

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Departamento Académico de Ciencias de los Recursos Naturales Renovables



POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD

ANTIOXIDANTE EN DOS ESPECIES DE CHANCA

PIEDRA (*Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L.)

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

MENCIÓN: FORESTALES

QUINTO EXALTACIÓN ESTELO CELESTINO

Promoción 2002 - I

Tingo María – Perú

2003

F60

E8

Estelo Celestino, Quinto Exaltación

Polifenoles totales y Capacidad Antioxidante en dos especies de chanca piedra (*Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L.)

Tingo María, 2003

78 h.; 18 figs.; 7 cuadros.; 41 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Recursos Naturales Renovables en mención: Forestal). Universidad nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de RNR.

POLIFENOLES TOTALES / ANTIOXIDANTES / PHILLANTHUS NIRURI / PHILLANTHUS URINARIA / QUIMICA / RADICALES LIBRES / TECNICAS ANALITICAS / TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO /



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María - Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 03 de febrero del 2003, a horas 05:00 p.m. en la Sala de Conferencias de la facultad de Recursos Naturales Renovables, para calificar la tesis titulada:

"POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DOS ESPECIES DE CHANCA PIEDRA (Phyllanthus niruri L. Y Phyllanthus urinaria L.)"

Presentado por el Bachiller: **QUINTO ESTELO CELESTINO**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de "BUENO".

En consecuencia el sustentante queda apto para optar el Título de **INGENIERO en RECURSOS NATURALES RENOVABLES**, mención **FORESTALES**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título de conformidad con lo establecido en el Art. 81 inc. m) del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 04 de febrero de 2003

Ing. WARREN RÍOS GARCÍA
Presidente



Ing. TANIA GUERRERO VEJARANO
Asesor

Blgo. ARMANDO ENEQUE PUICOM
Vocal

DEDICATORIA

A DIOS:

Por concederme la vida.

EN MEMORIA:

De mi hermano Francisco

que en paz descanse.

A MI MADRE:

**Emilia, por sus sabios
consejos en la
culminación de mi
carrera.**

A MIS HIJOS:

**Con cariño: Deborah,
Saulo, Emanuel por su
cariño y amor.**

A MI ESPOSA:

**Por su cariño y
comprensión.**

A MIS HERMANOS:

**Antonio, Tercero, Roberto
por su apoyo moral.**

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Agraria de la Selva por haberme permitido culminar mis estudios.

1. A mis asesores por su apoyo en el desarrollo del trabajo de investigación **Ing° TANIA GUERRERO VEJARANO** y a la **Ing° M.Sc. ELIZABETH ORDOÑEZ GOMEZ.**
2. Al **Ing° M.Sc. LUIS ALBERTO CONDEZO HOYOS** y al **Ing° FERNANDO RAMOS ESCUDERO**, por su apoyo incondicional en el avance y culminación del presente trabajo.
3. A los Bachilleres **LUIS ALBERTO BECERRIL ALBORNOZ, LILIAN PATRICIA LOZANO VARGAS** y a mis compañeros de trabajo **LUIS JARA ESTRADA, GLELIA RÍOS SALDAÑA, CELEDONIO YACHA MELGAREJO, RICHARD SIAS RODRIGUEZ.**
4. A la Facultad de Recursos Naturales Renovables por hacerme parte de ella, a todos mis profesores que me inculcaron en la culminación de la carrera profesional y motivarme a la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 CHANCA PIEDRA.....	4
2.1.1 Generalidades.....	4
2.1.2 Componentes químicos.....	6
2.1.3 Formas de uso.....	7
2.1.4 Propiedades terapéuticas.....	7
2.2 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES.....	9
2.2.1 Radicales libres.....	9
2.2.2 Antioxidantes.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	19
3.2 RECURSOS GENÉTICOS.....	19
3.3 MATERIALES.....	19
3.3.1 Materiales de laboratorio.....	19
3.3.2 Equipos de laboratorio.....	20
3.3.3 Reactivos.....	20
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	20
3.4.1 Polifenoles totales.....	20
3.4.2 Capacidad antioxidante.....	21
3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	22
IV. RESULTADOS.....	28

V.	DISCUSIONES.....	36
VI.	CONCLUSIONES.....	40
VII.	RECOMENDACIONES.....	41
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	42
IX.	ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y FOTOS

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 01. Uso de la chanca piedra en diferentes lugares.....	7
Cuadro 02. Defensas antioxidante de los seres humanos.....	14
Cuadro 03. Principales clases de polifenoles y sus características básicas.....	17
Cuadro 04. Contenido de polifenoles totales expresados en gramos de AGE/100 g.....	28
Cuadro 05. Coeficiente de inhibición IC ₅₀	32
Cuadro 06. Capacidad de secuestro del radical libre para <i>Phyllanthus urinaria</i> determinado por el ensayo de DPPH.....	33
Cuadro 07. Horario de recolección sobre la capacidad antioxidante medido por IC ₅₀	35

ÍNDICE DE FOTOS

	Pag.
Foto 01. <i>Phyllanthus niruri</i> L. crecimiento óptimo.....	49
Foto 02. <i>Phyllanthus niruri</i> L. Floración.....	50
Foto 03. <i>Phyllanthus niruri</i> L. Fruto.....	50
Foto 04. <i>Phyllanthus urinaria</i> L. crecimiento óptimo.....	51
Foto 05. <i>Phyllanthus urinaria</i> L. Floración.....	52
Foto 06. <i>Phyllanthus urinaria</i> L. Fruto.....	52

ÍNDICE DE PROTOCOLO

	Pag.
Protocolo 01. Protocolo para determinar polifenoles totales.....	53
Protocolo 02. Protocolo para determinar la capacidad antioxidante.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 01. Estructura del radical (1,1-dyphenyl-2-pycrylhydrazyl)	12
Figura 02. Origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios.....	18
Figura 03. Se presenta las diferentes etapas considerados en el experimento para la determinación de la capacidad antioxidante dos especies de cancha piedra <i>Phyllanthus niruri</i> y <i>Phyllanthus urinaria</i>	22
Figura 04. Esquema del diseño experimental utilizados para determinar los polifenoles totales.....	23
Figura 05. Flujo de preparación de las muestras de cancha piedra (<i>Phyllanthus niruri</i> y <i>Phyllanthus urinaria</i>).....	24
Figura 06. Esquema del diseño experimental utilizado para la determinación de los parámetros de inhibición de DPPH de las hojas, tallos y raíces.....	26
Figura 07. Esquema del diseño experimental para determinar el horario de recolección sobre la capacidad antioxidante.	27
Figura 08. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie <i>Phyllanthus niruri</i> L. Extracto de hoja (A), tallo (B) y raíz (C). Medido cada 20 segundos durante 600 segundos.....	30
Figura 09. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie <i>Phyllanthus urinaria</i> L. Extracto de hoja (A), tallo (B) y raíz (C). Medido cada 20 segundos durante 600 segundos.....	31

Figura 10. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie <i>Phyllanthus urinaria</i> L. Extracto de hojas recolectadas a 6:00 a.m. (A), 12:00 m. (B) y 5:00 p.m. (C). Medido cada 5 segundos durante 600 segundos.....	34
Figura 11. Curva de calibración para cuantificar polifenoles totales.....	55
Figura 12. Curva de calibración DPPH.....	56
Figura 13. Curva de IC ₅₀ para la hoja de <i>P. niruri</i>	57
Figura 14. Curva de IC ₅₀ para el tallo de <i>P. niruri</i>	58
Figura 15. Curva de IC ₅₀ para la raíz de <i>P. niruri</i>	59
Figura 16. Curva de IC ₅₀ para la hoja de <i>P. urinaria</i>	60
Figura 17. Curva de IC ₅₀ para el tallo de <i>P. urinaria</i>	61
Figura 18. Curva de IC ₅₀ para la raíz de <i>P. urinaria</i>	62

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los ambientes del laboratorio de Análisis de Alimentos y Espectrofotometría de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Presentando los siguientes objetivos: (1) Determinar los polifenoles totales en las hojas, tallo y raíz de (*Phyllanthus niruri* y *Phyllanthus urinaria*), (2) Determinar la capacidad antioxidante en dos especies de chanca piedra (hoja, tallo y raíz) frente al 1,1-diphenil-2-picrylhidrazyl (DPPH) y (3) Horario de recolección. El contenido de polifenoles presenta el siguiente orden *Phyllanthus urinaria* hoja, tallo y raíz 7.328 ± 0.157 , 4.544 ± 0.048 , 2.575 ± 0.024 respectivamente y para *Phyllanthus niruri* hoja, tallo y raíz 3.810 ± 0.074 , 3.487 ± 0.035 y 1.718 ± 0.045 g de AGE/g muestra seca. La capacidad antioxidante expresado en términos de IC_{50} fue el siguiente *Phyllanthus urinaria* hoja, raíz y tallo 138.831 ± 8.58 , 263.769 ± 5.15 , 345.871 ± 20.91 respectivamente y para *Phyllanthus niruri* hoja, raíz y tallo 1454.284 ± 23.84 , 1457.089 ± 19.87 , 1670.654 ± 51.94 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para el horario de recolección de la parte de hoja de *Phyllanthus urinaria* fue el siguiente 12:00 m, 12.074 ± 0.628 $\mu\text{g/mL}$; 5:00 p.m. 15.003 ± 0.581 $\mu\text{g/mL}$; 6:00 a.m. 15.030 ± 0.488 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Palabras Claves: *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus niruri*, capacidad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales de nuestra amazonia cuenta con una diversidad de plantas y animales, poco comunes, eso es lo, que percibimos con los sentidos, cuando damos los primeros pasos al internarnos entre los árboles y otras plantas, esto es el resultado de millones de años de evolución que guarda más carbono que en la atmósfera.

Dentro de la medicina tradicional, las plantas juegan un rol importante sobre las enfermedades. Existe una gran necesidad de curar enfermedades como el cáncer, la arteriosclerosis, la artritis reumatoide y otras. Esto ha conducido a la investigación de plantas con propiedades medicinales que son utilizadas de manera empírica.

En la provincia de Leoncio Prado, en zonas rurales y jardines urbanos crecen diferentes plantas de uso medicinal, entre ellas tenemos las especies de *Phyllanthus urinaria* y *Phyllanthus niruri* conocido como "chanca piedra", que son plantas nativas y tienen bondades curativas y son muy utilizados por los pobladores de la zona.

Por otro lado el organismo humano dispone de un sistema que le permite evitar el efecto nocivo de los radicales libres, en tal sentido cuenta con una diversidad de compuestos enzimáticos como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, etc. y de sustancias no enzimáticas como: la

bilirrubina, ácido úrico, ferritina, transferrina, ceruloplasmina, albúmina y la metalotioneínas (SOLOMONS, 1979).

Así mismo, los antioxidantes, son los compuestos que pueden atrasar o inhibir la oxidación los lípidos u otras moléculas e inhibir las reacciones en cadena de la oxidación. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es principalmente debido a su carcinogenicidad (ZHENG Y WANG, 1999)

El presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

1. Determinar los polifenoles totales en las hojas, tallo y raíz de (*Phyllanthus niruri* y *Phyllanthus urinaria*).
2. Determinar la capacidad antioxidante de dos especies de chanca piedra (hoja, tallo y raíz) frente al 1,1-diphenil-2-picrylhidrazyl (DPPH).
3. Horario del tiempo de recolección en concentración de polifenoles.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CHANCA PIEDRA

2.1.1 Generalidades

2.1.1.1 Género

Género *Phyllanthus* es una hierba anual; de unos 50 cm de altura, tallo erguido, hojas alternas, sésiles oblongas, flores verdoso-blanquecinas, solitarias, axilares, pediceladas, frutos pequeños en una cápsula comprimida y globosa, raíz larga y poco ramificada (BHARATIYA, 1992). Es una planta pantropical que crece en forma silvestre en la cuenca amazónica, pero se puede cultivar fácilmente. Especies silvestres como *Phyllanthus stipulatus*, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus niruri* reciben el nombre de "chanca piedra" así lo describe (ESTRELLA, 1995).

2.1.1.1.1 *Phyllanthus niruri* L.

Planta herbácea, anual y silvestre. Tallo erguido de 30-60 cm de alto y de 1-2.5 mm de diámetro, de ramificación pobre, ramas horizontales, de 5-10 cm de largo. Las hojas son abundantes, enteras, glabras, pálidas en el envés de forma elíptica, ápice robusto, peciolo corto, de 7-12 mm; dispuestas en forma alterna unas sobre otras, una a cada lado del tallo. Las flores son pequeñas, solitarias en la axila de cada hoja, apétalas, monoicas, con sépalos, blancuzcas o amarillentas con una raya verde longitudinal (TAYLOR, 2000).

Según Cronquist citado por JONES (1988), reporta la siguiente clasificación taxonómica.

REINO	:	PLANTAE
SUB-REINO	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GENERO	:	PHILLANTHUS
ESPECIE	:	NIRURI
Nombre científico	:	<i>Phyllanthus niruri</i> L.

2.1.1.1.2 *Phyllanthus urinaria* L.

Es una pequeña hierba anual tropical, desarrollándose hasta 24 cm. Tiene flores blancas verdosas, de hojas oblongas, sus frutos son muy pequeños de color rojo-verdoso al igual que las hojas. Es una planta común en Surinam y cercanamente relacionada en apariencia y en estructura fitoquímicas a otras 2 plantas, también comunes en este país: *Phyllanthus amarus* y *Phyllanthus niruri*.

Según Cronquist citado por JONES (1988), reporta la siguiente clasificación taxonómica.

REINO	:	PLANTAE
SUB-REINO	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GENERO	:	PHILLANTHUS
ESPECIE	:	URINARIA
Nombre científico	:	<i>Phyllanthus urinaria</i> L.

2.1.2 Componentes químicos

ESTRELLA (1995), reporta los componentes químicos de la cancha piedra (*Phyllanthus niruri*).

- Lignanós** : Filantina, hipofilantina, filtetralina, lintetralina, nirantina, nirtetralina, nirfilina, filnirurina, nirenina, nirunetina.
- Terpenos** : Ciemno, limoneao, lupeol y acetato de lupeol.
- Flavonoides** : Quercetina, quereitrina, isoquereitrinaastragalina, rutina, fisingluosido, nirurina, nirunetina.
- Lípidos** : Ácido ricinaleico, ácido dotriancontenoico, ácido linolenico.
- Alcaloides** : Norcecuridina, nirurine, 4-metoxi-norcecurinina, entnorcecurinina, filantina, filocricina.
- Esteroides** : Beta-citosterol, 24-isopropil, colesterol, estradiol.

2.1.3 Formas de uso

BALEE (1994), reporta los diferentes usos de la chanca piedra en algunos países.

Cuadro 1. Usos de la chanca piedra en diferentes lugares.

Amazonia	Riñón, piedras del riñón
Bahamas	Dolor de estómago, resfriado, estreñimiento, fiebre, gripe, tifoidea
Brasil	Dolor, antiespasmódico, vesícula, cistitis, diabetes, diurético, fiebre, hepatitis, hydropsia, riñón, piedras del riñón, hígado, próstata, urinario
Venezuela	Blennorragia, diabetes, diarrea, diurético, disentería, dispepsia, fiebre, Gonorrea, riñón, malaria, cataplasma, tónico
Haití	Dolor de estómago, cólico, digestivo, diurético, fiebre, malaria.
Java	Tos, Gonorrea.
Malaya	Dermatosis, diarrea, diurético, picazón, aborto, renosis, sífilis.
Marianas	Disentería, picazón, rectitis, vaginitis
Perú	Cálculo, diurético, hepatitis, piedra del riñón

2.1.4 Propiedades terapéuticas

Phyllanthus contiene sobre todo lignanos (phyllanthine y hypophyllanthine), alcaloides, y bioflavonoides (quercetin). Mientras que sigue siendo desconocido en cuanto a cuáles de estos ingredientes tienen un efecto antiviral, la investigación muestra que esta hierba actúa sobre todo en el

hígado. Esta acción en el hígado confirma su uso histórico como remedio para la ictericia. *Phyllanthus* bloquea la polimerasa de DNA, la enzima necesaria para que el virus de la hepatitis B se reproduzca. En un estudio, el 59 por ciento de los infectados con hepatitis viral crónica B perdieron uno de los principales marcadores en la sangre, de la infección de HBV (antígeno superficial de la hepatitis B) después de usar el *Phyllanthus* durante treinta días (THYAGARAJAN *et al.*, 1988)

Mientras que los estudios clínicos sobre el resultado del *Phyllanthus* y HBV se han mezclado, la especie *Phyllanthus urinaria* y *Phyllanthus niruri* parecen funcionar mejor que la *Phyllanthus amarus* (MEIXA *et al.*, 1995).

Acción diurética, hipoglicemiante, antiséptica, estomacal, citostática. De acuerdo a la revisión realizada todas las acciones señaladas por el uso popular han sido investigadas desde el punto de vista farmacológico y clínico. Los efectos benéficos en los problemas hepáticos y especialmente en el tratamiento de la ictericia han sido comprobados clínicamente. Las acciones diuréticas, ampliamente conocidas, han recibido algunas explicaciones farmacológicas y han tenido varias constataciones clínicas; estos efectos siguen en estudio. Las aplicaciones en la diabetes también han sido corroboradas por la investigación experimental. Como antibacteriano ha demostrado actividad frente a *Estafilococo dorado* y a la *Pasteurella pestis*. Se han detectado acciones antitumorales en ratas experimentales y hay

información de que esta actividad pueda estar relacionada con uno de sus componentes químicos, la dibenzilbutirolactona (SÁNCHEZ Y FLORES, 1999).

2.2 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

2.2.1 Radicales libres

2.2.1.1 Oxidación y producción de radicales libres

La oxidación es el proceso mediante el cual átomos traspasan electrones a otro átomo o molécula. Dos fenómenos muy importantes en nuestra vida son **procesos oxidativos**: la combustión y la respiración. Ambos se asemejan, ya que a través de los cuales substratos combustibles se transforman en energía consumiéndose oxígeno y liberándose agua y dióxido de carbono. En la respiración ocurre lo mismo: un combustible glucosa-ácido graso, también compuesto de carbono se transforma en energía esta transformación se realiza en el interior de la célula, en la mitocondria y exactamente se produce ATP (ácido adenosin trifosfato), la molécula clave para la síntesis de los componentes celulares y para la mayoría de los procesos celulares, se conoce también como la "moneda" energética de la célula en la respiración se consume oxígeno, se genera ATP, y quedan como residuos dióxido de carbono y agua pero este proceso no es perfecto ya que se producen también otras moléculas contaminantes, las especies reactivas del oxígeno (EROs), entre el 1 y 3% del oxígeno que respiran nuestras células al oxidar sus substratos se transforman en (EROs), que bien son radicales libres o llevan a su formación, estos radicales libres son tremendamente reactivos, capaces de oxidar indiscriminadamente muchas estructuras biológicas (LEIGHTON Y URQUIAGA, 1998).

2.2.1.2 Estrés oxidativo

Es el daño a las moléculas producido por acciones de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno. También se conoce como el desbalance entre la producción de radicales libres y antioxidantes en las células. Especies reactivas del oxígeno (EROs) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas químicas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Las fuentes exógenas generadoras de especies reactivas de oxígeno en los organismos son antibióticos, medicamentos (paracetamol) contaminantes (dióxido de nitrógeno, ozono, humo de cigarrillo), quimioterapia y exposición a radiación ultravioleta e ionizante (FINKEL y HOLBROOK, 2000).

Está comprobado que algunas de las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno, fierro y cobre se generan en el metabolismo. Algunas de las especies reactivas que tienen funciones fisiológicas y su producción puede ser un factor importante que desencadene una variedad de funciones celulares (GAMALEY y KLUYBIN, 1999).

Otras fuentes endógenas de radicales libres son los metales de transición como cobre y fierro, sin embargo, la regulación en la generación de estas moléculas es importante para evitar patologías, su incremento siempre acompaña a tejidos lesionados en la mayoría de las enfermedades humanas y puede darse por una disminución de las defensas antioxidativas o incremento en la generación de especies reactivas. En algunas patologías el estrés oxidativo tiene una contribución significativa en su desarrollo, como en la

enfermedad de Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide y el fenómeno llamado "paradoja del oxígeno" que se presenta posterior a un fenómeno de isquemia, durante la reperfusión, cuando el aporte de oxígeno no disminuye el daño sino que lo incrementa participando en reacciones de oxidación de proteínas y lipoperoxidación (GUTTERIDGE y HALLIWELL, 1999).

Otra especie de oxígeno reactivo es el oxígeno en singlete que puede generarse cuando los electrones que han sido excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 cambia su giro y se aparea con el otro electrón. También puede formarse durante la dismutación del O_2 , en las reacciones de Haber-Weiss y por la descomposición H_2O_2 . Produce daños en las membranas celulares, causa modificaciones en los aminoácidos y daños al ADN (HANSBERG, 1999).

2.2.1.3 Uso del radical DPPH (1,1-diphenyl picrylhydrazyl radical)

La oxidación de lípidos en los alimentos es responsable de la formación de compuestos químicos no deseados. La evaluación de la actividad antioxidante de componentes específicos o extractos, seguidamente se hacen reaccionar con el radical estable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), en solución de metanol. La reducción del DPPH[•] se determina por monitoreo del decremento de las absorbancias como característica de la longitud de onda durante la reacción. Este radical presenta una absorbancia máxima a 515 nm, la reducción del DPPH[•] por un antioxidante (AH) o una especie radical (R[•]), la absorción desaparece (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

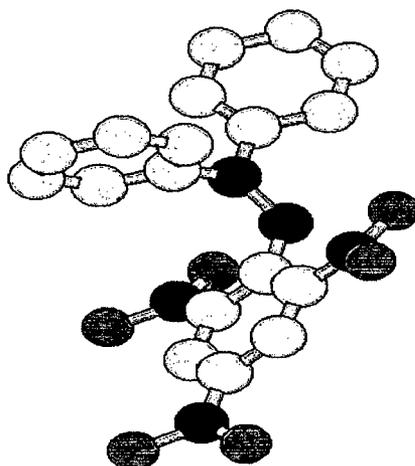


Figura 1. Estructura del radical (1,1-dyphenyl-2-pycrylhydrazyI)

2.2.2 Antioxidantes

2.2.2.1 Sistema de defensa de antioxidantes

Los organismos vivos poseen mecanismos antioxidantes para defenderse de las especies reactivas de oxígeno. En condiciones normales el oxígeno humano produce al respirar, sustancias “contaminantes”, químicamente inestables, llamadas especies reactivas del oxígeno que en su mayoría son radicales libres. El daño oxidativo que estas especies pueden producir en la macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, es de consecuencia crítica para la célula y se asocia a numerosas patologías. Sin embargo, el organismo tiene un eficiente sistema para protegerse del daño oxidativo los mecanismos antioxidantes con que esperan los seres vivos particularmente los seres humanos, son múltiples, y dependen del tipo de especie dañina y del lugar donde ésta se genera. Dentro de las células, el sistema antioxidante es de tipo enzimático y en el espacio extracelular, es decir en los fluidos biológicos como

el plasma el sistema antioxidante es de tipo no enzimático, de este modo contamos con antioxidantes específicos capaces de actuar oportunamente en distintos lugares. La primera defensa antioxidante al interior de la célula es de tipo enzimático; está dada por las llamadas enzimas antioxidantes. Éstas son proteínas y no se consumen al reaccionar con los radicales libres. Son endógenas lo que quiere decir que se sintetizan al interior del organismo, y su acción depende de la presencia de un metal que puede ser cobre, fierro, magnesio, zinc y selenio. Estas actúan de dos formas: evitan la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, que es lo que hace la catalasa con el peróxido de hidrógeno y la glutatión peroxidasa como los peróxidos lipídicos, o convierten los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes que puedan reaccionar y dañar otras moléculas vecinas como en el caso del superóxido dismutasa a la primera defensa antioxidante se suma otro: los antioxidantes no enzimáticos que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos como, el plasma y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes (LEIGHTON Y URQUIAGA, 1999).

2.2.2.2 Defensas antioxidantes de los seres humanos

Esta defensa lo forma los antioxidantes, que son sustancias de diverso tipo que previenen o demoran el daño molecular. Para lograrlo, los antioxidantes ceden un electrón a los radicales libres, con la cual los desactivan y extingue el proceso. Al hacer esto se consumen, ya que la estructura moléculas del antioxidante sufre daño o modificación química

transformándose los antioxidantes en radicales libres inactivos o flojos. Sin embargo, ello tiene un costo mucho menor para el organismo que si esa modificación o daño la sufriera una molécula con función biológica. Por ejemplo es preferible la alteración química de una molécula de vitamina E, que puede ser reconstituida por otro antioxidante o reemplazada a través de la dieta, que el daño al material genético y sus consecuencias. La segunda defensa antioxidante esta formada por distintos compuestos antioxidantes, endógenos y exógenos, que atrapan o neutralizan radicales libres. A diferencia que ocurre con las enzimas antioxidantes como los compuestos antioxidantes se modifican al reaccionar con los radicales libres necesitan ser reemplazadas LEIGHTON y URQUIAGA (1999).

Cuadro 2. Defensas antioxidantes de los seres humanos

Defensa antioxidante	Enzima
Enzimas (Dentro de las células)	❖ Catalasa ❖ Glutation peroxidasa ❖ Superoxido dismutasa
No enzimáticos (dentro y fuera de las células)	❖ Glutation ❖ Urato ❖ Ubiquinol ❖ Proteína plasmáticas
Dietarios	❖ β-caroteno ❖ vitamina C ❖ vitamina E ❖ Polifenoles ❖ Flavonoides ❖ Químicos sintéticos

Fuente: LEIGHTON y URQUIAGA (1999)

2.2.2.3 Mecanismos de acción de los polifenoles

Los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del daño oxidativo, o su acción como antioxidante está relacionada no sólo con su estructura química sino que también con su localización en la partícula. Pueden actuar como potentes inhibidores de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por varios mecanismos:

- Como antioxidantes propiamente tales, actuando como atrapadores de radicales libres. Los distintos polifenoles tienen distinta especificidad por las distintas especies oxidantes que se generan en el organismo.
- En forma directa como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir uniéndose a otros iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.
- Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre la superficie de la partícula de la lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminuyendo el consumo de los antioxidantes propios de la LDL como la vitamina E y carotenoides, y en algunos casos regenerando vitamina E oxidada en la partícula de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
- Por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo. Los distintos polifenoles tienen cada uno actividades particulares por ejemplo, se ha observado que el consumo de catequina, quercetina y vino tinto preserva la actividad de la paraoxonasa, enzima, asociada a las HDL o (colesterol bueno), que puede hidrolizar y regenerar lípidos oxidados en la LDL. Otros polifenoles inhiben oxigenasas celulares

y por lo tanto la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno dentro del cuerpo humano. Quercetina y sus glicósidos inhiben la oxidación de las LDL inducida por lipoxigenasa. Catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequin galato y epigallocatequin galato inhiben la producción de radicales libres por inhibición de la xantina oxidasa hepática (FRANKEL et al., 1995; CAMPOS y LISSI, 1996; RICE-EVANS et al., 1997)

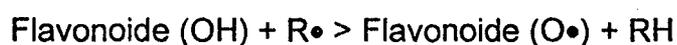
2.2.2.4 Los polifenoles como antioxidantes

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de radicales H[•] o electrones) necesarios para el funcionamiento de las células vegetales; que se encuentran en frutas y verduras, por ejemplo, manzanas y cebollas, y en bebidas como té y vino (NIJVELDT *et al.*, 2001; Kinsella *et al.*, 1993).

Los polifenoles son descritos por su capacidad antioxidante, también son poderosos para proteger el cuerpo de las especies reactivas del oxígeno (EROs). Las células del cuerpo continúan con su degeneración como causa de los radicales libres que se producen por la acción del oxígeno metabolizado por el organismo (GROOT, 2000)

Los polifenoles son oxidados por los radicales, resultando más estables el radical reactivo. Los polifenoles estabilizan las especies reactivas del oxígeno por reacción con el componente reactivo del radical, por su alta reactividad del grupo hidroxil, los radicales son inactivos (KORKINA y AFANAS, 1997).

MIDDLETON (1998), reporta que la reacción entre los flavonoides y las especies reactivas del oxígeno siguen la siguiente ecuación:



2.2.2.5 Principales clase de polifenoles y sus características básicas

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de productos naturales más importantes y ampliamente distribuido en el reino vegetal. Muchos de ellos son muy significativos fisiológica y ecológicamente para las plantas que los producen (PIÑON Y PALAZON, 1993)

Cuadro 3. Principales clases de polifenoles y sus características básicas

Clases	Coloración	Ejemplo	Comentario
Antocianinas	Azul, Verde-violeta	Cianidina Delfinidina Peonidina	Las antocianinas están predominando en frutas y flores y probablemente fueron los primeros flavonoides.
Flavanas	Incoloro	Catequina Epicatequina Luteoforol Procianidina Teaflavina	Son encontrados en frutas. Biflavanas son encontrados en frutas, lúpulo, nueces, bebidas, agua de coco. O sabor peculiar de alguna bebidas de frutas, vinos.
Flavanonas	Incoloro a un amarillo pálido	Hespiridina Naringinina	Son encontrados exclusivamente en frutas cítricas
Flavonas	Amarillo pálido	Apigenina Luteolina Diosmetina Tangeretina Nobiletina	Son encontrados en frutas cítricas. También en cereales, frutas, hierbas y vegetales. Confieren un pigmento amarillo. Los compuestos más comunes son la apigenina y la luteolina.
Flavonoides	Amarillo pálido	Quercetina Rutina Mircetina Kaemferol	Están presentes en diversas formas, siendo predominantes en vegetales y frutas. La quercetina es el principal representante de esta clase.
Isoflavonoides	Incoloro	Daidzeína Genisteína	Son encontrados exclusivamente en legumbres, particularmente en soja.

Fuente: PETERSON y DWYER, 1998

El origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios. El metabolismo primario como queda reflejado en la **figura 2**, proporciona un número de pequeñas moléculas, entre las que cabe destacar el ácido siquímico, el acetato y los aminoácidos los cuales constituyen los materiales de partida para las más importantes rutas del metabolismo secundario. El ácido siquímico por la ruta metabólica que lleva su nombre da origen a muchos compuestos aromáticos entre ellos los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los Policétidos por la ruta del acetato-malonato, y de los terpenos o isoprenoides, por la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de antibióticos pectidicos que incluyen la penicilina y las cefalosporinas (PIÑOL Y PALAZÓN, 1993)

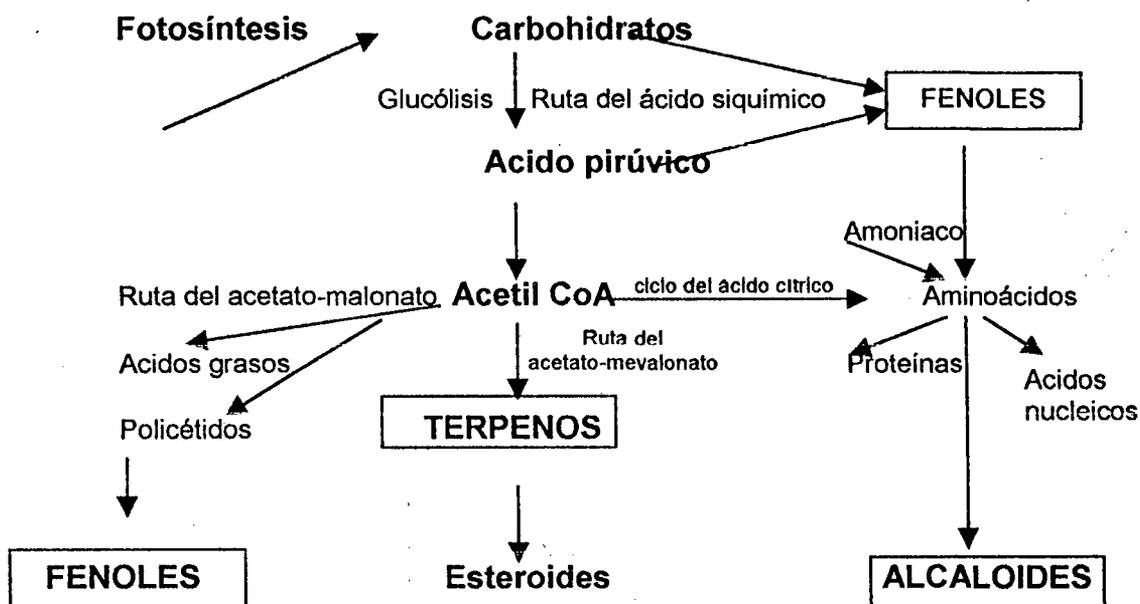


Figura 2. Origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se ejecutó en los meses de junio a diciembre del 2002. En los laboratorios de Análisis de Alimentos y Espectrofotometría de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), se encuentra a 09° 17' 08" de latitud sur, a 75° 59' 52" de longitud oeste y a 665 msnm, en el distrito de Rupa – Rupa, provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco que presenta una temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 89 % respectivamente. en los meses de junio a diciembre del 2002.

3.2 RECURSOS GENÉTICOS

Se utilizó como material genético dos especies de "chanca piedra" (*Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L.), provenientes de la ciudad de Tingo María. Estas especies fueron identificadas por el Ing. Warren Ríos García (Profesor del área de manejo forestal de la UNAS). Los recursos se muestran en el **Anexo – I, II, III, IV.**

3.3 MATERIALES

3.3.1 Materiales de laboratorio

Se utilizó matraces erlenmeyer de 100 mL, vasos de precipitación de 50 y 100 mL, pipetas graduadas de 5 y 10mL, micropipetas de 20 – 200 y 100 – 1000 µL, cubetas de poliestireno de 1000 µL (1 cm x 1cm x 4.5 cm), fiolas de 25 mL, crisoles de porcelana, embudo de vidrio, gradillas, papel whatman N° 42, agitador magnético.

3.3.2 Equipos de laboratorio

Se utilizó la balanza analítica de Ohaus. Suiza; termostato de Labor - MIN. Hungría; espectrofotómetro de absorción molecular de Thermo Spectronic (génesis 8) con interfase a una PC. Estados Unidos; centrifuga de Clinical centrifuga de 1000 a 7000 rpm. Estados Unidos.

3.3.3 Reactivos

Se utilizó 1,1 diphenyl-2-picrilhidrazyl (DPPH), etanol absoluto, ácido Clorhídrico, ácido gálico, cloruro férrico (FeCl_3), ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), acetona.

3.4 MÉTODOS DE ANALISIS

3.4.1 Polifenoles totales (TPP)

Se utilizó el método propuesto por PRICE y BUTLLER (1977). Se peso 1 g, de muestra seca de cada parte hoja, tallo, raíz de cada especie en estudio y extraídas con 15 mL, de acetona/agua (70/30), con agitación durante 20 minutos posteriormente se sometió a un centrifugado a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante fue evaluado con adición de 3 mL de 0.1M FeCl_3 en 0.1N de HCl, luego se adicionó 3 mL, de 0.008M de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. La mezcla fue leída a 720 nm, **Anexo - V**. Los resultados fueron calculados en función a g AGE/100 g de muestra seca a partir de la curva de calibración **Anexo - VI**.

3.4.2 Capacidad antioxidante

Método propuesto por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). Se hizo reaccionar 50 μ L de extracto acuoso con 950 μ L de DPPH en etanol al 95%. Se monitoreo la absorbancia de la mezcla a 515 nm, durante 10 minutos a intervalos de 20 segundos, **Anexo - VII**. Para la determinación de la capacidad antioxidante los resultados fueron ploteados μ g/mL versus μ M DPPH remanente, para el cual las absorbancias obtenidas fueron ajustadas a la curva de calibración de DPPH construida por RAMOS (2002), **Anexo – VIII**.

3.4.3 Análisis estadístico

Se utilizo un diseño completo al azar (DCA) con 3 repeticiones y la prueba de Duncan con un nivel de significancia de 0.01.

3.5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En la figura 3, se presentan las etapas consideradas en el trabajo de investigación.

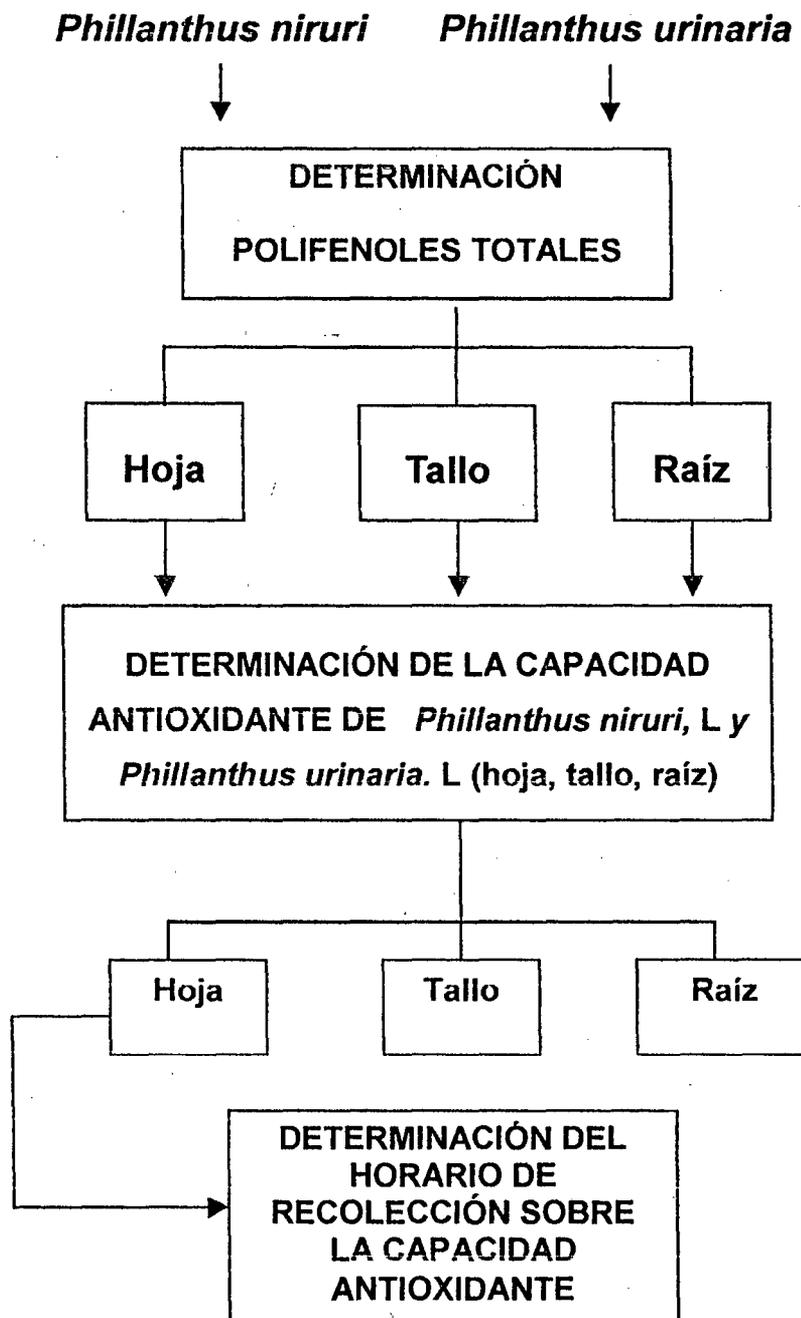
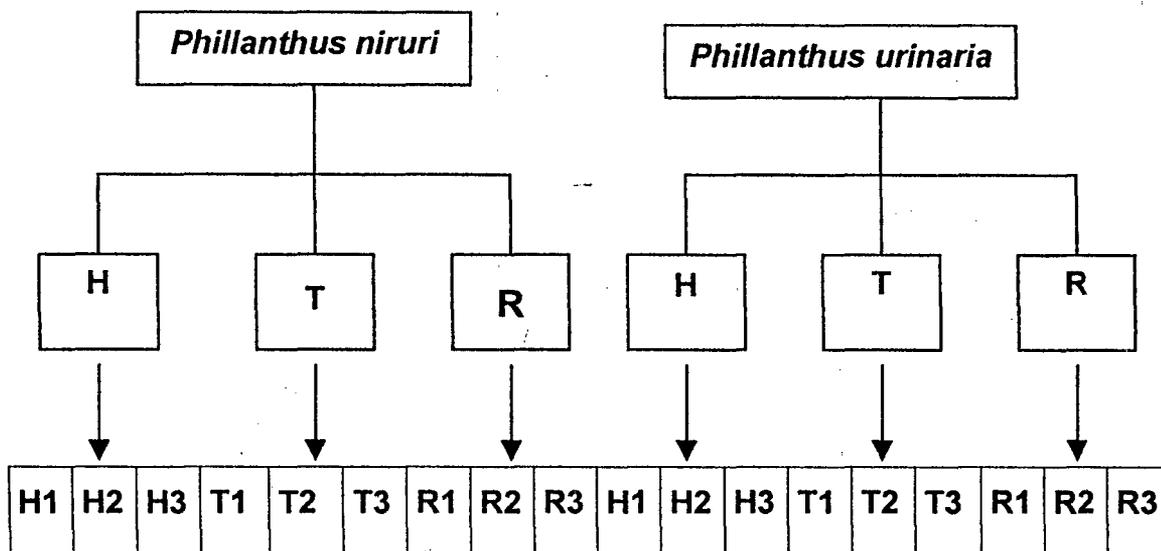


Figura 3. Se presenta las diferentes etapas consideradas en el experimento para la determinación de la capacidad antioxidante dos especies de canca piedra *Phyllanthus niruri* y *Phyllanthus urinaria*.

3.5.1 Determinación de polifenoles totales

En la figura 4, se presenta la metodología desarrollada para determinar el contenido de polifenoles totales, presentes en los diferentes partes considerados de las especies de estudio.



Leyenda:

Tratamientos: H, T, R (hoja, tallo, raíz)

H₁, H₂, H₃ : Repeticiones de la hoja

T₁, T₂, T₃ : Repeticiones del tallo

R₁, R₂, R₃ : Repeticiones de la raíz

Figura 4. Esquema del diseño experimental utilizados para determinar los polifenoles totales.

3.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante de *Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L. (hoja, tallo, raíz)

3.5.2.1 Preparación de las muestras

Las muestras de hojas, tallo y raíz de chanca piedra fueron obtenida a partir del siguiente proceso (ESTELO, 2002).

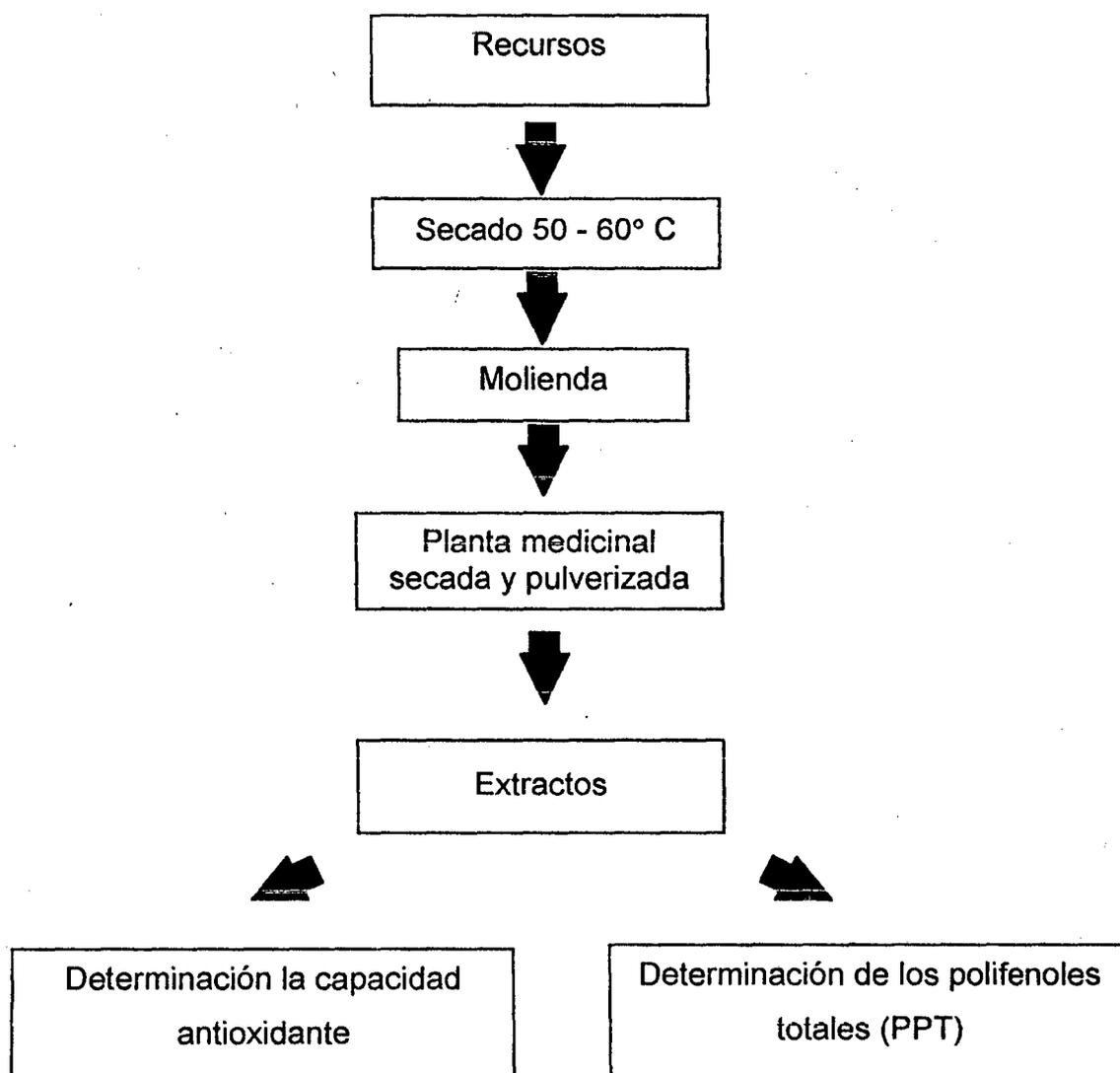


Figura 5. Flujo de preparación de las muestras de chanca piedra (*Phyllanthus niruri* y *Phyllanthus urinaria*).

El extracto rico en polifenoles fue extraído haciendo uso de acetona: agua (70/30), mediante agitación constante durante 10 minutos, el extracto fue filtrado con papel filtro rápido y luego fueron sometidas a las evaluaciones de cinética.

3.5.2.2 Coeficiente de inhibición IC₅₀

Se determinó mediante análisis de regresión de la concentración en $\mu\text{g/mL}$ versus la concentración del DPPH en μM DPPH remanente que corresponden a la concentración necesaria para inhibir el 50 % del radical DPPH. En el Anexo – IX, X, XI, XII, XIII, XIV se presentan las curvas para el cálculo del IC₅₀ de *Phyllanthus niruri* y *urinaria* (hoja, tallo y raíz).

En la **figura 6**, se presenta la metodología desarrollada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras en estudio.

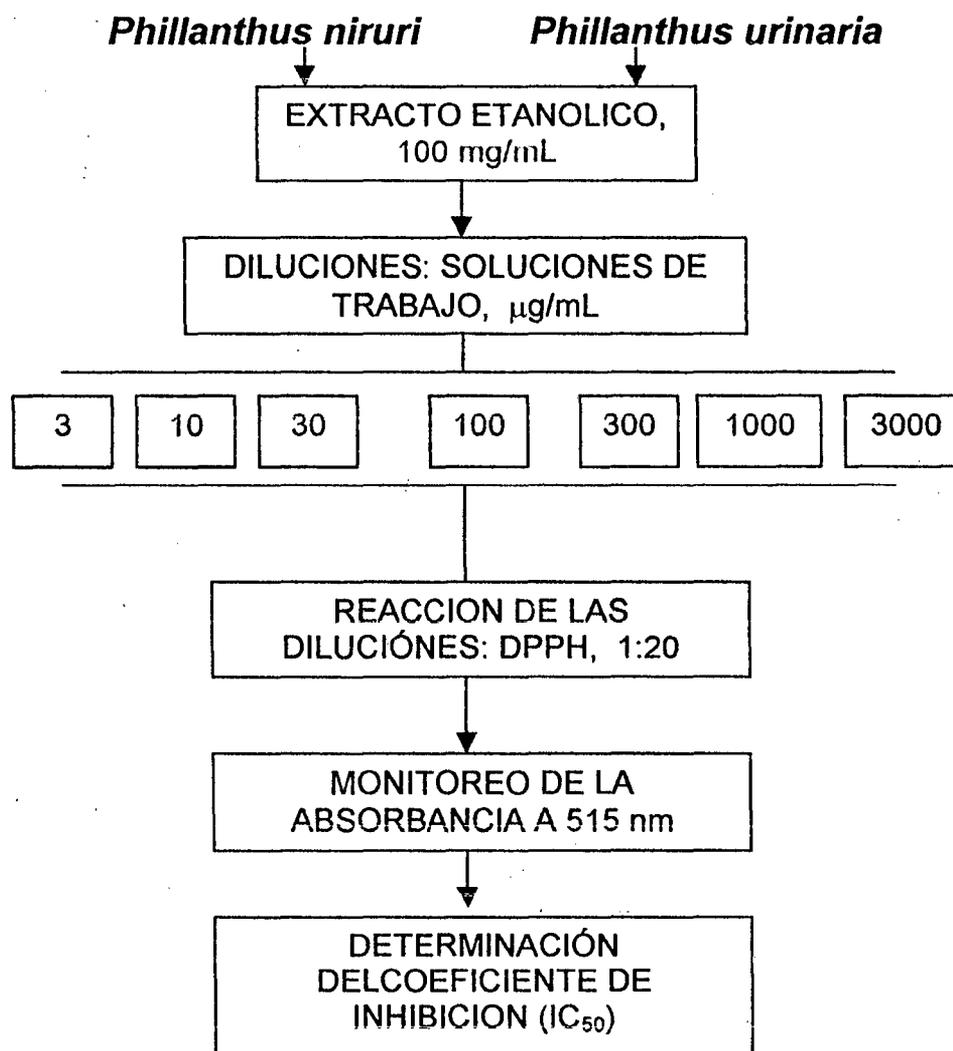


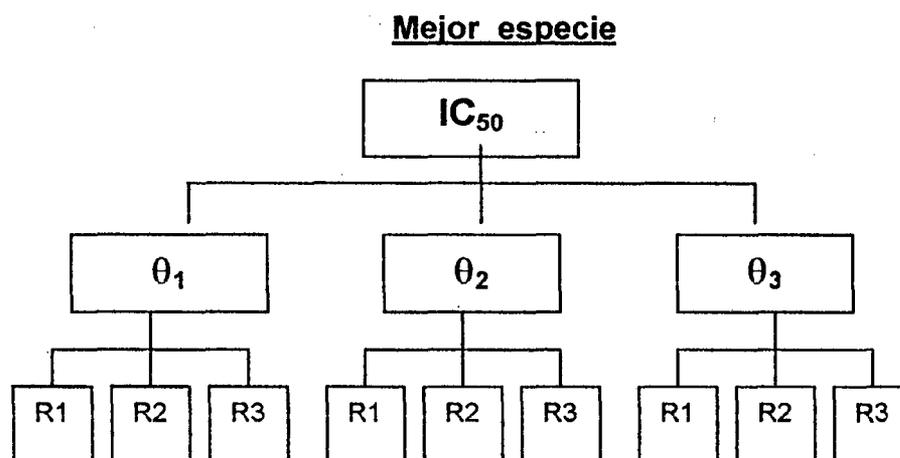
Figura 6. Esquema del diseño experimental utilizado para la determinación de los parámetros de inhibición de DPPH de las hojas, tallos y raíz.

3.5.2.3 Determinación del horario de recolección sobre la capacidad antioxidante de *Phyllanthus urinaria* (Hoja)

Para la evaluación del horario de recolección se seleccionó la mejor especie en función a su contenido de polifenoles y el IC_{50} de la mejor parte de la planta (hoja, tallo, raíz).

Las muestras fueron cosechadas a las 6:00 a.m., 12:00 m. y 5:00 p.m. Luego se fueron sometidas al cálculo de la constante de extinción IC_{50} .

En la **figura 7**, se presenta la metodología desarrollada para determinar el horario de recolección



Leyenda:

$\theta_1 \theta_2 \theta_3$: Horario de recolección 6:00 a.m., 12:00 m. y 5:00 p.m.

IC_{50} : Coeficiente de Inhibición 50 %

Figura 7. Esquema del diseño experimental para determinar el horario de recolección sobre la capacidad antioxidante.

IV. RESULTADOS

4.1 DETERMINACIÓN POLIFENOLES TOTALES

En el cuadro 4, se presenta el contenido del total de polifenoles presentes en las diferentes partes de las especies en estudio donde se puede observar que las hojas y tallo de *Phyllanthus urinaria* reportaron un mayor contenido de polifenoles totales a diferencia de *Phyllanthus niruri* que se encuentran en el mismo orden hoja – tallo, por otra parte las raíces de ambas especies se encuentran por debajo de las hojas y tallos correspondientemente..

Cuadro 4. Contenido de polifenoles totales expresado en gramos de AGE/100 g de materia seca.

Espece	Parte de la planta	Polifenoles totales
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Hoja	7.328±0.157 ^a
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Tallo	4.544± 0.048 ^b
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Raíz	2.575± 0.024 ^e
<i>Phyllanthus niruri</i>	Hoja	3.810± 0.074 ^c
<i>Phyllanthus niruri</i>	Tallo	3.487± 0.035 ^d
<i>Phyllanthus niruri</i>	Raíz	1.718± 0.045 ^f

Datos expresados en media±SEM, n=3. Media unido a letras (a – f), diferencia estadística a p<0.01 según la prueba de Duncan.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L. (hoja, tallo, raíz)

En las **figuras 8 y 9**, se muestra la decoloración del DPPH por los diferentes extractos de las dos especies, esto significa que una mayor concentración tendrá mayor capacidad de secuestro del radical.

En el caso de *Phyllanthus niruri* L. presentaron caídas de absorbancias muy similares para las concentraciones de 5000, 3000, 1000, 300, 100 y 30 $\mu\text{g/mL}$, para *Phyllanthus urinaria* L. se utilizaron concentraciones de extracto de 3000, 1000, 300, 100, 30 y 10 $\mu\text{g/mL}$ para secuestrar al radical DPPH, demostrando su mayor efecto inhibitorio que presentan las muestras de *Phyllanthus urinaria* frente a *Phyllanthus niruri*, cabe mencionar que la primera especie tiene capacidad de ceder o donar con mayor facilidad radicales hidrógeno (H^{\bullet}), la diferencia entre estas dos especies está determinada por el coeficiente de inhibición 50% (IC_{50}), donde el menor valor corresponde a la mejor especie. Aquí es importante conocer la cinética de inhibición de los extractos tanto de la hoja, tallo y raíz frente al radical DPPH esto guarda relación con el tiempo de secuestro lo que significa que mejores extractos presentaran un menor tiempo para inhibir la mayor cantidad del radical.

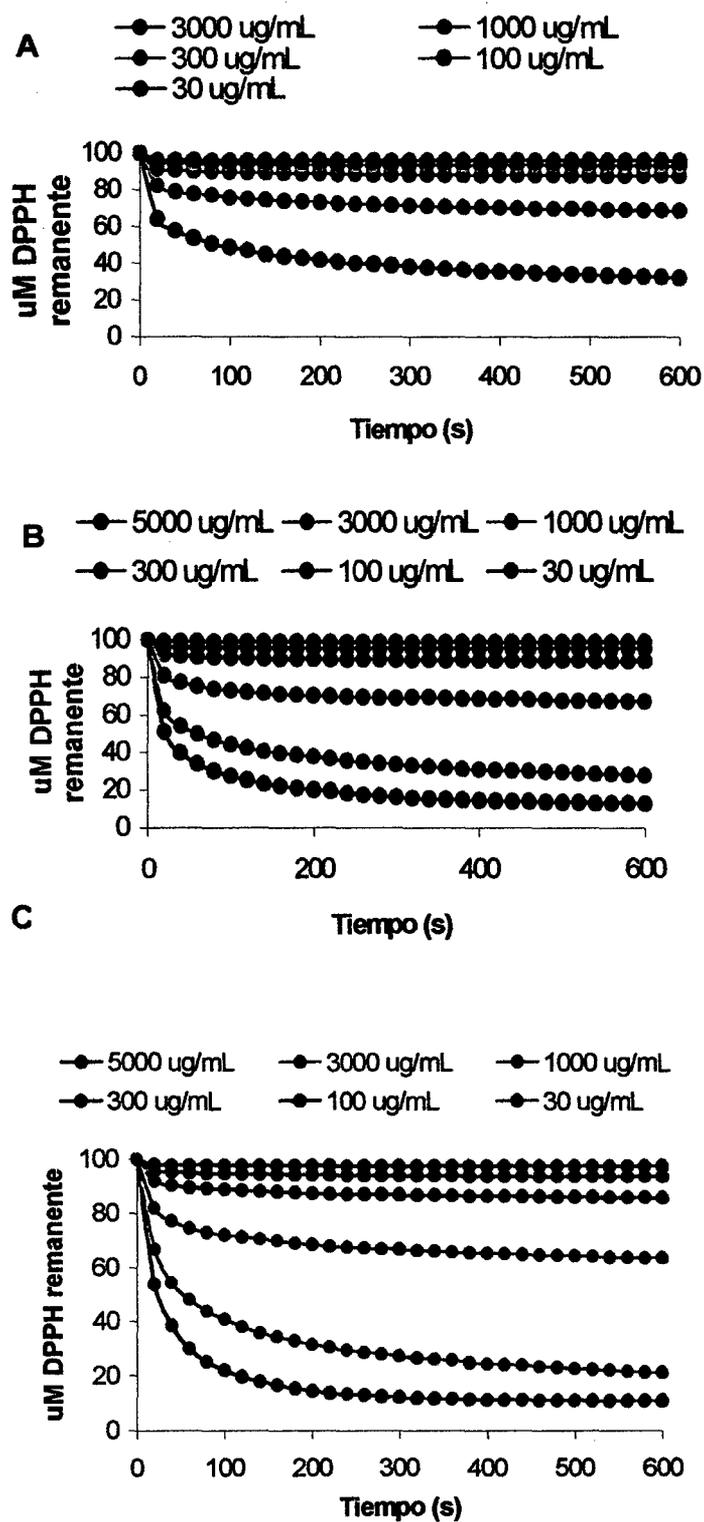


Figura 8. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie *Phyllanthus niruri* L. Extracto de hoja (A), tallo (B) y raíz (C). Medido cada 20 segundos durante 600 segundos.

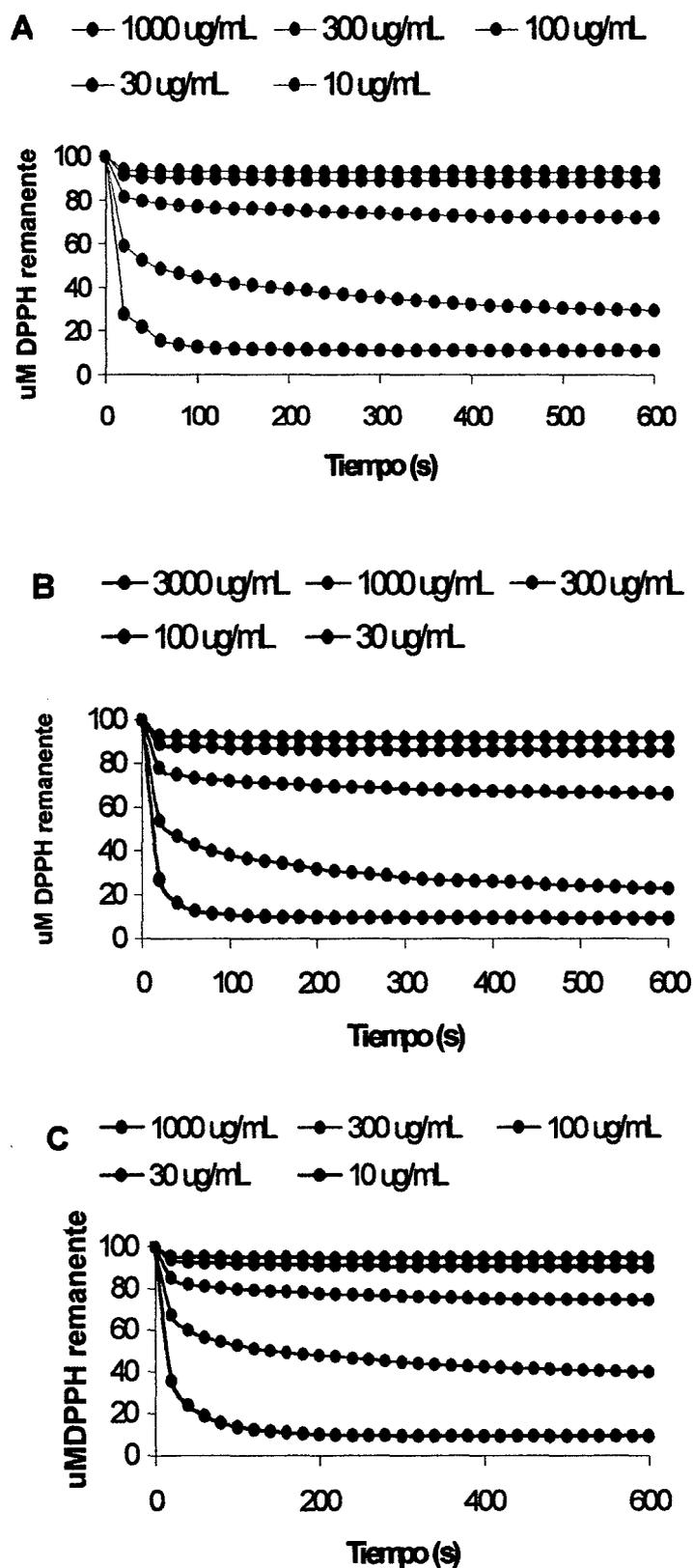


Figura 9. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie *Phyllanthus urinaria* L. Extracto de hoja (A), tallo (B) y raíz (C). Medido cada 20 segundos durante 600 segundos.

En el cuadro 5, se muestra los resultados del coeficiente de inhibición 50% (IC_{50}), para ambas especies del género *Phyllanthus* donde se observa se que existe una marcada diferencia entre *Phyllanthus urinaria* y *Phyllanthus niruri*, encontrándose que la primera es aproximadamente 10 veces mejor, secuestrando al radical DPPH. Las diferencias que existen entre la hoja, raíz y tallo para ambas muestras se aprecian claramente en el poder antiradical (ARP), presentando el mismo orden para ambas muestras, en cuanto a la capacidad antioxidante que se refiere, cabe resaltar que no hay una correlación para el caso de polifenoles totales en el caso del tallo y la raíz.

Cuadro 5. Coeficiente de inhibición IC_{50}

Espece	Parte de la planta	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ARP
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Hoja	138.831 \pm 8.58 ^a	7.20
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Raíz	263.769 \pm 5.15 ^b	3.79
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Tallo	345.871 \pm 20.91 ^c	2.89
<i>Phyllanthus niruri</i>	Hoja	1454.284 \pm 23.84 ^d	0.69
<i>Phyllanthus niruri</i>	Raíz	1457.089 \pm 19.87 ^d	0.69
<i>Phyllanthus niruri</i>	Tallo	1670.654 \pm 51.94 ^e	0.61

Datos expresados como media \pm SEM, n=3. Media unido a letras (a – e), diferencia estadística a $p < 0.01$ según la prueba de Duncan.

4.3 DETERMINACIÓN DEL HORARIO DE RECOLECCIÓN SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Phyllanthus urinaria* (hoja)

En la figura 10, se presenta la capacidad de secuestro del radical DPPH, por las diferentes concentraciones del tiempo de recolección de *Phyllanthus urinaria*. L, ya que esta especie tubo mejor capacidad antioxidante y mayor contenido de polifenoles totales, donde el mayor secuestro del radical DPPH se observa en las muestras cosechadas a las 12:00 m. que en las muestras cosechadas a las 6:00 a.m. y 5:00 p.m. se mantenían ligeramente constantes. Además se puede observar en la figura el efecto de la concentración de los extractos etanólicos sobre el radical DPPH.

En el cuadro 6, se presenta el secuestro del radical libre por las diferentes concentraciones a diferentes horarios de recolección.

Cuadro 6. Capacidad de secuestro del radical libre para *Phyllanthus urinaria* L. determinado por el ensayo de DPPH.

$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M DPPH remanente}^1$		
	Horario de recolección		
	6:00 a.m.	12:00 m.	5:00 p.m.
30	25.42 \pm 0.15	18.59 \pm 1.55	24.01 \pm 0.07
10	67.64 \pm 2.80	60.09 \pm 1.55	68.06 \pm 2.06
3	79.74 \pm 1.47	77.44 \pm 0.88	84.38 \pm 4.45

¹Fue determinado ajustando las absorbancias a la curva de calibración de DPPH. Los valores representan la media \pm SEM de tres diferentes reacciones corridos cada 5 segundos durante 600 s.

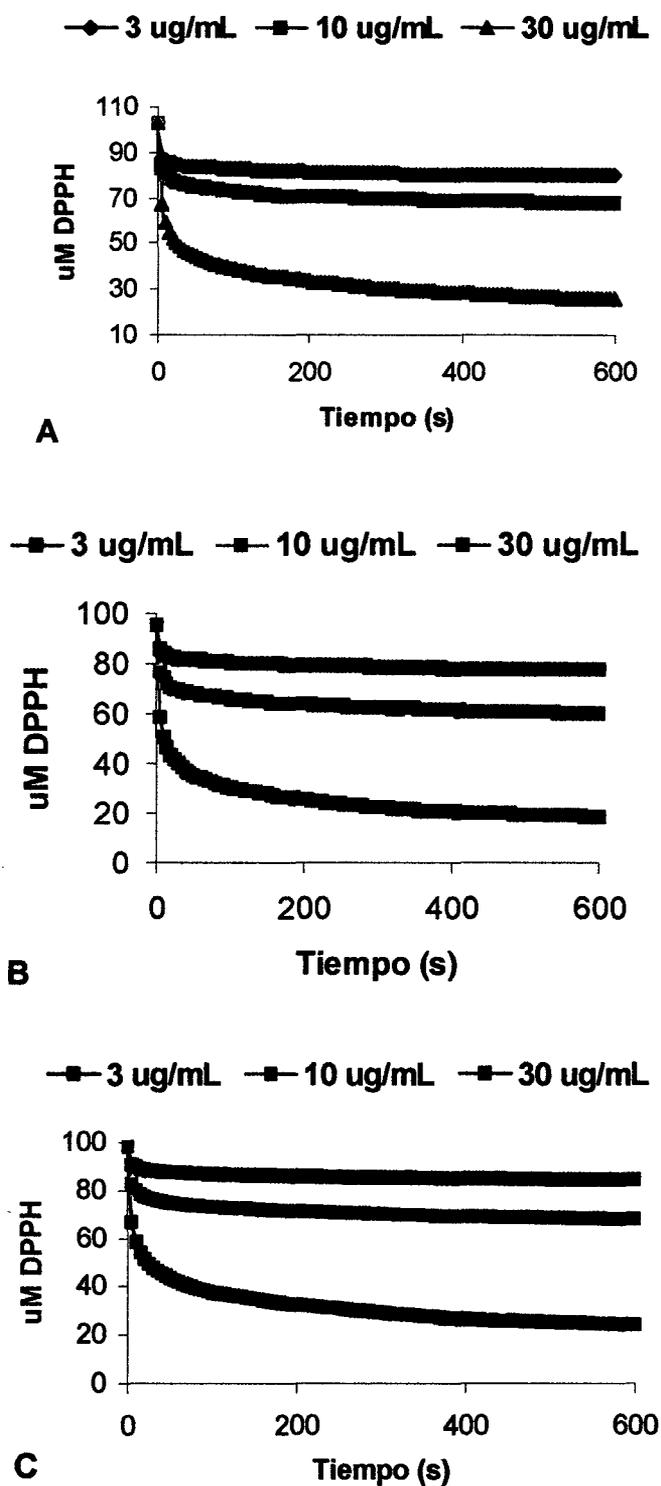


Figura 10. Capacidad de secuestro del radical DPPH, por los extractos de la especie *Phyllanthus urinaria*. L. Extracto de hojas recolectas a 6:00 a.m. (A), 12:00 m. (B) y 5:00 p.m. (C). Medido cada 5 segundos durante 600 segundos.

En el **cuadro 7**, se muestra los resultados del coeficiente de inhibición 50% (IC_{50}), para *Phyllanthus urinaria*, a diferentes horarios de recolección, donde se observa que las hojas recolectadas a las 12:00 m. presentaron un mayor IC_{50} que las recolectadas a las 6:00 a.m. y 5:00 p.m. a la misma vez que son corroborados por el poder antiradical (ARP), la capacidad antioxidante se incrementa en las muestras recolectadas a 12:00 m. a diferencia que en los otros tratamientos que esta capacidad tiende a disminuir.

Cuadro 7. Horario de recolección sobre la capacidad antioxidante medido por IC_{50} .

Especie	Tiempo de recolección	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ARP
<i>Phyllanthus urinaria</i>	12:00 m.	12.074 ± 0.628^a	82.83
<i>Phyllanthus urinaria</i>	5:00 p.m.	15.003 ± 0.581^b	66.65
<i>Phyllanthus urinaria</i>	6:00 a.m.	15.030 ± 0.488^b	66.53

Datos expresados en media \pm SEM, n=3. Media unido a letras (a – b), diferencia estadística a $p < 0.01$ según la prueba de Duncan.

Cabe indicar cuanto más bajo es el IC_{50} , significa que la presencia de los antiradicales, presentan mayor eficiencia para ceder con facilidad el radical hidrógeno, los datos anteriores indican la evolución de las diferentes reacciones cinéticas estos dependen de la naturaleza del antioxidante que a su vez presenta curvas de naturaleza hiperbólica.

V. DISCUSIONES

5.1 DETERMINACIÓN POLIFENOLES TOTALES

Phyllanthus urinaria. L, presentó mayor contenido de polifenoles totales respecto a *Phyllanthus niruri*, L en el orden hoja > tallo > raíz. Posiblemente la diferencia que existe entre el contenido de polifenoles de *P. urinaria* está relacionado con la pigmentación roja que presenta este recurso. MECHAIX *et al* (1990), reporta que los plantas con fuertes coloraciones rojas son productos ricos en contenido de antocianinas como se sabe que las antocianinas están incluidos en los polifenoles. El contenido de polifenoles en ambas especies varia, así tenemos que está entre *P. urinaria* de 7.32 a 2.27 y *P. niruri* de 3.10 a 1.71 g de AGE/100g de materia seca según la parte de la especie en estudio. Según KÄHKÖNEN *et al* (1999), indica que el contenido de polifenoles es variable en las diferentes plantas medicinales así señala que *Achillea millefolium* 0.53, *Andromeda polifolia glaucophylla* 3.28, *Armoracia rusticana* 0.09, *Epilobium angustifolium* 3.22, *Calluna bulgaris* 3.6, *Lythrum salicaria* 4.21, *Matricaria chamomilla* 0.91, *Prunus insititia* 2.3, *Succisa pratensis* 1.64, *Trifolium repens* 0.29 g de AGE/100 g de hoja seca. Así mismo RAMOS (2002), reporta para *Camellia sinensis* 14.1, *Cymbopogon citratus* 0.81 g de AGE/100g de hoja seca.

Por otro lado el contenido de polifenoles varia en función a la parte de la planta que es analizada como hoja, tallo y raíz; en la hoja de *P. urinaria* fue de 7.32 y en la hoja de *P. niruri* fue de 3.10, estos valores son superiores comparados al tallo y raíz, esto posiblemente se debe a lo reportado por PIÑOL y PALAZON (1993), que indica la biosíntesis de compuestos secundarios como son los

fenoles se forman a partir de carbohidratos y éstos a la vez del proceso de la fotosíntesis, así mismo AZCON (1993), indica que la fotosíntesis se realiza en las hojas por contar con un tejido especializado.

El contenido de polifenoles en tallo fue de 4.54 para *P. urinaria* y *P. niruri* 3.84 y en la raíz para *P. urinaria* 2.57 y *P. niruri* 1.71 este menor contenido a nivel de la raíz posiblemente se debe a lo indicado por AZCON (1993), que menciona que la raíz tiene la función de captar solutos del suelo y distribuirlo a los diferentes órganos de la planta así mismo el tallo se encarga de que suceda la división celular alargamiento como maduración y almacenamiento de los subproductos de la biosíntesis que viene hacer parte del engrosamiento del tallo (BIDWEL, 1979).

5.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L. (hoja, tallo, raíz)

Para las especie, el efecto de las partes en estudio sigue el orden hoja > tallo > raíz, para ambos recursos.

En este estudio se comparo ambas especies con el propósito de determinar su capacidad antioxidante en función al IC₅₀, los resultados indican que *P. urinaria* demostró ser mejor secuestrando el radical DPPH que *P. niruri*.

El que *P. urinaria* presente mayor capacidad antioxidante que *P. niruri*, probablemente se deba a la disponibilidad y habilidad del grupo hidroxy en su estructura química. OKAWA *et al* (2001), reporta que el número de grupos

hidroxy no siempre es importante cuando se compara capacidad antioxidante sino la posición del grupo hidroxy puede ser más importante para reducir el radical DPPH. HU Y KITTS (2000), reportan que la conjugación extendida y un gran número de grupos hidroxy en una estructura pueden ser una de las causas de su poder reductor y gran potencial para donar radicales hidrógenos a los radicales libres. El IC_{50} determinado para las hojas de *P. urinaria* y *P. niruri* fue de 138.831 y 1454.284 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Otros trabajos realizados reportan un IC_{50} , para otros recursos como *Uncaria tomentosa* 20.8, *Uncaria guianensis* 12.6 $\mu\text{g/mL}$ (SANDOVAL *et al.*, 2002). *Camellia sinensis* 32.43, *Cymbopogon citratus* 1345.79 $\mu\text{g/mL}$ (RAMOS, 2002)

De acuerdo a los resultados las hojas presentaron un mayor coeficiente de inhibición comparado con la raíz y tallo, esto posiblemente se debe a lo indicado por GONZALES *et al* (2000), que indica que los antioxidantes como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) y flavonoides son muy buenos antioxidantes la mayor parte de estos elementos están situados al nivel de la hoja.

La raíz ocupa el segundo orden IC_{50} , se puede decir que esta parte de la planta se encarga de captar y transportar solutos (BIDWEL, 1979). Posiblemente en este transporte se puede captar minerales o activan metaloenzimas como el cobre y zinc tal como lo indica GONZALES *et al* (2000). Las raíces de ambas especies comparados existen diferencia siendo el mejor *P. urinaria* que presenta una raíz tipo fibroso con membranas ramificadas alargadas y finas

según RAMIREZ (1993), indica que raíces con muchas ramificaciones favorecen la ventaja de captar y distribuir más solutos.

5.3 DETERMINACIÓN DEL HORARIO DE RECOLECCIÓN SOBRE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Phyllanthus urinaria*

Con respecto al cuadro 7, que el mayor coeficiente de inhibición se da a las 12:00 m. esto puede deberse a la intensidad de luz que recibe la planta. Según (LIRA, 1994), indica cuando la tasa de fotosíntesis y respiración son iguales el intercambio de gases es cero y esto sucede cuando la planta encuentra su punto de saturación de luz, llegando a su máxima actividad fotosintética. En el caso de las muestras recolectadas a las 6:00 a.m. y 5:00 p.m. éstas no presentan diferencia estadística significativa. Según MARTINEZ (1995), la apertura de los estomas cuando sale el sol suele tardar una hora y el cierre es gradual pero más rápido lo que parece indicar la existencia de mecanismos diferentes al del cese de los fenómenos fotosintéticos.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos presentamos las siguientes conclusiones:

1. La especie *Phyllanthus urinaria* L, presento mayor contenido de polifenoles totales (TPP). gramos de AGE/100 g de materia seca. Los contenidos son: *P. urinaria* (hoja) 7.328, (tallo) 4.544, *P. niruri* (hoja) 3.810, (tallo) 3.487, *P. urinaria* (raíz) 2.575, *P. niruri* (raíz) 1.718.
2. El coeficiente de inhibición IC_{50} para las partes en estudio fueron *P. urinaria* (hoja) 138.831, (raíz) 263.769, (tallo) 345.871 y *P. niruri* (hoja) 1454.284, (raíz) 1457.089, (tallo) 1670.654 $\mu\text{g/mL}$.
3. La especie *Phyllanthus urinaria* L, recolectado a las 12:00 m. presento mayor cantidad de polifenoles por lo tanto, menor coeficiente de inhibición IC_{50} , es decir mayor capacidad antioxidante.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para determinar los componentes fitoquímicos responsables de la capacidad antioxidante de la especie *Phyllanthus urinaria*.
2. Realizar investigación silviculturales para poder tener recursos permanentes.
3. Investigar especies del género *Phyllanthus*.
4. Realizar estudios de actividad antioxidante en las diferentes especies del género *Phyllanthus*.

ABSTRACT

This investigative work was executed with the facilities of the Food Analysis and Photospectrometry of the National Agrarian University of de Jungle (UNAS). We had the following objectives: (1) Determination the total polyphenoles in the leaves, stems and roots (2) Determination of the antioxidants activity in two species of chanca piedra (leaves, stems and roots) in regards to 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) and (3) schedule of harvest.

The contents of polyphenoles present in the *Phyllanthus urinaria* leaves, stems and roots, were 7.328 ± 0.157 , 4.544 ± 0.048 , 2.575 ± 0.024 respectively, and for the *Phyllanthus niruri* leaves, stems and roots, were 3.810 ± 0.074 , 3.487 ± 0.035 and 1.718 ± 0.045 g de EGA/g in dry samples.

The antioxidants activity, expressed in terms IC_{50} , were as follows; in the *Phyllanthus urinaria* leaves, stems and roots, 138.831 ± 8.58 , 263.769 ± 5.15 and 345.871 ± 20.91 respectively and for the *Phyllanthus niruri* leaves, stems and roots, 1454.284 ± 23.84 , 1457.089 ± 19.87 and 1670.654 ± 51.94 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

The schedule for the harvest for the *Phyllanthus urinaria* leaves was the following 12:00 m 12.074 ± 0.628 $\mu\text{g/mL}$, 5:00 m.p 15.003 ± 0.581 $\mu\text{g/mL}$ and at 6:00 ma. 15.030 ± 0.488 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus niruri*, and antioxidant capacity.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Azcon, B.J. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, España. 721 p.
- Balee, W. 1994. Las huellas del Bosque Ethnobotany: La Ecología Histórica de la Utilización de la Planta. Universidad de Columbia, Nueva York.
- Bharatiya, V.B. 1992. Selected medicinal plants of India. Tata Press. Bombay, India. 235 p.
- Bidwel, R.G.S. 1979. Fisiología vegetal. Editorial AGA. S.A. México, México 784 p.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. y Berset, C. 1995. Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. Academy Press Limited. 25 – 30.
- Campos, A.M.; Lissi, E. A. 1996. Total antioxidant potential of chilean wines. Nutrition Research. 16: 385 – 389.
- Estelo, C.Q. 2002. Cuantificación de flavonoides 3 – hidroxyl sustituido y proantocianidinas en plantas medicinales "chanca piedra" (*Phyllanthus niruri*. L), "llantén" (*Plantago major*. L) y "mata pasto" (*Pseudelephantopus spicatus* Rohor). Universidad Nacional Agraria de la Selva. pp 16 – 20.
- Estrella, E. 1995. Tratado de cooperación amazónica. Plantas Medicinales Amazónicas. FAO. 312 p.

- Finkel, T.; Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239 – 247.
- Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Teissedre, p.L. 1995. Principal phenolic phitochemical in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low dencity lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890 – 894.
- Gamaley, I. A.; Kluybin, I.V. 1999. Roles of reactivo oxygen species: Signaling and Regulation of Cellular Functions. *Review Cytology*. 188: 203 – 255.
- González, T.M.C.; Betanciurt, R.M.; Ortiz, M.R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 25: 3 – 9.
- Groot, H. 2000. Reavtive oxygen species in tissue injuri. *Hepatogas-troenterology*. 41: 328 – 332.
- Gutteridge, J.; Halliwell, B. 1999. Antioxidant protection and oxygen radical signaling: En: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York. pp 189-218.
- Hansberg, W. 1999. La biología del dioxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico - Biológicas*. 2: 47 – 55.
- Hu, C.; Kitts, D. 2000. Studies on the antioxidant activity of echinacea root extrac. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1466 – 1472.

- Jones, S. 1998. Sistemática vegetal. Primera edición española. Editorial Fuentes Impresores, S. A. Granjas Esmeraldas. Mexico. 536 p.
- Känkönen, M.P., Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containig phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954 – 3962.
- Kinsella, J.E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology.* 45: 85 – 89.
- Korkina, L.G.; Afanas ev, I.B. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38: 151 – 163.
- Leighton, F.; Urquiaga, I. 1998. Oxidación y producción de radicales libres. Antioxidantes y calidad de vida. Organo de difusión de South American Group for Free Radical Research. 2: 1 – 2.
- Leighton, F.; Urquiaga, I. 1999. El sistema de defensas antioxidantes es multiple y especifico. Antioxidantes y calidad de vida. Organo de difusión de South American Group for Free Radical Research. 3: 1 – 2.
- Leighton, F.; Urquiaga, I. 2000. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y Calidad de Vida. Organo de difusión del South American Group for Free Radical Research. 7: 5 – 13.
- Lira, S.R.H. 1994. Fisiología vegetal. Editorial Trillas. México, México 237 p.

- Martínez, F.G. 1995. Elementos de fisiología vegetal, relación hídrica, nutrición, mineral, transporte y metabolismo. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 387 p.
- Mechaix, J.; Fieuriel, A.; Billot, J. 1990. Fruit phenolics. CRC Press. Boca Raton. Florida, USA. pp 76 – 87.
- Meixa, W.; Haowei, C.; Yanjin, L. 1995. Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observation with three preparations from different geographic sites. *J Lab Clin Med.* 126: 350 – 52.
- Middleton, E.J. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med Biol.* 439: 175 – 182.
- Nijveldt, R.J.; Nood, E.; Hoorn, D.; Boelens, P.; Norren, K.; Leeuwen, P. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 74: 418 – 425.
- Okawa, M.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Ono, M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1202 – 1205.
- Peterson, J.; Dwyer, J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research.* 18: 1995 – 2018.
- Piñol, M.T.; Palazón, J. 1993. Metabolismo secundario. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon, B.J. Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, España. pp 237 – 283.

- Price, M.L.; Butler, L.G. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268 – 1273.
- Ramirez, J. 1993. Relación hídrica y fotosíntesis en la planta. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon, B.J. Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, España. pp 175 – 196.
- Ramos, E. F. 2002. Diseño y evaluación de la capacidad antioxidante in vitro de una bebida en base a té verde (*Camellia sinensis*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tesis Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. 121 p.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant Science.* 2: 152 – 159.
- Sánchez, L. A.; Flores, M. 1999. Genotoxicidad de *Phyllanthus orbicularis* evaluada mediante el ensayo de micronúcleos en células de ovario de hámster chino. *Revista Cubana Investigación Biomedica.* 18: 22 – 23.
- Sandoval, M.; Okuhama, N.; Zhang, X.; Condezo, L.; Lao, J.; Angeles, F.; Musah, R.; Bobrowski, P.; Miller, M. 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activity of cats claw (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) independent of their alkaloid content. *Phytomedicine.* 9: 1 – 13.
- Solomons, N.W. 1979. On the assessment of zinc and copper nitrite in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 856 – 871.

Thyagarajan, S.P.; Subramanian, S.; Thiranapasundaru, T.; Enkateswaran, P.S. 1988. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet*. 2: 764 – 766.

Zheng, W.; Wang, S. 1999. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en hierbas seleccionadas. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1749 – 1754.

IX. ANEXOS

Anexo - I

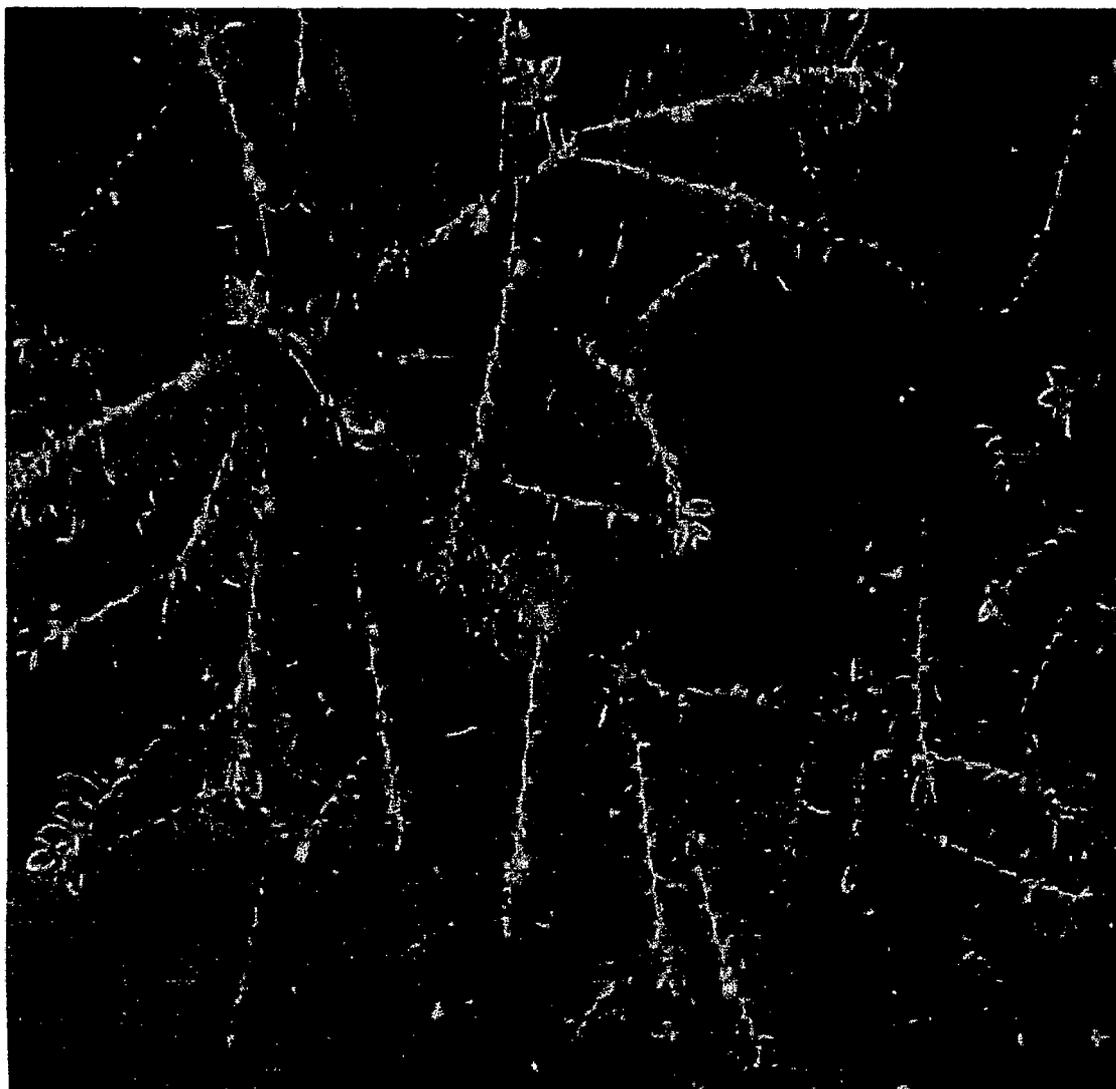


Foto 1. *Phyllanthus niruri* L. crecimiento óptimo.

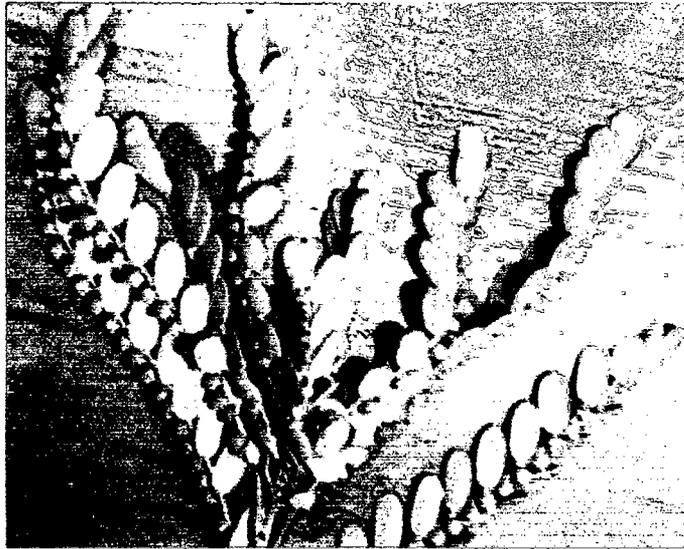
Anexo – II

Foto 2. *Phillanthus niruri* L. (Floración)



Foto 3. *Phillanthus niruri* L. (Fruto)

Anexo – III

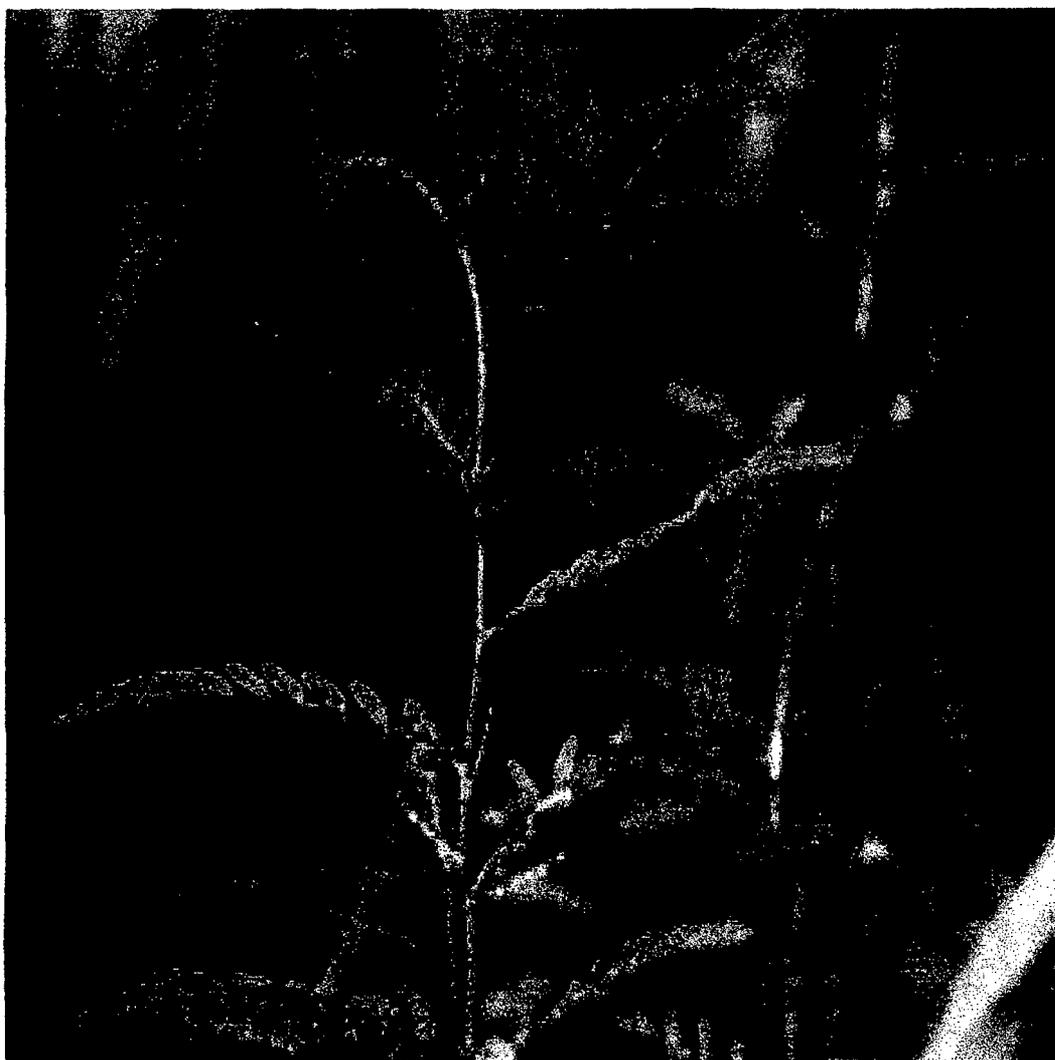


Foto 4. *Phyllanthus urinaria* L. crecimiento óptimo.

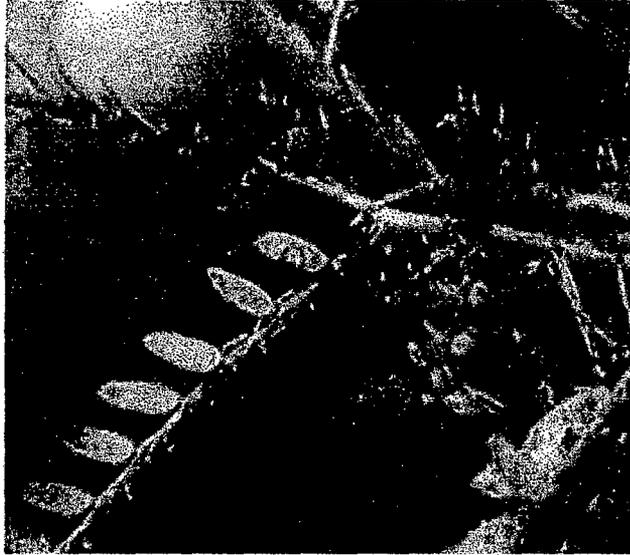
Anexo – IV

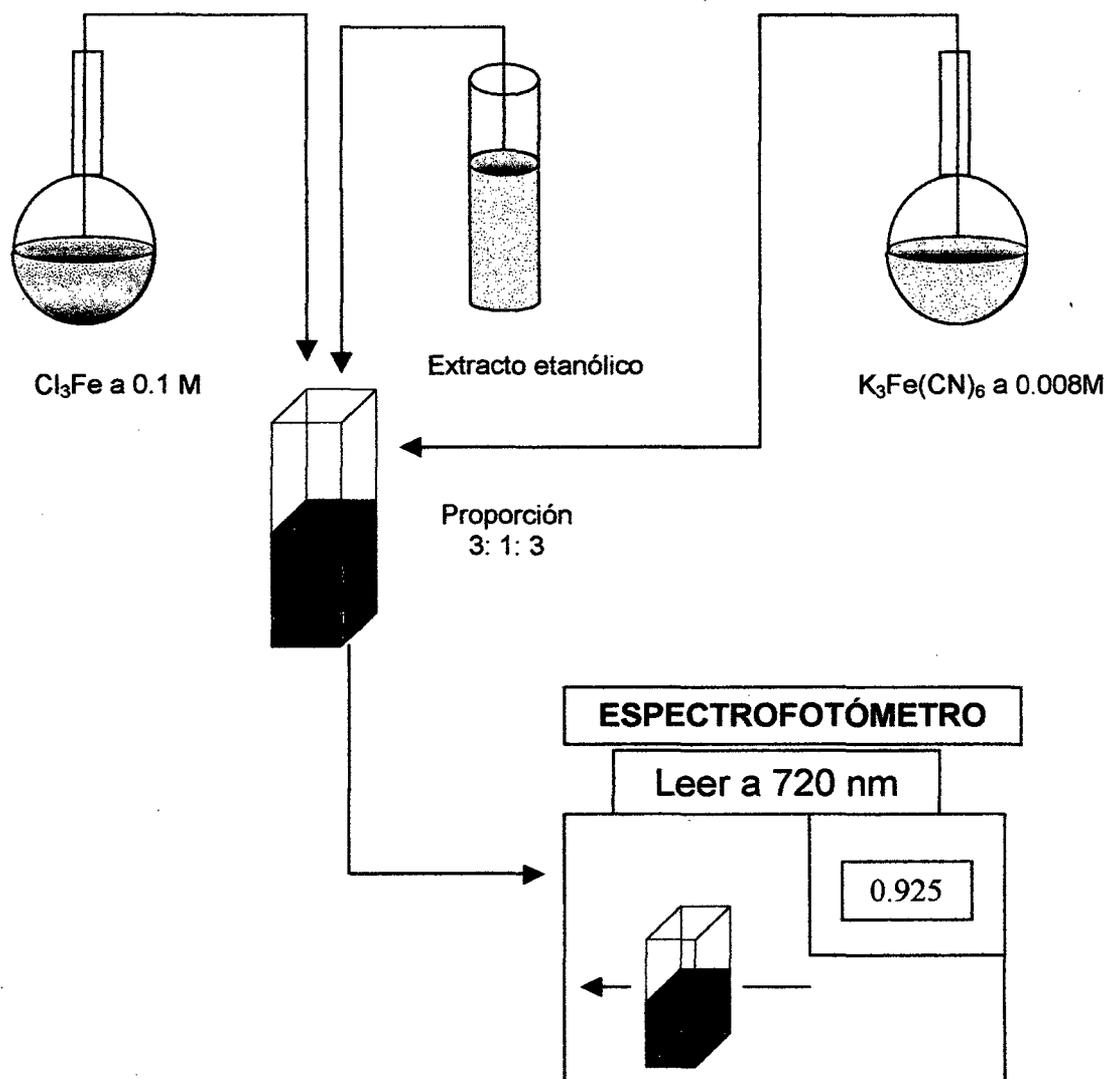
Foto 5. *Phyllanthus urinaria* L. (Floración)



Foto 6. *Phyllanthus urinaria* L. (Fruto)

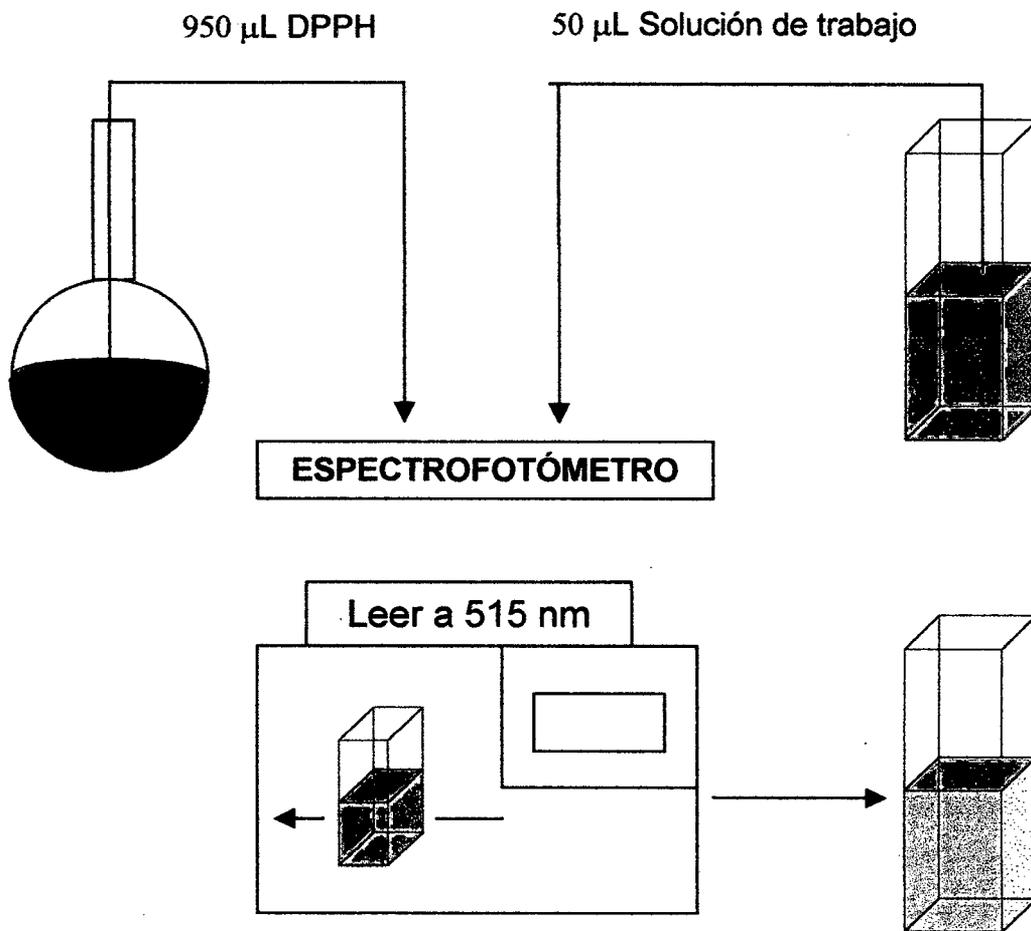
Anexo - V

Protocolo para determinar polifenoles totales.

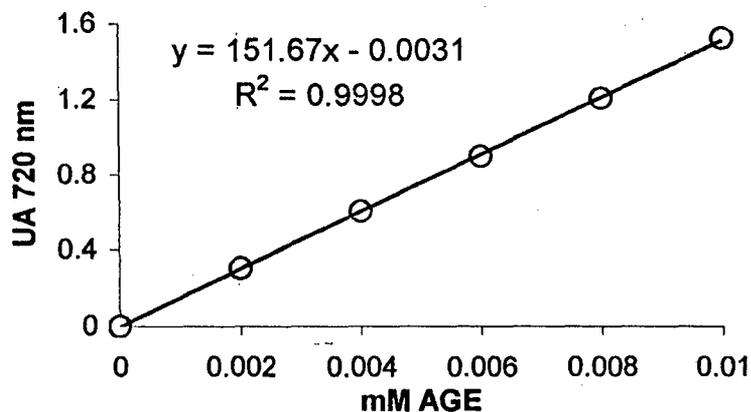


Anexo – VI

Protocolo para determinar la capacidad antioxidante.



Anexo - VII



Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.00295238	0.00604561	-0.488351	0.6509
Slope	151.657	0.9984	151.9	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1.60999	1	1.60999	23073.66	0.0000
Residual	0.000279105	4	0.0000697762		
Total (Corr.)	1.61027	5			

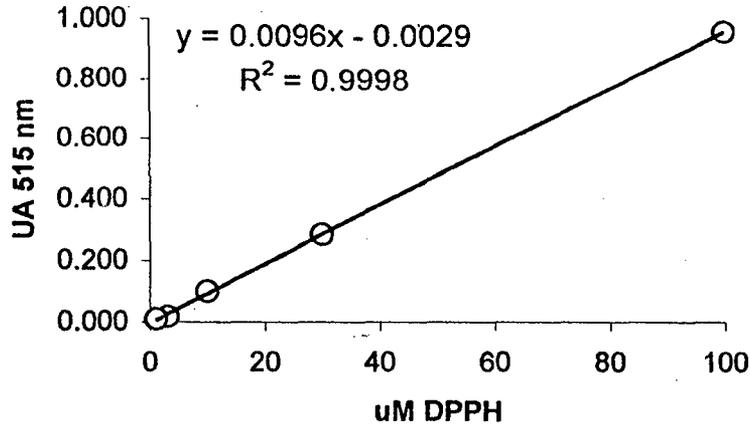
Correlation Coefficient = 0.999913

R-squared = 99.9827 percent

Standard Error of Est. = 0.00835321

Figura 11. Curva de calibración para cuantificar polifenoles totales.

Anexo - VIII



Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.00285011	0.00345873	-0.824035	0.4703
Slope	0.00959202	0.0000737069	130.137	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.631424	1	0.631424	16935.72	0.0000
Residual	0.000111851	3	0.0000372836		
Total (Corr.)	0.631536	4			

Correlation Coefficient = 0.999911

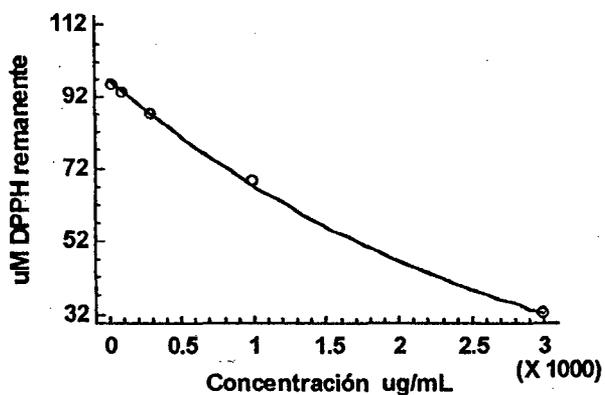
R-squared = 99.9823 percent

Standard Error of Est. = 0.00610603

Figura 12. Curva de calibración DPPH.

Adaptado: RAMOS (2002)

Anexo - IX



Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.57655	0.0062418	733.211	0.0000
Slope	-0.000366639	0.00000439152	-83.488	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.830193	1	0.830193	6970.24	0.0000
Residual	0.000357316	3	0.000119105		
Total (Corr.)	0.83055	4			

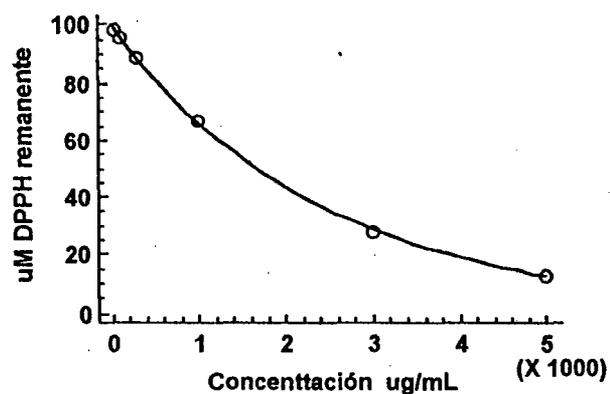
Correlation Coefficient = -0.999785

R-squared = 99.957 percent

Standard Error of Est. = 0.0109135

Figura 13. Curva de IC₅₀ para la hoja de *P. niruri*

Anexo - X



Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.60269	0.0108687	423.482	0.0000
Slope	-0.000414575	0.00000449359	-92.2592	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3.48558	1	3.48558	8511.76	0.0000
Residual	0.00163801	4	0.000409502		
Total (Corr.)	3.48722	5			

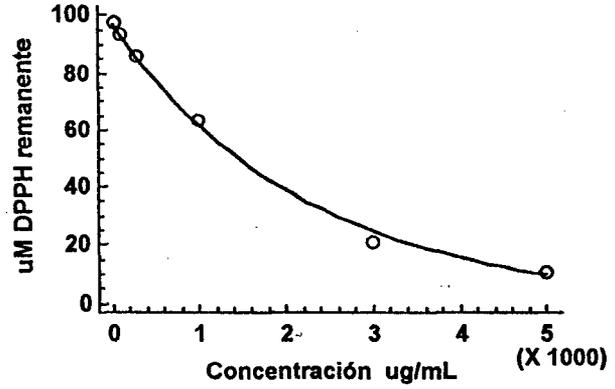
Correlation Coefficient = -0.999765

R-squared = 99.953 percent

Standard Error of Est. = 0.0202361

Figura 14. Curva de IC₅₀ para el tallo de *P. niruri*

Anexo - XI



Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2
Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.57622	0.0485264	94.3038	0.0000
Slope	-0.000456964	0.0000200629	-22.7765	0.0000

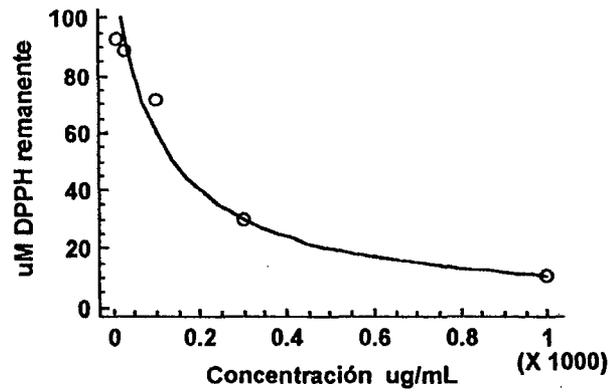
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	4.23481	1	4.23481	518.77	0.0000
Residual	0.0326526	4	0.00816316		
Total (Corr.)	4.26746	5			

Correlation Coefficient = -0.996167
R-squared = 99.2348 percent
Standard Error of Est. = 0.0903502

Figura 15. Curva de IC₅₀ para la raíz de *P. Niruri*

Anexo - XII



Regression Analysis - Reciprocal-Y model: $Y = 1/(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.00829982	0.0010745	7.72435	0.0045
Slope	0.0000835987	0.0000022898	36.5092	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00479623	1	0.00479623	1332.92	0.0000
Residual	0.0000107949	3	0.0000035983		
Total (Corr.)	0.00480703	4			

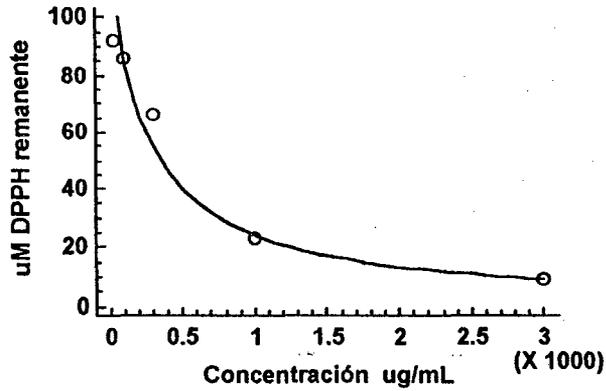
Correlation Coefficient = 0.998877

R-squared = 99.7754 percent

Standard Error of Est. = 0.00189692

Figura 16. Curva de IC₅₀ para la hoja de *P. urinaria*

Anexo - XIII



Regression Analysis - Reciprocal-Y model: $Y = 1/(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2
 Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.00836917	0.00138578	6.03931	0.0091
Slope	0.0000331737	9.7499E-7	34.0247	0.0001

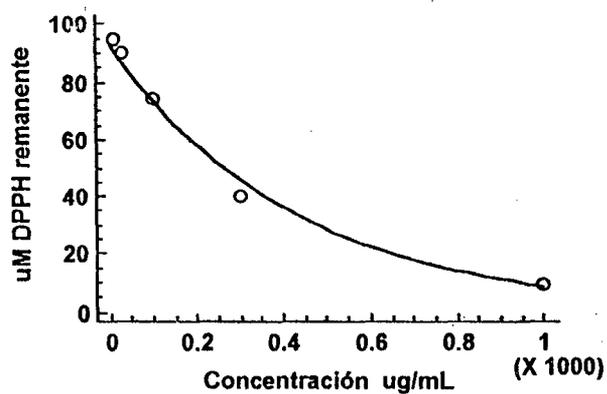
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00679657	1	0.00679657	1157.68	0.0001
Residual	0.0000176126	30.00000587086			
Total (Corr.)	0.00681418	4			

Correlation Coefficient = 0.998707
 R-squared = 99.7415 percent
 Standard Error of Est. = 0.00242299

Figura 17. Curva de IC₅₀ para el tallo de *P. urinaria*

Anexo - XIV



Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col_2

Independent variable: Col_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.5308	0.0508329	89.1313	0.0000
Slope	-0.00236012	0.000108327	-21.787	0.0002

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3.82269	1	3.82269	474.67	0.0002
Residual	0.0241599	3	0.0080533		
Total (Corr.)	3.84685	4			

Correlation Coefficient = -0.996855

R-squared = 99.372 percent

Standard Error of Est. = 0.0897402

Figura 18. Curva de IC₅₀ para la raíz de *P. urinaria*