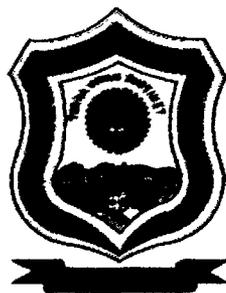


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO
TOTAL DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y
METANÓLICOS DE HOJAS Y CORTEZA DE *Trema micrantha* (L.)Blume**

Tesis

Para optar el título de:

**INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
MENCIÓN: FORESTALES**

WILFREDO TELLO ZEVALLOS

PROMOCIÓN 2007-II

Tingo María - Perú

2008

K50

T35

Tello Zevallos, Wilfredo

Determinación de la Capacidad Antioxidante y Contenido Total de Polifenoles en los Extractos Acuosos y Metanólicos de Hojas y Corteza de *Trema micrantha* (L.)Blume. Tingo María, 2008

61 h.; 20 cuadros; 16 fgrs.; 65 ref.; 30 cm.

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

TREMA MICRANTHA (L.)BLUME / CAPACIDAD ANTIOXIDANTE /

POLIFENOLES / TAXONOMÍA / METODOLOGÍA / TINGO MARÍA /

RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



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 18 de diciembre de 2008, a horas 09:15 a.m. en la Sala de Conferencias de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, para calificar la tesis titulada:

“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y METANOLICOS DE HOJAS Y CORTEZA DE *Trema micrantha* (L.) Blume”

Presentado por el Bachiller: **WILFREDO TELLO ZEVALLOS**, 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 correspondiente.

Tingo María, 23 de enero de 2009

Mcbigo. M.Sc. **CESAR SAMUEL LOPEZ LOPEZ**
Presidente

Bigo. M.Sc. **JOSE KALION GUERRA LU**
Vocal

Ing. **LAURIANO ZAVALETA DE LA CRUZ**
Vocal

Ing. M.Sc. **TANIA ELIZABETH GUERRERO VEJARANO**
Asesora

DEDICATORIA

A Dios, por
concederme la vida

A mis Padres: Emilia
Zevallos y Emilio Tello
por sus sabios
consejos en la
culminación de mi
carrera

A mis hermanos:
Ronny Tello, William
Tello, Ruth Tello, Javier
Tello, Percy Paúl Tello
con amor Fraternal.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por haberme forjado como profesional.
- A todos mis profesores de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, quienes contribuyeron en mi formación académica.
- A la Ingeniera M.Sc. Tania E. Guerrero Vejarano, Patrocinador del presente trabajo de investigación, por su motivación e incalculable colaboración, durante el trabajo de laboratorio y la redacción de la presente investigación.
- Al Ph.D. Manuel Sandoval Chacón, Co-patrocinador del presente trabajo de investigación por su orientación profesional, durante el trabajo de laboratorio y por brindarme las facilidades en la utilización de los reactivos y materiales de laboratorio.
- A mis amigos Bachs. Melvin Mestanza, Helmut Calvay y a todos aquellos que contribuyeron en forma incondicional en la culminación del presente trabajo de investigación.
- Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron significativamente en la realización y culminación del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Trema micrantha</i> (L.)Blume	3
2.1.1. Descripción botánica.....	3
2.1.2. Usos.....	3
2.1.3. Distribución	5
2.1.4. Clasificación taxonómica.....	5
2.2. Las plantas medicinales y la fitoterapia en los planes generales de la salud.....	5
2.3. Radicales libres y antioxidantes.....	6
2.3.1. Radicales libres.....	6
2.3.2. Antioxidantes.....	8
2.3.3. Modelos In Vitro, para evaluar la actividad antioxidante ...	11
2.3.4. Radical 2,2 Diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	12
2.4. Polifenoles	13
2.4.1. Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos	14
2.4.2. Ácidos cinamicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles	14
2.4.3. Flavonoides (quecetina, kaempherol y miricetina)	16
2.4.3.1. Catequinas.....	16
2.4.3.1.1. Fuentes de catequinas.....	17

2.4.3.1.2.	Beneficio de las catequinas en la salud.....	18
2.4.4.	Interés de los polifenoles.....	19
2.4.4.1.	Interés tecnológico.....	19
2.4.4.1.1.	Contribución al color	19
2.4.4.1.2.	Contribución al sabor amargo	20
2.4.4.1.3.	Contribución al sabor astringente ..	20
2.4.4.1.4.	Contribución al pardeamiento	20
2.4.4.2.	Interés nutricional.....	21
2.4.4.2.1.	Interés sobre los macronutrientes y la biodisponibilidad de minerales.....	21
2.4.4.2.2.	Interés en la Actividad Antioxidante (AA) y su relación con diversas patologías.....	21
2.4.5.	Mecanismos de acción de los polifenoles	22
2.4.6.	Los polifenoles como antioxidantes.....	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1.	Lugar de ejecución.....	24
3.2.	Recurso vegetal.....	24
3.3.	Zonas de colección de materia prima	24
3.3.1.	Tulumayo	24
3.3.2.	La Divisoria	25
3.4.	Diseño experimental y factores estudiados.....	25

3.5.	Metodología experimental.....	26
3.5.1.	Preparación de muestras	26
3.5.2.	Preparación de los extractos (hojas y corteza)	26
3.5.2.1.	Extractos metanólicos.....	16
3.5.2.2.	Extractos acuosos.....	27
3.5.3.	Determinación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxílo.....	27
3.5.3.1.	Capacidad antioxidante frente al radical DPPH*	27
3.5.3.2.	Capacidad antioxidante frente al radical peroxílo	28
3.5.4.	Determinación del contenido total de polifenoles	29
3.5.5.	Cuantificación de epicatequina por HPLC.....	30
3.5.5.1.	Equipo de HPLC	30
3.6.	Análisis estadístico	31
3.6.1.	Modelo aditivo lineal.....	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.	Capacidad antioxidante de frente al radical DPPH* y peroxílo	33
4.1.1.	Capacidad antioxidante frente al radical DPPH*	33
4.1.2.	Capacidad antioxidante frente al radical peroxílo.....	35
4.2.	Contenido de polifenoles totales	36
4.3.	Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxílo respecto al tipo de droga.....	38

4.4.	Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peróxido respecto al factor tipo de solvente.....	40
4.5.	Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peróxido respecto a la zona de procedencia de las muestras	42
4.6.	Cuantificación de epicatequina (EC) de <i>Trema micrantha</i> (L.)Blume por HPLC.	44
V.	CONCLUSIONES.....	46
VI.	RECOMENDACIONES.....	48
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VIII.	ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Radicales libres derivados del oxígeno.....	9
2. Otras especies de radicales libres	10
3. Factores estudiados y sus correspondientes niveles.....	25
4. Análisis de varianza para los análisis realizados de <i>Trema micrhantha</i> (L.)Blume.....	31
5. Capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria frente al radical DPPH*.....	34
6. Capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria frente al radical peroxilo.	36
7. Contenido de polifenoles totales expresado en mgCATE/g de materia seca en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria.	38
8. Contenido de epicatequina (mg/g) de <i>Trema micrantha</i> (L.)Blume.....	44
9. ANVA para la capacidad antioxidante frente al radical DPPH*.....	62
10. Prueba de Duncan para el tipo de droga en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*.....	62
11. Prueba de Duncan para el tipo de solvente en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*.....	62
12. Prueba de Duncan para las zonas en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*	63

13.	ANVA para la capacidad antioxidante frente al radical peróxido.....	63
14.	Prueba de Duncan para el tipo de droga en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical peróxido	63
15.	Prueba de Duncan para el tipo de solvente en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical peróxido	64
16.	Prueba de Duncan para las zonas en la capacidad antioxidante como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical peróxido.....	64
17.	ANVA para el contenido total de polifenoles.....	64
18.	Prueba de Duncan para el tipo de droga en el contenido total de polifenoles mgCATE/g de materia seca.	65
19.	Prueba de Duncan para el tipo de solvente en el contenido de polifenoles totales mgCATE/g de materia seca.....	65
20.	Prueba de Duncan para las zonas en el contenido de polifenoles totales mgCATE/g de materia seca.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Técnicas para evaluar la actividad antioxidante en suplementos dietarios y plantas medicinales.....	11
2. Química de la inhibición del radical libre por una especie antioxidante. .	13
3. Metabolismo general de los productos naturales.....	15
4. Estructura química básica de las principales catequinas.....	17
5. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH* y peroxílo respecto al factor tipo de droga.....	40
6. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH* y peroxílo respecto al tipo de solvente	41
7. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC ₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH* y peroxílo respecto a la zona.....	43
8. Cromatograma de la identificación de epicatequina (1) en <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	45
9. Curva patrón de catequina para la cuantificación de polifenoles totales.	61
10. Curva patrón para la cuantificación epicatequina.	61
11. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g) de hojas y corteza usando como solvente agua y metanol de la zona de Tulumayo y La Divisoria.	66

12. IC₅₀ (µg/ml) frente la radical DPPH* de hojas y corteza usando como solvente agua y metanol de la zona de Tulumayo y La Divisoria.66
13. IC₅₀(µg/ml) frente la radical peroxílo de hojas y corteza usando dos solventes (agua y metanol) de la zona de Tulumayo y La Divisoria.....67
14. Hojas y frutos de *Trema micrantha* (L.)Blume.....68
15. Efectuando las diluciones 68
16. Colocando la muestra en el espectrofotómetro para efectuar la lectura. 69

RESUMEN

Trema micrantha (L.) Blume., es una planta medicinal de la Amazonía usada en el tratamiento de la tos seca, descongestionante nasal, remedio contra enfermedades como el sarampión, úlceras, astringente, anti-sifilítica, anti-reumática. También extractos de esta planta mostró actividad analgésica y anti-inflamatoria. El propósito del presente estudio fue determinar el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante en los extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza, procedentes de dos zonas tales como: Tulumayo y La Divisoria para finalmente cuantificar el contenido de epicatequina por HPLC. Los polifenoles totales fueron determinados por método de Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante fueron determinados por la inhibición de 1,1 diphenil-2-picrilhidrazil (DPPH*), peroxílos y la cuantificación de epicatequina fueron determinados por HPLC. El contenido de polifenoles totales fue $169,377 \pm 3,473$ mg/g expresados como catequina equivalente en extracto metanólico de corteza ($P < 0,01$). El IC_{50} en la capacidad de secuestro de radicales DPPH* y peroxílos fue $40,132 \pm 0,153$ y $10,472 \pm 0,071$ ug/ml ($P < 0,01$), en extracto acuoso de corteza y en extracto metanólico de corteza respectivamente y el contenido de epicatequina fue de $1,089 \pm 0,087$ mg/g de muestra seca. En conclusión los resultados indican que *Trema micrantha* (L.) Blume. posee un alto contenido de polifenoles totales, así como también buena capacidad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

La amazonía peruana tiene una alta diversidad de plantas medicinales, usadas como medicina alternativa para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades; dentro de éstas tenemos a *Trema micrantha* (L.)Blume. “atadijo”, estudiada más como especie forestal que como especie medicinal.

Las propiedades medicinales de las plantas se deben a la presencia de sustancias químicas como glicósidos, alcaloides, polifenoles entre otros, en las hojas, corteza, etc. Entre ellos, los polifenoles tienen propiedades antioxidantes y son una alternativa para proteger del envejecimiento prematuro, el cáncer y otras enfermedades que cada día se incrementan, disminuyendo el promedio de vida.

La capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles de la especie forestal *Trema micrantha* (L.) Blume., no son conocidas, es decir no existen estudios relacionados a su capacidad inhibidora de radicales libres que podría presentar esta planta, dado que esta planta posee propiedades medicinales que son utilizadas por la medicina tradicional en la prevención de signos (malestares) como la tos seca, descongestionante nasal (MEJIA y RENGIFO, 2000); remedio contra enfermedades como el sarampión, astringente, anti-sifilítica, anti-reumática. Los indígenas del oeste de Francia

emplean el cocimiento de las semillas y hojas para combatir erupciones de la piel, etc. (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Es por eso que la determinación tanto de la capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles, requiere hacer estudios necesarios a través de tecnologías adecuadas, para que de esta manera se tenga el conocimiento y poder validar el uso de esta planta como antioxidante, ya que es importante realizar investigaciones sobre sus actividades farmacológicas para que se pueda dar la posibilidad a las personas que deseen usarla.

En tal sentido los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación fueron: Determinar la capacidad antioxidante en los extractos acuosos y metanólicos de las hojas y corteza frente al radical DPPH* y peróxido de *Trema micrantha* (L.)Blume, determinar los polifenoles totales en los extractos acuosos y metanólicos de las hojas y corteza de *Trema micrantha* (L.)Blume, determinar el mejor lugar de procedencia de las muestras respecto a la capacidad antioxidante y polifenoles totales y cuantificar el contenido de epicatequina (EC) por HPLC (cromatografía líquida de alta performance).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Trema micrantha* (L.)Blume

2.1.1. Descripción botánica

Árbol de hasta 20 m de alto, de 20 a 30 cm de diámetro. Hojas simples, alternas; comúnmente lanceoladas, acuminadas, borde aserrado, base oblícua, trinervada. Inflorescencia axilar en una panícula. Flores uni o bisexuales; blanco-verdosas, hasta rojizas. Fruto: drupa, ovoide, anaranjada, 2 a 3 mm. de largo (MEJIA y RENGIFO, 2000).

2.1.2. Usos

- **Artesanal.** Con la madera se elaboran sillas y molenderos. Con la corteza se elabora un tipo de papel "amate" que puede sustituir al tradicional que se extrae de *Ficus sp.*
- **Combustible.** Leña y carbón para pólvora.
- **Construcción.** Construcción rural (vigas). La madera es de color amarillo-crema y notablemente suave. Se hacen postes.

- **Fibra.** La corteza es fibrosa y fuerte y se usa para manufacturar sogas y cordeles.
- **Forrajero.** Su follaje es considerado como buen forraje. En Brasil se han hecho estudios que indican la presencia de un alto contenido de proteína para nutrir al ganado. En animales monogástricos (pollos) se han hecho pruebas con mezclas de hasta 5 % de forraje en su comida normal con resultados satisfactorios, y los pigmentos contenidos en las hojas incrementan el color amarillo de su epidermis.
- **Industrializable.** Pulpa para papel.
- **Medicinal.** Extractos de hojas y corteza de esta planta han demostrado efecto contra el sarampión, adstringente, anti-sifilítica, anti-reumática, antidiarreico (BARBERA *et al.*, 1992; MUÑOZ *et al.*, 2000; FRIMMEL *et al.*, 1999; LORENZI, 2000; TRAVERSO *et al.*, 2005), también actúa como antiespasmódico (MUÑOZ *et al.*, 1998), antidiabética (SCHOENFELDER *et al.*, 2006). Por otra parte sirve también en la prevención de malestares (signos) de la Tos seca: el cocimiento de la corteza y hojas se usa para hacer gárgaras. También se usa la corteza como masticatorio, Descongestionante nasal: en inhalaciones del vapor del cocimiento de la corteza y hojas, Tos seca: se toman unas siete hojas y se estrujan en agua; al líquido resultante se añade el jugo de un limón. Se toma tres veces al día (MEJIA y RENGIFO, 2000).

2.1.3. Distribución

Amazonas, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, Puno, San Martín, Ucayali (MEJIA y RENGIFO, 2000).

2.1.4. Clasificación taxonómica

Según MOSTACERO *et al.* (2002) da la siguiente clasificación.

División	: Angiospermae
Clase	: Dicotyledonea
Sub-clase	: Achyklamidaeae
Orden	: Urticales
Familia	: ULMACEAE
Género	: Trema
Especie	: <i>Trema micrantha</i> (L.)Blume.

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 AVELLO y SUWALSKY (2006) manifiestan que los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. El exceso de radicales libres provoca diversas enfermedades degenerativas, entre ellas produce el envejecimiento prematuro de la piel por exposición a los rayos solares.

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 ocasionan 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 (KUMPULAINEN y SALONEN, 1999; VENEREO, 2002; AVELLO y SUWALSKY, 2006)

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 ésta ligada al cáncer así como al daño causado en las arterias por el colesterol "oxidado", lo que relaciona directamente a estas moléculas con las enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras muy frecuentes actualmente (KUMPULAINEN y SALONEN, 1999; AVELLO y SUWALSKY, 2006).

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 (VENEREO, 2002; VILLANUEVA, 2003; AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Según VENEREO (2002), 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.

Cuadro 1. Radicales libres derivados del oxígeno

Radical	Nombre	Características
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^-	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^-	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
ONOO^-	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 desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (a).
H^\cdot	Átomo de Hidrógeno	Es el radical libre más simple (b).
RS^\cdot	Tiol	Nombre general para un grupo de radicales con un electrón desapareado ubicado en el sulfuro (b).
RO^\cdot	Alcoxil	Radical ubicado en el oxígeno, formado durante el rompimiento de peróxidos orgánicos (b).
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).

Fuente: Adaptado de VILLANUEVA (2003).

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), o por inhibición directa de radicales libres éste puede ser realizado por diversos análisis *in Vitro* (Figura 1), que caracterizan la eficiencia de compuestos bioactivos en plantas y suplementos alimenticios (AUROMA, 2003).

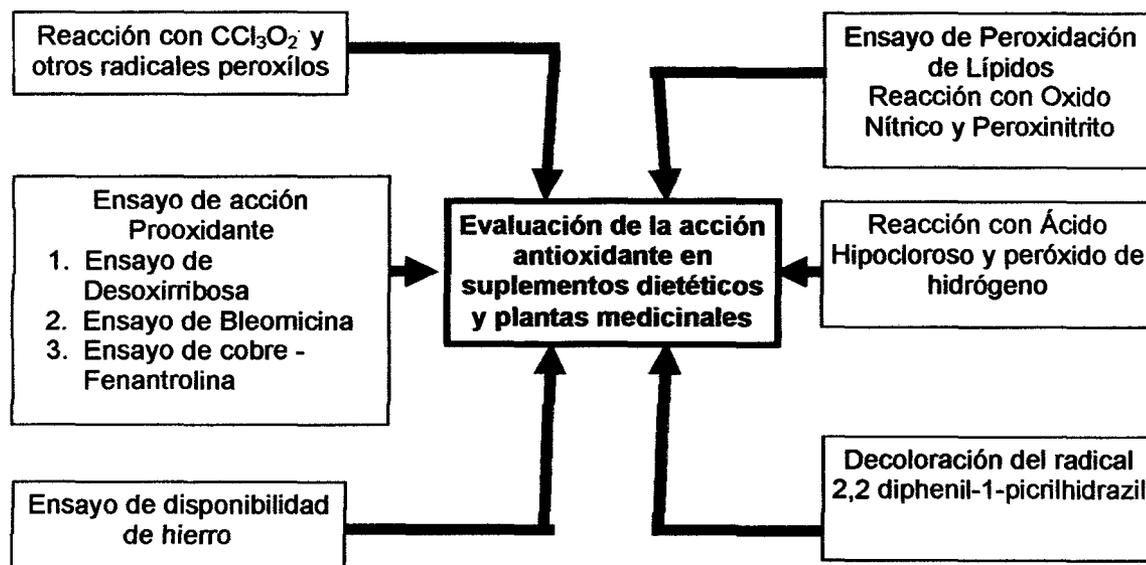
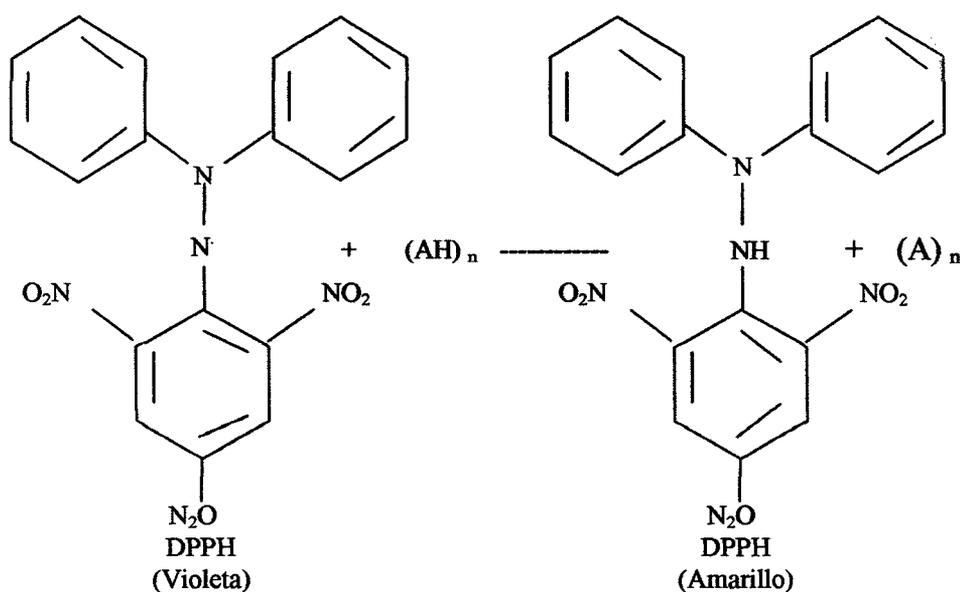


Figura 1. Técnicas para evaluar la actividad antioxidante en suplementos dietarios y plantas medicinales

2.3.4. Radical 2,2 Diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El radical DPPH, es un reactivo que se usa ampliamente para investigar la inhibición de radicales libres por los polifenoles (HIRAMATSU *et al.*, 1997; YILDIRIM *et al.*, 2003), también sufre decoloración (Figura 2) por la cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferol, compuestos polihidroxiaromáticos (hidroquinona, pirogalol, etc.) y aminas aromáticas (p-finilendiamina, p-aminofenol, etc.) (BLOIS, 1958).

El mecanismo de reacción consiste en sustraer un átomo de hidrógeno de un fenol donador para dar difenilpicrilhidrazina y un radical fenoxil (Figura 2), (LEBEAU *et al.*, 2000). La reacción involucra un cambio de color de violeta a amarillo, que fácilmente es monitoreado. (BLOIS, 1958; BRAND – WILLIAMS, 1995).



Donde:

DPPH – H = Radical DPPH reducido

$(A H)_n$ = Especies de Radicales

n = Indica la presencia de 1 o más especies de radicales.

Figura 2. Química de la inhibición del radical libre por una especie antioxidante Según ESPIN *et al.* (2000).

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 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 (HERNANDEZ y PRIETO, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2000; VILLANUEVA, 2003). Entre los compuestos polifenólicos tenemos:

2.4.1. Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos

Dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, cresol 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; MARTINEZ *et al.*, 2000).

2.4.2. Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, por lo general esta presente en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico 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; MARTINEZ *et al.*, 2000).

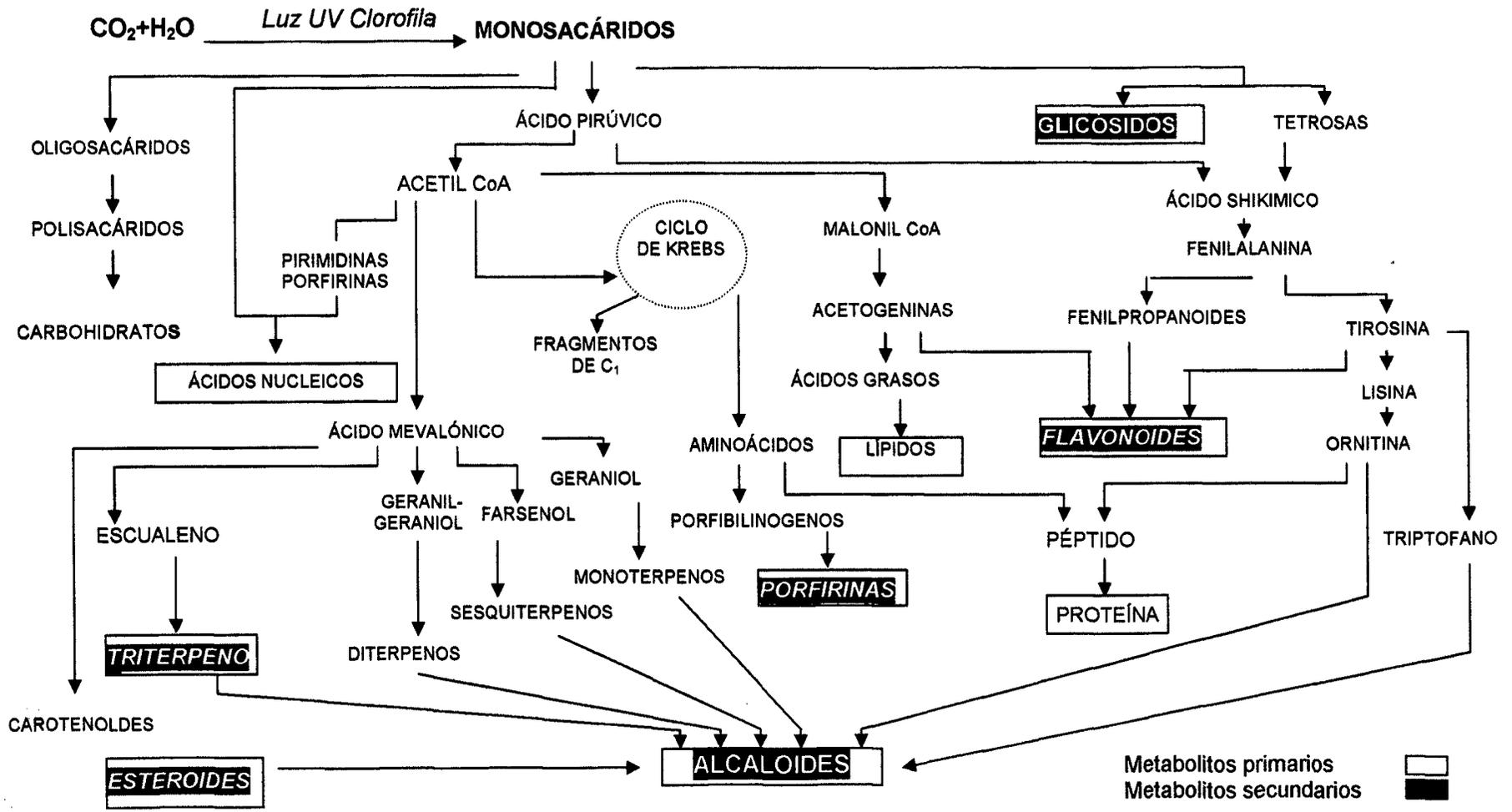


Figura 3. Metabolismo general de los productos naturales

2.4.3. 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 flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, etc. (HERTOG *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 2000).

2.4.3.1. Catequinas

Son metabolitos polifenólicos de las plantas con capacidad antioxidante. Pertenecen a la familia de flavonoides y para ser más específicos, flavan-3-ols. Estos compuestos abundan en los tés procedentes de la planta de té (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), así como en algunos cacao y chocolates (hecho de semillas de *Theobroma cacao* L.) (ZHENG *et al.*, 2008). Los principales polifenoles (Figura 4) que se encuentran en las hojas frescas del té y demás vegetales son la epigalocatequina galato (EGCG), la epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), catequina (CAT) y epicatequina (EC). Los resultados de estudios realizados con estos compuestos indican que los mismos tendrían una actividad protectora contra la enfermedad de Alzheimer y ciertos tipos de tumores malignos, además de

mejorar el sistema cardiovascular, antioxidativo y contribuir a controlar la obesidad (HU *et al.*, 2008).

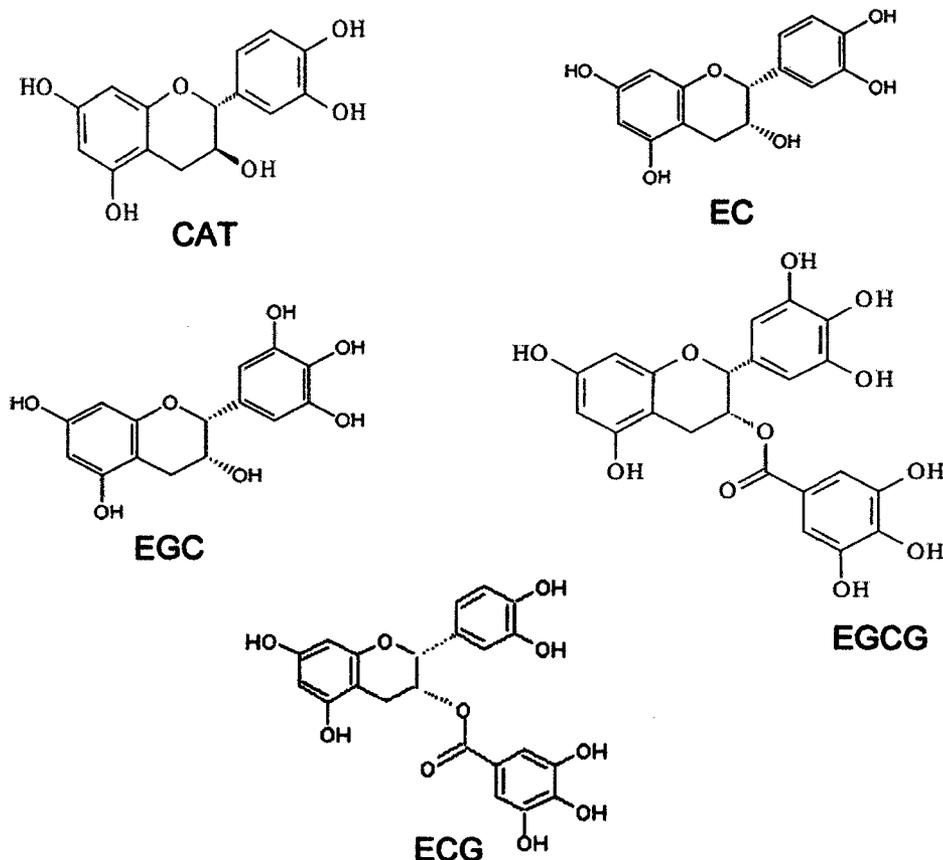


Figura 4. Estructura química básica de las principales catequinas

2.4.3.1.1. Fuentes de catequinas

Las catequinas constituyen alrededor del 25% del peso seco de hoja de té fresco (BALENTINE *et al.*, 1998) aunque el contenido total de catequina varía mucho en función de la variación clonal, el aumento de la ubicación, estacional / variación de la luz, y la altitud (LU *et al.*, 2001). Están presentes en casi todos los téis realizados a partir de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, incluyendo el té blanco, té verde, té negro y té Oolong. Las catequinas

también están presentes en la dieta humana en el chocolate (HAMMERSTONE *et al.*, 2000), las frutas, las hortalizas y el vino (RUIDAVETS *et al.*, 2000) y se encuentran en muchas otras especies de plantas (HARBORNE *et al.*, 1982)

2.4.3.1.2. Beneficio de las catequinas en la salud

Los beneficios para la salud de las catequinas se han estudiado ampliamente en los seres humanos y en modelos animales. Reducción de placas arterioscleróticas se ha visto en modelos animales (CHYU *et al.*, 2004). Reducción de la carcinogénesis fue visto *in vitro* (MITTAL *et al.*, 2004)

Muchos estudios sobre los beneficios de salud se han vinculado a la epicatequina (EC). Según SCHROETER *et al.* (2006), epicatequina puede reducir el riesgo de cuatro de los principales problemas de salud: los accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, el cáncer y la diabetes; el estudio del pueblo Kuna en Panamá, que beben hasta 40 tazas de cacao a la semana, se encontró que la prevalencia de los "cuatro grandes problemas" es inferior al 10%, los investigadores creen que la epicatequina debe ser considerado esencial para la dieta y por tanto clasificarse como una vitamina.

Según KATIYAR *et al.* (2007), epigallocatequina galato es un antioxidante que ayuda a proteger la piel de la radiación UV-inducida por los daños y la formación de tumor. Catequinas del té verde también han demostrado que poseen propiedades de los antibióticos debido a su papel en la perturbación de una etapa específica de los bacterianas proceso de replicación

del ADN. Las Catequinas, cuando se combinan con el ejercicio habitual; se ha demostrado que alguna manera retrasa el envejecimiento (MURASE et al., 2008). Ratonés alimentados con catequinas demostraron disminución de los niveles de envejecimiento. El estrés oxidativo se redujo en la mitocondria celular, así como aumento de mRNA de la transcripción de proteínas relacionadas con la mitocondria (MURASE et al., 2008)

2.4.4. Interés de los polifenoles

MARTINEZ *et al.* (2000); VILLANUEVA (2003) mencionan los siguientes intereses:

2.4.4.1. 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.

2.4.4.1.1. 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.

2.4.4.1.2. Contribución al sabor amargo

Las flavononas, están asociados con el sabor amargo en los cítricos, entre ellos tenemos a la naringina.

- En la naranja tenemos a la neohesperidina.
- En la cerveza tenemos al ácido clorogénico.

2.4.4.1.3. 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.

2.4.4.1.4. 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.

2.4.4.2. Interés nutricional

2.4.4.2.1. Interés sobre los macronutrientes y la biodisponibilidad de minerales

La presencia de algunos tipos de flavonoides, ayudan 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.

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

La actividad antioxidante 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.

2.4.5. Mecanismos de acción de los polifenoles

Según FRANKEL *et al.* (1995), 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 lipoproteína de baja densidad (LBD).
- Por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo.

2.4.6. Los polifenoles como antioxidantes

Los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las LBD 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. Los compuestos polifenólicos tienen propiedades conocidas en el secuestro de radicales libres, inhibición de hidrólisis y oxidación de enzimas y acción anti-inflamatorio (FRANKEL *et al.*, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1997; POURMORAD *et al.*, 2003).

MELCHOR (2002) manifiesta que la actividad antioxidativa de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. "té verde" expresada como coeficiente de inhibición del 50 % de radicales libres (IC_{50}), fue de 47 $\mu\text{g/ml}$ y las condiciones de almacenamiento (60 días) no disminuyó dicha actividad.

DAZA (2004) manifiesta que, la mayor capacidad antioxidativa de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook., reflejada en términos de IC_{50} , lo presenta el extracto acetona/agua, de la muestra de hoja recolectada a las 05:00 p.m. con $37,148 \pm 5,565 \mu\text{g/ml}$, y en la extracción acuosa, la muestra de corteza recolectada a las 07:00 a.m. con $52,352 \pm 2,669 \mu\text{g/ml}$.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), Tingo María.

3.2. Recurso vegetal

Los materiales vegetales utilizados fueron las hojas y cortezas de *Trema micrantha* (L.)Blume (atadijo). Las muestras fueron colectadas de la zona de Tulumayo y La Divisoria que a continuación se describen.

3.3. Zonas de colección de materia prima

3.3.1. Tulumayo

Está situado a 650 m.s.n.m. con una humedad relativa promedio de 84 % y una temperatura promedio anual de 24 °C; las precipitaciones pluviales pasan de 3000 mm y casi no hay un solo mes al año sin lluvias; unidad fisiográfica de terraza baja.

3.3.2. La Divisoria

Está situada a 800 m.s.n.m. con una humedad relativa promedio de 22 a 25 % y una temperatura promedio anual de 20 °C; las precipitación promedio anual es de 3200 a 3800 mm, con una época lluviosa entre los meses de octubre y abril; unidad fisiográfica de montaña alta.

3.4. Diseño experimental y factores estudiados

Se utilizó un Diseño Experimental de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con un arreglo factorial de 2Ax2B. En el Cuadro 3, factores estudiados y sus correspondientes niveles.

Cuadro 3. Factores estudiados y sus correspondientes niveles

Factores	Niveles	Símbolo
A. Tipo de droga	– Hoja	a ₁
	– Corteza	a ₂
B. Tipo de solvente	– Agua(95°C)	b ₁
	– Metanol	b ₂

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Preparación de muestras

Las muestras fueron secadas en una estufa a 40 ± 5 °C, por 8 horas, posteriormente fueron molidas en un molino de cuchillas, con un tamiz de 2 mm y almacenadas a temperatura ambiente hasta sus respectivos análisis.

3.5.2. Preparación de los extractos (hojas y corteza)

Los extractos de las muestras molidas fueron preparados utilizando dos tipos de solventes de la siguiente manera (LOCK, 1994).

3.5.2.1. Extractos metanólicos

- La extracción se realizó por maceración durante 48 horas en matraces de capacidad de 200 ml a razón de 5 gr de materia seca/100 ml de metanol grado reactivo (Merck KGaA).
- Luego el sobrenadante se puso en microtubos de 1500 μ L de capacidad, centrifugados a 10000 rpm / 5 minutos a 4 °C.
- Finalmente se realizó la dilución de manera adecuada a partir de la solución stock para obtener las siguientes diluciones (1/5, 1/10, 1/20, v/v) para su análisis respectivo.

3.5.2.2. Extractos acuosos

- La extracción se realizó por Infusión durante 30 minutos con agua (95 °C), en matraces de capacidad de 200 ml a razón de 5 gr de materia seca/100 ml de agua destilada.
- Luego el sobrenadante se puso en microtubos de 1500 µL de capacidad; centrifugados a 10000 rpm / 5 minutos a 4 °C.
- Finalmente se realizó la dilución de manera adecuada partir de la solución stock para obtener las siguientes diluciones (1/5, 1/10, 1/20, v/v) para su análisis respectivo.

3.5.3. Determinación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxílo

3.5.3.1. Capacidad antioxidante frente al radical DPPH*

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se utilizó el radical 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH), reportado por BRAN-WLLIAMS *et al.* (1995).

Se preparó la solución stock: DPPH 1mM en metanol grado reactivo; luego se almacenó a 4 °C protegido de la luz con papel metálico; a partir de la solución stock se preparó DPPH de 100 µM en metanol; la inhibición de radical DPPH* fue determinado por la reacción de 25 uL de la muestra con 975 µL de la solución de DPPH (100 µM) en una cubeta de poliestireno (1 cm

x 1 cm x 4,5 cm) el cual fue registrado a una longitud de onda de 515 nm usando un espectrofotómetro (Genesys 6 UV/VIS) a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos. Para la obtención del parámetro IC₅₀, fueron ploteados las concentraciones Vs. los porcentajes de inhibición. Para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

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

A_{control} : absorbancia del radical DPPH

A_{muestra} : absorbancia de la muestra

3.5.3.2. Capacidad antioxidante frente al radical peroxílo

Se realizó mediante el método reportado por BARTOSZ *et al.* (1998).

Para generar el radical peroxílo se mezcló en una proporción de 1:1:8 (v/v/v) de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS) 2,25 mM, 2,2-azobis (2-amidopropano) hidrocloreuro (ABAP) 20 mM y solución buffer fosfato (PBS) pH 7,4 respectivamente, todos ellos procedentes de Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA) y se incubó a 70 °C en baño maría por 20 minutos. Luego se dejó enfriar sobre hielo durante 5-10 minutos; la inhibición del radical peroxílo fue determinado por la reacción de 10 µL de muestra (extracto acuoso o metanólico) con 990 µL del radical peroxílo. La disminución de la absorbancia fue determinada a 414 nm con un espectrofotómetro (Genesys 6 Uv/Vis), durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos. Para el cálculo del porcentaje

de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

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

A_{control} : absorbancia del radical DPPH

A_{muestra} : absorbancia de la muestra

3.5.4. Determinación del contenido total de polifenoles

Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965., citado por SAUCIER y WATERHOUSE, 1999).

Se preparó las siguientes soluciones stocks en tubos de capacidad de 30 ml: Na_2CO_3 al 20 % en H_2O , (+)-Catequina en metanol 0.1 M. Para construir la curva estándar de catequina se preparó las siguientes concentraciones (0; 0,3; 1; 3; 10; 30 y 100 μM) a partir de la solución stock (ANEXO I. Figura 9); se agregó en tubos de vidrio de capacidad de 10 ml 1,58 ml de agua destilada desionizada (H_2O) y 20 μL del estándar (catequina), usando micropipetas de capacidad 100-1000 μL , 10-100 μL marca eppendorf y recipientes con punta de capacidad 10-1000 μL y se agitó ligeramente. Para el caso de las muestras se diluyó adecuadamente de manera que la absorbancia esté dentro del rango de la curva estándar. Para el caso del blanco se agregó 20 μL de agua destilada desionizada, 100 μL de solución de fenol Folin-Ciocalteu (Sigma chemical Co.) y se agitó ligeramente, se incubó por 1 minuto a temperatura de ambiente, se agregó 300 μL de Na_2CO_3 al 20 %, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente; finalmente se registró la absorbancia por

espectrofotómetro (marca Genesys 6 UV/VIS) a 700 nm, usando cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm).

3.5.5. Cuantificación de epicatequina por HPLC

La cuantificación de epicatequina se realizó por el método descrito por DING *et al.* (1999).

Se preparó la fase móvil constituida por agua/metanol/ácido acético en una proporción de 70:30:0.1 (v/v/v); luego se preparó la solución stock (estándar) de epicatequina de 2 mM en metanol grado HPLC (Merck KGaA) y se diluyó para obtener las concentraciones de 10; 20; 40; 80 y 160 μ M para construir la curva estándar (ANEXO I. Figura 10); inyectando 20 μ L de cada concentración y realizó la lectura durante 15 minutos a 270 nm, con un flujo de 1,0 ml/min; para el caso de las muestras se diluyó adecuadamente usando metanol grado HPLC y se homogenizó, luego lo filtramos usando un filtro de membrana de polipropileno de 0,2 μ m para después realizar la lectura en las mismas condiciones que se hizo para la curva estándar por triplicado (n=3).

3.5.5.1. Equipo de HPLC

El equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es modelo LC-10AVP (Shimadzu Scientific. MD, USA.). Equipado con: Bomba modelo LC – 10ATVP, Columna cromatográfica C18-110R Gemini, Horno de

columna modelo CTO – 10ASVP Detector UV-Vis modelo SPD – 10AVVP, Controlador Modelo SCL – 10AVP, Software de interfase CLASS – VP.

3.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un Diseño de Bloques Completamente al Azar con un arreglo factorial de $2A \times 2B$, las mismas que se muestran en el Cuadro 4. Para comparar la diferencia entre promedios se utilizó la prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 4. Análisis de varianza para los análisis realizados de *Trema micrhanta* (L.)Blume.

Fuente de variación	Grados de libertad
Bloques	$r-1 = 1$
Tipo de droga(A)	$a-1 = 1$
Tipo de solvente (B)	$b-1 = 1$
A * B	$(a-1)*(b-1) = 1$
Error experimental	$(a*b-1)(r-1) = 3$
Total	7

3.6.1. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Bloque} + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde :

Y_{ijk} : Variable respuesta u observación

μ : Media poblacional

Bloque : Efecto verdadero del k – ésimo bloque

A_i : Efecto del i – ésimo tipo de droga

B_j : Efecto del j – ésimo tipo de solvente

$(A*B)_{ij}$: Efecto de la interacción del i- ésimo nivel del factor tipo de droga con el j – ésimo nivel del factor tipo de solvente

E_{ijk} : Error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peróxido

4.1.1. Capacidad antioxidante frente al radical DPPH*

La capacidad antioxidante expresado como IC₅₀, varía ampliamente en las diversas partes de la planta evaluada, tipo de solvente y la zona de procedencia.

La prueba de Duncan para los resultados obtenidos se puede observar que la mayor capacidad antioxidante (Cuadro 5) presenta las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en la corteza y extracto acuoso siendo altamente significativa ($P < 0,01$) $40,132 \pm 0,153$ µg/ml, superando a todas las demás combinaciones y seguido por la misma zona de procedencia de las muestras, en la corteza, extracto metanólico siendo $42,291 \pm 0,207$ µg/ml y presentando la menor capacidad antioxidante fue la combinación correspondiente a las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en hoja y extracto metanólico siendo $112,711 \pm 0,497$ µg/ml.

La capacidad antioxidante, de los compuestos fenólicos, está relacionada con la presencia de los grupos hidroxilos (OH), a su capacidad de

donar H* y a sus propiedades fisicoquímicos (VAN ACKER *et al.*, 1996; COLLANTES *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2002; TROMELIN *et al.*, 2003).

Los altos valores de IC₅₀ obtenidos mediante las dos formas de extracción, dos tipos de droga vegetal y dos zonas de procedencia de las muestras (Cuadro 5), 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* (Kunth) McVaugh "camu camu" IC₅₀ = 46,20±0,10 µg/ml. Además, RAMOS (2002), reporta un IC₅₀ = 32,43±0,389 µg/ml en hoja de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze "té verde"; mientras que ESTELO (2003) reporta un IC₅₀ = 138,831 y 1454,284 µg/ml en la "chanca piedra" (*Phyllanthus urinaria* L. y *P. niruri* L.) en las dos especies estudiadas.

Cuadro 5. Capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria frente al radical DPPH*.

Zona	Tipo de droga	Tipo de solvente	Promedios ¹
Tulumayo	Hoja	Agua	53,420±0,170 ^e
	Corteza		40,132±0,153 ^a
	Hoja	Metanol	112,711±0,497 ^h
	Corteza		42,291±0,207 ^b
La Divisoria	Hoja	Agua	57,860±0,218 ^f
	Corteza		46,404±0,245 ^d
	Hoja	Metanol	110,906±0,503 ^g
	Corteza		43,992 ±0,204 ^c

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a-g, representan diferencia estadística entre promedios evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

4.1.2. Capacidad antioxidante frente al radical peroxilo

La prueba de Duncan para la capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilos (Cuadro 6) presentó las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en corteza y extracto metanólico siendo $10,472 \pm 0,071$ $\mu\text{g/ml}$, superando a todas las demás combinaciones ($P < 0,01$) y seguido por la misma zona en la corteza, en extracto acuoso siendo $13,062 \pm 0,054$ $\mu\text{g/ml}$ y presentando la menor capacidad antioxidante las muestras procedentes de la zona de Divisoria, en la hoja en extracto metanólico y la zona de Divisoria, hoja en extracto metanólico siendo $41,577 \pm 0,209$ y $41,355 \pm 0,154$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente no existiendo diferencia estadística entre ellos ($P < 0,01$).

SANDOVAL *et al.* (2001) evaluaron la actividad antioxidante de *Lepidium mayenii* Walp. (maca), frente al radical peroxilo obteniendo un valor de 430 $\mu\text{g/ml}$ y en *Myrciaria dubia* (Kunth)McVaugh (camu camu) en extractos acuosos de cáscara en estado maduro frente al radical peroxilo con un valor de 8,30 $\mu\text{g/ml}$ (VILLANUEVA, 2003), destacándose una mayor eficiencia de las muestras de *Trema micrantha* (L.)Blume, comparadas con *Lepidium mayenii* Walp., pero inferior al obtenido en *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, indicando que las muestras en experimento contribuyeron a la disminución de la formación de radicales peroxilo (DEAN *et al.*, 1993; SANDOVAL *et al.*, 2001).

Cuadro 6. Capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria frente al radical peroxílo.

Zona	Tipo de droga	Tipo de solvente	Promedios ¹
Tulumayo	Hoja	Agua	18,873±0,072 ^e
	Corteza		13,062±0,054 ^b
	Hoja	Metanol	41,355±0,154 ^g
	Corteza		10,472±0,071 ^a
La Divisoria	Hoja	Agua	20,118±0,066 ^f
	Corteza		14,975±0,057 ^d
	Hoja	Metanol	41,577±0,209 ^g
	Corteza		13,496±0,038 ^c

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a-f, representan diferencia estadística entre promedios evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

4.2. Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles, varía ampliamente en las diversas partes de la planta evaluada, tipo de extracto y la zona de procedencia.

Según los resultados obtenidos se puede observar que el mayor contenido de polifenoles totales (Cuadro 7) presentó las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en la corteza y extracto metanólico siendo $169,377 \pm 3,473$ mg de catequina equivalente por gramo de muestra (mgCATE/g) superando a todas las demás combinaciones ($P < 0,01$) y no existiendo diferencia estadística entre las combinaciones de la zona de Tulumayo, en la corteza, en extracto acuoso y las muestras procedentes de la

zona de La Divisoria, en corteza, en extracto metanólico siendo $134,606 \pm 1,321$ y $130,154 \pm 1,519$ mgCATE/g respectivamente.

Así mismo, ESTRELLA (2002) determinó el contenido de polifenoles en *Aloysia tripillia* (L'Hér.) "cedrón" que obtuvo $2,44 \pm 0,05$ mgAGE/g peso fresco. ESTELO (2003) determinó el contenido de polifenoles en dos especies de "chanca piedra", obteniendo para *Phyllanthus urinaria* L. de $7,32 \pm 0,05$ mgAGE/g y *P. niruri* L. de $3,010 \pm 0,05$ mgAGE/g muestra seca. DAZA (2005) determinó el contenido de polifenoles de *Calycophyllum 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 $0,3185 \pm 0,0176$ mg AGE/g). MURILLO *et al.* (2007) determinó el contenido de polifenoles de *Bauhinia kalbreyeri* Harms, realizado por las dos formas de extracción en hojas y corteza (etanólico con 26.02 mg AGE/g y 8,4 mg AGE/g; agua (decocción) con 23,19 mgAGE/g y 18,47 mgAGE/g respectivamente), con estos resultados y haciendo las comparaciones con el contenido de polifenoles de *Trema micrantha* (L.)Blume., realizado por dos formas de extracción para las muestras procedentes de la zona de Tulumayo y la Divisoria (Cuadro 7), podemos manifestar que *Trema micrantha* (L.)Blume, presenta el mayor contenido de polifenoles que las especies antes indicadas.

Cuadro 7. Contenido de polifenoles totales expresado en mgCATE/g de materia seca en extractos acuosos y metanólicos de hojas y corteza de la zona de Tulumayo y La Divisoria.

Zona	Tipo de droga	Tipo de solvente	Promedios ¹
Tulumayo	Hoja	Agua	106,027±1,067 ^c
	Corteza		130,154±1,519 ^b
	Hoja	Metanol	73,578±1,536 ^e
	Corteza		169,377±3,473 ^a
La Divisoria	Hoja	Agua	92,222±0,865 ^d
	Corteza		107,446±1,452 ^c
	Hoja	Metanol	62,063±1,637 ^f
	Corteza		134,606±1,321 ^b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a-f, representan diferencia estadística entre promedios evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

4.3. Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxílo respecto al tipo de droga

El tipo de droga tuvo un influencia altamente significativa ($P < 0,01$) en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxílo demostrando que el mejor tipo de droga vegetal respecto a las parámetros evaluados es la corteza (ANEXO II. Cuadros 10; 14; 18) y Figura 5.

La prueba de Duncan para el tipo de droga vegetal muestra que en el contenido de polifenoles totales la corteza (135,396±2.924 mgCATE/g) es superior a las hojas (Figura 5), en cuanto a la capacidad antioxidante expresados como IC₅₀ presentó un mayor valor la corteza respecto a la hoja

frente al radical DPPH* y peróxido con valores de $43,205 \pm 4,759$ y $13,001 \pm 0,275$ ug/ml respectivamente ($P < 0,01$), como se muestra en la Figura 5 (ANEXO II. Cuadros 10; 14), esto posiblemente debido a que la corteza posee mayor cantidad de compuestos fenólicos y a la naturaleza de actuar como parte protectora de factores externos que pueden dañar a la planta (FENGEL y WEGENER, 1984; FOO *et al.*, 1997; GHASEMPOUR *et al.*, 1998; GARCÍA, 2004).

El que la corteza presente mayor contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peróxido, probablemente se deba a que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos, disponibilidad y habilidad del grupo hidroxilo en su composición química. OKAWA *et al.* (2001) reporta que el número de grupos hidroxilo no siempre es importante cuando se compara la capacidad antioxidante sino la posición del grupo hidroxilo puede ser más importante para reducir el radical DPPH* o peróxido. HU y KITTS (2000), reportan que la conjugación extendida y un gran número de grupos hidroxilo en una estructura pueden ser una de las causas de su poder reductor y gran potencial para donar radicales hidrógeno a los radicales libres.

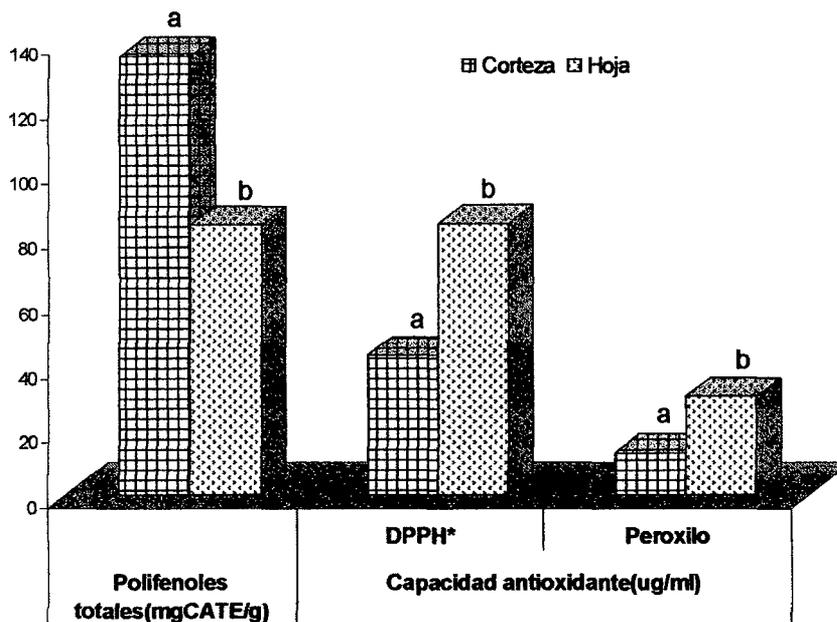


Figura 5. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC_{50} (ug/ml) frente al radical DPPH* y peróxido respecto al factor tipo de droga. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (NS) dentro del mismo grupo. Prueba de Duncan ($P < 0,01$).

4.4. Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peróxido respecto al factor tipo de solvente

El tipo de solvente utilizado respecto al contenido de polifenoles totales no existió diferencia estadística ($P > 0,01$), pero en la capacidad antioxidante tuvo una influencia altamente significativa ($P < 0,01$) frente al radical DPPH* y peróxido respecto a los parámetros evaluados (ANEXO II. Cuadros 11; 15; 19) respectivamente y Figura 6.

La prueba de Duncan para el tipo de solvente muestra que en el contenido de polifenoles totales el metanol es superior al agua con un valor de

109,906±2,376 mgCATE/g (Figura 6), pero respecto a la capacidad antioxidante expresados en función del IC₅₀ se determinó que el mejor tipo de solvente en la extracción fue el agua a 95 °C como se muestra en la Figura 6 frente al radical DPPH* y peroxílo con valores de 49,454±1,146 y 16,757±0,483 ug/ml respectivamente ($P<0,01$). La diferencia del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, realizado por las dos formas de extracción una por maceración con metanol y otra por infusión en agua a 95 °C, está influenciada por las propiedades fisicoquímicas de las diferentes estructuras de los polifenoles, la polaridad del solvente usado y el tiempo de extracción (GEANKUPLIS, 1982; SINGH y HELDMAN, 1998; TROMELIN, 2003).

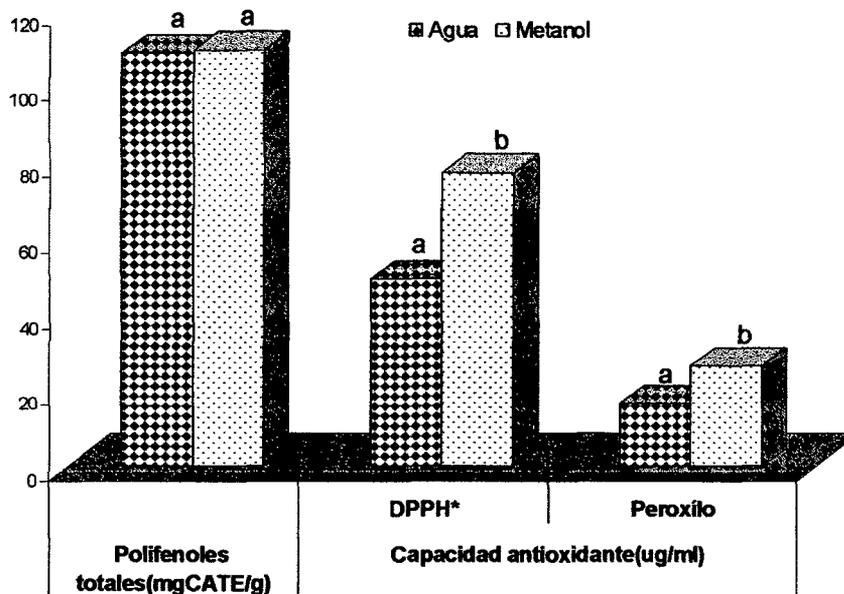


Figura 6. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH* y peroxílo respecto al tipo de solvente. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (NS) dentro del mismo grupo. Prueba de Duncan ($P<0,01$).

4.5. Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxilo respecto a la zona de procedencia de las muestras

La zona de procedencia de las muestras tuvo una influencia altamente significativa ($P<0,01$) en el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxilo (ANEXO II. Cuadros 12; 16; 20) y Figura 7.

La prueba de Duncan para la zona de procedencia de las muestras respecto a los parámetros evaluados se observa que, el mayor contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante frente al radical DPPH* y peroxilo fueron las muestras procedentes de la zona de Tulumayo superando estadísticamente a la zona de La Divisoria ($P<0,01$) con valores de $119,784\pm 5,996$ mgCATE/g, $62,139\pm 5,010$ ug/ml, $20,941\pm 2,058$ ug/ml respectivamente como muestra la Figura 7, esto posiblemente se deba a la altitud (M.S.N.M) de la zona, al contenido de minerales y nutrientes existentes en suelo, al microclima, humedad relativa, radiación solar, etc. (TISDALE, 1991; LU *et al.*, 2001). PIZARRO (2001) evaluó la capacidad antioxidante del látex de *Croton draconoides* Müll. Arg. frente al radical DPPH* en tres unidades fisiográficas tales como terraza alta, colina baja y montaña alta, siendo el mejor lugar terraza alta con un valor IC_{50} (ug/ml) de 13.33 ± 0.4 siendo esta tendencia similar a lo determinado en la presente investigación ya que la zona de Tulumayo pertenece a una clasificación fisiográfica de terraza baja, mientras que La Divisoria pertenece a una unidad fisiográfica de montaña.

DAUBENMIRE (1990) menciona que la composición del aire atmosférico cambia sus proporciones sustancialmente sólo con la altitud, sabiendo que en razón directa de ella disminuye el contenido de oxígeno y que esta situación va siendo progresivamente limitadora para los organismos animales y vegetales. Por otro lado KEITH (1994) manifiesta que, el rendimiento que alcance una planta ya sea en frutos, resina, hojas, etc. depende de una serie de factores, uno son inherentes al vegetal mismo y están relacionadas con su potencial genético, otros son de tipo externo y están relacionados con las características del suelo, las condiciones meteorológicas y la técnica agronómica.

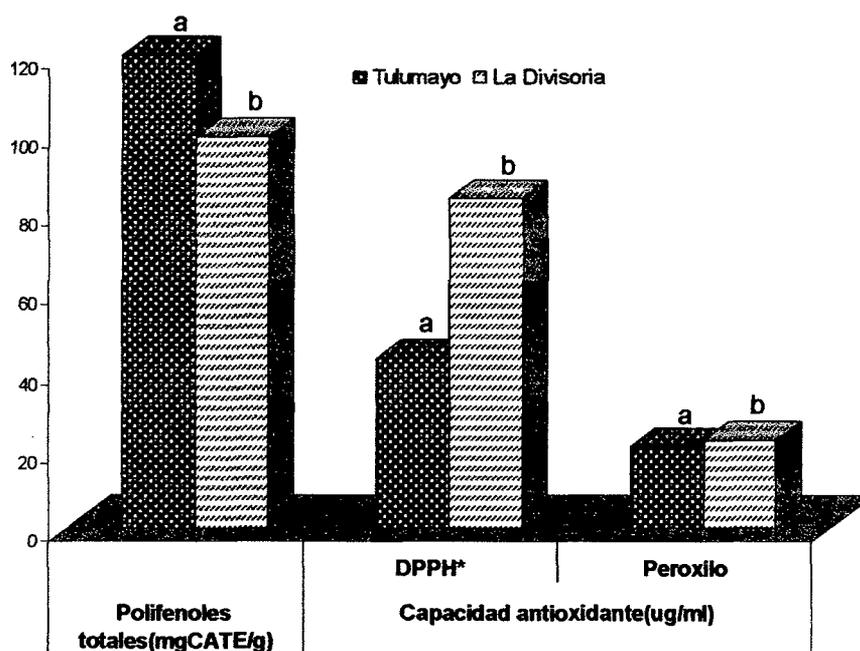


Figura 7. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g), capacidad antioxidante expresado como IC_{50} (ug/ml) frente al radical DPPH* y peróxido respecto a la zona. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (NS) dentro del mismo grupo. Prueba de Duncan ($P < 0,01$).

4.6. Cuantificación de epicatequina (EC) de *Trema micrantha* (L.)Blume por HPLC

Los resultados obtenidos en la determinación del contenido de epicatequina se presenta en el Cuadro 8, este resultado es derivado tomando como referencia el Cuadro 7, sobre la determinación del contenido de polifenoles totales. El contenido de epicatequina en extracto metanólico de corteza fue $1,089 \pm 0,087$ mg/g de muestra seca (Cuadro 8), es por ello que posiblemente sea uno de los motivos por el cual tiene una buena capacidad antioxidante. MELCHOR (2002) determinó el contenido de epicatequina en *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (te verde) con un valor de $28,37 \pm 0,92$ mg/g de materia seca siendo este valor superior al presente trabajo de investigación, sin embargo superior a *Lepidium meyenii* Walp. con un valor de $0,17 \pm 0,009$ mg/g reportado por SANDOVAL *et al.* (2001).

En la Figura 8, se reporta un cromatograma representativo de la identificación de la epicatequina en *Trema micrantha* (L.)Blume.

Cuadro 8. Contenido de epicatequina (mg/g) de *Trema micrantha* (L.)Blume

Zona	Tipo de droga	Tipo de extracto	Promedio ¹
Tulumayo	Corteza	Metanólico	$1,089 \pm 0,087$

¹El valor representan el promedio \pm ES de tres replicas(n=3).

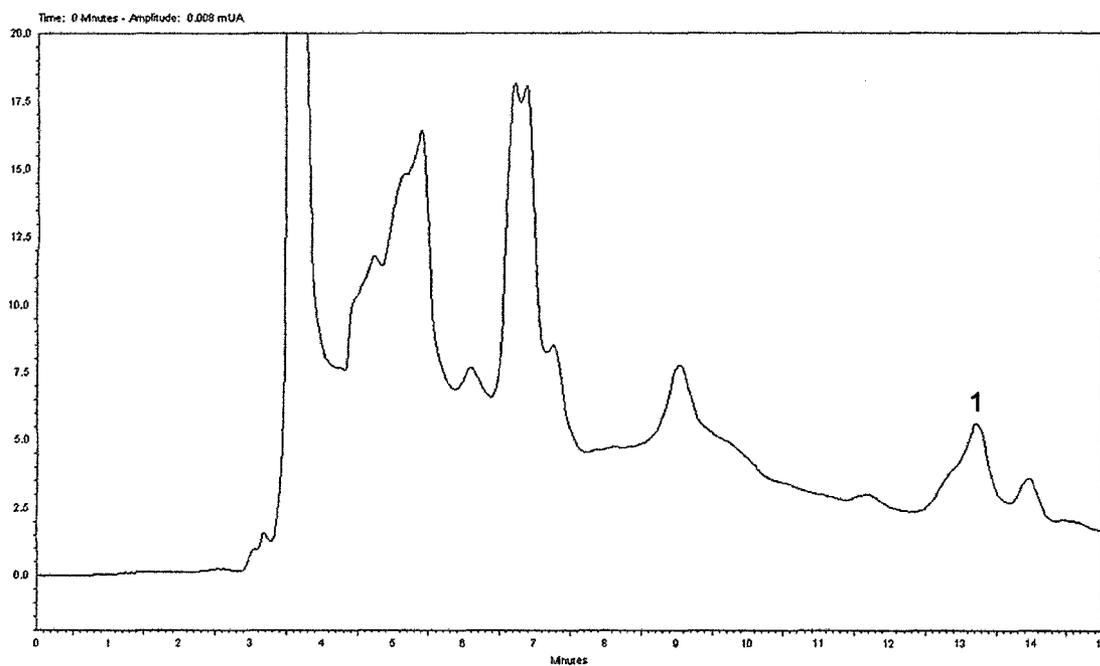


Figura 8. Cromatograma de la identificación de epicatequina (1) en *Trema micrantha* (L.) Blume

V. CONCLUSIONES

1. La mayor capacidad antioxidante (IC_{50}) presentó las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en la corteza y extracto acuoso con un valor de $40,132 \pm 0,153 \mu\text{g/ml}$ frente al radical DPPH* y frente la radical peroxílo fue las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en la corteza y en extracto metanólico con un valor de $10,472 \pm 0,071 \mu\text{g/ml}$.
2. El mayor valor en la capacidad antioxidante (IC_{50}) respecto al tipo de droga y tipo de solvente fue la corteza y el agua a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ con valores de $43,205 \pm 4,759$ y $49,454 \pm 1,146 \text{ ug/ml}$ respectivamente frente al radical DPPH*. El mayor valor en la capacidad antioxidante (IC_{50}) respecto al tipo de droga y tipo de solvente fue la corteza y el agua a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ con valores de $13,001 \pm 0,275$ y $16,757 \pm 2,058 \text{ ug/ml}$ respectivamente frente al radical peroxílo
3. El mayor contenido de polifenoles totales presentó las muestras procedentes de la zona de Tulumayo, en corteza y extracto metanólico siendo $169,377 \pm 3,473 \text{ mgCATE/g}$ de muestra. El mayor valor en el contenido de polifenoles totales respecto al tipo de droga vegetal y tipo solvente fue la corteza y metanol con valores de $135,396 \pm 3,881$ y $109,906 \pm 7,514 \text{ mgCATE/g}$ respectivamente.

4. El mayor valor respecto a los parámetros evaluados tales como polifenoles totales, capacidad antioxidante frente la radical DPPH* y peroxílo fueron las drogas vegetales procedentes de la zona de Tulumayo con valores de $119,784 \pm 5,996$ mgCATE/g, $20,941 \pm 2,058$ $\mu\text{g/ml}$ y $62,139 \pm 5,010$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

5. El contenido de epicatequina (EC) fue de $1,089 \pm 0,087$ mg/g.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antioxidante de *Trema micrantha* (L.) Blume., usando otros tipos de radicales, como son: peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, desoxirribosa, etc.
2. Establecer modelos in vivo para evaluar la actividad antioxidante de la corteza de *Trema micrantha* (L.) Blume.
3. Evaluar el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante, en las diferentes especies del género *Trema*.
4. Continuar este tipo de trabajo en otras especies forestales propias de la zona.

**DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND TOTAL
POLYPHENOLS CONTENT OF AQUEOUS AND METANOLIC EXTRACTS
OF LEAVES AND BARK FROM *Trema micrantha* (L.) Blume.**

ABSTRACT

Trema micrantha (L) Blume; it is a medical plant of the Amazonia used in the treatment of the dry cough, nasal decongestant, remedy against diseases such as: measles, sores, astringent, anti-syphilitic and anti-rheumatic. Also, the extracts of this plant showed analgesic and antiinflammatory activity. The purpose of the present study was to evaluate the content of total polyphenols, antioxidant capacity in the aqueous and metanolic extracts of the leaves and bark; coming from two zones such as; Tulumayo and the Divisoria, finally to quantify the content of the epicatechin for HPLC. The total polyphenols were determined for the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant capacity was determined by the inhibition of 1,1 diphenyl-2-picryl-hidrazyl (DPPH*), peroxy radicals and the quantification of the epicatechin were determined by HPLC. The content of total polyphenols was $169,377 \pm 3,473$ mg/g expressed as catechin equivalently in metanolic extract of bark ($P < 0,01$). The IC_{50} in the capacity of radicals seize DPPH* and peroxy radicals were $40,132 \pm 0,153$ and $10,47 \pm 0,071$ ug/ml ($P < 0,01$) in aqueous extract bark and in metanolic extract of bark respectively and the content of the epicatechin was of $1,089 \pm 0,087$ mg/g of dry sample. In conclusion our results indicate that *Trema micrantha* (L.) Blume., possesses a high contained of total polyphenols, as well as good antioxidant capacity.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUROMA, O. 2003. Method Logical Considerations for Characterizing Potential Antioxidant Actions of Bioactive Components in Plant Foods. *Mutation Research*. 523 – 524: 9-20.
- AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494. ISSN 0716-1840:161-172.
- BALENTINE, D.A., HARBOWY, M.E., GRAHAM, H.N. 1998. Tea: the Plant and its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage in Caffeine, Ed. G. Spiller.
- BARBERA, R., TROVATO, A., RAPISARDA, A., RAGUSA, S. 1992. Analgesic and Anti-inflammatory activity of *Trema guianeense* (Schum. Et Thom) Ficalho and *Trema micrantha* (L) Blume. Extracts in rodents. *J. Phytotherapy Research*. 6:146-148.
- BARTOSZ, G., JANASZEWSKA, A., ERTEL, D., BARTOSZ, M. 1998. Simple Determination of Peroxyl Radical Trapping Capacity. *J. Biochem. Mol. BIOL. Int.* 46:519-528.

- BELITZ y GROSCH. 1988. Química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- BLOIS, M. 1958. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*. 181 (4617): 1199 -1200.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. 1995. Use of a Free Radicals Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Academy Press Limited*. 28: 25 – 30
- CHYU, K.Y., BABIDGE, S.M., ZHAO, X., DANDILLAYA, R., RIETVELD, A.G., YANO, J., DIMAYUGA, P., CERCEK, B., SHAH, P.K. 2004. Differential Effects of Green Tea–Derived Catechin on Developing Versus Established Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Null Mice. *J. Circulation*, 109: 2448 - 2453.
- 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.
- DAZA, E. 2004. Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante en *Calycophyllum spruceanum* (Bent.)Hook. F. ex Schum “capirona”. Tesis Ing. en Recursos Naturales Renovables-Mención Forestal. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 71 p.

- DEAN, R., GIESEG, S., DAVIES, M. 1993. Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18:437- 441.
- DING, M., YANG, H., XIAO, S. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 849: 637–640.
- DAUBENMIRE, R. 1990. *Ecología vegetal, Tratado de autoecología de plantas*. 3ra. Ed. Edit. Limusa S.A. México. 496 p.
- 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.
- ESPIN, J., SOLER-RIVAS, C., WICHERS, H., GARCÍA-VIGUERA, C. 2000. Anthocyanin Based Colorants: A New Source of Antirradical Activity for Foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1588 – 1592.
- ESTRELLA, S. 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.

- FOO, L. Y., LU, Y., M^CNABB, W.C., WAGHORN, G., ULYATT, M. J. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *J. Phytochemistry*. 45:1689
- FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L., TEISSEGRE, P. L. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *J. Agric Food Chem.*43:890-894.
- FRIMMEL, A. E., BILHEIRO, J. L., SARRAGIOTTO, M.H., VIDOTTI G.J. 1999. Vitexin, Paprazine and Terpenoids from *Trema micrantha* (L.) Blume. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 495-496.
- GARCÍA, D. E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(1): 1-12.
- GEANKUPLIS, C. 1982. *Proceso de Transporte y Operaciones Unitarias*. Traducido del Inglés por Gómez Eroles Antonio, Ing. Químico PhD. Edit. Continental. 757p.
- GHASEMPOUR, H.R., ANDERSON, E.M., GIANELLO, R.D., GAFF, D.F. 1998. Growth inhibitor effects on protoplasmic drought tolerance and protein synthesis in leaf cells of the resurrection grass *Sporobolus stapfianus*. In: *Plant growth regulation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 179 p.

- HARBORNE, J. B., MABRY, T. J., MABRY, H. 1982. The Flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hill Ltd. London New York. 745 p.
- HAMMERSTONE, J.F., LAZARUS, S.A., SCHMITZ, H.H. 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr*, 130, 2086S -2092S.
- HERTOG, M.; HOLLMAN, P., VAN DI PUTTE, B. 1993. Content of Potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions. Wines a fruit juices. *J. Agric. and Food. Chemistry*. 41: 1242-1246
- HERNANDEZ, M., PRIETO, E. 1999. Plantas que contienen polifenoles. antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cubana Invest. Biomed*. 18(1):12-14.
- HU, C., KITTS, D. 2000. Studies on the antioxidant activity of echinaceae root extract. *J. Agrig. Food Chem*. 48: 1466-1472.
- HU, B., PAN, C., SUN, Y., HOU, Z., YE, H., HU, B., ZENG, X . 2008. Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (16): 7451–7458.
- HIRAMATSU, M., YUSHIKAWA, T., INUVE, M. 1997. Food and Free Radical. Plenum Press. New York and London. 165 p.

- KATIYAR, S., ELMETS, C.A., KATIYAR, S.K. 2007. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *J. Nutr. Biochem.* 18(5): 287-96.
- KEIT, L. 1994. *Ecología, Ciencia y política medio ambiental*. McGraw-Hill. Colombia. 251 p.
- KUMPULAINEN, J. T., SALONEN, J. T. 1999. *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. The Royal Society of Chemistry. UK: 178- 187.
- 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.
- LORENZI, H. 2000. *Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. Nova Odessa: Plantarum, 623p.
- LOCK, O. 1994. *Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontífice Universidad Católica del Perú. Lima-Perú. 300 p.
- LU, Y. P., LOU, Y., LIN, Y., SHII, W., HUANG, M., YANG, C.H., CONNEY, A. 2001. Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet

b. Light (High-risk mice): relationship to decreased tissue fat . J. Cancer res, 61: 5002 - 5009.

MELCHOR, V. 2002. Procesamiento tecnológico para la obtención de té verde (Camelia sinensis): Determinación de la Actividad Antioxidante y Cuantificación de Flavonoles por HPLC. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 66 p.

MARTINEZ, V., PERIAGO, M. J., ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos latinoamericanos de nutrición (ALAN), 50(1): 5-18.

MEJIA, K., RENGIFO, E. 2000. Plantas medicinales de uso popular en la amazonía peruana. Agencia española de cooperación internacional (AECI) y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). 2da. Edición. 285 p.

MITTAL, A., PATE, M.S., WYLIE, R.C., TOLLEFSBOL, T.O., KATIYAR, S.K. 2004. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and inducing apoptosis. Int. J. Oncol. 24:703–710.

MOSTACERO, J. MEJIA, F. y GAMARRA T. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Vol. I. Ed. Normas Legales S.A.C. 667 p.

- MUÑOZ, V., SAUVAIN, M., BOURDY, G., CALLAPA, J., ROJAS, I., VARGAS, L., TAE, A., DEHARO, E. 2000. The search of natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. *J. Ethnopharmacology*, 69: 139 - 155.
- MURILLO, E., LOMBO, O., TIQUE, M., MÉNDEZ, M. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. (FABACEAE). *Información Tecnológica*, 18(6): 65 - 74.
- MURASE, T., HARAMIZU, S., OTA, N., HASE, T. 2008. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R281-R289.
- OKAWA, M., KINJO, J., HOHARA, T., ONO, M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of de flavonoids obtained from some medicinal plants. *J. Biol. Pharm. Bull.* 24:1202-1205.
- PARK, D. S., JUSTIN, A., COATS., GRODNITZKY, R. 2002. QSAR Evaluation of Cyanohydrins Fumigation Toxicity to House Fly (*Musca doméstica*) and Lesser Grain Borer (*Rhyzopertha dominica*). *J. Agric. Food Chem.* 50: 5617 – 5620.

- PIZARRO, J. 2001. Caracterización del látex de sangre de grado (*Croton draconoides* Muell. Arg) de árboles de diferentes pisos ecológicos. Tesis Ing. Industrias Alimentarias.. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria, Perú.87 p.
- POURMORAD, F, S., HOSSEINIMEHR, J., SHAHABIMAJD, N. 2003. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *J. Biotechnology*.5:1142-1145
- 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. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú. 121p.
- RUIDAVETS, J., TEISSEDRE, P., FERRIÈRES, J., CARANDO, S., BOUGARD, G., CABANIS, J. 2000. Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *J. Atherosclerosis*.153: 107 – 117.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *J.Trends in Plant Science*. 2:152-159
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F., MELCHOR, V., CONDEZO, L. A., LAO, J., MILLER, M. 2001. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *J. Food Chem*. 79: 207-213.

- SAUCIER, C., WATERHOUSE, A. 1999. Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*47:4491-4494.
- SCHROETER, H., HEISS, C., BALZER, J., KLEINBONGARD, P., KEEN, C.L., HOLLENBERG, N.K., SIES, H., KWIK-URIBE, C., SCHMITZ, H.H., KELM, M. 2006. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *J. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(24): 1024 -1029.
- SINGH, R., HELDMAN, D. 1998. *Introducción a la Ingeniería de Alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Impreso en España. 544p.
- SCHOENFELDER, T., MARCON, T., CITADINI-ZANETTE. 2006. Acute effect of *Trema micrantha* (ULMACEAE) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. *J. of Ethnopharmacology.*107: 456–459.
- TISDALE, M. 1991. *Fertilidad de suelos y fertilizantes*. Trad. por. Belash. Edit. Limusa S.A. México. 760 p.
- 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.

- TRAVERSO, S., ZLOTOWSKI, P., GERMER, M., FARIAS, C., DRIEMEIER, D. 2005. Spontaneous poisoning by *Trema micrantha* (Ulmaceae) in goats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(2): 207-210.
- 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.
- VENEREO, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31(2):126-133.
- 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. 125 p.
- YILDIRIM, A., MALVA, A., KARA, A. 2001. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 4083 – 4089.
- ZHENG, L. T., RYU, G. M., KWON, B. M., LEE, W. H., SUK, K. 2008. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. *J. Pharmacology*, 588(24): 106 -113.

VIII. ANEXOS

Anexo I

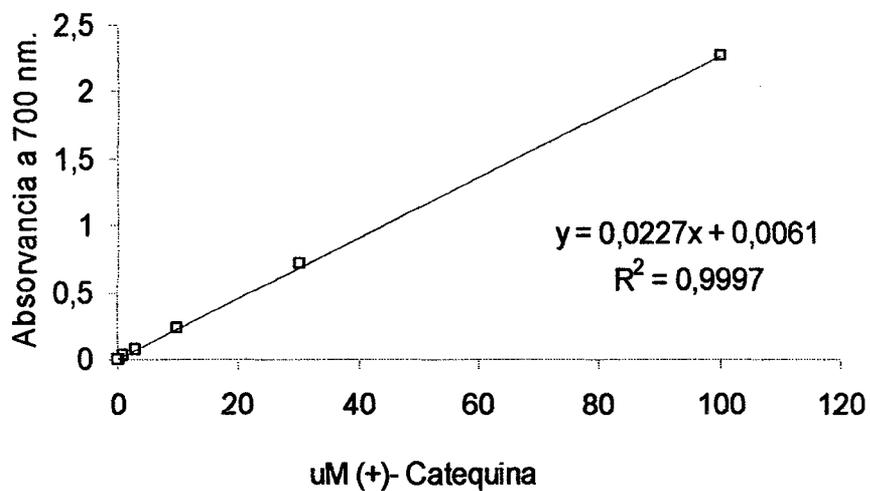


Figura 9. Curva patrón de catequina para la cuantificación de polifenoles totales

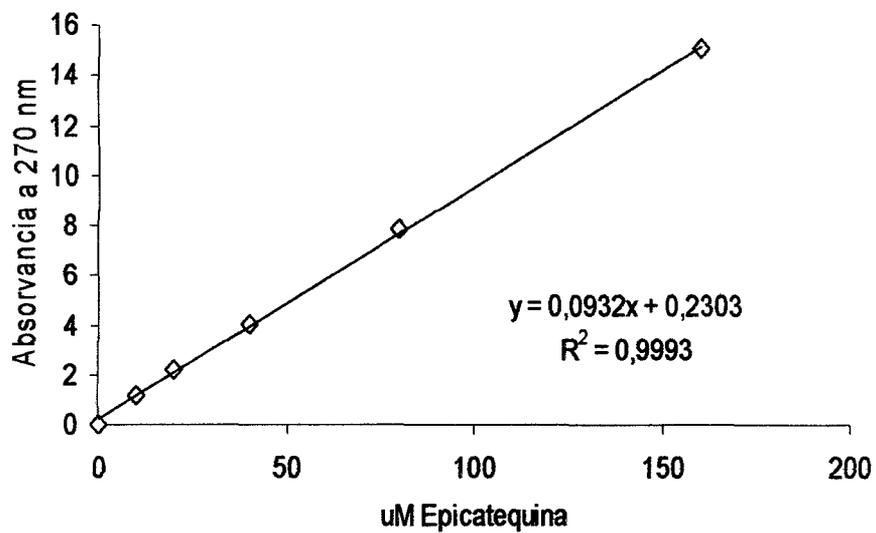


Figura 10. Curva patrón para la cuantificación de epicatequina

Anexo II

Cuadro 9. ANVA para la capacidad antioxidante frente al radical DPPH*

Fuentes de Variación	GL.	CM.	FC.	SIG.
Bloque	1	42,192	12,600	**
Tipo de droga (A)	1	9851,047	2941,894	**
Tipo de extracto (B)	1	4711,143	1406,925	**
A * B	1	4753,700	1419,634	**
Error experimental	3	3,349		
Total	7			

** : Altamente significativo

CV. : 2,88%

Cuadro 10. Prueba de Duncan para el tipo de droga en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*

Tipo de droga	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Corteza	43,205±4,759	a
Hoja	83,724±0,401	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de droga. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 11. Prueba de Duncan para el tipo de solvente en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*

Tipo de solvente	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Agua	49,454±1,146	a
Metanol	77,475±5,808	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de solvente. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 12. Prueba de Duncan para las zonas en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical DPPH*

Zona	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Tulumayo	62,139 ± 5,010	a
La Divisoria	64,790 ± 4,589	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre las zonas. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 13. ANVA para la capacidad antioxidante frente al radical peroxilo

Fuentes de Variación	GL.	CM.	FC.	SIG.
Bloque	1	15,376	42,867	**
Tipo de droga (A)	1	1833,221	5110,900	**
Tipo de extracto (B)	1	596,126	1661,961	**
A * B	1	864,336	2409,713	**
Error experimental	3	0,359		
Total	7			

** : Altamente significativo

CV. : 2,75%

Cuadro 14. Prueba de Duncan para el tipo de droga en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical peroxilo

Tipo de droga	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Corteza	13,001 ± 0,275	a
Hoja	30,481 ± 1,859	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de droga. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 15. Prueba de Duncan para el tipo de solvente en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical peroxilo

Tipo de solvente	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Agua	16,757±0,483	a
Metanol	26,725±2,499	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de solvente. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 16. Prueba de Duncan para las zonas en la capacidad antioxidante como IC₅₀ (ug/ml) frente al radical peroxilo

Zona	Promedios	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Tulumayo	20,941 ± 2,058	a
La Divisoria	22,541 ± 1,904	b

¹Los valores representan el promedio ± ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre las zonas. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 17. ANVA para el contenido total de polifenoles.

Fuentes de Variación	GL.	CM.	FC.	SIG.
Bloque	1	2571,009	63,897	**
Tipo de droga (A)	1	16175,330	402,007	**
Tipo de solvente (B)	1	5,336	0,133	NS
A * B	1	6239,623	155,074	**
Error experimental	3	40,236		
Total	7			

** : Altamente significativo

CV. : 5,79%

NS. : No significativo

Cuadro 18. Prueba de Duncan para el tipo de droga en el contenido total de polifenoles mgCATE/g de materia seca.

Tipo de droga	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Corteza	135,396±2,924	a
Hoja	83,473±3,881	b

¹Los valores representan el promedio \pm ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de droga. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 19. Prueba de Duncan para el tipo de solvente en el contenido de polifenoles totales mgCATE/g de materia seca.

Tipo de solvente	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Agua	109.906±2,376	a
Metanol	108.962±7,514	a

¹Los valores representan el promedio \pm ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre el tipo de solvente. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 20. Prueba de Duncan para las zonas en el contenido de polifenoles totales mgCATE/g de materia seca.

Zona	Promedios ¹	Duncan ($\alpha = 0,01$)
Tulumayo	119,784±5,996	a
La Divisoria	99,084±4,478	b

¹Los valores representan el promedio \pm ES. Las letras a,b, representan diferencia estadística entre las zonas. Evaluado mediante DBCA, prueba de Duncan ($P < 0,01$).

Anexo III

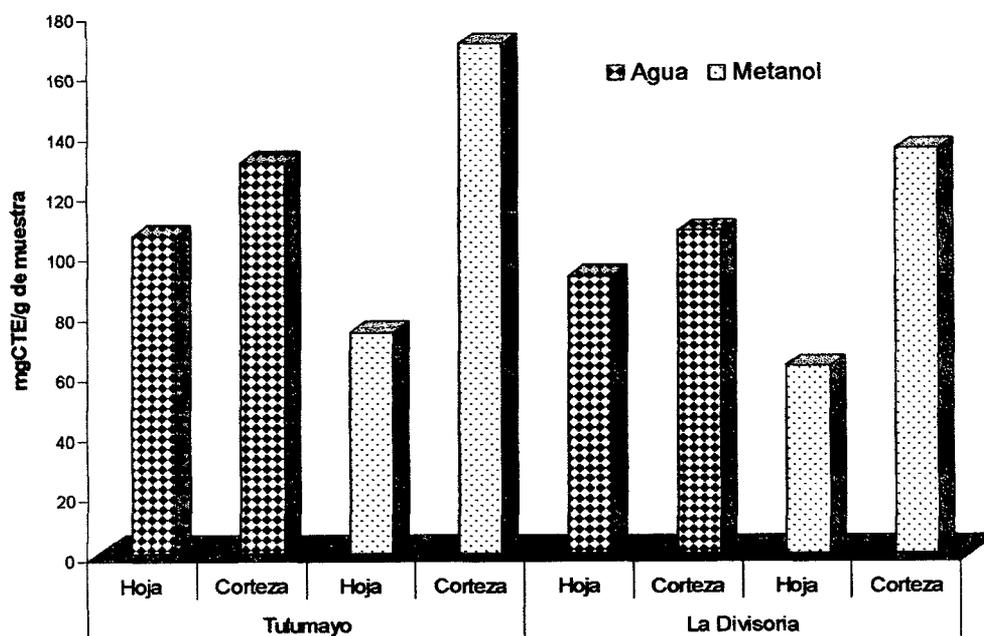


Figura 11. Contenido de polifenoles totales (mgCATE/g) de hojas y corteza usando como solvente agua y metanol de la zona de Tulumayo y La Divisoria.

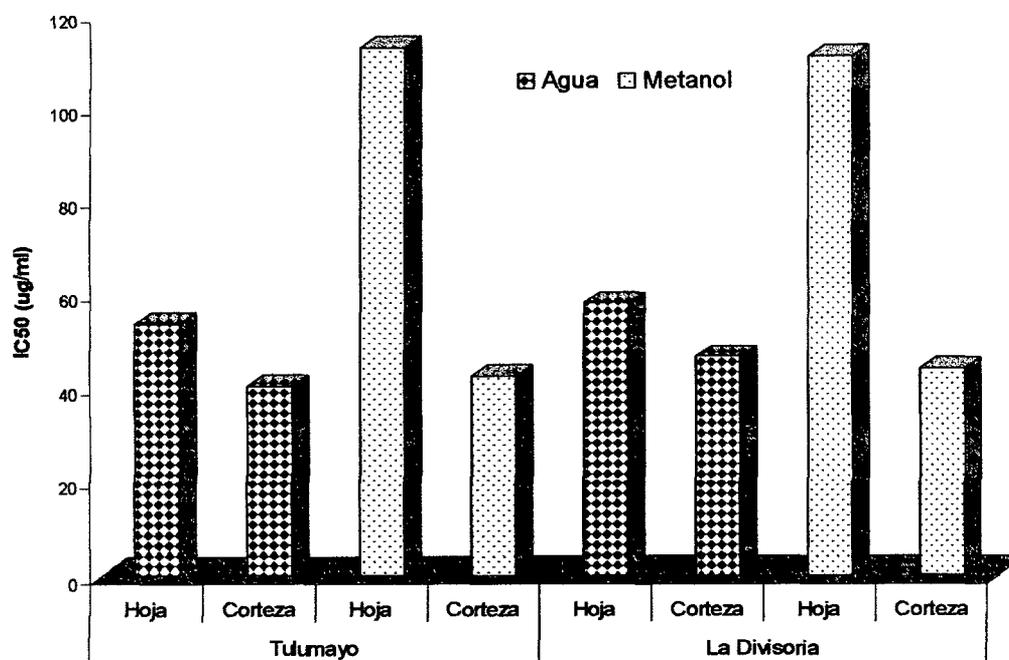


Figura 12. IC₅₀ (µg/ml) frente la radical DPPH* de hojas y corteza usando como solvente agua y metanol de la zona de Tulumayo y La Divisoria.

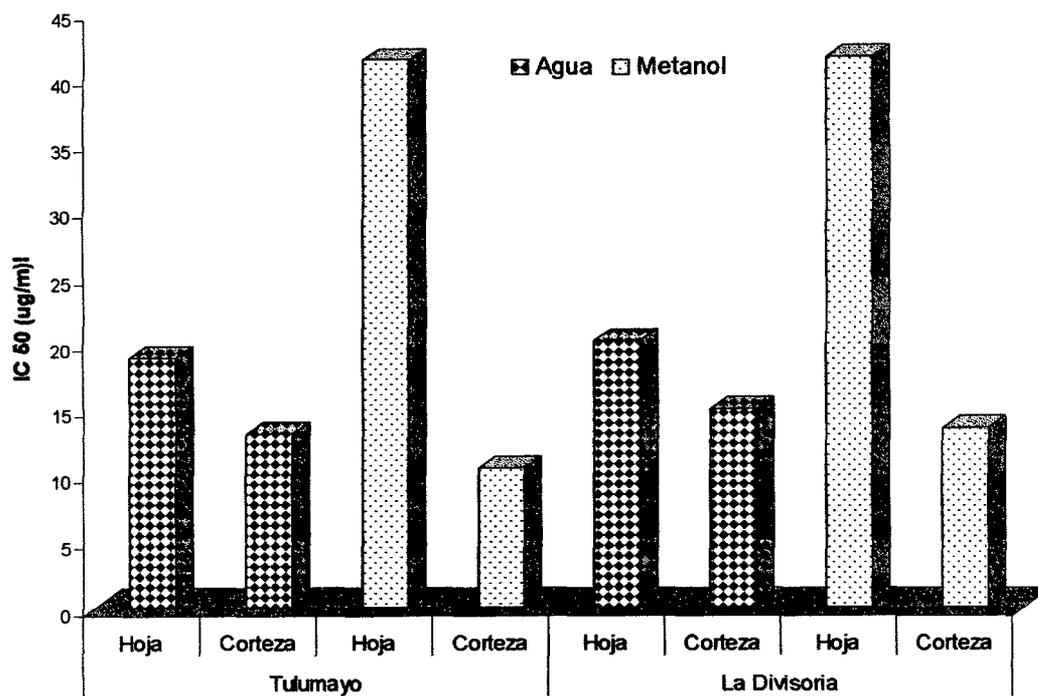


Figura 13. IC₅₀ (µg/ml) frente la radical peróxido de hojas y corteza usando dos solventes (agua y metanol) de la zona de Tulumayo y La Divisoria.

Anexo IV



Figura 14. Hojas y frutos de *Trema micrantha* (L.)Blume.



Figura 15. Efectuando las diluciones

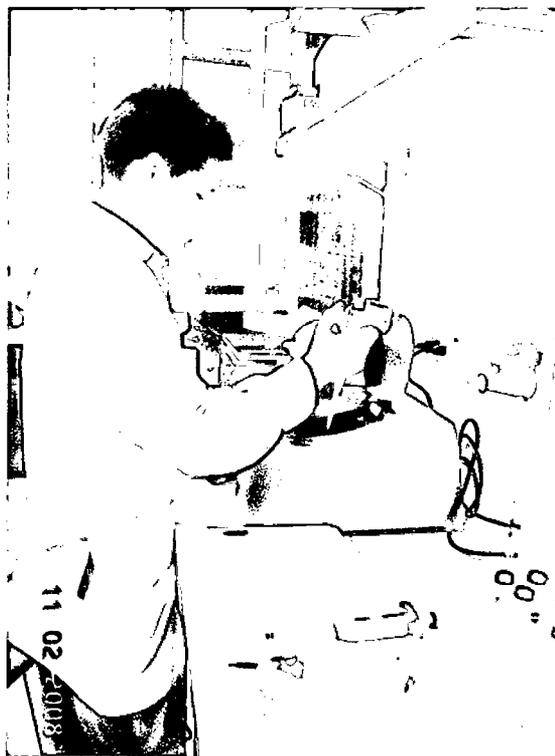


Figura 16. Colocando la muestra en el espectrofotómetro para efectuar la lectura