashahuasca, phytochemical.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACOSTA, C.; FONSECA, C.; ALMEIDA S.; FONSECA, G.; REYTOR R. 2010. Tamizaje fitoquímico de extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de *Pteris vittata* L. Revista química viva, N° 1. p. 30 - 34.
- AHMAD, D.; MUHAMMAD, A.; TAHIR, Z. y HAQ N. 2011. Extracción y utilización de beta glucano de cebada para la preparación de bebidas funcionales. National Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan. Mundo Alimentario. p. 17 - 20.
- AMAO, I.; SEMINARIO, J.; CISNEROS, R.; TRABUCCO, J. 2011. Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. Y Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca - Peru. An Fac. Med. 2011; 72 (4). p. 239 - 43.
- ANDERSON, D. y PHILLIPS, B. 2001. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. Food. Chem Toxicol 37. p. 1015 - 1025.
- A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis. vitamins and other nutrients. 15° Ed. Gaithersburg Md. U. S. A.
- A.O.A.C. 1997. Official methods of analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International; Agricultural Chemicals, Foods, Contaminants and Drugs. V<sub>1</sub> y V<sub>2</sub> Arlington: A.O.A.C. Inc. p. 2658.

- AVELLO, M. y SUWALSKI, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismo de protección, Atenea 464, II Seminario. p. 161.
- AVELLO M., VALDIVIA R., 2009.Extractos antioxidantes y antimicrobianos de *aristoteliachilensis* y *ugnimolinae* y sus aplicaciones como preservante en productos cosméticos. Vol. 8. N°6. p. 430, 479 - 486.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. 2006.Phenolic compounds in plants and agriindustrial by - products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. Food Chemistry. Vol. 99 (1), p. 191 - 203.
- BONILLA, R; ARROYO, A.; CHÁVEZ, F.; 2007.Estudio fitoquímico y efecto antiulceroso del extracto acuoso de hojas *Valleestipularis*L.f. «chuillur» en ratas. Rev. Acad. Peru Salud 14 (2), p. 102 - 106.
- BRAND - WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995 Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol., p. 22, 25 - 30.
- CARVAJAL, R.; HATA, U; SIERRA, M.; RUEDA, N. 2009.Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strychnos schultesiana krukoff*). Revista Colombia Forestal Vol. 12: p. 161 - 170.
- CCATAMAYO, O.; VALDERRAMA, P. 2011. Aprovechamiento agroindustrial del ayrampu (*Berberis sp.*) en le prosesamiento de una bebida buncional para la seguridad alimentaria. Escuela Academica Profesional de Agroindustrias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Huancavelica. Peru. GCP/RLA/163/NZE - FAO. p. 1 - 15.

- CHASQUIBOL S., LENGUA C., DELMAS I., RIVERA D., BAZAN D., AGUIRRE M., BRAVO A., 2003. Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia, Rev. Per. Quim, Lima, 5 (2): p. 9 - 10.
- CONSTANZA, A.; CUCA, S. 2007. Metabolitos fenólicos aislados de *Pilocarpus alvaradoi* Pittier (Rutaceae). Scientia et Technica año XIII, Nº 33, Universidad Tecnica Pereira. ISSN 0122 - 1701.Colombia. p. 67 - 69.
- CHOEZ, A.; FERNANDA, M. 2010. Elaboración de una bebida hidratante a base de lactosuero y enriquecida con vitaminas. Facultad de ingeniería en mecánica y ciencias de la producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Guayaquil, Ecuador. p. 2 - 8.
- CUBERO N., MONFERRER A. AND VILLALTA J., 2002. Aditivos alimentarios. Madrid, Spain: Mundi - Prensa. ISBN 84-8476-088-X.
- CRUZ, S. 2008. "Presentación de Alcaloides". Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 45 - 54.
- DE MENDIBURU D. 2007. Modelo estadístico. Modelos de efectos fijos, aleatorios y mixtos. (PDF) CAPITULO III: Diseño Completamente al Azar, características, ventajas y desventajas. Arreglo Factorial en D.C.A., Arreglo Factorial en D.B.C.A. Aleatorización.
- DE LA CRUZ, B. 2005. Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas. Tesis para optar el Título Químico Farmacéutico.Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 34.
- DOMÍNGUEZ, O.; MUÑOZ, M.; GARCÍA, R.; VÁZQUEZ, H.; GALLEGOS, E.; CRUZ, S. (2009) Antioxidant and anti - inflammatory activity of

- Moussonía deppeana. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9 (1), BLACPMA ISSN 0717 7917. p.13 - 19.
- DROST, T. 1996. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. Rev. Cub. Med. Milit. 2. p.44 - 57.
- ELEJALDE, G. 2001. Oxidación entre la vida y la enfermedad. Análisis de medicina interna. Madrid-España 18 (1):1 - 4.
- ESPIÑOZA, S. 1993. Extracción de proteínas de la hoja de kuzu (*Pueraria phaseoloides*) para alimentación humana Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Tingo María- Perú. p. 36.
- FINKEL., T. & HOLBROOK, N.J. 2000. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", en *Nature*.408, p.239 - 247.
- FOLINN, C.; CIOCALTEAU, V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* p. 73, 627 - 650.
- GARCIA, N.; GARCIA, G.; ROJO, D.; SANCHEZ, G. 2001. Plantas con Propiedades Antioxidantes. Instituto Superior de Ciencia Básicas y Preclínicas "Victoria Ceirón". Revista Cubana de Investigación Biomédica. 20(3). p. 231.
- GAVIRIA M. C., CIFUENTES O., MONSALVE G., ROJANO B., 2007. Actividad antioxidante de extractos metanolicos de *Attalea butyracea*, Scie, Tech. Año XIII. (33): 298.
- GIRALDO, T.; ARISTIZABAL, G.; VELASCO, M. 2006 Estudio de la obtención de harina de hojas de yuca (*Manihot esculenta crantz*). 2006. Universidad de Cauca. Cali - Colombia. Trabajo de grado realizado en Clayuca. p. 9 - 11.

- HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, M. 1985. Free radicals in biology and medicine. clarendon pres, Oxford.
- HALLIWELL, B.; MARCIA, M.; CHIRICO, S.; AUROMA-OKEZIE, L. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo; GAT they do and how they work. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p. 35.
- HART, L. y FISHER, J. 1991. Análisis moderno de los alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza, España. p. 625.
- HENAO; MUÑOZ; RÍOS, V.; PADILLA; GIRALDO, G. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippiaoriganoidesh.b.k*. Cultivada en el departamento del Quindío. rev.invest. univ.quindio (19): 159 - 164.
- HUAMAN, M.; GUERRERO, A.; TOMAS, CH.; BRAVO, A.; AGUIRRE, M.; CARHUANCHO, A. 2003. Estudio químico y nutricional de las hojas de rabanito, *Raphanus sativus l*. como alimento para el consumo humano. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Rev. Per. Quim. 5 (2): 54 - 58.
- INDECOPI, 1974. Normas N° 319.089, 319.085, 319.081, 319.075, Lima Perú.
- JHONSON, L. 1995. Food technology of the antioxidant nutrients. Critical reviews in food science and nutrition 35(1/2): 149 - 159.
- KÄHKÖNEN, MARJA; ANU I. 2001. Copia and marina heinonen. berry fenolics and their Antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 49: 4076 - 4082.
- KRINSKI BS, YU BP. 2000. Mechanism of action of biological antioxidants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1992; 2000. p. 248 - 254.

- KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO, J. y FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *ciencia y tecnología de alimentos*. Campinas, 25 (4): 726 - 732.
- LARROSA, M. 2002. Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *Lebensmittel - Wissenschaft and Technologie - Food Science and Technology*. 35 (6): 532 - 542.
- LEBEAU, J., FURMAN, C., BERNIER, J.L., DURIEZ, P., TESSIER, E., COTELLE, N. 2000. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Rad. Biol. And Med.* p. 990 - 991.
- LIAO, H.; BANDURY, L.; LEACH D. 2008. Actividad antioxidante de 45 hierbas chinas y la relación con sus características en Medicina Tradicional China. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, December 2008 China; 5:429 - 434.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50 (1):5-18.
- MAZZA, G. 2000. Alimentos funcionales - Aspectos bioquímicos y de procesado. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España. p. 22 - 23.
- MELCHOR S. V., 2002. Procesamiento tecnológico para la obtención de té verde (*Camelliasinensis*): Determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavonoles por HPLC, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María. p. 33 - 34.

- MOSQUERA, O., NIÑO, J., CORREA, Y. y BUITRAGO, D. 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Sci. Et Techn.* 11(27): 23.
- MUÑOZ, O.; MOLLINEDO, P.; GARCIA, P. 2011. Actividad tripanocida y antioxidante in vitro de los extractos etanólicos de *Caesalpinia pluviosa* DC. y *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. *BIOFARBO*, 19 (2):1 - 5.
- MURILLO, E. 2002. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Universidad de Panamá, Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT), Laboratorio Bioquímica y Nutrición. Alfa Editores Técnicos. p.36 - 45.
- MURILLO, E. 2006. Actividad Antioxidante "In Vitro" de las bebidas de frutas. Universidad de Panamá, Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT), Laboratorio Bioquímica y Nutrición. Alfa Editores Técnicos. p. 20 - 27.
- PELLIGRINI, N.; RE, R.; YANG, M. y RICE-EVANS, C. 1999. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts of Antioxidant Activities Applying 2,2 - Azinobis (3 - Ethylenebenzothiazoline - 6 - sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. *Methods in Enzymology*. 299: 379 - 391.
- PINO, B.; CORDOBA C. 2007. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de quibdó - chocó. *Scientia et Technica* Año XIII, No 33. UTP. ISSN 0122-1701. p 387 - 389.
- PENNY, M.E.; ZAVALETA, A.; LEMAY, M.; LIRIA, M.R.; HUAYLINOS, M.L.; ALMINGER, M.; MCCHESENEY, J.; ALCARAZ, F.; REDDY, M.B. 2009.



¿Puede la hoja de coca contribuir a mejorar la nutrición de la población Andina?. Food and Nutrition Bulletin.Vol. 30, N° 3, p. 207 - 209.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (10): 4290 - 4302.

PSZCZOLA, D.E. 2003. Getting more fruits and vegetable's into foods. Food Technology..57 (1): 52.

PUERTAS, M.; MESA A.; SAEZ, J. 2005 In Vitro radical scavenging activity of two Columbian Magnoliaceae. Naturwissenschaften; 92 (8):381 - 4.

RAFTER, J.J. 2002. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. The British Journal of Nutrition. 88: S 219 - S 224.

RE, R. [et al.]. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26 (9 - 10): 1231 - 1237.

ROBBINS, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 51: 2866 - 2887.

ROBERFROID, M.B. 2002. Global view on functional foods: European perspectives. The British Journal of Nutrition. 88: S 133 - S 138.

RODRÍGUEZ, P. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cub. Med. Milit. 30(1): 15 - 20.

RODRIGUEZ, P.; PERDOMO, G.; SANCHEZ, O.; ROSAS, P.; BEDOYA, M. 2010. Caracterización física, química y sensorial de la hoja de

- Steviarebaudiana* (var. morita II) cultivada en tres paisajes del Caquetá (Colombia). *Momentos de Ciencia* 7(1): 57 - 65.
- ROIG, JT, .1988. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ed. Científico - Técnica. La Habana. p. 839.
- ROMERO MARES P., 2008. Especialización en estadística aplicada diseño de experimentos I. UNAM, México. p. 25 - 28.
- ROZO, G.; ROZO, C.; RODRIGUEZ, L.; PUYANA, M.; RAMÍREZ, J. 2010. bioprospección en algas del caribe colombiano y su valor como fuente potencial de alimento. Universidad distrital Francisco José de Caldas. Colombia. p.57 - 56.
- SALAMANCA, G.; OSORIO, T.; MONTOYA. 2010. Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borojo (*borojoa patinoi cuatrec*). *Rev Chil Nutr.* 37(1): 87 - 96.
- SANCHEZ - MORENO, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology Internacional.* 8 (3): 121 - 137.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L.; LAO, J. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry.* p. 1 - 23.
- SCHLESIER, K. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research.* 36 (2): 177 - 187.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 2009. p.112, 654 - 658.

- SHEKELLE P, HARDY ML, COULTER I, UDANI J, SPAR M, ODA K. 2003. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Summ)*; 75: 1 - 3.
- SHILPI, J., TAUFIQ – UR - RAHMAN M, UDDIN SJ, ALAM MS, SADHU SK, SEIDEL V. 2006. Preliminary Pharmacological Screening of *Bixa orellana* L. Leaves. *J Ethnopharmacol.* 108(2): 264 - 71.
- SIES, H. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy vol 38 USA Academia Press Inc. p. 293.
- SILVA, W.; GRAU, R.; MARX, F.; BIFANI, V.; IHL, M. 2011. Capacidad antirradicalaria e inhibición de la oxidación de ácido ascórbico de seis infusiones acuosas de hojas. Universidad de La Frontera. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Departamento de Ingeniería Química. p. 35 - 39.
- UREÑA P. D., ARRIGO H., GIRON M. 1999. Evaluación sensorial de los alimentos, Aplicación didáctica, 1 ed., Lima, Perú, edt. Agraria. p. 95 - 99.
- VILLANUEVA, J. 2001. Antocianina, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camú camú (*Myrciariadubia Mc Vaugh H.B.K.*). Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentaria. Tingo María - Perú. p. 47.
- WAIZEL, B.; MARTÍNEZ, P.; VILLARREAL, O.; ALONSO, C.; PLIEGO, C. 2003. Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad

citotóxica y antimicrobiana de *cuphea aequipetalaca* v. (lythraceae). ISSN 1405-2768; México. Núm. 15. p. 99 - 108.

ZULUETA, A. 2009. Variación de compuestos bioactivos y con capacidad antioxidante en una bebida de zumo y leche al aplicar tecnologías no térmicas de conservación. Tesis para optar el Título de Doctor en Ciencias y Tecnologías en alimentos. Universidad de Valencia. España. p. 89 - 98.

## **IX ANEXOS**

## ANEXO - I

**Cuadro 14.** ANVA del análisis de humedad.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	59,6145	29,8073	23593,24	0,0000
Error	6	0,00758029	0,00126338		
Total	8	55,68767			

**Cuadro 15.** ANVA del análisis de proteína.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	87,8214	43,910	5118,89	0,0000
Error	6	0,051469	0,00857817		
Total	8	87,8728			

**Cuadro 16.** ANVA del análisis de grasa.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	8,23137	4,11569	5344,79	0,0000
Error	6	0,00462022	0,000770036		
Total	8	8,23599			

**Cuadro 17.** ANVA del análisis de fibra.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	162,084	81,0422	253810,36	0,0000
Error	6	0,00191581	0,000319302		
Total	8	162,086			

**Cuadro 18.** ANVA del análisis de ceniza.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	8,11814	4,05907	338,10	0,0000
Error	6	0,0720326	0,0120054		
Total	8	8,19017			

**Cuadro 19.** ANVA del análisis de carbohidratos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	34,2344	17,1172	529,72	0,0000
Error	6	0,193883	0,0323139		
Total	8	34,4283			

## ANEXO II

**Cuadro 20.** ANVA de la capacidad de inhibir el radical DPPH ( $IC_{50}$ ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	5	2345,0	469,0	1575575,38	0,0000
Error	12	0,00357203	0,000297669		
Total	17	2345,0			

**Cuadro 21.** ANVA del Índice de actividad antioxidante (AAI) en la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	5	1,7183	0,34366	1368976,00	0,0000
Error	12	0,00000301242	2,51035E-7		
Total	17	1,7183			

**Cuadro 22.** ANVA de la capacidad de inhibir el radical ABTS<sup>o+</sup> ( $IC_{50}$ ) de la hoja de cashahuasca en sus tres estadios.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	5	900,955	180,191	124826,24	0,0000
Error	12	0,0173224	0,00144353		
Total	17	900,972			



**Cuadro 23.** ANVA de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) en la hoja de cashahuasca en sus tres estadíos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	5	290761	58152,2	29197,36	0,0000
Error	12	23,9003	1,99169		
Total	17	290785			

### ANEXO III

**Cuadro 24.** Prueba de Friedman de la evaluación del olor de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).

Tratamiento	n	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Valor P
T <sub>1</sub>	30	53,00	1,77	0,1238
T <sub>2</sub>	30	60,00	2,00	
T <sub>3</sub>	30	67,00	2,23	

**Cuadro 25.** Prueba de Friedman de la evaluación del color de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).

Tratamiento	n	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Valor P
T <sub>1</sub>	30	54,00	1,82	0,2259
T <sub>2</sub>	30	59,00	1,97	
T <sub>3</sub>	30	66,00	2,22	

**Cuadro 26.** Prueba de Friedman de la evaluación del sabor de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).

Tratamiento	n	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Valor P
T <sub>1</sub>	30	47,00	1,57	0,0013
T <sub>2</sub>	30	61,50	2,05	
T <sub>3</sub>	30	71,50	2,38	

**Cuadro 27.** Escala hedónica para la evaluación sensorial de la bebida funcional de la hoja de cashahuasca (*Serjania cf. rubicaulis* Benth).

Calificaciones	Valores
Me gusta muchísimo	9
Me gusta mucho	8
Me gusta moderadamente	7
Me gusta poco	6
No me gusta ni me disgusta	5
Me disgusta poco	4
Me disgusta moderadamente	3
Me disgusta mucho	2
Me disgusta muchísimo	1

## X GLOSARIO

**AAI**, El índice de actividad antioxidante se puede expresar como la relación entre la concentración inicial del DPPH y el valor de la concentración  $IC_{50}$  es decir, cuando el antioxidante ha reducido a la mitad la cantidad inicial de DPPH.

**Apical**, En botánica, este término expresa el extremo superior o punta (del latín *apex*, con el mismo significado) de la hoja, del fruto, etc.

**Basal**, Propio de la base o relativo a ella, se opone a apical.

**Droga vegetal**, Parte de la planta que contiene los principios activos y que se utiliza en terapéutica.

**Principio activo**, Sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.

**Tamizaje fitoquímico**, El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.