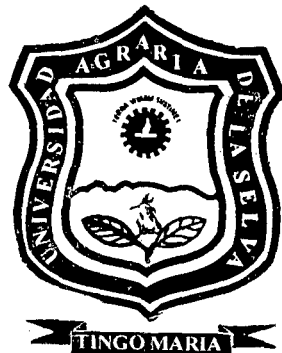


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Departamento Académico de Ciencias de los Recursos
Naturales Renovables



POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN

Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. f. ex k. Schum.

“CAPIRONA”

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO DE:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

MENCION FORESTALES

MARIA EVELING DAZA PANDURO

Promoción 2004 - II

Tingo María - Perú



F30

D19

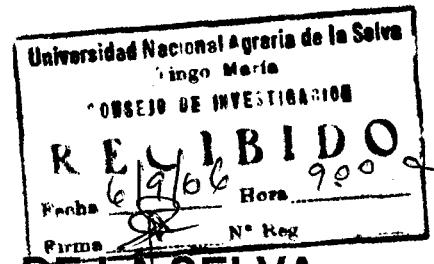
Daza Panduro, M. E.

Polifenoles totales y capacidad antioxidante en *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex k. Schum. "Capirona".- Tingo María 2004

70 h.; 10 cuadros, 28 figs.; 30 cm.

Ingeniero Recursista. (Mención Forestales). Facultad de Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú).

POLIFENOLES / ANTIOXIDANTES / CALYCOPHYLLUM
SPRUCEANUM / PLANTAS MEDICINALES / ÁRBOLES DE
PROPOSITO MULTIPLE



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN

***Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex Schum.**

“CAPIRONA”

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

MENCIÓN FORESTALES

PRESENTADO POR:

MARIA EVELING DAZA PANDURO

SUSTENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Ing. M.Sc. RICARDO OCHOA CUYA
Presidente

Blgo. M.Sc. EDILBERTO CHUQUILIN BUSTAMANTE
Vocal

Ing. M.Sc. PEDRO VEJARANO JARA
Vocal

Blgo. ARMANDO ENEQUE PUICON
Asesor



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 19 de diciembre del 2005, a horas 11:00 a.m. en la Sala de Conferencias de la facultad de Recursos Naturales Renovables, para calificar la tesis titulada:

POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex Schum. "CAPIRONA"

Presentado por la Bachiller: **MARIA EVELING DAZA PANDURO**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de "MUY BUENO".

En consecuencia la sustentante queda apta 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.

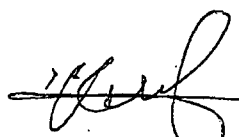
Tingo María, 19 de diciembre de 2005



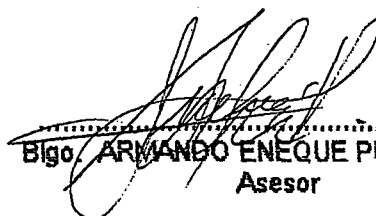
.....
Ing. M.Sc. RICARDO OCHOA CUYA
Presidente



.....
Bigo. M.Sc. EDILBERTO CHUQUILIN BUSTAMANTE
Vocal



.....
Ing. M.Sc. PEDRO VEJARANO JARA
Vocal



.....
Bigo. ARMANDO ENEQUE PUICON
Asesor

DEDICATORIA

A DIOS, por darme la vida y fuerzas para realizar mis deseos de superación.

A mis queridos padres:

GUNTER y LOURDES, con eterna gratitud, por su amor, su apoyo en la realización de mis anhelos y por sus sabios consejos en la culminación de mi carrera.

A mi hermano:

GUNTER, por su apoyo moral, cariño y amistad.

A mis familiares:

Abuelo, tías, tíos, primas, primos, padrinos, que significaron un estímulo para mi superación y por sus consejos, especialmente a mi tía **ZOILA**.

En memoria:

De mí recordada hna. **ROSSMERY** y mi abuelita **TEOFILA**, quienes desde la eternidad guían mi vida.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por darme la oportunidad de realizar mis estudios superiores.
- A la Facultad de Recursos Naturales Renovables, trabajadores y a todos mis profesores, por su apoyo y consejos brindados durante mi formación profesional.
- A mis asesores del presente trabajo de investigación, Biólogo Armando Eneque P. y el Ing°. Juan Villanueva T., por su amistad, confianza, apoyo incondicional, en el desarrollo y culminación del presente trabajo.
- A mi padre, el Ing°. Gunter Daza Rengifo, por su apoyo incondicional, económico y sus consejos para la elaboración y culminación de este trabajo.
- Al Licenciado Lindo Pizarro, por su colaboración en el análisis estadístico.
- A la Facultad de Industrias Alimentarias, por haberme brindado el Laboratorio de Análisis de Alimentos para la ejecución del presente trabajo.
- A los Ing°. Vanesa Melchor, Eduardo Cáceres y Alipio Ortega, por su colaboración para la realización del presente trabajo.
- A los señores, Juan Soto, Concepción Ariza, Celidonio Yacha, Richar Sias, Glelia Rios y Julio Soto, por que de una u otra forma colaboraron en la realización del trabajo.
- A todos mis amigos y amigas por su apoyo, amistad y compañerismo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 La capirona.....	4
2.1.1 Generalidades de la capirona.....	4
2.1.2 Características botánicas.....	5
2.1.3 Información etnobotánica y etnomédica.....	5
2.2 Las plantas medicinales y la fitoterapia en los planes generales de la salud.....	7
2.3 Radicales libres y antioxidantes.....	7
2.3.1 Radicales libres.....	7
2.3.2 Antioxidantes.....	10
2.3.3 Modelo <i>IN VITRO</i> , para evaluar la actividad antioxidante.....	14
2.3.4 Radical 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	14
2.4 Polifenoles.....	16
2.4.1 Interés de los polifenoles.....	17
2.4.1.1 Interés tecnológico.....	17
a) Contribución al color.....	17
b) Contribución al sabor amargo.....	18
c) Contribución al sabor astringente.....	18
d) Contribución al pardeamiento.....	18

2.4.1.2 Interés nutricional.....	18
a) Interés sobre los macronutrientes y la biodisponibilidad de minerales.....	18
b) Interés en la Actividad Antioxidante (AA) y su relación con diversas patologías.....	20
2.4.2 Mecanismo de la acción de los polifenoles.....	20
2.4.3 Los polifenoles como antioxidante.....	21
III. MATERIALES Y METODOS.....	22
3.1 Lugar de ejecución.....	22
3.2 Recurso vegetal.....	22
3.3 Materiales.....	22
3.3.1 Materiales de laboratorio.....	22
3.3.2 Equipos.....	23
3.3.3 Reactivos.....	23
3.4 Métodos de análisis.....	24
3.4.1 Cuantificación de polifenoles totales.....	24
3.4.2 Evaluación de la actividad antioxidante.....	24
3.5 Metodología experimental.....	24
3.5.1 Preparación de muestras.....	24
3.5.2 Determinación de polifenoles totales.....	25
3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante DPPH de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. (hoja, corteza, ritidoma y raíz).....	25
3.5.4 Etapas de la metodología experimental.....	26

3.5.4.1 Determinación de polifenoles totales.....	26
3.5.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante DPPH de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. (hoja, corteza, ritidoma y raíz)..	27
3.6 Análisis estadístico.....	28
3.6.1 Curva estandar, para la cuantificación de polifenoles	28
3.6.2 Determinación de la actividad antioxidante (IC ₅₀).....	28
IV. RESULTADOS.....	30
V. DISCUSION.....	35
VI. CONCLUSIONES.....	39
VII. RECOMENDACIONES.....	41
VIII. ABSTRACT.....	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	43
X. ANEXOS.....	49
XI. GLOSARIO.....	70

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Radicales libres derivados del oxígeno.....	11
2.	Otras especies de radicales libres.....	12
3.	Contenido de polifenoles totales en las muestras secas de hoja, corteza, raíz y ritidoma de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., recolectados a diferentes horas del día, extraídos con acetona/agua (70/30), durante 20 minutos en agitación.....	30
4.	Contenido de polifenoles totales en las muestras secas de hoja, corteza, raíz y ritidoma de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., recolectados a diferentes horas del día, extraídos con agua a 45°C.....	31
5.	Coeficiente de inhibición IC ₅₀ , de las muestras secas de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., extraídos con acetona/agua (70/30), durante 20 minutos en agitación.....	33
6.	Coeficiente de inhibición IC ₅₀ , de las muestras secas de, <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook extraídos con agua a 45°C.....	34
7.	ANVA de los polifenoles totales de acetona/agua.....	50
8.	ANVA de los polifenoles totales de agua a 45°C.....	50
9.	ANVA IC ₅₀ de acetona/agua.....	51
10.	ANVA IC ₅₀ de agua a 45°C.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Técnicas para evaluar la actividad antioxidante en suplementos dietarios y plantas medicinales.....	14
2.	Química de la inhibición del radical libre por una especie antioxidante.....	15
3.	Metabolismo general de los productos naturales.....	19
4.	Diseño experimental para la determinación de los polifenoles totales presentes en <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook.	26
5.	Diseño experimental para la determinación de los parámetros de inhibición de DPPH presentes en <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook.	27
6.	Diseño experimental para determinar el efecto del tiempo de recolección sobre los polifenoles y la capacidad antioxidante.....	29
7.	Porcentaje de inhibición del radical DPPH, de los diferentes extractos de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., recolectadas a 07:00 a.m., 12:00 m. y 05:00 p.m. E – A/A (Extracto Acetona/Agua (70/30), E – A (Extracto Acuoso).	32
8.	Curva patrón general de ácido gálico en acetona/agua....	52

9.	Curva patrón general de ácido gálico en agua a 45°C....	52
10.	Curvas del contenido de polifenoles de los extractos acetona /agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); en las tres horas de recolección.....	53
11.	Curvas del contenido de polifenoles de los extractos agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); en las tres horas de recolección.....	54
12.	Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 07:00 a.m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.....	55
13.	Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 12:00 m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.....	56
14.	Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 05:00 p.m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.....	57
15.	Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook., de los	

- extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectado a las 07:00 a.m. utilizando agua a 45°C..... 58
16. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectado a las 12:00 m. utilizando agua a 45°C..... 59
17. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 05:00 p.m. utilizando agua a 45°C.... 60
18. Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona /agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 07:00 a.m..... 61
19. Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona/agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 12:00 m..... 62
20. Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona/agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 05:00 p.m..... 63
21. Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 07:00 a.m..... 64
22. Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz

	(C), ritidoma (D); recolectadas a las 12:00 m.....	65
23.	Curvas de IC₅₀ de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 05:00 p.m.....	66
24.	Plantación de capirona.....	67
25.	Muestras acondicionadas para el secado.....	67
26.	Mostrando la agitación de las muestras.....	68
27.	Efectuando las diluciones.....	69
28.	Colocando la muestra en el espectrofotómetro para efectuar la lectura.....	69



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva – Tingo María, Perú. Los objetivos fueron evaluar polifenoles totales por el método de PRICE y BUTLLER (1977) en hojas, corteza, raíz y ritidoma de la “Capirona” (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., en una mezcla acetona/agua (70/30) y en agua a 45°C. Además de evaluar la capacidad antioxidante, usando el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH) mediante el método descrito por BRAND-WILLIAMS (1995).

La extracción de los polifenoles con los resultados de las evaluaciones de cada experimento, se realizaron en un diseño en Bloque Completo al Azar (B.C.A), con una prueba de Tukey con $p < 0,05$. Siendo el extracto de la hoja muestra recolectada a las 07:00 a.m. que presentó el mayor contenido de polifenoles, con $2,0814 \pm 0,2816$ mg AGE/g muestra seca en extracción acetona/agua y $0,3185 \pm 0,0176$ mg AGE/g muestra seca con el extracto de agua a 45°C respectivamente.

La mayor actividad antioxidante fue detectada en el extracto acetona/agua, de la muestra de hoja recolectada a las 05:00 p.m. con un IC_{50} $37,148 \pm 5,565$ μ g/mL y en el extracto de agua a 45°C fue la muestra de corteza recolectada a las 07:00 a.m. con un IC_{50} $52,352 \pm 2,669$ μ g/mL, frente al radical DPPH.

I. INTRODUCCION

Es preocupación de la salud pública mundial, el incremento de las enfermedades crónicas, lo cual principalmente se da por la forma de vida que llevamos y por la contaminación ambiental que cada día es mayor. Estas enfermedades que tienen más incidencia en el occidente, son conocidas como las “del desarrollo”.

Los resultados de innumerables estudios epidemiológicos, de los que se infiere el valor de ciertas plantas para el tratamiento de muchos males que afectan a la humanidad, ha provocado la necesidad de seguir estudiando las plantas como una alternativa de curación a numerosas enfermedades, que a pesar de los avances científicos y tecnológicos no han dado solución a los problemas de salud presentados.

Así mismo, la diversidad vegetal es muy amplia y en el mundo existen más de 250000 especies; para el Perú se reporta más de 17144, de las cuales existen 1105 especies que presentan propiedades medicinales.

La amazonía peruana tiene una alta diversidad de plantas medicinales, usadas como medicina alternativa para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades; dentro de estas tenemos a *Calycophyllum spruceanum* (Benth.)

Hook. "capirona", la cual, ha sido estudiado más como especie forestal que como especie medicinal.

Las propiedades medicinales de las plantas se deben a la presencia, en las hojas, tallos y raíces, de sustancias químicas como glucósidos, alcaloides, polifenoles entre otros. Por lo que, los polifenoles tienen propiedades antioxidantes y son una alternativa para los problemas tales como proteger del envejecimiento prematuro, el cáncer y otras enfermedades que cada día se incrementan, disminuyendo el promedio de vida.

Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook., además de sus múltiples usos como especie maderable, es utilizada tradicionalmente en la amazonía peruana para el tratamiento de numerosas enfermedades; sin embargo, no se ha estudiado con profundidad estas propiedades. En consecuencia, el estudio de las propiedades medicinales le daría un mayor valor agregado a este recurso al poder utilizar toda la planta, no solo como especie forestal sino también como una especie promisoría desde el punto de vista medicinal.

El presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

1. Determinar los polifenoles totales por el método de PRICE y BUTLLER (1977) en hojas, corteza, raíz y ritidoma de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. "capirona", en solvente acetona/agua (70/30) y agua a 45°C.
2. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de hojas, corteza, ritidoma y raíz de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. "capirona", frente al radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) por el método descrito por BRAND-WILLIAMS (1995).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La capirona

2.1.1 Generalidades de la capirona

ESTRELLA (1995), menciona que *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. es un árbol deciduo de hasta 30 metros de altura, tronco con corteza liza, de color rojo verdoso, caduca, dejando ver una superficie interna amarillenta; flores blanco-verdeadas, aromáticas, madera blanca. Crece en el bosque húmedo de llanura inundada, en el pie de monte y en el bosque arbustivo.

En el Perú esta especie se encuentra en los departamentos de San Martín, Huánuco, Madre de Dios, Loreto y Ucayali; entre los 0 y 1000 msnm (BRAKO y ZARUCCHI, 1993). La especie crece en comunidades denominados "capironales". La corteza es de color marrón verdoso que al desprenderse en placas coriáceas expone el tronco blanco grisáceo, por ello también se le conoce como "palo mulato". ASERRADERO TUNG YING S.R.L. (s.d.)

MOSTACERO *et al.*, (2002), menciona que esta especie tiene el fuste recto y ramificado, la forma de la copa es heterogénea, la raíz es pivotante y ramificada; el color de la corteza es verde petróleo brillante, ritidoma coriáceo color rojizo, lámina que se desprende anualmente; la corteza interna tiene una textura

suave coriáceo, de color blanco cremoso, sin olor ni sabor; el fuste no tiene látex ni resina, exuda una savia de color blanco transparente, que es utilizada para quitar manchas de la piel.

2.1.2 Características botánicas

MOSTACERO *et al.*, (2002), reporta que la “capirona” tiene la siguiente clasificación botánica:

División : Angiospermae

Clase : Dicotyledoneae

Sub clase : Matachlamydeae

Orden : Gentianales

Familia : Rubiaceae

Género : *Calycophyllum*

Especie : *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex k.Schum.

Nombre común: “capirona”.

Según ESTRELLA (1995), el nombre común de esta especie en América del sur es: (Bolivia), guayabochi, cojeshe; (Brazil), mulateiro, capirona, mulateiro da várza; (Colombia), palo mulato; (Perú), capirona, capirona de bajo, capirona negra.

2.1.3 Información etnobotánica y etnomédica

Los reportes de CADESAM (s. d.), indican que *C. spruceanum* (Benth.) Hook. es utilizada como medicina alternativa, la corteza y la savia sirven como cicatrizante y hemostático, así como para el tratamiento de arrugas,

diabetes, heridas infectadas, hongos, manchas de la piel, infecciones oculares y sarna negra. Según ECONEGOCIOS (s.d.), esta especie tiene múltiples propiedades medicinales; su corteza en infusión es útil para infecciones oculares, la diabetes y males ováricos, en emplastos es muy buen cicatrizante y antimicótico; la savia tiene propiedades cosméticas, borra las manchas y cicatrices en la piel y previene las arrugas.

ESTRELLA (1995), manifiesta que en el Alto Amazonas, la corteza de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., es utilizada para contrarrestar varias enfermedades. Entre los indígenas Huarani de la amazonía ecuatoriana la especie *C. acreanum* (Ducke Ducke) es muy apreciada para el tratamiento de la malaria. Los Quichas del Napolo lo usan como estimulante; se cree que puede tener unos efectos semejantes a los de la coca. En la amazonía boliviana, los grupos indígenas toman la corteza seca y molida; mezclada con agua es utilizada como una pasta que se aplica a las heridas con el objeto de curar y prevenir las infecciones. Los indígenas del río Aparoris beben una infusión de la corteza de *C. obovatum* (Ducke Ducke) para eliminar los parásitos intestinales; la corteza es muy astringente y amarga, por contener taninos.

La composición química y farmacológica no han sido estudiadas; la acción del extracto de *C. spruceanum* (Benth.) Hook. es febrífugo, antiinflamatorio, desinfectante, antifúngico, contraceptivo. La parte utilizada es la corteza, se utiliza la decocción o infusión y en forma de polvo para aplicación externa. Así mismo esta especie es utilizada para dermatitis, lesiones dérmicas, lesiones fúngicas de la piel, malaria; en el Perú, la decocción de la corteza es utilizada

contra la “sarna negra” que es un arácnido que vive bajo la dermis; el polvo seco de la corteza es aplicado en las infecciones fúngicas de la piel (ESTRELLA, 1995).

2.2 Las plantas medicinales y la fitoterapia en los planes generales de la salud

Con vistas a la investigación científica de los medicamentos herbarios, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha publicado una serie de resoluciones sobre la amplia cobertura de los servicios a través de la estrategia de Atención Primaria de la Salud (APS), cuyo pilar fundamental es la utilización de recursos terapéuticos desarrollados por la propia comunidad, es decir incorporando las plantas medicinales.

2.3 Radicales libres y antioxidantes

2.3.1 Radicales libres

Según DAMIANICH *et al.*, (s. d.), es “**radical libre**”, todo átomo, molécula o fragmento de molécula que posee en su orbital externo, un electrón no apareado, este “acepta” un electrón de otro elemento, pasando a actuar como radical libre, siendo posible de esta manera una auténtica reacción en cadena. El exceso de radicales libres provoca diversas enfermedades degenerativas, entre ellas produce el envejecimiento prematuro de la piel por exposición a los rayos solares.

EL PUENTE (s.d.) manifiesta que los radicales libres son subproductos de las reacciones químicas habituales que se producen en el organismo, aunque

tienen una vida muy corta, son capaces de oxidar y envejecer a las células con las que se encuentran, provocando una reacción en cadena que daña los tejidos. Ocasionalmente serios perjuicios, entre otros atacan al colesterol beneficioso, que al ser absorbido por los macrófagos queda atrapado en las paredes arteriales contribuyendo a su endurecimiento y posible obstrucción; también se ha demostrado su nocivo papel en la aparición y desarrollo del cáncer.

Según Leighton y Urquiaga (1998), mencionado por ESTELO (2003), 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 sustratos combustibles se transforman en energía consumiendo oxígeno y liberando agua y dióxido de carbono. En el caso de la respiración, 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 adenocin trifosfato); sin embargo este proceso no es perfecto ya que se producen también otras moléculas contaminantes, las especies reactivas de oxígeno (EROS); entre el 1 y 3% del oxígeno que respiran nuestras células al oxidar sus sustratos 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.

Millones de radicales libres bombardean diariamente nuestras células, el hecho de que necesitan tantos años para causar daños mayores es un atributo a

la eficacia de las enzimas que produce nuestro propio organismo para neutralizarlos. El problema para nuestro sistema se produce cuando se tiene que tolerar de forma continuada un exceso de radicales libres; este exceso es producido mayormente por contaminantes externos que penetran en nuestro cuerpo. La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres. Este exceso no puede ser eliminado por el cuerpo, y en su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas de nuestras células, llegando fácilmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que desarrollen diversos tipos de enfermedades. La acción de los radicales libres esta ligada al cáncer así como al daño causado en las arterias por el colesterol "oxidado", lo que relaciona directamente estas moléculas con las enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras muy frecuentes actualmente (JUVER, s.d.).

El 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 de 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 o ionizante finkel y holbrook (2000), citado por ESTELO (2003).

En los cuadros 1 y 2, se muestran algunas especies de radicales libres, causantes de muchos daños al organismo.

2.3.2 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 las macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, es de consecuencia crítica para la célula y se asocia a numerosas patologías. VILLANUEVA (2003).

Según EL PUENTE (s. d.), los antioxidantes son las sustancias protectoras que neutralizan la acción de los radicales libres, los alimentos ricos en antioxidantes contribuyen a disminuir el riesgo de sufrir cardiopatías, cataratas y determinado tipo de cáncer. En general los antioxidantes son también útiles para prevenir cualquier de las enfermedades caracterizadas por la degeneración de tejidos, como Alzheimer, artritis, degeneración muscular o hepatitis.

Las defensas contra el daño producido en el organismo por los radicales libres, lo forman los antioxidantes, que son sustancias de diversos tipos que previenen o demoran el daño molecular; para lograrlo, los antioxidantes ceden un electrón a los radicales libres, con lo cual lo desactivan y extinguen el proceso.

Cuadro 1. Radicales libres derivados del oxígeno.

Radical	Nombre	Características
$^1\text{O}_2$	Oxígeno molecular	A pesar de su carácter radicalario, es estable y moderadamente agresivo (a*).
O_2^-	Anión superóxido	Otra variedad de oxígeno molecular que se forma a partir de O_2 normal por captura de un electrón (a*). Es muy reactivo en medio hidrófobo, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno (b).
HO^\cdot	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente a las proteínas, membranas celulares, ADN y lípidos (a*, b).
ROO^\cdot	Peroxilo	Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos como lípidos o por pérdida de un hidrógeno de hidroperóxidos orgánicos (a**).

(*) Radicales Primarios o Inorgánicos, (**) Radicales Secundarios u Orgánicos.

Fuente: Adaptado de VILLANUEVA, (2003).

Cuadro 2. Otras especies de radicales libres.

Radical	Nombre	Características
$\text{ONOO}\cdot$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico (a, b). se le ha relacionado directamente con la patología de varios desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (a).
$\text{H}\cdot$	Átomo de Hidrógeno	Es el radical libre más simple (b).
$\text{RS}\cdot$	Tiol	Nombre general para un grupo de radicales con un electrón desapareado ubicado en el sulfuro (b).
$\text{RO}\cdot$	Alcoxil	Radical ubicado en el oxígeno, formado durante el rompimiento de peróxidos orgánicos (b).
$\cdot\text{CCl}_3$	Triclorometil	Radical desapareado ubicado en el carbono; el CCl_3 se forma durante el metabolismo de CCl_4 y contribuye el efecto tóxico de este solvente (b).

Al hacer esto se consumen, ya que la estructura molecular del antioxidante sufre daño o modificación química transformándose los antioxidantes en radicales libres inactivos o flojos, ello tiene un costo mucho menor para el organismo que si esa modificación o daño la sufriera una molécula con función biológica.

Según BOVERIS (1998), las células fagocitarias juegan un papel básico en la defensa del organismo, ya que son las encargadas de la destrucción y eliminación de todo agente agresor. Durante la fagocitosis se produce una serie de alteraciones metabólicas y un aumento de consumo de oxígeno que conllevan a la producción y liberación de especies altamente reactivas derivadas del oxígeno, tales como, el radical superóxido, radical hidroxilo y otros agentes oxidantes. Estas especies radicalarias, aunque son las responsables directas de la acción bactericida de las células fagocitarias, van a dañar los tejidos próximos al lugar de la inflamación.

Un antioxidante es una sustancia que disminuye la generación de productos oxidados en un sistema de reacciones de radicales libres. En las dos últimas décadas la palabra oxidante ha adquirido un nuevo significado, es ese el caso biomédico, constituyéndose en la descripción de un tipo de medicamentos o de nutraceuticos, caracterizados por producir una disminución de la velocidad de las reacciones de radicales libres en el organismo humano.

Según GARCIA *et al.*, (1996), en la actualidad se están desarrollando estudios experimentales *in vitro e in vivo*, tanto en animales de experimentación y

epidemiológicos en humanos, para evaluar el efecto antioxidante y la acción biológica de los flavonoides.

2.3.3 Modelos *In Vitro*, para evaluar la actividad antioxidante

El estudio de radicales libres y antioxidantes en la biología, ha producido una revolución médica, que promete una nueva era en la salud y direccionamiento de enfermedades, la acción antioxidante *in Vitro* o en alimentos, pueden inhibir continuamente la generación de EROS (especies reactivas de oxígeno, cuadro 1), o por inhibición directa de radicales libres este puede ser realizado por diversos análisis *In Vitro* (Figura 1), que caracterizan la eficiencia de compuestos bioactivos en plantas y suplementos alimenticios (AUROMA, 2003).

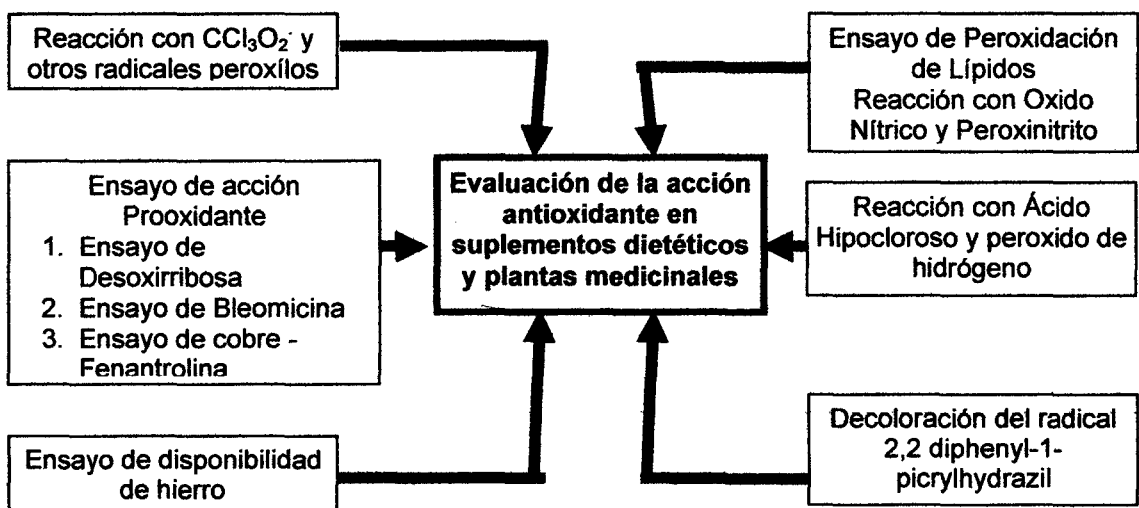


Figura 1. Técnicas para evaluar la actividad antioxidante en suplementos dietarios y plantas medicinales.

2.3.4 Radical 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

El radical DPPH, es un reactivo que se usa ampliamente para investigar la inhibición de radicales libres por los polifenoles (HIRAMATSU *et al.*,

2.4 Polifenoles

Son metabolitos secundarios de las plantas, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas de numerosas especies de plantas (Figura 3). Su función en las plantas es el de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción, y como agentes protectores frente al ataque de agentes patógenos, incluyendo bacterias, fungí y virus, así como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de éstas. En la actualidad, se ha encontrado más de 8,000 compuestos diferentes reportándose que los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (VILLANUEVA, 2003).

Entre los compuestos polifenólicos tenemos:

- Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos

Dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, creso timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, hidroxibenzoico y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Pero existe poca información científica sobre los ácidos fenil acéticos en los vegetales (BELITZ Y GROSCH, 1988).

- Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, por lo general está presente en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el

ácido químico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico. Las cumarinas e isocumarinas están en forma a partir de las antocianidinas ante incrementos de pH del medio (BELITZ Y GROSCH, 1988).

- **Flavonoides:** Flavonoides (quecetina, kaempferol y miricetina).

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos, siendo los más distribuidos en las plantas, son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos $C_6-C_3-C_6$: dos anillos bencenos unidos a través de un anillo pirona y pirán heterocíclico, esta estructura presenta una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonales, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides, catequizas, calconas, dihidrocalconas, etc. (HERTOG *et al.*, 1993).

2.4.1 Interés de los polifenoles

VILLANUEVA (2004) menciona los siguientes intereses:

2.4.1.1 Interés tecnológico

Los polifenoles intervienen en las características organolépticas de las frutas y verduras, durante el procesamiento, tanto en el color como en el sabor.

a) Contribución al color. Los polifenoles son responsables del color natural de muchas frutas y verduras, entre los que destacan, las

antocianinas, que son responsables de los colores rojo, azul, violeta entre otros, estas moléculas son sensibles al cambio de temperatura y pH.

b) Contribución al sabor amargo. Las flavononas, están asociadas con el sabor amargo en los cítricos, entre ellos tenemos a la naringina, en la naranja tenemos a la neohesperidina y en la cerveza tenemos al ácido clorogénico.

c) Contribución al sabor astringente. Los taninos, constituyen la fracción fenólica responsable de las características astringentes en ciertas frutas y verduras, estos presentan buena capacidad para precipitar proteínas. Cuando mayor sea el peso molecular que presentan los taninos, mayor será la eficiencia de precipitación de proteínas.

d) Contribución al pardeamiento. La presencia de pigmentos oscuros durante la manipulación y procesado de frutas y verduras, está influenciada por niveles de polifenoles, la presencia de oxígeno y la actividad de la polifenoloxidasas.

2.4.1.2 Interés nutricional.

a) Interés sobre los macronutrientes y la biodisponibilidad de minerales.

La presencia de algunos tipos de flavonoides, ayuda a la absorción de minerales al torrente sanguíneo, tales como el hierro, sin embargo un exceso en el consumo de taninos, llegan a comportarse como antinutrientes, formando complejos con las proteínas, causando una disminución en la absorción en el intestino.

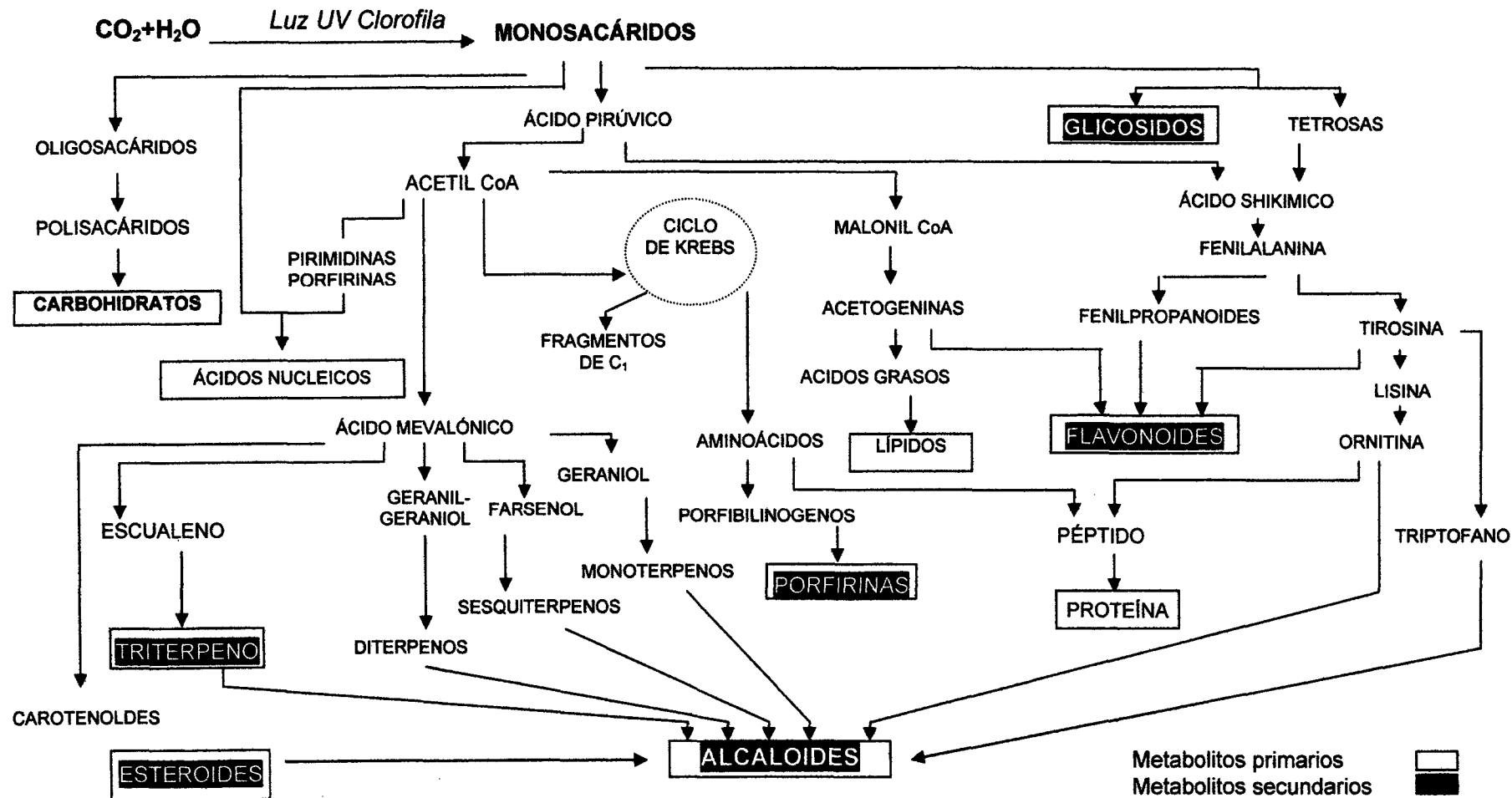


Figura 3. Metabolismo general de los productos naturales.

b) Interés en la Actividad Antioxidante (AA) y su relación con diversas patologías.

La actividad antioxidantes de compuestos fenólicos, está relacionado con la capacidad de:

- Inhibir Radicales Libres,
- Quelar metales pesados,
- Prevención y disminución de enfermedades cardiovasculares, cáncer, alzheimer, diabetes, parkinson, etc.
- Efectos farmacológicos como antiinflamatorio, bactericida, antialérgico, estimuladores de la respuesta inmune, antivirales, efectos estrogénicos, inhibidores de la COX₂.
- Reducen el desarrollo de tumores internos.
- Protegen al DNA.

2.4.2 Mecanismos de acción de los polifenoles.

Según SALUD (2001), los polifenoles actúan como antioxidante por diferentes mecanismos:

- Como antioxidantes propiamente tales, actuando como atrapadores de radicales libres.
- En forma indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición.
- Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre la partícula de Low Density Lipoprotein (LDL).
- Por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo.

2.4.3 Los polifenoles como antioxidantes.

SALUD (2001), menciona que los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las LDL del daño oxidativo, y su acción como antioxidante esta relacionada no sólo con su estructura química sino que también con su localización en la partícula. Cada polifenol actúa por uno o más de los mecanismos de acción; al actuar como antioxidantes, los polifenoles protegen de enfermedades crónicas que hoy son la preocupación de la salud pública mundial.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), en Tingo Maria, ubicado a 665 msnm, a 09° 17' 08" de latitud sur, a 75° 59' 52" de longitud oeste, con una temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 83.5% respectivamente, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco.

3.2 Recurso vegetal

El material vegetal fue las hojas, la corteza, el ritidoma y la raíz, de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. "capirona". Las muestras fueron recolectadas del frontis del complejo deportivo y de las plantaciones de "capirona" del módulo de la Facultad de Recursos Naturales Renovables – UNAS.

3.3 Materiales

3.3.1 Materiales de laboratorio

- Matracas erlenmeyer de 20 mL.
- Vasos de precipitación de 50 y 100 mL.

- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Micropipetas de 5, 20 – 200, 100 – 1000 μ L.
- Cubetas de poliestireno de 1000 μ L (1 cm x 1 cm x 4.5 cm).
- Fiolas de 25 mL.
- Crisoles de porcelana.
- Papel filtro número 40.
- Gradilla.
- Embudo de vidrio.
- Tubos de ensayos.

3.3.2 Equipos

- Balanza analítica de Ohaus Suiza Modelo AP - 2105.
- Refrigeradora, USA – modelo SM – 16 Copr. friolux.
- Termostato de labor _ MIN.
- Espectrofotómetro de absorción molecular de Termo Spectronic (génesis 8) NC 335801_000, No 568_100405, con interfase a una PC Estados Unidos, Made in England.
- Agitador magnético.
- Estufa (Labor Müzeripari Muvek Esztergom) model 334 - UNAS.
- Molino de cuchillas (Marca: Laboratory Hill – Modelo: 04).

3.3.3 Reactivos

- 2,2 diphenyl-1 -picrilhidrazyl (DDPH) radical libre al 90%.
- Methanol (CH₃OH) al 95%, para análisis (P. A.)
- Acido clorhídrico. (HCl) al 35% P.A.

- Acido gálico ($C_7H_6O_5 \cdot H_2O$) al 75% P.A..
- Cloruro de fierro ($FeCl_3$) al 99% P.A..
- Ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) al 98% P.A.
- Acetona ($(CH_3)_2CO$) al 99.5% P.A.

3.4 Métodos de análisis

3.4.1 Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó mediante el método reportado por PRICE Y BUTLLER (1977), tal como se detalla en la Figura 4.

3.4.2 Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se utilizó el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH), el método descrito por BRAND –WILLIAMS (1995), tal como se detalla en la Figura 5.

3.5 Metodología experimental

3.5.1 Preparación de muestras

Las muestras fueron recolectadas del campus universitario de la Universidad Nacional Agraria de la Selva – Centro experimental de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, a diferentes horas (07:00 a.m., 12:00 m. y 05:00 p.m.), luego fueron secadas en una estufa a 45 ± 50 °C, por 24 horas, posteriormente fueron molidas y almacenadas a temperatura ambiente hasta sus respectivos análisis (Figura 4).

3.5.2 Determinación de Polifenoles totales

La determinación de los polifenoles totales se realizó por el método descrito por PRICE y BUTLLER (1977) (Figura 4). Se pesó 1 g, de muestra seca (hoja, corteza, ritidoma y raíz), y se extrajo una muestra de 20 ml de acetona/agua (70/30), en agitación por 20 minutos, y otra muestra con agua a 45C°, se filtró un volumen de 50 µL, se hizo reaccionar con 3 ml de solución A (FeCl₃ 0.1M en HCL 0.1 N), luego se adicionó 3 ml de solución B (K₃Fe(CN)₆ 0.008M). La Absorbancia se registró a 720 nm. Los resultados fueron expresados en términos de AGE (ácido gálico equivalente)/g de muestra seca.

3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante DPPH de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. (hoja, corteza, ritidoma y raíz)

a) Porcentaje de Inhibición

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se utilizó el método descrito por BRAND-WILLIAMS (1995) (Figura 5). Se hizo reaccionar 50 uL de extracto con 950 uL de 1mM de DPPH al 90% en methanol de 95 %. Se monitoreo la absorbancia de la reacción a 517 nm durante 10 minutos a intervalos de 1 minuto. Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [(Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}) / Abs_{\text{inicial}}] \times 100 \text{ ----- (4)}$$

b) Parámetro de cinética de Inhibición (IC_{50}).

Para la obtención del parámetro IC_{50} , fueron planteado las concentraciones Vs. los porcentajes de inhibición (BRAND-WILLIAMS, 1995).

3.5.4 Etapas de la metodología experimental.

Las etapas para la realización del trabajo de investigación fueron:

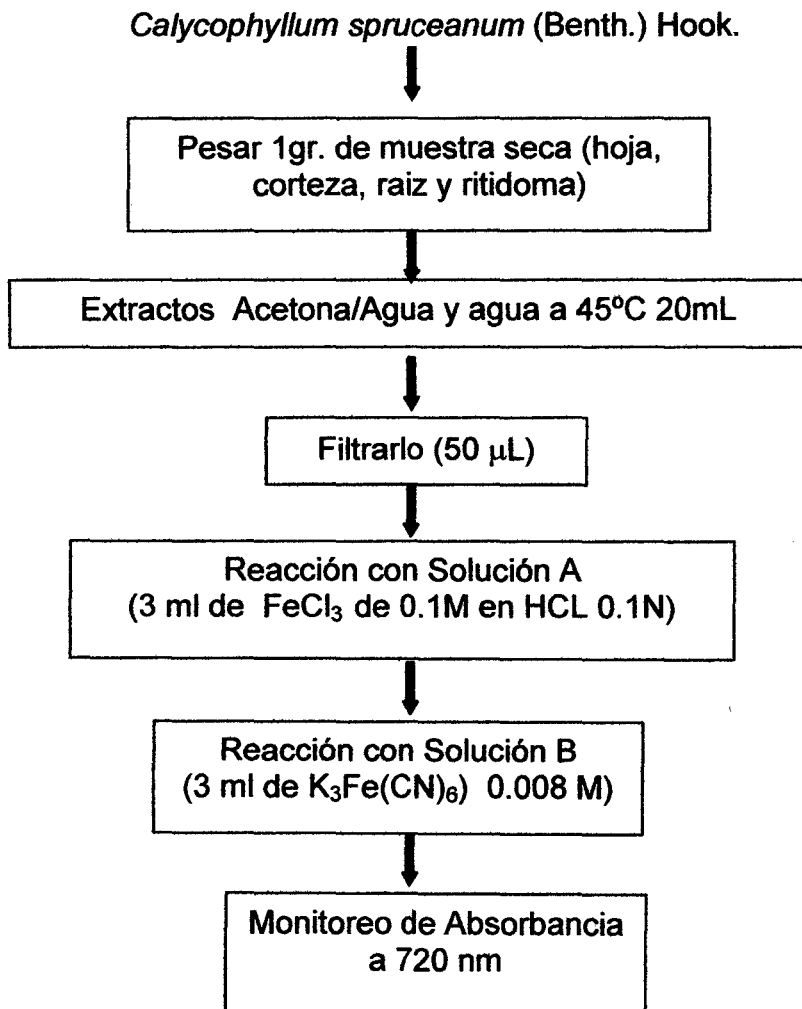
3.5.4.1 Determinación de Polifenoles totales.

Figura 4. Diseño experimental para la determinación de los polifenoles totales presentes en *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook.

3.5.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante DPPH de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. (hoja, corteza, ritidoma y raíz).

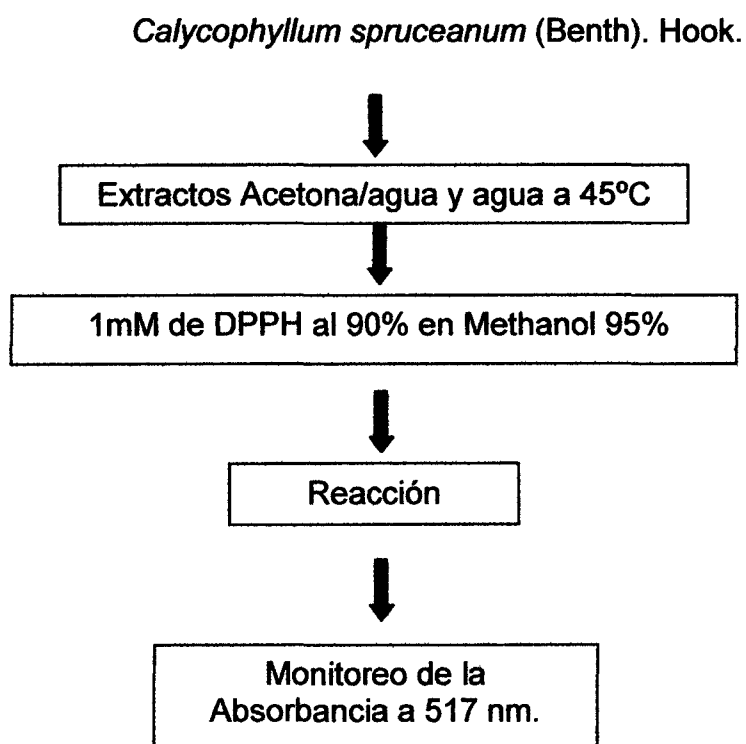


Figura 5. Diseño experimental para la determinación de los parámetros de inhibición de DPPH presentes en *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Curva estandar, para la cuantificación de polifenoles totales.

Se realizó, mediante la metodología descrita por PRICE Y BUTLLER (1977). Para lo cual se utilizó ARLn (Análisis de Regresión Lineal), con un modelo aditivo lineal simple, con tres repeticiones.

$$Y = a + bx \text{ ----- (5)}$$

3.6.2 Determinación de la actividad antioxidante (IC₅₀).

La evaluación de la actividad antioxidativa en términos de IC₅₀, de los extractos acuosos y de agua/acetona, recolectados a diferentes horas (07:00 a.m., 12:00 m. y 05:00 p.m.), frente al radical DPPH (2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl), con tres repeticiones, con un diseño Bloque Completo al Azar (DBCA), fueron sometidos a un ANVA, para establecer la diferencia estadística, de acuerdo a la metodología reportado por CALZADA (1976), mostrada en el diseño de la Figura 6.

Tiempo de recolección de las muestras:

A = 07:00 a.m.

B = 12:00 m.

C = 05:00 p. m.

Se efectuó un ANVA, un diseño bloque completo al azar:

$$Y_{ij} = U + T_i + B_j + E_{ij} \text{ ----- (6)}$$

Luego se realizó la prueba de Tukey.

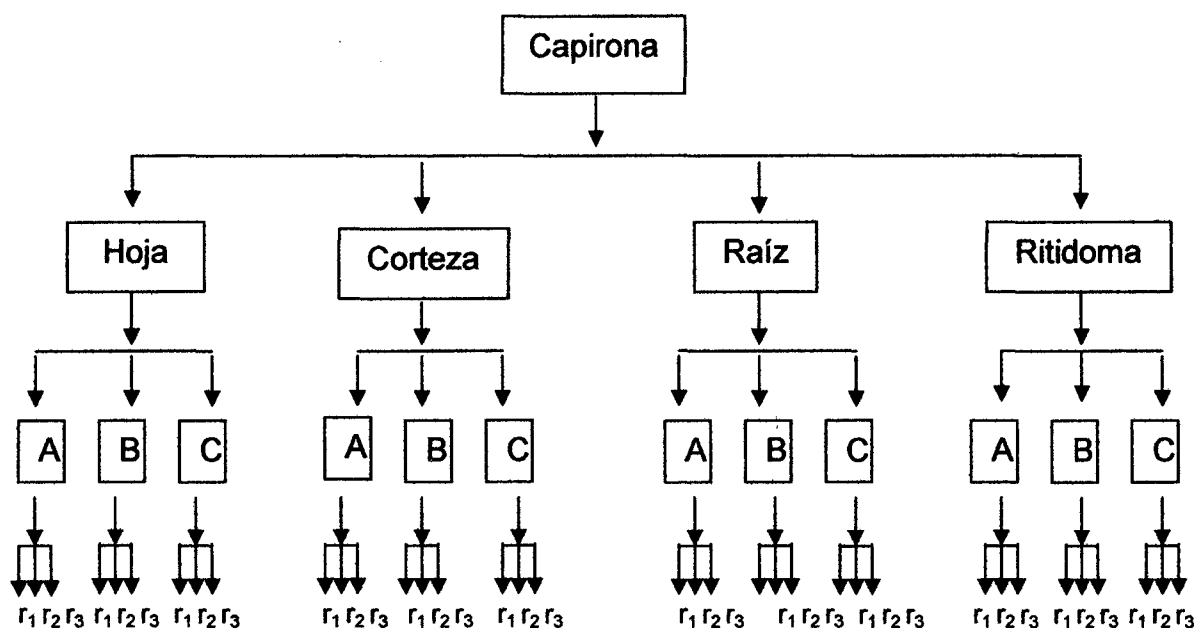


Figura 6. Diseño experimental para determinar el efecto del tiempo de recolección sobre los polifenoles y la capacidad antioxidante.

Donde: A: 07:00 a.m.

B: 12:00 m.

C: 05:00p.m.

IV. RESULTADOS

4.1 Cuantificación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles, varía ampliamente en las diversas partes de la planta evaluada, observándose una diferencia significativa entre las muestras evaluadas de la hoja, corteza, raíz y ritidoma (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Contenido de polifenoles totales en las muestras secas de hoja, corteza, raíz y ritidoma de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., recolectada a diferentes horas del día, extraídos con solvente acetona/agua (70/30), durante 20 minutos en agitación.

POLIFENOLES TOTALES				
Horas de recolección	Hoja ^{1A}	Corteza ^{1B}	Raíz ^{1C}	Ritidoma ^{1D}
7:00 a.m.	2,0814±0,2816	0,6567±0,0533	0,3071±0,0097	0,4550±0,0891
12:00 m.	1,0205±0,1221	1,6775±0,2953	0,3361±0,0692	0,3813±0,0319
5:00 p.m.	1,2853±0,0933	0,8415±0,0545	0,3166±0,0229	0,5077±0,0366

¹Los valores representan el promedio ± SD, n=3. Las letras A,B,C,D, representan diferencia estadística entre bloques. Evaluado mediante DBCA, prueba de Tukey (p < 0,05).

Cuadro 4. Contenido de polifenoles totales en las muestras secas de hoja, corteza, raíz y ritidoma de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., recolectada a diferentes horas del día, extraídos con agua a 45°C.

POLIFENOLES TOTALES				
Horas de recolección	Hoja^{1A}	Corteza^{1B}	Raíz^{1C}	Ritidoma^{1C}
7:00 a.m.	0,3185±0,0176	0,2730±0,0057	0,0772±0,0071	0,0347±0,0018
12:00 m.	0,2548±0,0180	0,0800±0,0114	0,0440±0,0046	0,0365±0,0016
5:00 p.m.	0,3143±0,0071	0,2850±0,0108	0,0657±0,0021	0,0375±0,0057

¹Los valores representan el promedio ± SD, n=3. Las letras A,B,C, representan diferencia estadística entre bloques. Evaluado mediante DBCA, prueba de Tukey (p < 0,05).

4.2 Actividad antioxidante de *C. spruceanum* (Benth.) Hook.

4.2.1 Porcentaje de Inhibición

Respecto al porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., recolectados a las 07:00 a.m., 12:00 m. y 05:00 p.m., se observa que las concentraciones de los extractos acetona/agua, están en el rango de 100 µg/mL a 600 µg/mL, mientras que el extracto acuoso varia de 100 µg/mL hasta 5000 µg/mL. Así mismo, la inhibición es dependiente de la concentración, debido a que los diferentes extractos presentan diferencia en su porcentaje de inhibición. Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno son moléculas señaladoras activas a bajas concentraciones (Figura 7). De acuerdo a este parámetro, bajos los valores de IC₅₀, reflejan una alta eficiencia para inhibir radicales libres (DE ANCOS *et al*; 2000; LEBEAU *et al*; 2000).

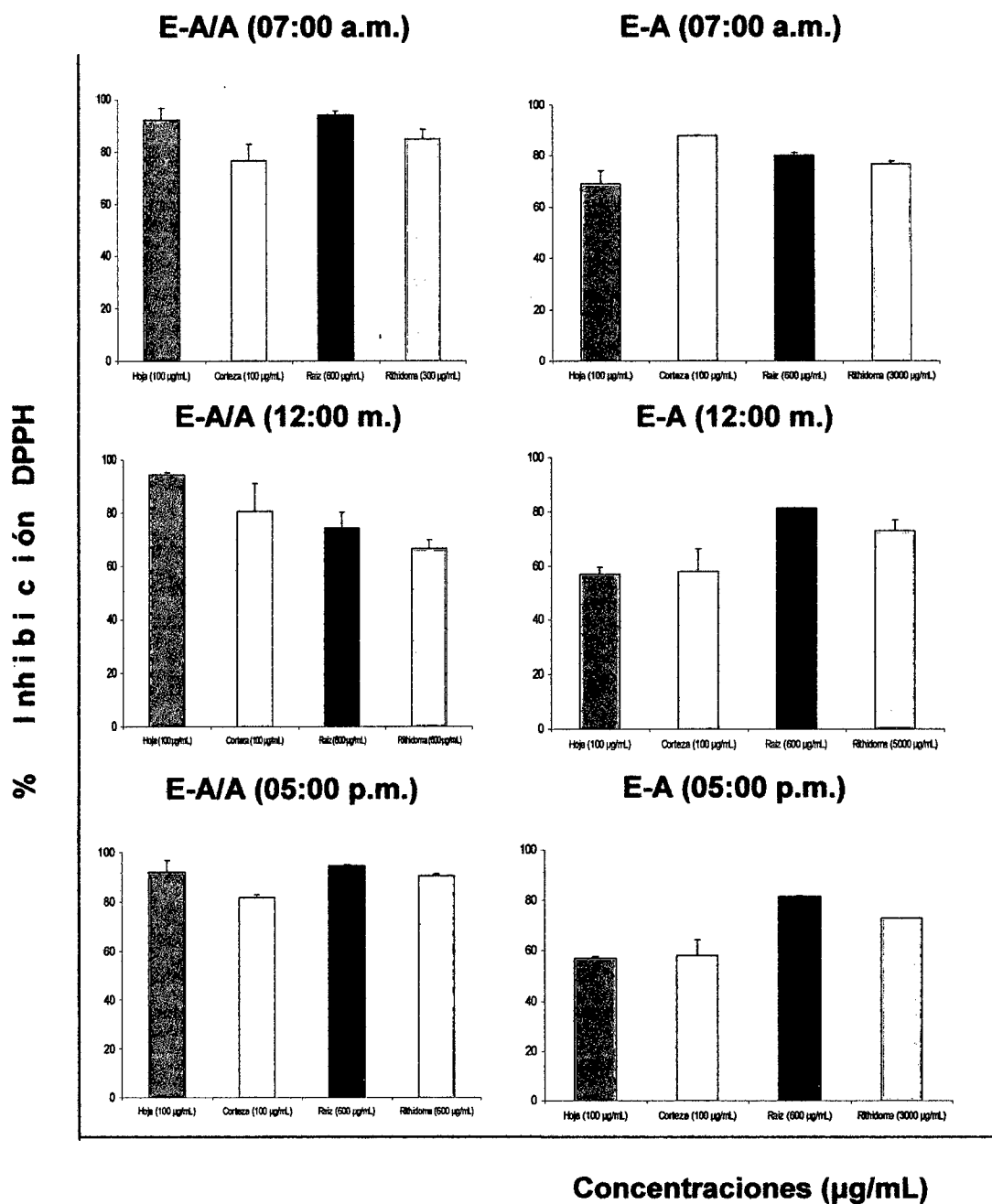


Figura 7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH, por los diferentes extractos de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., obtenidos a 07:00 a.m., 12:00 m. y 05:00 p.m. E – A/A (Extracto Acetona/agua, E – A (Extracto Acuoso).

4.2.2 Coeficiente de Inhibición IC₅₀

Para comparar la eficiencia de inhibir al radical DPPH, se determinó el IC₅₀ para cada una de las horas de recolección, observándose una diferencia significativa entre las muestras evaluadas de la hoja, corteza, raíz y ritidoma (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Coeficiente de inhibición IC₅₀, de las muestras secas de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., extraídos con acetona/agua (70/30), durante 20 minutos en agitación.

Horas de colección	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Hoja ^{1A}	Corteza ^{1A}	Raíz ^{1B}	Ritidoma ^{1B}
07:00 a.m.	48,378±5,291	60,728±6,117	125,857±2,648	95,858±18,232
12:00 m.	50,12±2,681	47,028±10,848	170,291±20,133	395,918±28,811
05:00 p.m.	37,148±5,565	46,476±1,412	122,214±8,161	76,522±2,062

¹Los valores representan el promedio ± SD, n=3. Las letras A,B, representan diferencia estadística entre bloques. Evaluado mediante DBCA, prueba de Tukey (p < 0,05).

Cuadro 6. Coeficiente de inhibición IC₅₀, de las muestras secas de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., extraídos con agua a 45°C, durante 20 minutos en agitación.

Horas de colección	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Hoja ^{1A}	Corteza ^{1A}	Raíz ^{1B}	Ritidoma ^{1C}
07:00 a.m.	69,118±5,851	52,352±2,689	103,441±0,473	622,701±13,386
12:00 m.	85,208±3,856	86,531±11,879	82,415±3,984	3214,783±262,221
05:00 p.m.	74,247±0,527	56,956±4,215	237,918±18,101	280,783±89,506

¹Los valores representan el promedio ± SD, n=3. Las letras A,B,C, representan diferencia estadística entre bloques. Evaluado mediante DBCA, prueba de Tukey (p < 0,05).

V. DISCUSION

Con el avance de la ciencia y tecnología, el mundo se enfrenta a enormes desafíos; ante el reto de superar nuestras grandes dificultades, una fuente de esperanza – y quizás una de las principales – es la posibilidad, de que la exuberancia de la fauna y la flora finalmente se consoliden como factor que contribuya al desarrollo humano que tanto anhelamos. El Perú es un país mega diverso con una flora de 17,118 especies (BRAKO, 1993), de las cuales, 4,400 plantas nativas se usan para 48 fines distintos (BRACK y MENDIOLA, 2000); así mismo, los bosques amazónicos presentan una flora impresionante y compleja, compuesta por alrededor de 80,000 especies vegetales, las que han sido por siglos fuentes de alimento, medicina, vestido, leña y otros para las comunidades nativas; siendo entre ellas la *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., planta conocida como “capirona”.

5.1 Cuantificación de polifenoles totales

La presencia de polifenoles es una característica de todos los tejidos vegetales y según AZCON - BIETO y TALON (2000), se conocen más de 8000 polifenoles. Así mismo, la actividad benéfica o medicinal de extractos vegetales, esta atribuida al contenido de polifenoles (DORNENBURG y KNORR, 1977; PIETTA *et al.*, 1998 y VALENTAO *et al.*, 2002).

El contenido de polifenoles, obtenidos en *C. spruceanum* (Benth.) Hook, varía según las diferentes partes de la planta evaluada (hoja, corteza, raíz y ritidoma), (Cuadro 3). La muestra de hoja presentó mayor contenido de polifenoles, recolectada a las 07:00 a.m. y extraído con solvente acetona/agua (70/30), obteniendo el valor de $2,0814 \pm 0,2816$ mg AGE/g, existiendo diferencia estadística ($p < 0,05$) y el que tuvo menor contenido fue la muestra de raíz recolectada a las 07: 00 a.m. con valores de $0,3071 \pm 0,0097$ mg AGE/g.

Los rangos de contenido de polifenoles en la extracción con agua a 45°C, según los resultados obtenidos, presentó mayor contenido de polifenoles la muestra de hoja; no existiendo diferencia estadística entre las horas de recolección de 07:00 a.m. con 0.3185 ± 0.0176 mg AGE/g y de las 05:00 p.m. con 0.3143 ± 0.0071 mg AGE/g ($p < 0,05$). En esta extracción, la muestra que presentó el menor valor de contenido de polifenoles es la muestra correspondiente al ritidoma, con $0,0347 \pm 0.0018$ mg AGE/g (Cuadro 4).

La diferencia del contenido de polifenoles, realizado por las dos formas de extracción (acetona/agua y agua a 45°C), esta influenciado por las propiedades fisicoquímicas de las diferentes estructuras, la polaridad del solvente usado (agua/acetona) y el tiempo de extracción (GEANKUPLIS, 1982; SINGH Y HELDMAN, 1998 Y TROMELIN, 2003). Además, la hora de recolección está influenciada por la vida media de los metabolitos, la cual es variable; en algunos es de días y en otras de tan sólo horas. Este hecho es la causa de las fluctuaciones que se observa en su concentración a lo largo del día (AZCON – BIETO y TALON, 2000).

Así mismo, ESTRELLA (2002), determinó el contenido de polifenoles en *Aloysia triphylla* “cedrón” que obtuvo $2,44 \pm 0,05$ mg AGE/g peso fresco y ESTELO (2003), determinó el contenido de polifenoles en dos especies de “chanca piedra”, obteniendo para *Phyllanthus urinaria* de $7,32 \pm 0,05$ mg AGE/g y *P. niruri* de $3,010 \pm 0,05$ mg AGE/g muestra seca. Con estos resultados y haciendo las comparaciones con el contenido de polifenoles de *C. spruceanum* (Benth.) Hook., realizado por las dos formas de extracción (acetona/agua con $2,0814 \pm 0,2816$ mg AGE/g y agua a 45°C con 0.3185 ± 0.0176 mg AGE/g), podemos manifestar que *C. spruceanum* (Benth.) Hook., presenta menor contenido de polifenoles que las especies antes indicadas; sin embargo ésta no puede ser despreciable.

5.2 Actividad antioxidante de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook.

En las plantas se ha informado de la generación de radicales libres en situaciones de estrés y se les ha considerado implicadas en numerosas funciones fisiológicas y promueve una cadena de eventos caóticos que acelera el proceso de senescencia (REIGOSA y PEDROL, 2004). En seres humanos están implicadas en varias enfermedades que van desde la artritis reumatoide, hasta el shock hemorrágico y el sida. Los antioxidantes protegen a los tejidos de los efectos de los radicales libres. Debido a que a estos los convierten en moléculas menos dañinas antes que tengan la oportunidad de reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas (PRASAD, 2004).

La extracción acetona/agua de la muestra de hojas, recolectadas a la 05:00 p.m., presenta el valor más alto de absorbancia de IC_{50} $37,148 \pm 5,565$ μ g/mL, (Cuadro 5) y en la extracción acuosa, lo presentó la muestra de corteza,

recolectada a las 07:00 a.m., con un IC_{50} de $52,352 \pm 2,669 \mu\text{g/mL}$ (Cuadro 6). En ambos casos existe diferencia estadística entre las muestras estudiadas ($p < 0,05$).

PIETTA *et al.*, (1998) y VALENTAO *et al.*, (2002), atribuyeron a los polifenoles su acción antioxidativa y benéfica de los extractos vegetales. Los fenoles típicos que poseen actividad antioxidante, son conocidos mayormente por ser fenoles ácidos y flavonoides. Los más amplios y diversos polifenoles, son los flavonoides (ROBARDS *et al.*, 1999). De estos flavonoides, en muchas hierbas, los mayores constituyentes son Quercetin, Myricetin (LARSON, 1988), que presentan una alta actividad inhibitoria (KAHKONEN *et al.*, 1999).

La capacidad antioxidante, de los compuestos fenólicos, esta relacionada con la presencia de los grupos hidroxilos (OH) y a sus propiedades fisicoquímicas, (VAN ACKER *et al.*, 1996; COLLANTES *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2002; TROMELIN *et al.*, 2003).

Los altos valores de IC_{50} obtenidos mediante las dos formas de extracción (acetona/agua $IC_{50} = 37,148 \pm 5,565 \mu\text{g/mL}$; acuoso $IC_{50} = 52,352 \pm 2,669 \mu\text{g/mL}$), reflejan una buena capacidad antioxidativa que presenta este recurso. Estos valores son similares a los reportados, por VILLANUEVA (2003) en cáscara pintón seco de *Myrciaria dubia* "camu camu" $IC_{50} = 46,20 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$. Además, RAMOS (2002), reporta un $IC_{50} = 32,43 \pm 0,389 \mu\text{g/mL}$ en hoja de *Camellia sinensis* "té verde"; mientras que ESTELO (2003) reporta un $IC_{50} = 138,831$ y $1454,284 \mu\text{g/mL}$ en la "chanca piedra" (*Phyllanthus urinaria* y *P. niruri*) en las dos especies estudiadas.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación, realizado en *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook.; en muestras secas de hoja, corteza, raíz y ritidoma, recolectadas a las 07:00 a.m. 12:00 m. y 05:00 p.m., se concluye lo siguiente:

1. La muestra de hoja recolectada a las 07:00 a.m., presentó el mayor contenido de polifenoles, con $2,0814 \pm 0,2816$ mg AGE/g en extracto acetona/agua y $0,3185 \pm 0,0176$ mg AGE/g en el extracto de agua a 45°C.
2. La mayor capacidad antioxidativa, reflejada en términos de IC₅₀, lo presenta el extracto acetona/agua, de la muestra de hoja recolectada a las 05:00 p.m. con $37,148 \pm 5,565$ µg/mL, y en la extracción acuosa, la muestra de corteza recolectada a las 07:00 a.m. con $52,352 \pm 2,669$ µg/mL.
3. Los datos obtenidos, reflejan una buena cantidad de polifenoles totales en las hojas; así mismo, su buena capacidad antioxidante de las muestras de hoja y corteza, valores muy cercanos a los mostrados con trabajos similares realizados en *Camellia sinensis* "té verde" ($32,43 \pm 0,389$ µg/mL) y superior a los obtenidos en *Phyllanthus urinaria* "chanca piedra" con $138,831 \pm 0,018$ µg/mL.

4. Las muestras se trabajaron con acetona/agua, con la finalidad de tener un uso farmacéutico alternativo, y en el caso del extracto acuoso, para poder utilizarlo directamente en forma de infusión.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antioxidante de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., usando otros tipos de radicales, como son: Superóxilos, radical hidroxilo, peroxilo, taninos, etc.
2. Evaluar el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante, en las diferentes especies de Capironas.
3. Realizar estudios benéficos y sus efectos medicinales en *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook, para la salud humana y así poder contrarrestar enfermedades.
4. Continuar este tipo de trabajo en otras especies forestales propias de la zona.

VIII. ABSTRACT

The present trial was carried out in the Food Analysis laboratory of the Universidad Nacional Agraria de la Selva – Tingo Maria, Perú. The objectives were to evaluate total polyphenols by PRICE y BUTLLER (1977) method, in leaves, bark, root and ritidoma of “Capirona (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., in a mixture acetone/water (70/30) and in water to 45°C. Moreover, to evaluate the antioxidant ability using the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), by the method described by BRAND-WILLIAMS (1995).

The results of the evaluation in each experiment were analysed in a random complete block (RCB) design, with a Tukey test ($p < 0,05$). The extract from a recollected leaf sample to 07:00 a.m., it had the most polyphenols content with $2,0814 \pm 0,2816$ mg AGE/g of dry sample in acetone/water extraction and $0,3185 \pm 0,0176$ mg AGE/g of dry sample, with the water a 45°C extract, respectively.

The most antioxidant ability was detected in acetone/water extract, from recollected leaf sample to 05:00 p.m. with a $IC_{50} 37,148 \pm 5,565$ µg/mL, and in the water to 45°C extract, it was the sample of bark recollected to 07:00 a.m., with a $IC_{50} 37,148 \pm 5,565$ µg/mL., with respect to DPPH radical

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASERRADERO TUNG YING S.R.L. s.d.** Maderas Selectas Calidad y Servicio: Capirona. [En línea]: Hammer (<http://www.hammer.prohosting.com/-tungying/spcapi.htm>., 21 de oct. del 2004)
- AZCON – BIETO, M. Y M. TALON. 2000.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Mc. Graw Hill. Interamericana, S.A. 522 p.
- AUROMA, O. 2003.** Methodo Logical Considerations for Characterizing Potential Antioxidant Actions of Bioactive Components in Plant Foods. Mutation Research. 523 – 524: 9-20
- BLOIS, M. 1958.** Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical, Nature. 181 (4617): 1199 -1200.
- BOVERIS. 1998.** Radicales Libres. Conferencia en el IV Congreso Peruano de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Lima, Perú. 156 p.
- BRACK E., A. Y C. MENDIOLA. 2000.** Ecología del Perú. Ed. Bruño. Lima, Perú.
- BRAKO, L. Y L. ZARUCCHI. 1993.** Catálogo de Las Angiospermas Y Gimnospermas del Perú. Edit. Missouri Botanical Garden. Estados Unidos de Norteamérica.
- BRAND-WILLIAMS, 1995.** Use of a Free Radicals Method to Evaluate Antioxidant Activity. Academy Press Limited. 28: 25 – 30
- BELITZ Y GROSCH. 1988.** Química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

- CADESAM** s.d. Desarrollo Sostenible. [En línea]: Cadesam (http://www.cadesam.org/biofotos/foto_48.htm., 30 de nov. del 2004)
- CALZADA, B. 1976.** Métodos Estadísticos. Lima. 3 ed. 613 P.
- COLLANTES, E.; XING, L.; MILLER, P.; WELSH, W.; PROFETA, S. 1999.** Comparative Molecular Freeed Analysis as a Tool To Evaluate Mode of Action of Chemical Hybridization Agents. J. Agric. Food Chem. 47: 5245 – 5251.
- DAMIANICH ASTETE s.d.** Obtención de Polifenoles de Sustancias de Origen Natural. [En línea]: A.aqc. (http://www.aaqc.org.ar/cyt_polif.htm., 6 de oct. del 2004)
- DE ANCOS, B.; GONZALES, E.; CANO, P. 2000.** Ellagic Acid., Vitamin C and total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Free zing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. J. Agric. Food Chem. 48: 4565 – 4570.
- DORNENBURY, H.; KNORR, D. 1997.** Challenges and Opportunities for Metabolite Prodition from Plant cell and Tissue Cultures, Food technology. 51 (11):47 – 54.
- ECONEGOCIOS** s.d. Capirona. [En línea]: Peruecologico (http://www.peruecologico.com.pe/flora_medic_gal_17htm., 10 de oct. del 2004).
- EL PUENTE** s.d. Radicales Libres y Antioxidantes. [En línea]: Puente (<http://www.puente-e.com/Med/dietas/Radicales.html>., 12 de nov. del 2004).
- ESTELO, C. 2003.** Capacidad Antioxidante y Polifenoles Totales en dos Especies de Chanca Piedra (*Phyllanthus niruri. L* y *Phyllanthus urinaria. L*). Tesis Ing.

en Recursos Naturales Renovables. Tingo Maria, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 63 p.

ESTRELLA, E. 1995. Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas. Tratado de Cooperación Amazónica. 263 p.

ESTRELLA, C. 2002. Actividad Antioxidante del Extracto acuoso del Cedron (*Aloysia triphylla*) en diferentes modelos IN VITRO. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo Maria, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 53p.

GARCIA, J; GARCIA T. Y COLINA E. 1996. Efectos Antioxidantes de los Extractos Fluido de Flavonoides de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.(orégano francés). Revista Cubana.

GEANKUPLIS, CH. 1982. Proceso de Transporte y Operaciones Unitarias. Traducido del Inglés por Gómez Eroles Antonio, Ing. Químico PhD. Ed.I Continental. 757p.

HERTOG, M.; HOLLMAN, P. y VAN DI PUTTE, B. 1993. Content of Potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions. W ines a fruit juices. Journal Agric. And Food. Chemistry. Vol. 41: 1242-1246

HIRAMATSU, M.; YUSHIKAWA, T.; INUVE, M. 1997. Food and Fee Radical. Plenum Press. New and London. 165 p.

JUVER s. d. Nutrición. ¿Qué es un Antioxidante. [En línea]: Juver (<http://www.juver.com/nutricion/articulos/antioxid.htm>., 14 de oct. del 2004).

KAHKONEN, M.; HOPIA, A.; VUORELA, H.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant Actvity of Plant Extract Containing Phenolic Compounds J. Agric. Food Chem. 47: 3954 – 3962.

- LEBEAU, J.; FURMAN, C., BERNIER, J.; DURIE, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N. 2000.** Antioxidant Properties of Di-tert-Butylhydroxylated Flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 29(9): 900 – 912.
- LARSON, R. 1988.** The Antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27: 969 – 978.
- MOSTACERO, L. J , F. MEJIA C. y O. GAMARRA T. 2002.** Taxonomía de las Fanerógamas Peruanas. Concytec. Lima, Perú. 602 p.
- PARK, D-S.; JUSTIN, A.; COATS AND GRODNITZKY, R. 2002.** QSAR Evaluation of Cyahohydrins Fumigation Toxicity to House Fly (*Musca doméstica*) and Lesser. Grain Borer (*Rhyzopertha dominica*), *J. Agric. Food Chem.* 50: 5617 – 5620.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. 1998.** Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *J. Agric. Food Chem.* 46:4487 – 4490.
- PRASAD, M.N.V. 2004.** Radicales Libres (FR) y Especies Reactivas del Oxígeno (ROS). *In: La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis.* Ed. por M. Reigosa, N. Pedrol, A. Sánchez. Madrid, España, Thomson. P. 775-790.
- PRICE, M.L. y BUTLLER, L.G. 1977.** Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268 – 1273.
- RAMOS, E. F. 2002.** Diseño y Evaluación de la Capacidad Antioxidante In Vitro de una Bebida en base a té verde (*Camellia sinensis*) y hierva luisa (*Cymbopogon citratos*). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 121P.

- REIGOSA, M., PEDROL, N. 2004.** La Ecofisiología Vegetal. *In: La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis.* Ed. por M. Reigosa, N. Pedrol, A. Sánchez. Madrid, España, Thomson. P. 1-58.
- SALUD. 2001.** Mecanismo de Acción de los Polifenoles como Antioxidantes. [En línea]: Bio. (<http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/52mecanismos.htm>., 19 de oct. del 2004).
- SINGH, R.; HELDMAN, D.; 1998.** Introducción a la Ingeniería de Alimentos. Ed. Acribia, S.A. Impreso en España. 544p.
- TROMELIN, A.; GUICHARD, E. 2003.** Use of Catalyst in a 3D – QSAR study of the Interactions between Flavor Compounds and β – Lacto globulin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1977 – 1983.
- VALENTAO, P.; FERNANDESJ, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.; SEABRA, R.; BASTOS, M. 2002.** Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) Infusión Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4989 – 4993.
- VAN ACKER, S.; GROOT, M.; VAN den BERG, D.; TORMP, M.; DONNE – OP, G.; VAN den VIJGH, W.; BAST, A. 1996.** A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 1305 – 1312.
- VILLANUEVA, T. 2003.** Antocianinas, Ácido Ascórbico, Polifenoles totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camu Camu (*Myrciaria dubia* *McVaugh H.B.K.*). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo Maria, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Total de páginas.
- VILLANUEVA, T. 2004.** Curso: Técnicas de Investigación para Determinar la Actividad Antioxidativa de los Alimentos y Plantas Medicinales de la

Amazonía. COINIA (Conferencias para la Investigación y Desarrollo de la Industria Alimentaria). FIA, Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria, Perú.

YILDIRIM, A.; MALVA, A.; KARA, A. 2001. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Rumex crispus* L. Extracts. *Agric. Food Chem.* 49: 4083 – 4089.

X. ANEXOS



ANEXO I

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: POLIFENOLES

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2.61613317	0.52322663	2.69	0.1301
Error	6	1.16705450	0.19450908		
Corrected Total	11	3.78318767			

R-Square	C.V.	Root MSE	PESO Mean
0.691516	53.64263	0.44103184	0.82216667

Source	DF	ANOVA SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	2.57247300	0.85749100	4.41	0.0581
HORA	2	0.04366017	0.02183008	0.11	0.895

Cuadro 7. ANVA de los Polifenoles Totales de Acetona/Agua.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: POLIFENOLES

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.15156142	0.03031228	11.55	0.0049
Error	6	0.01574883	0.00262481		
Corrected Total	11	0.16731025			

R-Square	C.V.	Root MSE	PESO Mean
0.905870	33.76135	0.05123286	0.15175000

Source	DF	ANOVA SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	0.13773692	0.04591231	17.49	0.0023
HORA	2	0.01382450	0.00691225	2.63	0.1510

Cuadro 8. ANVA de los Polifenoles Totales de Agua a 45°C.

ANEXO II

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PESO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	4.08174150	0.81634830	4.51	0.0471
Error	6	1.08553617	0.18092269		
Corrected Total	11	5.16727767			
	R-Square	C.V.	Root MSE	PESO Mean	
	0.789921	9.633840	0.4253501	4.4151667	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	3.42684633	1.14228211	6.31	0.0276
HORA	2	0.65489517	0.32744758	1.81	0.2426

Cuadro 9. ANVA IC₅₀ de Acetona/Agua.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PESO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	12.86279150	2.57255830	4.76	0.0419
Error	6	3.23974217	0.53995703		
Corrected Total	11	16.10253367			
	R-Square	C.V.	Root MSE	PESO Mean	
	0.798805	14.65288	0.7348177	5.0148333	

Source	DF	ANOVA SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	12.16704633	4.05568211	7.51	0.0187
HORA	2	0.69574517	0.34787258	0.64	0.5579

Cuadro 10. ANVA IC₅₀ de Agua a 45°C.

ANEXO III

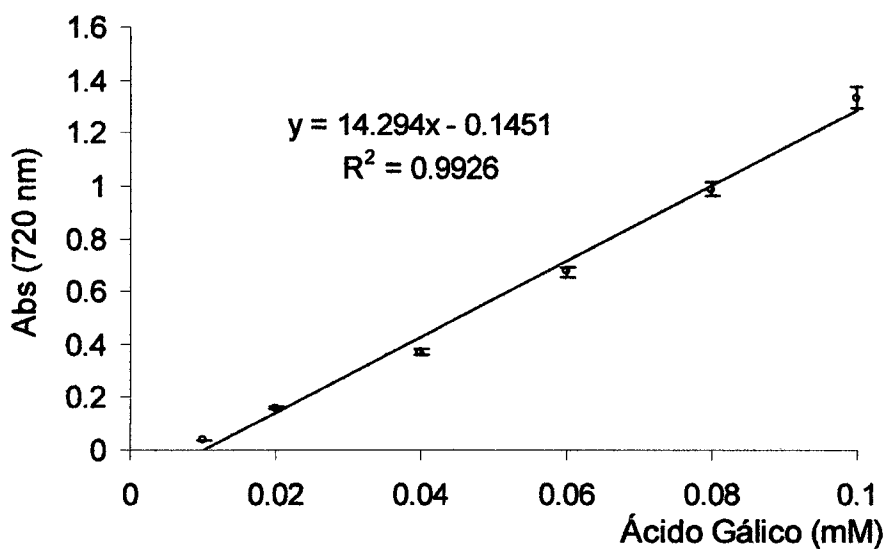


Figura 8. Curva padrão general de ácido gálico em acetona/água.

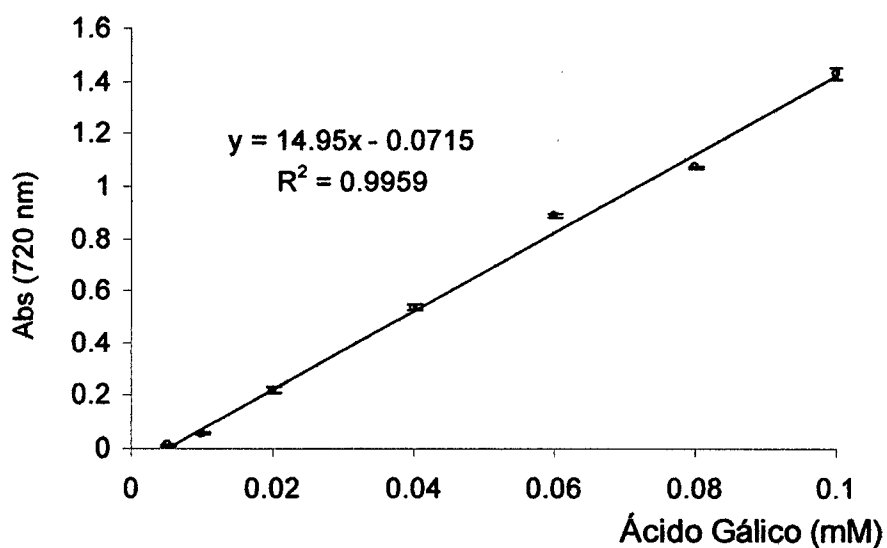


Figura 9. Curva padrão general de ácido gálico em água a 45°C.

ANEXO IV

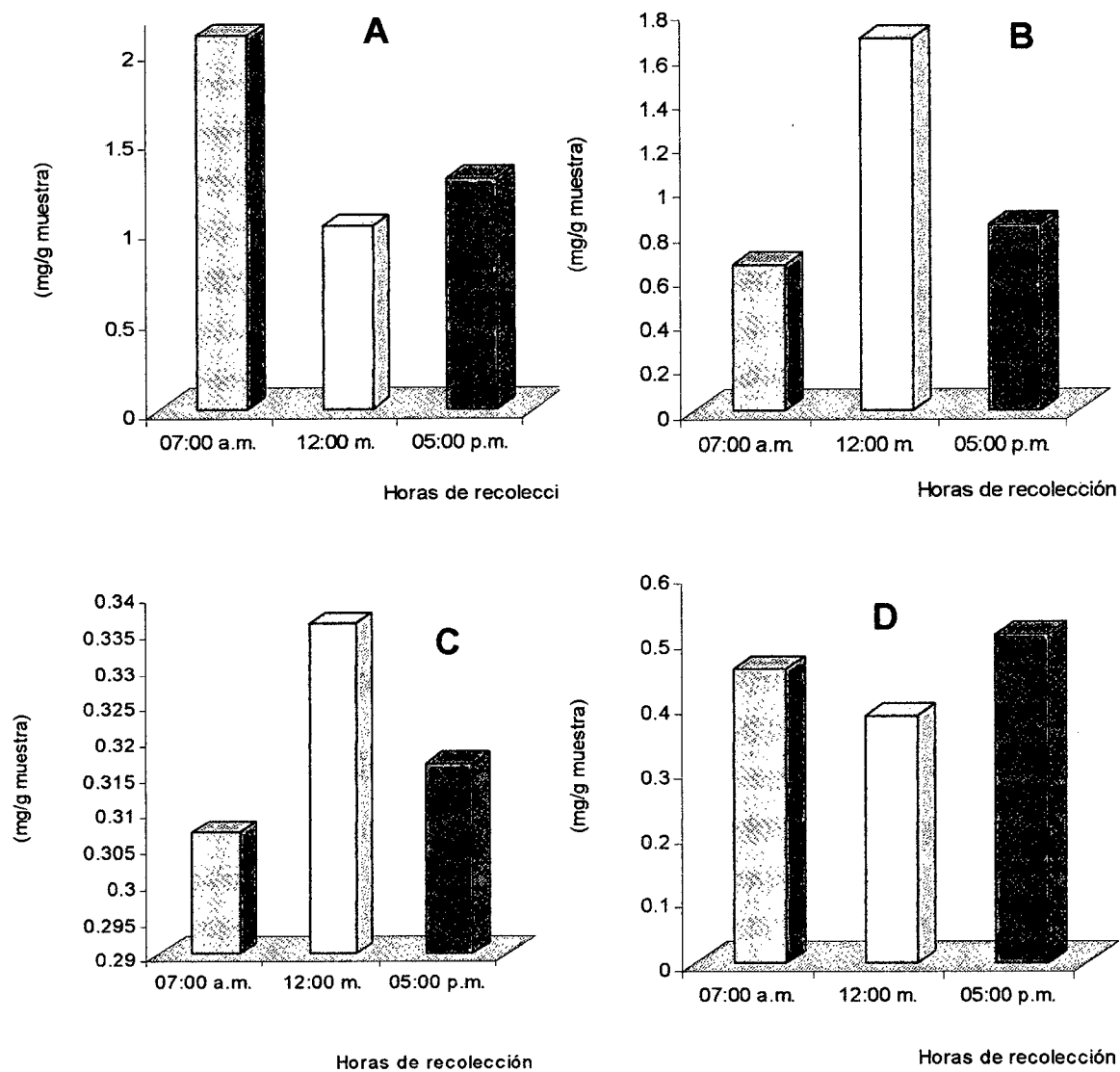


Figura 10. Curvas del contenido de polifenoles de los extractos acetona /agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); en las tres horas de recolección.

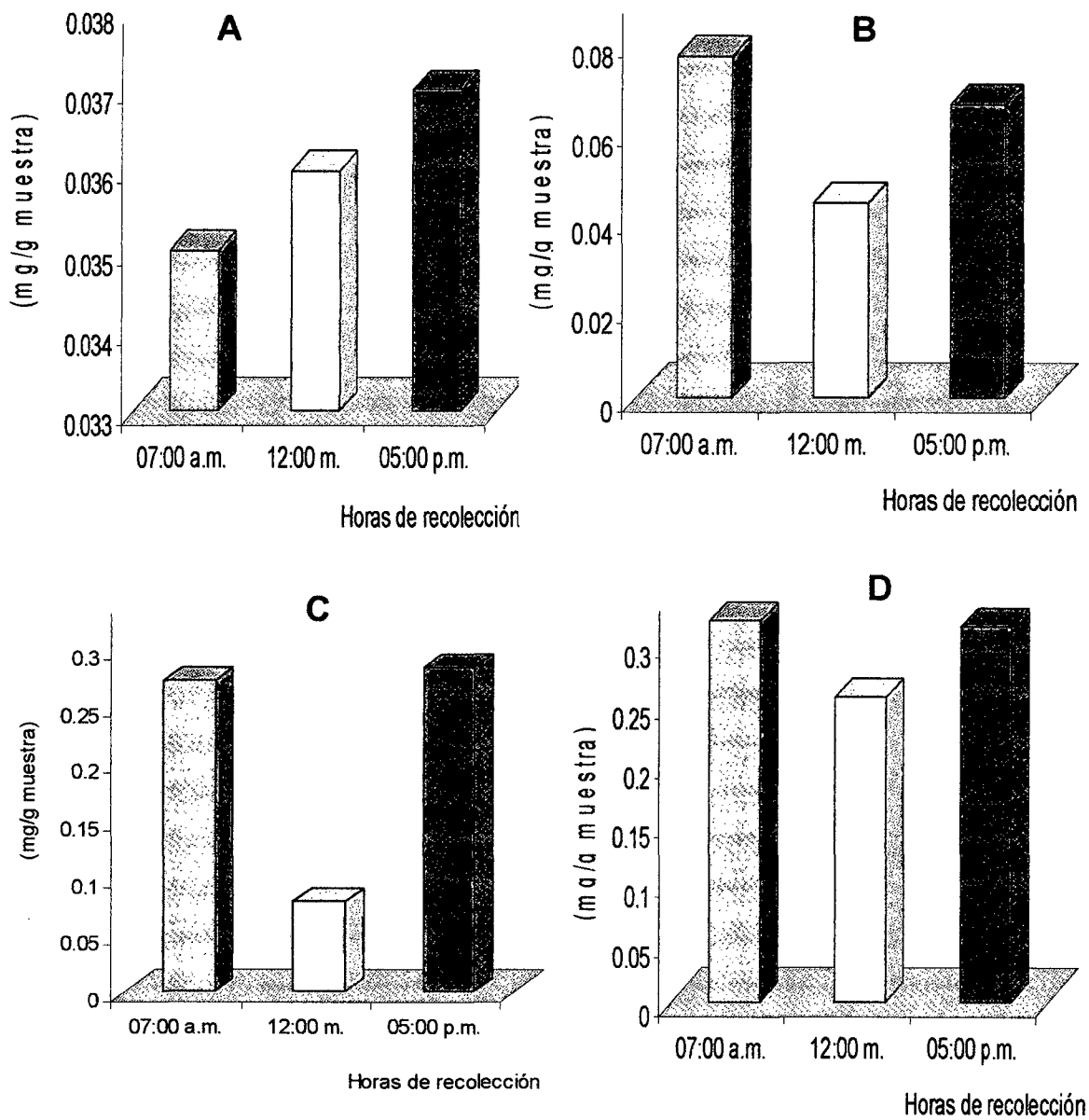


Figura 11. Curvas del contenido de polifenoles de los extractos de agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); en las tres horas de recolección.

ANEXO V

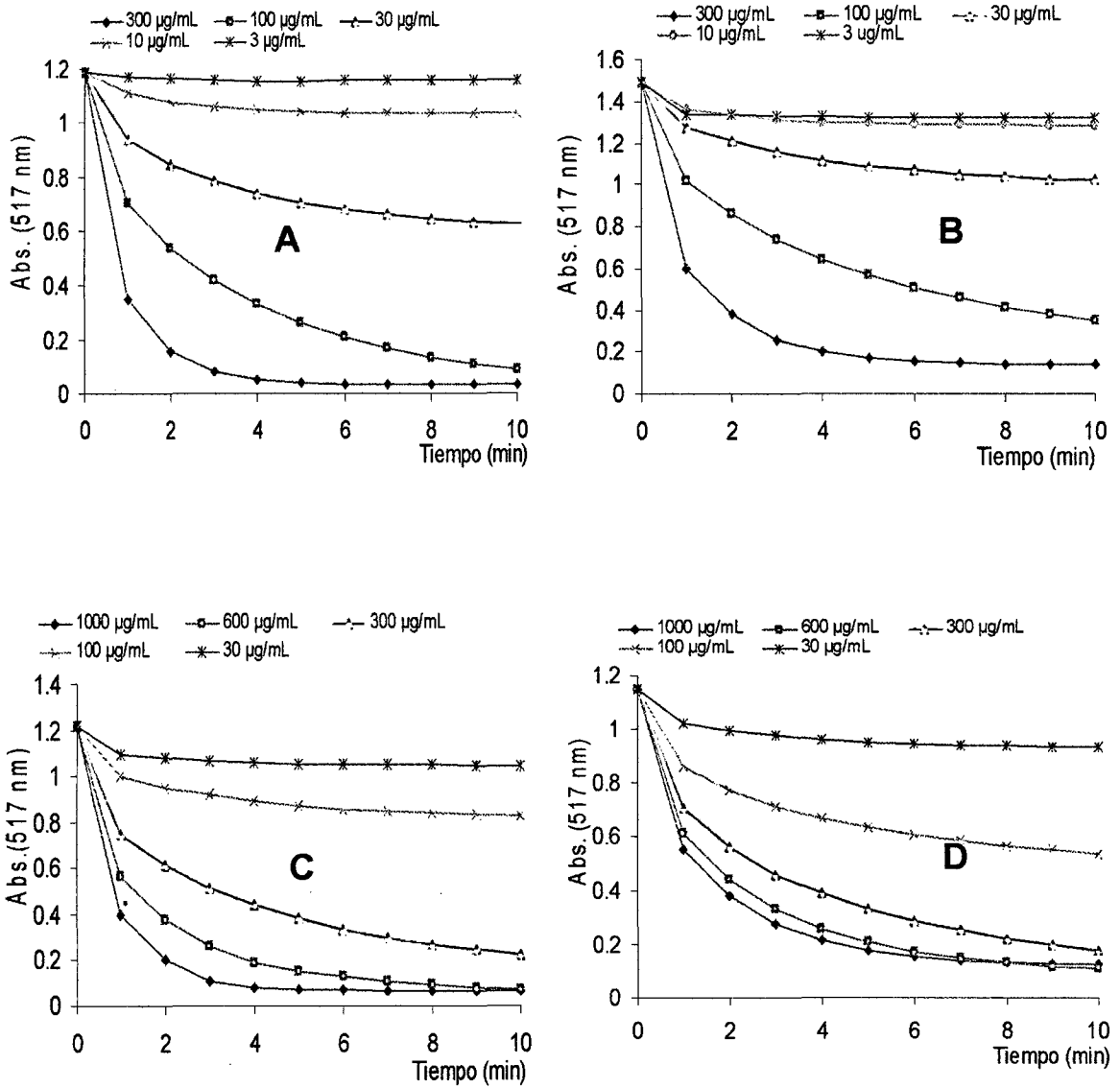


Figura 12. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 07:00 a.m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.

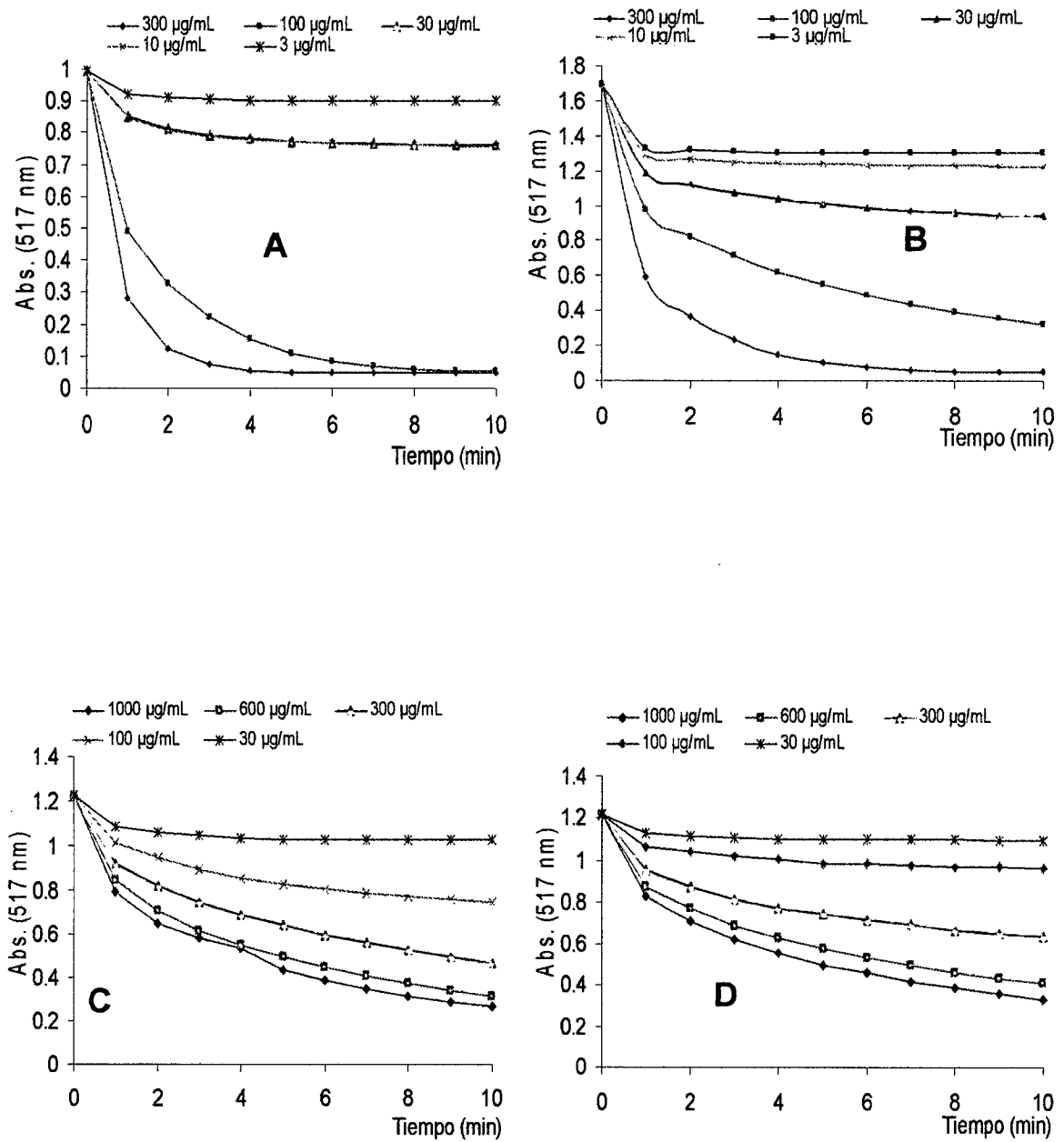


Figura 13. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 12:00 m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.

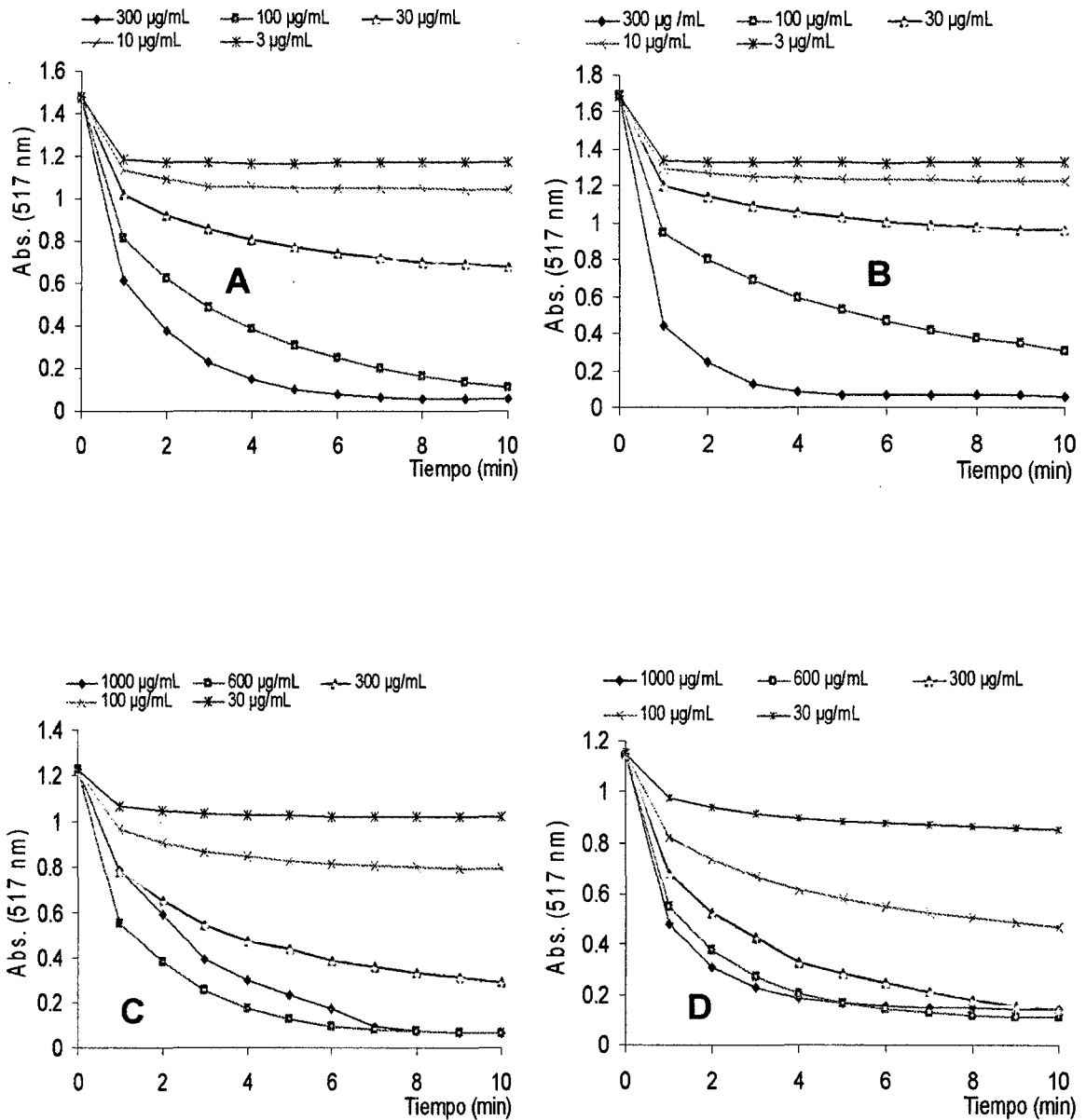


Figura 14. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 05:00 p.m. utilizando acetona/agua como solución de extracción.

ANEXO VI

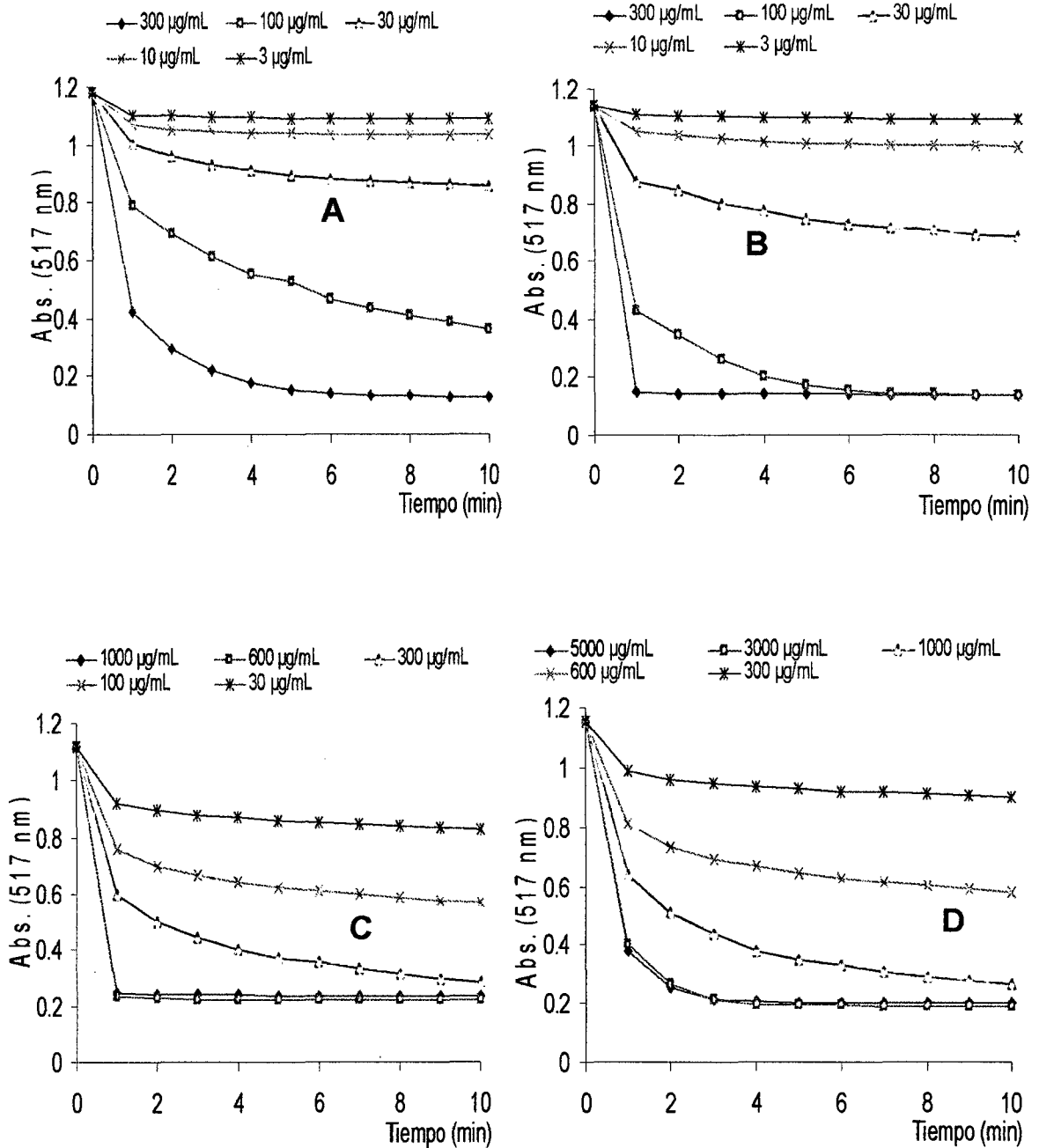


Figura 15. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 07:00 a.m. utilizando agua a 45°C como solución de extracción.

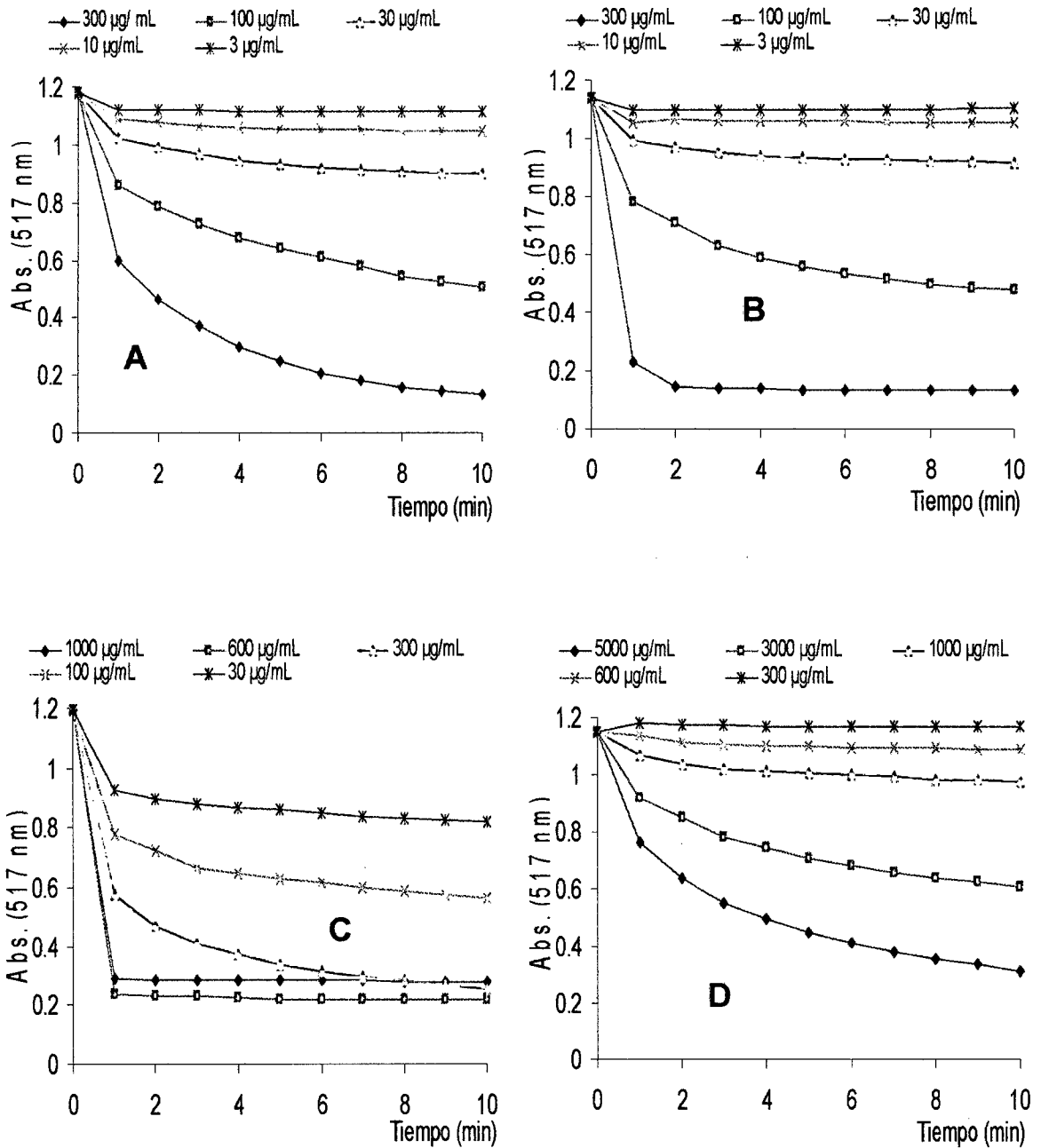


Figura 16. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 12:00 m. utilizando agua a 45°C como solución de extracción.

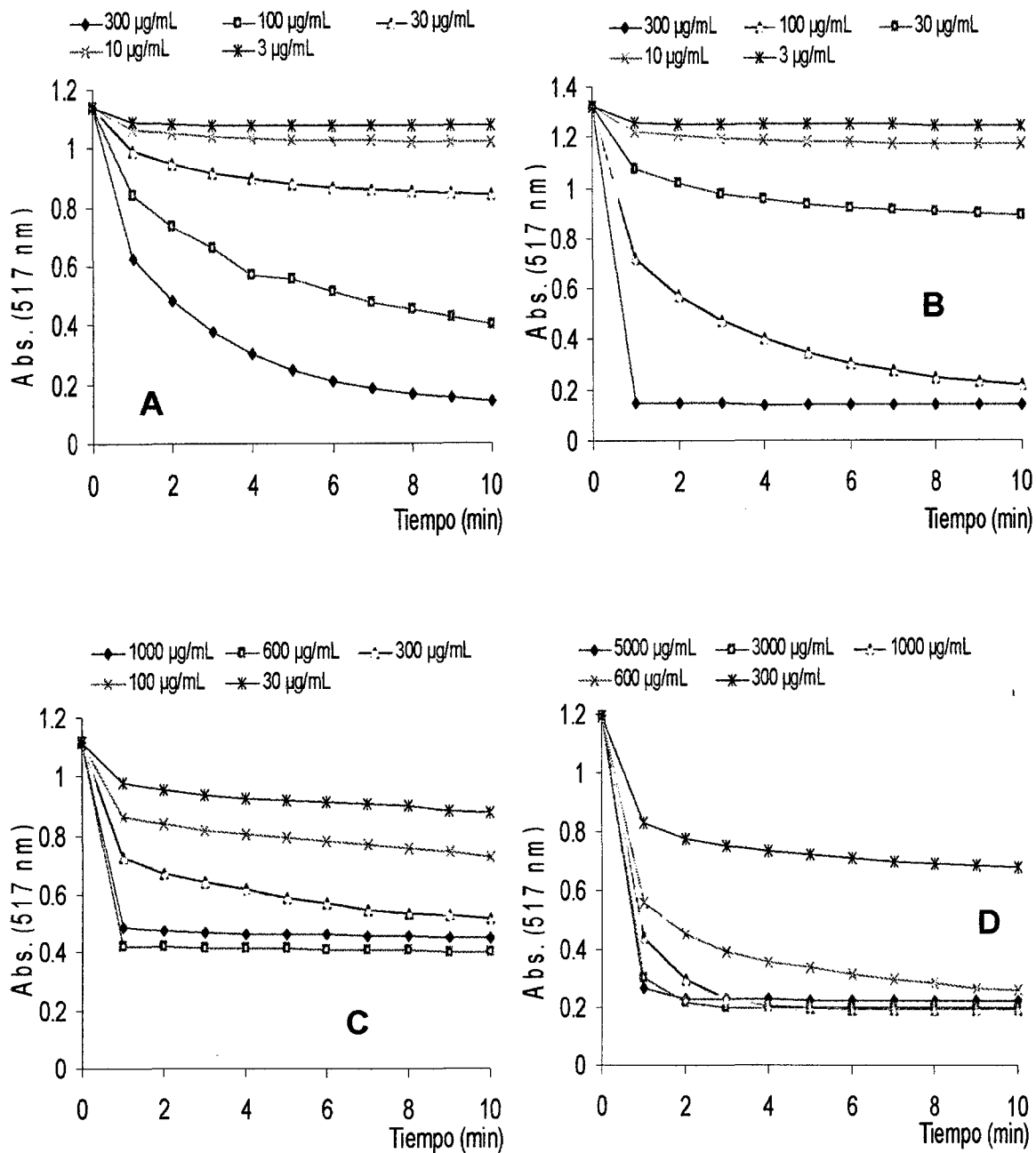


Figura 17. Cinética de secuestro del radical DPPH, de la especie *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., de los extractos de hoja (A), corteza (B), raíz (C) y ritidoma (D), recolectadas a las 05:00 p .m. utilizando agua a 45°C como solución de extracción.

ANEXO VII

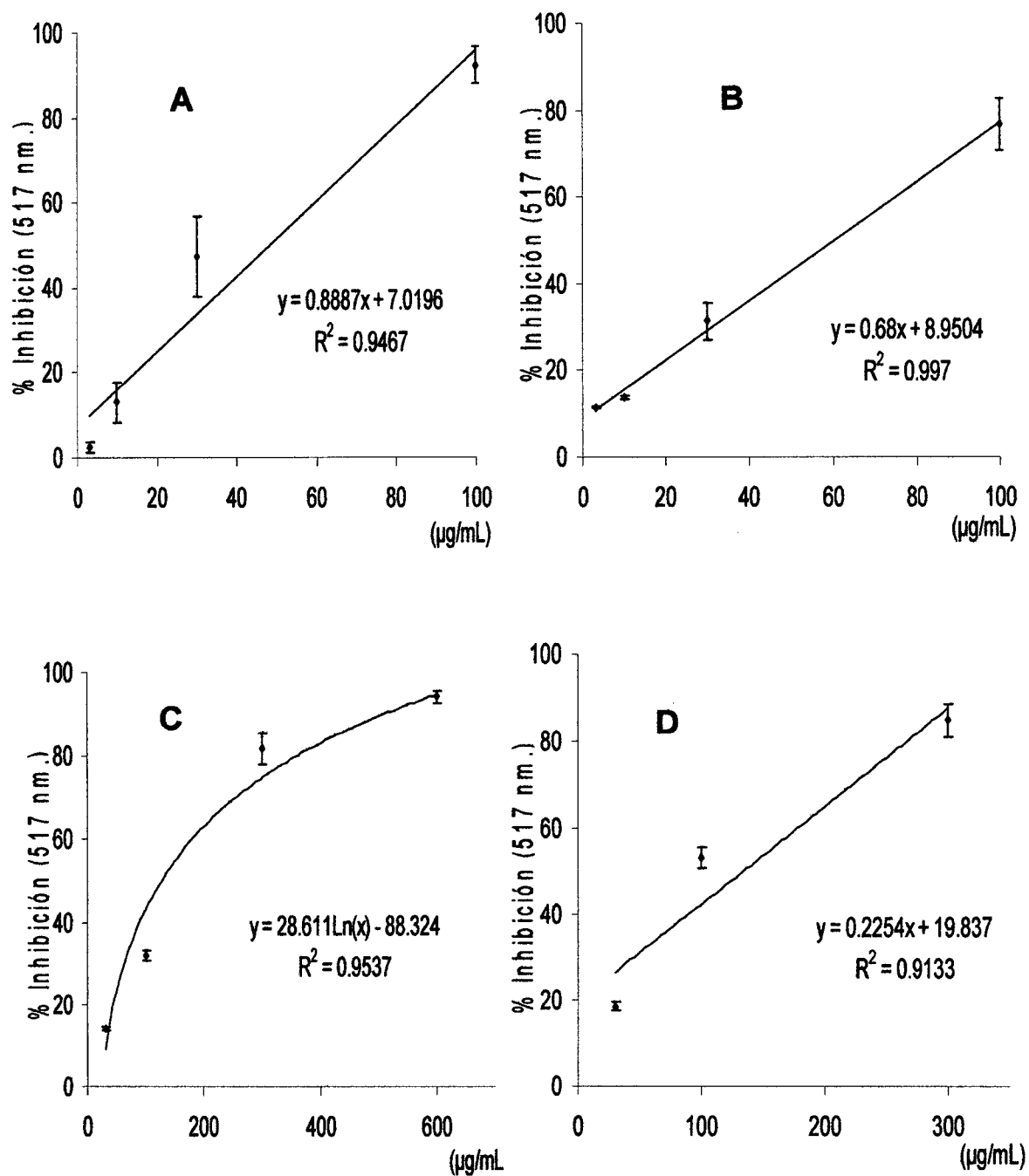


Figura 18. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona /agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 07:00 a.m.

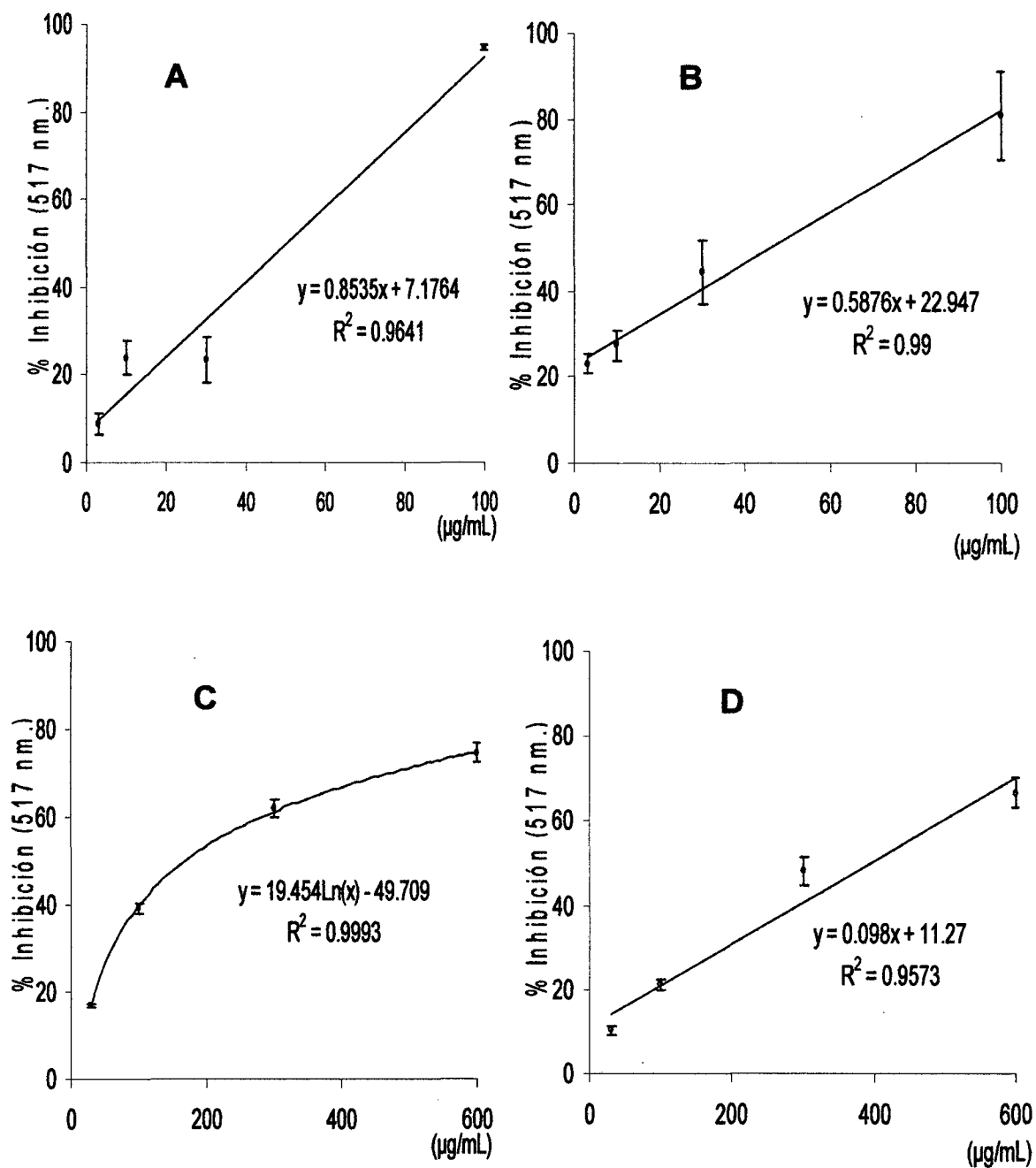


Figura 19. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona/agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 12:00 m.

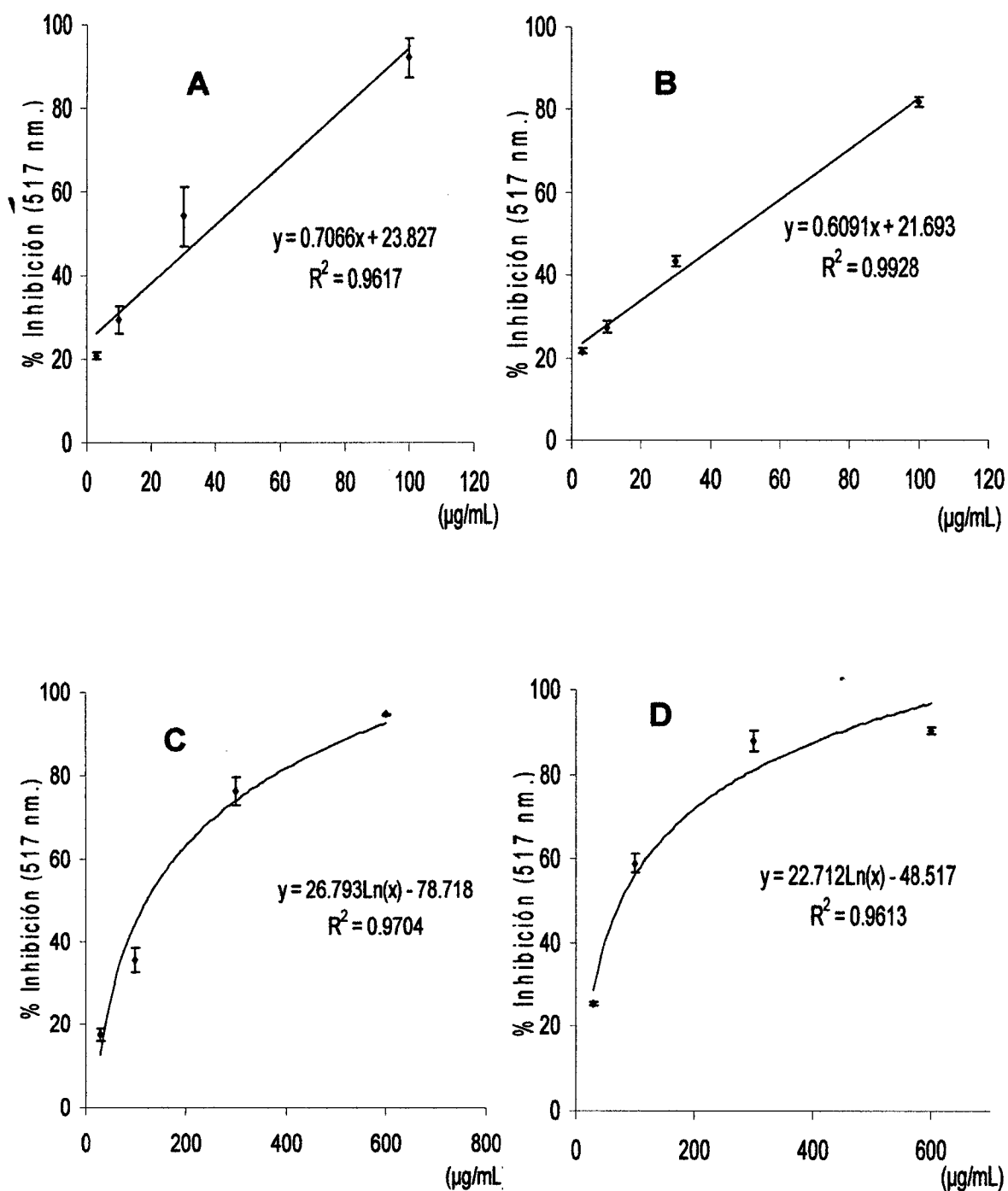


Figura 20. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos acetona/agua, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 05:00 p.m.

ANEXO VIII

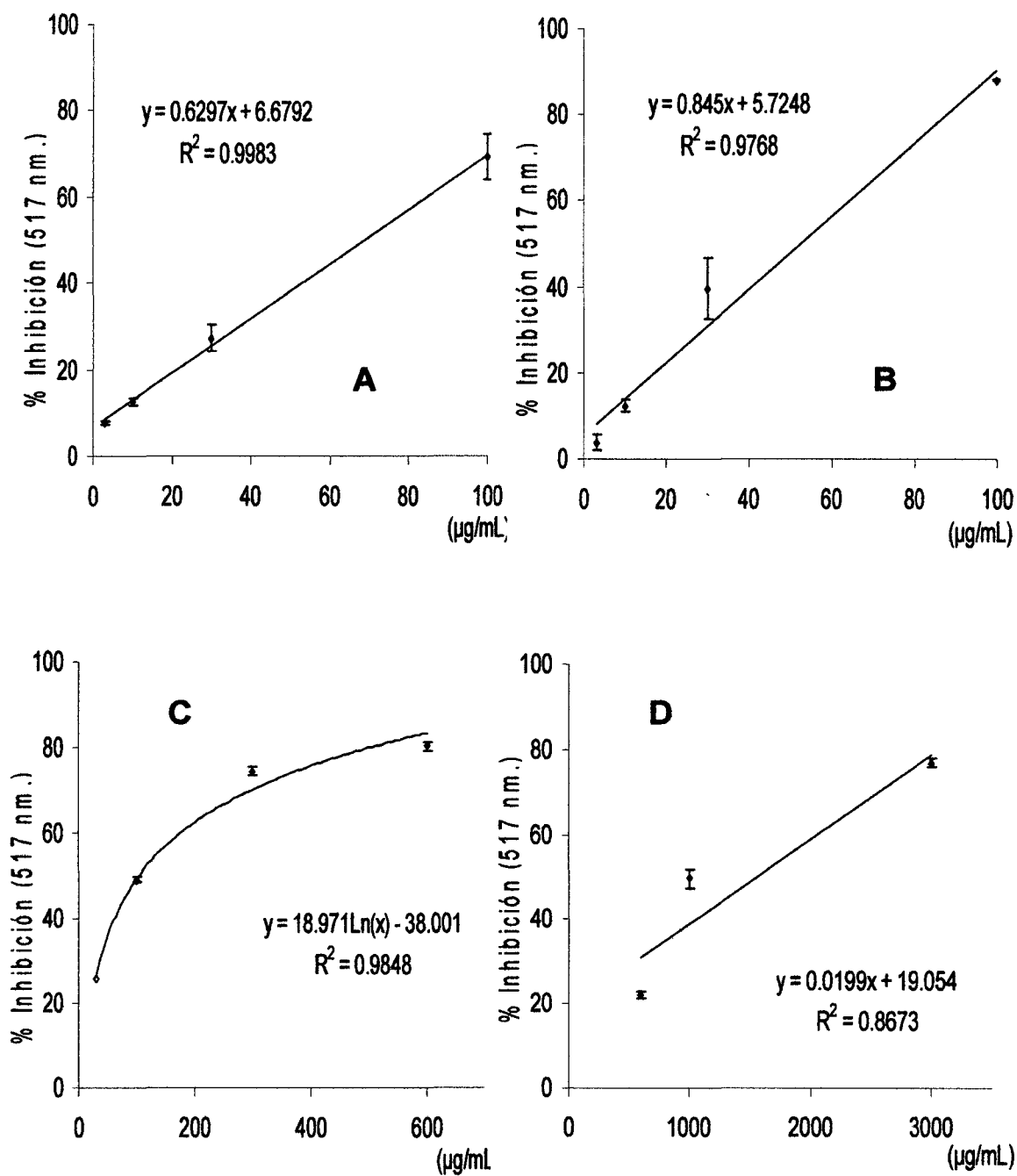


Figura 21. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a $45^{\circ}C$, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 07:00 a.m.

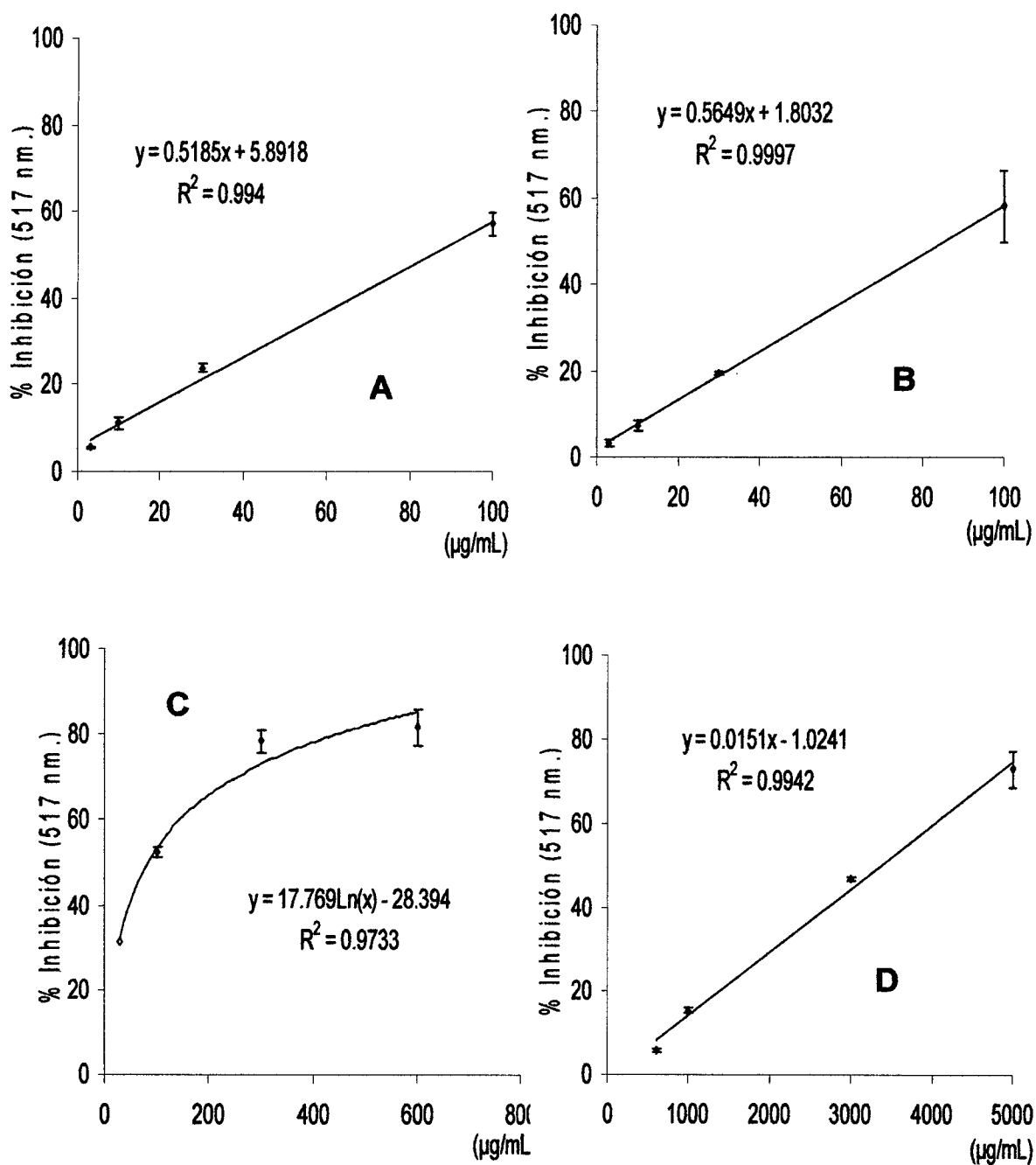


Figura 22. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a 45°C, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 12:00 m.

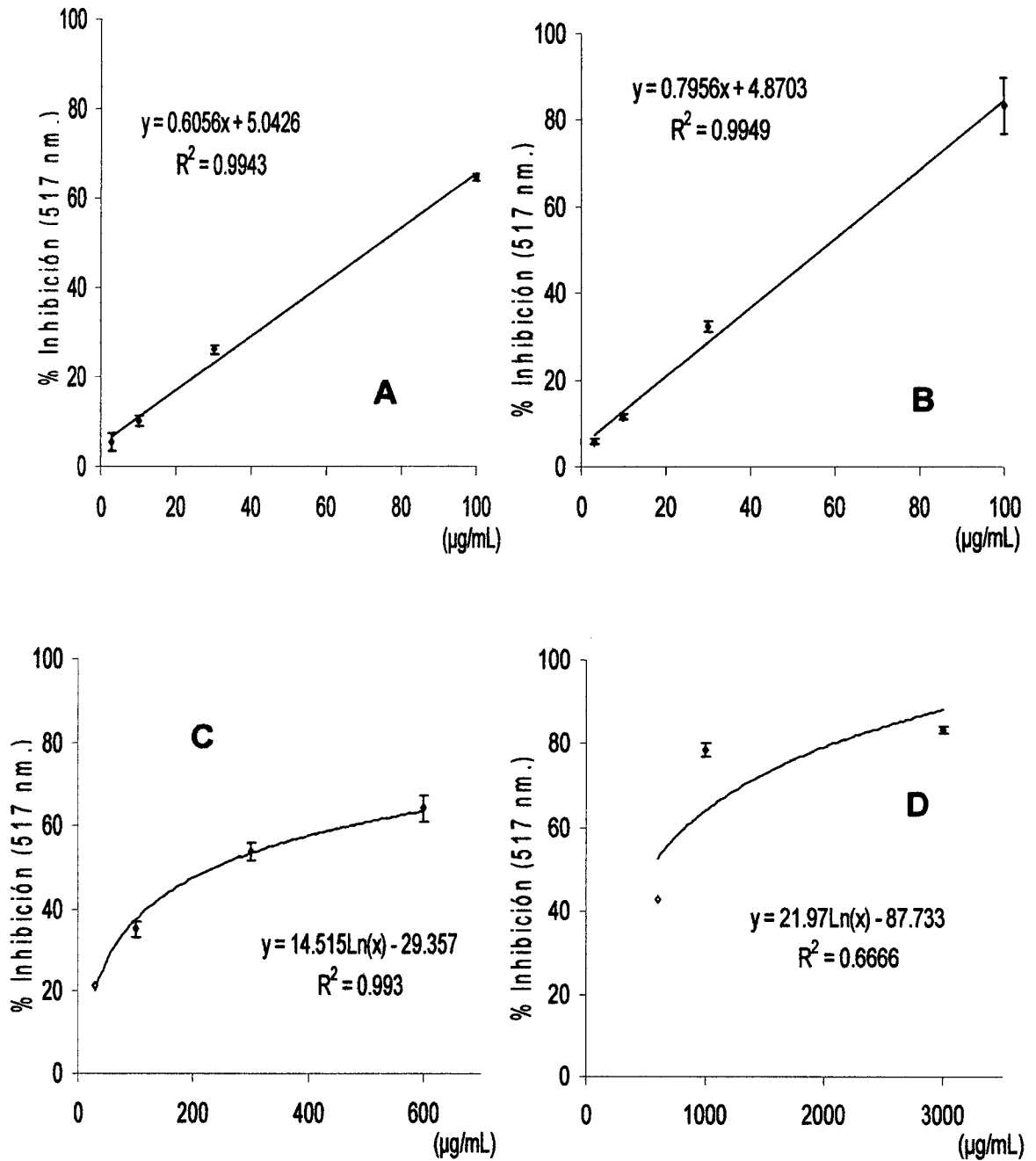


Figura 23. Curvas de IC_{50} de la reacción del radical DPPH, de los extractos agua a $45^{\circ}C$, de hoja (A), corteza (B), raíz (C), ritidoma (D); recolectadas a las 05:00 p.m.

ANEXO IX



Figura 24. Plantación de capirona.

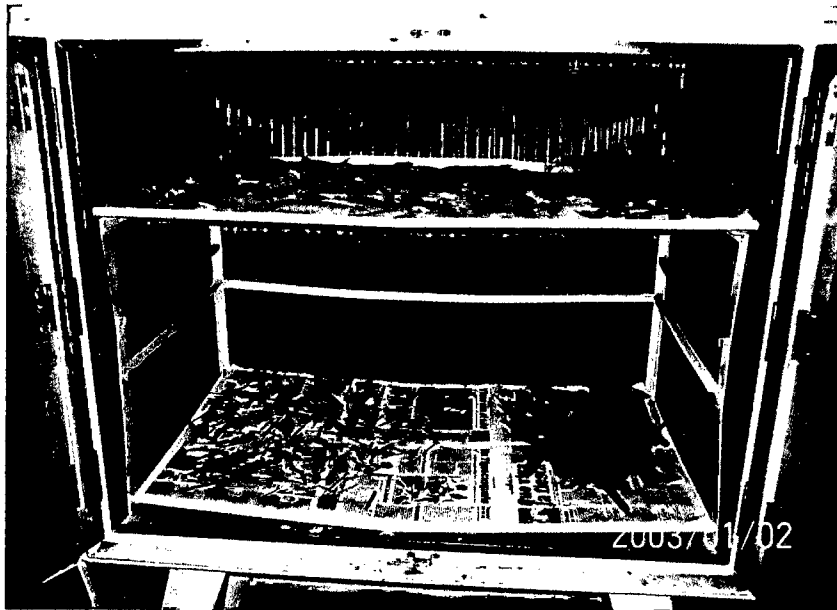


Figura 25. Muestras acondicionadas para el secado.



Figura 26. Mostrando la agitación de las muestras.

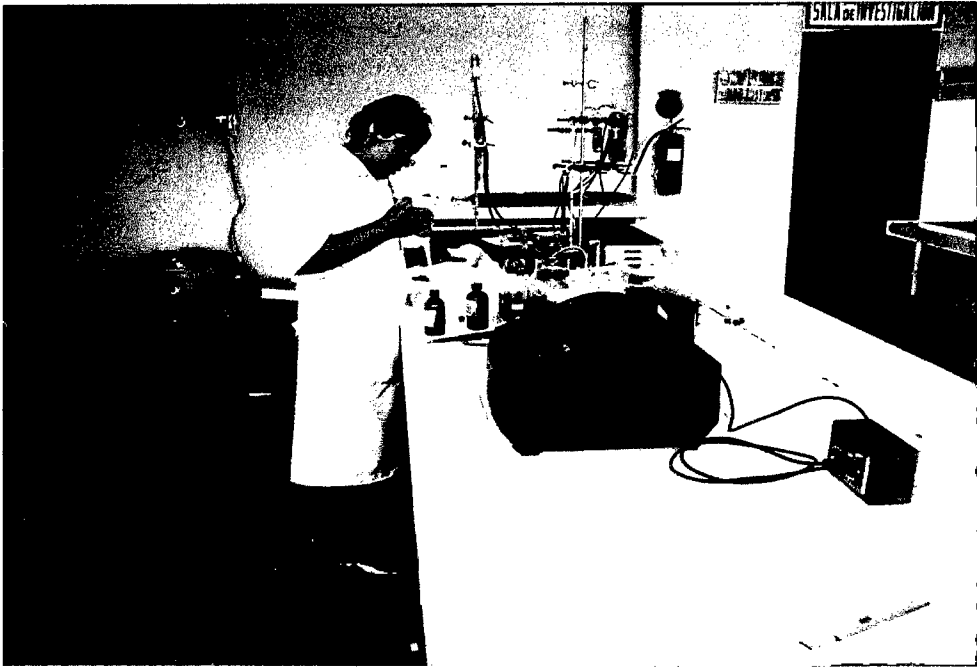


Figura 27. Efectuando las diluciones.



Figura 28. Colocando la muestra en el espectrofotómetro para efectuar la lectura.

XI. GLOSARIO

1. **Antioxidante:** Que evita o protege de la oxidación.
2. **Cinética:** Estudio de la velocidad de las reacciones químicas.
3. **Curva patrón:** Para calcular la concentración de polifenoles totales.
4. **DPPH:** Radical 2,2 - diphenyl -1- picrylhidrozyll
5. **Espectrofotómetro:** Instrumento para desdoblar un haz heterogéneo de radiación electromagnética en sus distintos componentes y dar una indicación de la transferencia de energía entre cada uno de ellos y una sustancia en estudio.
6. **Farmacológico:** Estudio de la acción dinámica y fisiológica de los fármacos.
7. **Infusión:** Acción de extraer de las sustancias orgánicas las partes solubles en agua, a una temperatura mayor que la del ambiente y menor que la del agua hirviendo.
8. **Inhibición:** Proceso mediante el cual se impide la manifestación de un comportamiento.
9. **Radical libre:** Es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados.
10. **Ritidoma:** Corteza muerta de una árbol.

