

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

ANTIOXIDANTES DE LA INCA MUÑA (*Clinopodium*

***bolivianum* (Benth.) Kuntze)**

TESIS

Presentada por:

Bach. ROXANA YAPUCHURA MAMANI

Para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TACNA - PERÚ

2010

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN TACNA
TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Tomo N° II Folio N° 371-372

El jurado calificador nominado mediante Resolución Faculta-
tiva N° 3644-2010-FAIA, Integrada por

<u>Dra. Lidiane Loanchipe</u>	<u>Presidenta</u>
<u>Dr. Miguel Lanea</u>	<u>Miembro</u>
<u>Mgr. Luis Marín</u>	<u>Miembro</u>
<u>Mgr. Rolando Espedez</u>	<u>Asesor</u>

Para examinar el Trabajo de Tesis:

Identificación de los Compuestos Fenólicos
Antioxidante de la Inca Muna (Clinopodium
bolivianum (Berth.) Kuntze)

presentada por Rech. Roxana Yapuchura Mamani

Obteniendo el siguiente veredicto: Aprobado por

Unanimitad



Tacna, 03 de noviembre del 2010

DEDICATORIA

Dedico de manera muy especial, este pequeño esfuerzo, el cual significa un nuevo triunfo en mi vida, principalmente:

A Dios, por darme la vida y sabiduría, permitiéndome llegar a este momento tan especial de mi existencia.

A mis padres Francisco y Flora, hermanos Verónica y Yasmany, cuñado Jeison y a mi sobrina Tamara mi gratitud por su valioso apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se hubiera realizado sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que quiero agradecer sinceramente por su colaboración y al mismo tiempo dedicar este trabajo.

Deseo agradecer a mi Padre Celestial por estar conmigo en cada paso que doy, también agradecer a mi familia que me brindó apoyo en todo momento y siempre me animaron en los tiempos más duros.

Deseo destacar el trabajo realizado por mis patrocinadores de tesis, la Dra. Rosana Chirinos, el Dr. David Campos e Ing. MSc. Rolando Céspedes, a quienes agradezco me hayan brindado la oportunidad de compartir sus conocimientos y su amistad.

Agradezco a la CUD (Commission universitaire pour le Développement) de Bélgica quién a través del proyecto PIC (Projet Interuniversitaire Ciblé) 2009-2013 me brindó el apoyo financiero para la ejecución de la presente investigación.

Por último, agradezco a los miembros del área de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología Industrial (IBT) de la UNALM, quienes con su amistad, orientación, ayuda y apoyo brindados a lo largo del desarrollo de los ensayos experimentales y por la facilidad de los ambientes del laboratorio.

A todos ellos por siempre agradecida.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS EMPLEADAS

RESUMEN

	Pág.
I INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS	1
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 INCA MUÑA (<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze)	4
2.1.1 Generalidades	4
2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción morfológica	4
2.1.3 Usos	6
2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS O POLIFENOLES	7
2.2.1 Generalidades	7
2.2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos	8
a. Los ácidos fenólicos	8
Ácidos hidroxibenzoicos	9
Ácidos hidroxicinámicos	10
b. Los flavonoides	11
Las flavanonas	12
Las flavonas	13
Los flavonoles	14
Las antocianinas	15
Los flavanoles	15
2.2.3 Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos	16
2.2.4 Métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante	19

2.3	EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	21
2.3.1	Extracción	21
2.3.2	Purificación	23
	a. Partición líquido – líquido	24
2.3.3	Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos	24
	a. Métodos espectrofotométricos	25
	Ensayo de Folin – Ciocalteu	26
	b. Métodos cromatográficos	27
	Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	27
III	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	30
3.2	MATERIA PRIMA	30
3.3	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	30
3.3.1	Equipos	30
3.3.2	Materiales	31
3.3.3	Reactivos	32
3.3.4	Estándares de compuestos fenólicos	33
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
3.4.1	Determinación de humedad	33
3.4.2	Determinación de la capacidad antioxidante	34
3.4.3	Determinación de los compuestos fenólicos totales	35
3.4.4	Determinación de flavonoles y flavonas	37
3.5	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	38
3.5.1	Selección y Limpieza	38
3.5.2	Liofilización	38
3.5.3	Molienda	39

3.5.4	Extracción y fraccionamiento de los compuestos fenólicos	39
a.	Extracción	39
b.	Fraccionamiento	41
3.5.5	Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD	42
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
IV	HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES	44
4.1.	FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	44
4.2.	IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES	44
4.2.1.	VARIABLES	44
	Variables independientes	44
	Variables dependientes	44
4.2.2.	INDICADORES	45
V	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
5.1	Extracción de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña	46
5.2	Fraccionamiento de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña	48
5.3	Identificación de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña	53
a.	Identificación de los compuestos fenólicos en la fracción acuosa	54
b.	Identificación de los compuestos fenólicos en la fracción acetato de etilo	57
VI	CONCLUSIONES	61
VII	RECOMENDACIONES	62
VIII	BIBLIOGRAFÍA	63
IX	ANEXOS	73

ÍNDICE DE CUADROS

N°	Título	Pág.
1	Compuestos fenólicos totales de especies de la familia lamiaceae	45
2	Capacidad antioxidante de especies de la familia lamiaceae	45
3	Determinación de compuestos fenólicos totales, flavonoles y capacidad antioxidante del extracto de inca muña	46
4	Determinación de compuestos fenólicos totales, flavonoles y flavonas y capacidad antioxidante de las fracciones de acetato de etilo (Fae) y acuosa (Fac) de la inca muña	49
5	Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la fracción acuosa de las hojas de la inca muña	56
6	Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la fracción acetato de etilo de las hojas de inca muña	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
1	Planta de la inca muña (<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze)	5
2	Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos más comunes	9
3	Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos más comunes	10
4	Núcleo flavan (a) y núcleo 4-oxo-flavonoide (b) de los flavonoides	12
5	Estructura de flavanonas	13
6	Estructura de las flavonas	14
7	Estructura de flavonoles	15
8	Estructura del flavanol epicatequina (a) y epigalocatequina (b).	16
9	Proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de inca muña	40
10	Contenido de compuestos fenólicos totales de las fracciones obtenidas para la inca muña	50
11	Contenido de flavonoles y flavonas en las fracciones obtenidas de la inca muña	51
12	Valores de capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas de la inca muña	51
13	Perfil cromatográfico HPLC-DAD de la fracción de acuosa de las hojas de la inca muña	55

14 Perfil cromatográfico HPLC-DAD de la fracción acetato de etilo de las 58
hojas de la inca muña

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS

AGE: Ácido gálico equivalente.

DAD: Detector de arreglo de diodos.

d.e.: Diámetro externo.

d.i.: Diámetro interno.

EB: Extracto bruto.

EBC: Extracto bruto concentrado.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

Fae: Fracción acetato de etilo

Fac: Fracción acuosa.

FT: Fenólicos totales.

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

QE: Quercetina equivalente.

TE: Trolox equivalente.

RESUMEN

En la presente investigación se estudió el contenido y perfil de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las hojas de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze). El contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en la inca muña fue de 91,8 mg de AGE/g (b.s.), mientras que la capacidad antioxidante fue 1004,1 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.).

Los extractos fenólicos de la inca muña se sometieron a un proceso de partición líquido- líquido con acetato de etilo obteniéndose dos fracciones: una fracción de acetato de etilo y otra acuosa. En la fracción acetato de etilo se concentraron la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (70,1%) y capacidad antioxidante (64,4%) en comparación con la fracción acuosa.

Por medio del análisis por cromatografía líquida de alta performance con el detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), se evidenció en la fracción acuosa de la inca muña la presencia de ácidos hidroxicinámicos del tipo ácido cafeico y *p*-cumárico; flavanonas del tipo eriodictiol y flavonoles del tipo rutina; siendo las flavanonas los compuestos más representativos. En la fracción acetato de etilo se detectaron a los ácidos hidroxicinámicos del tipo ácido cafeico; flavanonas del tipo eriodictiol y las flavonas del tipo apigenina; siendo los ácidos hidroxicinámicos los más representativos.

I. INTRODUCCIÓN

Los vegetales además de aportar nutrientes, contienen una serie de sustancias denominadas fitoquímicos o compuestos bioactivos, que intervienen en el metabolismo secundario; así se tiene a las sustancias colorantes y aromáticas, los reguladores del crecimiento, los protectores naturales frente a parásitos, entre otros; estos compuestos no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en el curso de un rango de enfermedades (Troncoso *et al.*, 2005; Bazinet *et al.*, 2007). Dentro de este grupo de sustancias se encuentran los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son comúnmente hallados en plantas comestibles y no comestibles, constituyendo una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos. En los últimos años, un gran número de investigaciones científicas han descrito las propiedades de los compuestos fenólicos, entre las que destacan la capacidad de actuar como conservantes de alimentos, tener un papel importante en la protección contra una serie de alteraciones patológicas, como la arterosclerosis, disfunción cerebral y cáncer, propiedades antioxidantes, etc. (Pinelo *et al.*, 2006).

En el medio se halla una variedad de hierbas con miles de especies, las cuales hasta el día de hoy son empleadas por la medicina tradicional para aliviar o curar una serie de dolencias en el hombre. Muchas de las propiedades que se les atribuye a estas hierbas estarían muy relacionadas con los compuestos bioactivos que ellas presentan (como los compuestos fenólicos). El investigar y conocer el tipo de compuesto bioactivo presente en las plantas resulta, por tanto, de suma importancia para poder encontrar la relación causa efecto que ellos producen en la prevención o cura de enfermedades.

Varias hierbas pertenecientes a la familia Lamiaceae como el romero, orégano, salvia, tomillo y albahaca, han sido bien estudiadas por su capacidad antioxidante y composición fenólica; los compuestos responsables de la capacidad antioxidante que se encontraron principalmente son fenólicos diterpenoides y otros compuestos fenólicos, entre los más relevantes tenemos el carvacrol y thymol del orégano (*Origanum vulgare*); thymol de tomillo (*Thymus vulgaris*); ácido carnosito del romero (*Rosmarinus officinalis*); ácido rosmarínico del orégano, romero, salvia (*Salvia officinalis*) y ácidos hydroxicinnamico (Parejo *et al.*, 2004; Troncoso *et al.*, 2005).

La inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) pertenece a la familia Lamiaceae y es un arbusto aromático que crece en los Andes sobre un amplio rango de altitudes. Esta especie es empleada ampliamente por sus propiedades medicinales como analgésico, antiespasmódico, antiséptico, contra el reumatismo y enfermedades respiratorias; parte de las propiedades medicinales podrían ser atribuidas a su alta capacidad antioxidante (Abad *et al.*, 1999; Lizárraga y Abdala, 2004).

En vista a que hasta la fecha aún no se ha elucidado la composición de los compuestos fenólicos de la inca muña que crecen en el medio y dada la importancia que esta hierba presenta en la medicina tradicional andina, es que la presente investigación tiene como objetivos:

General:

- Identificación, cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze).

Específicos:

- Determinar fenólicos totales por el método de Folin–ciocalteu según Singleton y Rossi (1965).
- Evaluar el contenido de flavonoles y flavonas, flavanoles por el método de Chang et al. (2002) y Mc Murrough y Mc Dowell (1978) respectivamente.
- Determinar la capacidad antioxidante de la inca muña mediante el método del ABTS.
- Identificar los principales compuestos fenólicos de la inca muña por el método de HPLC-DAD.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 INCA MUÑA (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze)

2.1.1 Generalidades

La inca muña es también conocida como "cjuñuca", "cjuñu muña", "pampa muña", "chulpa muña" u "orégano de los incas", y pertenecen a la Familia Lamiaceae (Teodoro, 2003). Esta planta abunda en la sierra del Perú, así en el departamento de Cuzco se le conoce con los nombres populares de "muña muña" y "cjuñuca" y en el departamento de Puno con el nombre de "muña" (Zirena, 1945).

2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Takhtajan (1980), indica que la ubicación taxonómica de la inca muña es la siguiente:

DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
SUBCLASE	:	Asteridae
ORDEN	:	Verbenales
FAMILIA	:	Lamiaceae
GENERO	:	<i>Clinopodium</i> L.
ESPECIE	:	<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze

La inca muña es un arbusto hirsuto de 1 metro de alto. Las hojas opuestas, cortamente pecioladas (1-1,5 mm); láminas abovadas a elípticas, sub-obtusas,

bordes enteros o aserrados, 1-2 cm de largo; flores blanquecinas, subsésiles, solitarias o en fascículos axilares; cáliz tubuloso, lóbulos deltoides, corola tubular, bilabiada, internamente pubescente; estambres didínamos, epipétalos; frutos tetraquenos, de 1 – 5 mm de largo con una espícula pubescente en la parte superior (Macbride, 1960). La planta de la inca muña se muestra en la Figura N° 01.



Figura N° 01: Planta de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) (Fuente: Elaboración propia)

2.1.3 Usos

La inca muña ha sido empleada milenariamente por los antepasados, siendo múltiples los usos que se le atribuye (Teodoro, 2003 y Zirena, 1945), así se tiene:

- Por vía externa es utilizada en forma de emplastos contra las neuralgias en fricciones, para ello la maceración de la planta se hace en alcohol.
- Por vía interna se emplea frecuentemente en infusiones para combatir dolores, espasmos intestinales, cólicos, males estomacales. La infusión de las hojas y flores es utilizada para el soroche y abortiva (en dosis altas). El preparado bajo la forma de un licor (por maceración de la planta en alcohol), la beben con frecuencia atribuyéndole propiedades medicinales como estomáticas y tónico excitante. La decocción de la planta es recomendada para la anemia, raquitismo infantil y como expectorante (acompañado con miel).
- Además de las propiedades curativas se le atribuye propiedades insecticidas, para ello se utilizan las raíces y hojas.
- En la agricultura los productores de papa aplican la inca muña para matar gusanos que pueden contener los tubérculos al ser almacenados, de la siguiente manera: haciendo uso de un emparrillado con las ramas de paja “ichu” y sobre este se arreglan una abundante cama de inca muña, las papas son amontonadas sobre la inca muña, con la finalidad de que los gusanos de la papa aparezcan muertos entre las hojas.

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS O POLIFENOLES

2.2.1 Generalidades

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas (Proestos *et al.*, 2006; Dicko *et al.*, 2006). Entre los compuestos fenólicos naturales, la familia de los flavonoides, es la más importante (Trouillas *et al.*, 2006) ellos representan más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos identificados en la naturaleza (Balasundram *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos o polifenoles se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal, en plantas medicinales, especias, vegetales, frutas, granos y semillas, donde su presencia contribuye a las cualidades sensoriales como color, aroma, pardeamiento, amargor y la astringencia (Rizzo *et al.*, 2006; Stratil *et al.*, 2007). En la actualidad son los fitoquímicos más conocidos (Dimitrios, 2006).

Los polifenoles son de especial importancia por sus características antioxidantes debido a que pueden participar en la protección contra la acción dañina de especies reactivas (principalmente los radicales libres de oxígeno) por su alto potencial redox (Tsao y Deng, 2004; Stratil *et al.*, 2007).

Considerables investigaciones epidemiológicas sostienen la concepción de que alimentos y bebidas ricos en compuestos fenólicos están asociados con una baja incidencia de enfermedades en humanos debido a su capacidad antioxidante (Rizzo *et al.*, 2006). Entre los efectos positivos a la salud relacionados a los compuestos fenólicos reportados en la literatura figuran el actuar como:

antibacteriano (Ezoubeiri *et al.*, 2005), antimutagénico (Pedreschi y Cisneros - Zevallos, 2007; Snijman *et al.*, 2007), anticarcinogénico (Kähkönen y Heinonen, 2003), antitrombótico, presentar actividades vasodilatadoras (Wang *et al.*, 1997) entre otros.

2.2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un amplia familia que incluye a diferentes sub-familias como: los fenoles simples, ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides (flavanoles, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y antocianinas), chalconas, auronas (hispidol), hidroxycumarinas, lignanos, estilbenos y poliflavanos (proantocianidinas y prodeoxiantocianidinas) (Dicko *et al.*, 2006); de entre ellos más de 5 000 polifenoles han sido identificados (Tsao y Deng, 2004).

A continuación se describen algunas de las familias de los compuestos fenólicos más comúnmente hallados en los alimentos.

a. Los ácidos fenólicos

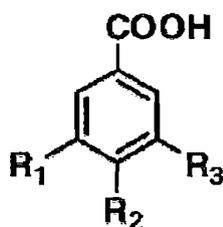
Los ácidos fenólicos constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos, distribuidos en la naturaleza y muestran un amplio espectro de actividades farmacológicas; estos han reportado propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antitumorales y anticarcinogénicas (Tarnawski *et al.*, 2006).

Son sintetizados a través de la ruta del ácido sikímico y pueden presentarse de forma conjugada o libre. Se distingue 2 principales grupos de ácidos fenólicos, ambos son derivados hidroxilados de ácidos carboxílicos aromáticos, así se tiene a los

ácidos benzoicos y a los ácidos cinámicos (Tsao y Deng, 2004). Ellos difieren de acuerdo al número y posición de hidroxilaciones y metoxilaciones del anillo aromático (Tarnawski *et al.*, 2006).

Ácidos hidroxibenzoicos

Poseen una estructura general de C6-C1 y son derivados directamente del ácido benzoico. La variación en la estructura de los ácidos hidroxibenzoicos individuales radica en la hidroxilación y metilación del anillo aromático (Macheix *et al.*, 1990; Cabrita *et al.*, 2007). Los cuatro ácidos hidroxibenzoicos más comúnmente conocidos son: *p*-hydroxybenzoico, vanílico, siríngico y protocatéuico, destaca también el ácido gálico. Ellos pueden estar presentes en forma soluble conjugada con azúcares o ácidos orgánicos o ligados en las fracciones de la pared celular (lignina). La estructura de los principales ácidos hidroxibenzoicos se presentan en la Figura N° 02.

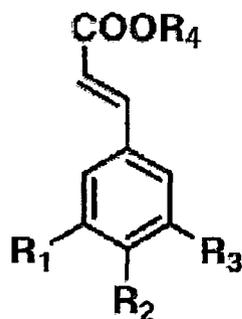


Benzoic acids	R1	R2	R3
gallic acid	OH	OH	OH
protocatechuic acid	H	OH	OH
vanillic acid	OCH ₃	OH	H
syringic acid	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura N° 02: Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos más comunes (Fuente: Tsao y Deng (2004))

Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos poseen la estructura general C6-C3 y son derivados del ácido cinámico (Cabrita *et al.*, 2007). Los cuatro ácidos hidroxicinámicos más ampliamente distribuidos en frutas son: el *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Häkkinen, 2000 y Cabrita *et al.*, 2007). Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico dando origen a los ácidos clorogénico, isochlorogénico, neochlorogénico y criptochlorogénico (Martínez – Valverde *et al.*, 2000). Los ácidos hidroxicinámicos están además, envueltos en procesos de co-pigmentación con las antocianinas, lo cual afecta el color de los vinos rojos. La estructura de los principales ácidos hidroxicinámicos se pueden observar en la Figura N° 03.



Cinnamic acids	R1	R2	R3	R4
<i>p</i> -coumaric acid	H	OH	H	H
caffeic acid	H	OH	OH	H
ferulic acid	OCH ₃	OH	H	H
sinapic acid	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
chlorogenic acid	H	OH	OH	5-quinic acid

Figura N° 03: Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos más comunes (Fuente: Tsao y Deng (2004))

b. Los flavonoides

Son un grupo de sustancias formadas por la combinación de derivados sintetizados de la fenilalanina (vía la ruta del ácido sikímico) y del ácido acético (Aherne y O'Brien, 2002). La estructura básica de los flavonoides es el núcleo flavan, el cual consiste en 15 átomos de carbono dispuesto con tres anillos (C6–C3–C6), denominados A, B y C (Figura N° 04a) (Wojdylo *et al.*, 2007). El anillo bencénico A es condensado con el sexto miembro del anillo C, el cual en la posición 2 lleva un anillo bencénico B como sustituto. El anillo C puede ser un heterocíclico pirán, el cual produce flavanoles (catequina) y antocianidinas, o pirona, los cuales pueden ser flavonoles, flavonas, y flavanonas. El anillo aromático A es un derivado de la vía acetato/malonato, mientras que el anillo B se deriva de la fenilalanina a través de la vía sikimato (Balasundram *et al.*, 2006). El término 4-oxo-flavonoide es a menudo usado para describir a los flavonoides como a los flavanoles (catequinas), flavanonas, flavonoles y flavonas, los cuales llevan un grupo carbonil en C-4 del anillo C (Figura N° 04b) (Aherne y O'Brien, 2002).

La estructura básica del núcleo flavonoide permite una múltiple sustitución del modelo en los anillos A, B y C resultando en varios subgrupos. La variación en la sustitución del anillo C resulta en las principales clases de flavonoides, es decir, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (o catequinas), isoflavonas, flavanonoles, y antocianidinas, de los cuales las flavonas y flavonoles son los más extendidos. Las sustituciones de los anillos A y B dan lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de flavonoides (Aherne y O'Brien, 2002; Tsao y Deng, 2004 y Balasundram *et al.*, 2006).

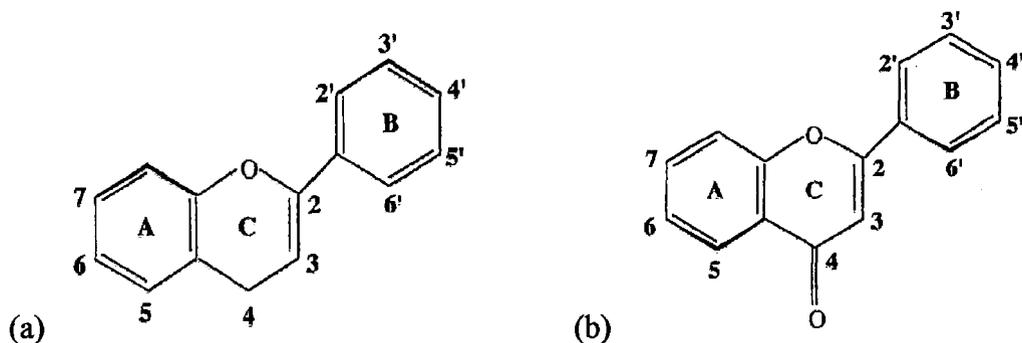


Figura N° 04: Núcleo flavan (a) y núcleo 4-oxo-flavonoide (b) de los flavonoides (Fuente: Aherne y O'Brien (2002))

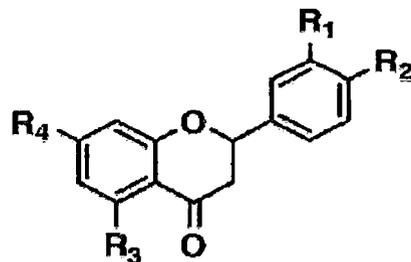
Los estudios han mostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicósidos y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides; los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como *o*-glicósidos o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como *c*-glicósidos. (Martínez, 2005).

A continuación se describen algunos de los flavonoides comúnmente hallados en los alimentos.

Las flavanonas

El mayor origen de las flavanonas son las frutas y jugos cítricos. Estos compuestos también se encuentran en el garbanzo, comino, bayas de espin,

regaliz y menta. La flavanona hesperidina puede ser encontrada en el comino y la menta; la narirutina y la naringenina glicósidos en las bayas de espino, el eriodictiol en limones y la liquoritigenina en algunas raíces. Las flavanonas contribuyen al sabor de los cítricos. La naringenina encontrada en uvas, es usualmente amarga; la hesperidina encontrada en naranjas, es usualmente insípida (Peterson y Dwyer, 1998). La estructura de los principales flavanonas se observa en la Figura N° 05.



Flavanones	R1	R2	R3	R4
naringenin	H	OH	OH	OH
hesperetin	H	OCH ₃	OH	OH

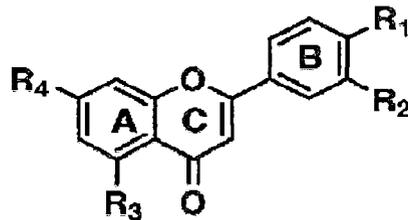
Figura N° 05: Estructura de flavanonas (Fuente: Tsao y Deng (2004))

Las flavonas

Son compuestos derivados de la benzo- γ -pirona; no son encontradas frecuentemente en frutas pero son halladas en granos y hierbas. Pueden contribuir al color del tejido de las plantas y participan en el gusto (Peterson y Dwyer, 1998).

Las flavonas más comunes son la apigenina y luteolina. El perejil, romero y tomillo contienen flavonas. La apigenina y sus glicósidos son comúnmente hallados en cereales, grano, algunas hierbas y algunos vegetales. La luteolina se presenta en cereales y hierbas. En vegetales y en las hojas de los vegetales, los

glicósidos de luteolina y apigenina han sido reportados. La estructura de las principales flavonas se presenta en la Figura N° 06.



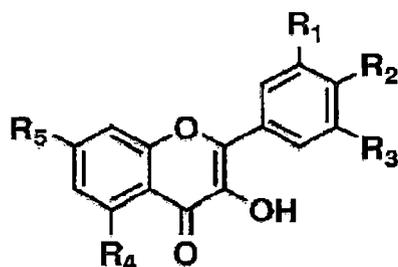
Flavones	R1	R2	R3	R4
Apigenin	OH	H	OH	OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH

Figura N° 06: Estructura de las flavonas (Fuente: Tsao y Deng (2004))

Los flavonoles

Los flavonoles son hallados en todos los alimentos y se acumulan en los tejidos exteriores aéreos (epidermis y hojas) porque su síntesis se ve estimulada por la luz; tan sólo trazas de flavonoles se encuentran en partes de la planta por debajo de la superficie terrestre con la notable excepción de las cebollas (Aherne y O'Brien, 2002). Los flavonoles están presentes predominantemente como glicósidos que bajo su forma no glicosidada (aglicón) (Wang y Lin, 2000).

Los flavonoles más conocidos son la quercitina, el kaempferol y la mirecitina. La quercitina glicosidada predomina en la hoja de varios vegetales. El kaempferol es el más común entre frutas y vegetales frondosos; también es hallado en algunas bayas, hierbas, legumbres y vegetales de raíz. La miricetina se encuentra a menudo en bayas, maíz y té. En las frutas, los flavonoles y sus glicosilados son hallados predominantemente en la piel (Peterson y Dwyer, 1998). La estructura de los principales flavonoles se aprecia en la Figura N° 07.



Flavonols	R1	R2	R3	R4	R5
kaempferol	H	OH	H	OH	OH
quercetin	OH	OH	H	OH	OH
myricetin	OH	OH	OH	OH	OH

Figura N° 07: Estructura de flavonoles (Fuente: Tsao y Deng (2004))

Las antocianinas

Las antocianinas producen la coloración azul y roja de las frutas como: las cerezas (*Prunus avium* L.) y ciruelas (*Spondias purpurea* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), rábano (*Raphanus sativa* L.) entre otras. Aunque son inestables en la forma aglicona, mientras están en las plantas, son resistentes a la luz, pH y condiciones de oxidación que podrían degradarlas, debido a que se presentan glicosiladas y esterificadas con varios ácidos orgánicos. Las antocianinas contenidas en frutas usualmente se incrementan con la madurez de la fruta (Peterson y Dwyer, 1998).

Los flavanoles

Pueden presentarse en forma monomérica (catequinas) y en forma polimérica (proantocianidinas o taninos condensados). Las catequinas son muy abundantes en las frutas, pero las principales fuentes son el té verde, el chocolate y el vino tinto. La catequina y la epicatequina son los principales flavanoles en la

fruta, las catequinas son incoloras en agua e imparten el amargor y astringencia en las infusiones de té verde (Wang y Lin, 2000); la galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato se encuentran en ciertas semillas leguminosas, en la uva y el té (Dreosti, 2000; Manach *et al.*, 2004). Este grupo de compuestos no se encuentran glicosilados en los alimentos. De otro lado las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de las catequinas unidos por uniones C4 y C8 (o C6) y las encontramos en bebidas como el té, vino y cerveza, en el chocolate y en frutas como la uva, el melocotón y la manzana y son las responsables del carácter astringente de estos alimentos. La estructura de los principales flavanoles se presenta en la Figura N° 08.

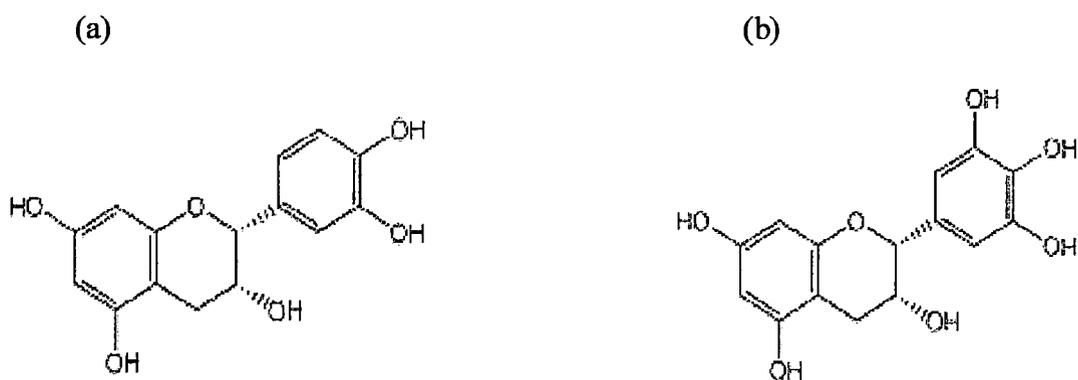


Figura N° 08: Estructura del flavanol epicatequina (a) y epigalocatequina (b)
(Fuente: Tsao y Deng (2004))

2.2.3 Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos

En sistemas biológicos (generalmente en las células aerobias) como una consecuencia natural de la reacción de oxidación (redox) durante la respiración celular y productos del metabolismo, se forman especies reactivas de oxígeno y

nitrógeno (ERO y ERN) como: Radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros (Tarnawski *et al.*, 2006; Vrchovska *et al.*, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2008). A bajas o moderadas concentraciones ellos poseen varios roles fisiológicos así, son esenciales para el suministro de energía, desintoxicación, señalización química y la función inmunológica (Dimitrios, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2008). Sin embargo, durante el estrés oxidativo hay una sobreproducción de ERO y ERN que pueden producir degradación de los componentes celulares, DNA, RNA, carbohidratos, proteínas y lípidos; lo que lleva eventualmente a la disfunción y finalmente a la muerte celular. Estos daños contribuyen a un mayor riesgo de enfermedades relacionados con el estrés oxidativo tales como: cardiovasculares, cáncer, arteriosclerosis, diabetes mellitus, reumatismo, isquemia, la aceleración de procesos de envejecimiento y otras enfermedades crónicas (Dimitrios, 2006; Tarnawski *et al.*, 2006; Vrchovska *et al.*, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2008; Ningappa *et al.*, 2008).

Un antioxidante se define como una sustancia que encontrándose en pequeñas concentraciones comparada con un sustrato oxidable inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Matkowski, 2008). Para que un antioxidante tenga actividad antiradical debe cumplir una característica básica que es: generar un radical más estable y menos dañino después de reaccionar con la especie radical, esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radical. Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad (Cadenas, 2001).

Según Rice-Evans *et al.* (1997) y Tsao y Deng (2004), la capacidad antioxidante de un compuesto está determinada por:

- Su reactividad como un agente donador de hidrógeno y electrón (que se refiere a su potencial de reducción).
- El destino resultante del radical derivado antioxidante, que se rige por su capacidad para estabilizar y deslocalizar electrones desapareados.
- Su reactividad con otros antioxidantes.
- Su potencial de quelación de metales de transición.

Los compuestos fenólicos de las plantas pueden reducir los efectos perjudiciales de las ERO de una serie de procesos biológicos y patológicos; la inactivación de los ERO por los fenólicos de las plantas puede ser la base del supuesto beneficio de la salud humana (Alarcón *et al.*, 2007). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve afectada por su estructura química, mostrando una mayor eficiencia antioxidante *in vitro* en comparación con la vitamina E y C (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Según Rice-Evans *et al.* (1997), el arreglo estructural que imparte una gran capacidad antioxidante viene determinada por lo siguiente:

- La estructura orto 3', 4'-dihidroxi en el anillo B; que confiere mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones (como, en la catequina, luteolina y quercetina).
- El arreglo meta 5,7-dihidroxi en el anillo A (como, en el kaempferol, apigenina y chrisina).
- El enlace doble 2,3 en conjunción con los grupos 4-keto y 3-hidroxilo en el anillo C, por deslocalización de electrones (como, en la quercetina), siempre y cuando la estructura *o*-dihidroxi en el anillo B también este presente. Sin embargo, las alteraciones en el arreglo de los grupos hidroxilo y la sustitución

de grupos hidroxilo por glicosilaciones contribuyen a la disminución de la actividad antioxidante.

- Para la quelación de metales, los dos puntos de fijación de los iones metálicos de transición a la molécula de flavonoides son los grupos *o*-difénolico en la posición 3', 4'-dihidroxi del anillo B, y la estructura ketol 4-Keto, 3-hidroxi ó 4-Keto y 5-hidroxi en el anillo C de los flavonoles.

Así, la quercetina que se observa en la Figura N° 07, cumple con todas las condiciones anteriormente mencionadas y sería el antioxidante *in vitro* más eficaz (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Además de sus propiedades antioxidantes, los polifenoles poseen otras actividades biológicas específicas derivadas o no de su acción antioxidante. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas con enfermedades coronarias, y protegen el ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad (Halliwell y Gutteridge, 1995); además, inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos anti-inflamatorios; se ha descrito que poseen actividad anticarcinogénica, actuando como inhibidores de procesos cancerígenos; actividad anti VIH y actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos (Yang *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2004).

2.2.4 Métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es ampliamente usada como un parámetro para caracterizar a diferentes materiales (frutas, vegetales, vinos, té, aceites, etc.). Esta capacidad está relacionada con compuestos capaces de proteger a un sistema

biológico del potencial efecto dañino de procesos o reacciones que causan excesiva oxidación, donde están involucrados las ERO y ERN (Arnao, 2000).

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante de un material biológico existen diferentes métodos, entre los cuales se tienen: la medida de la capacidad antioxidante en función de la especie oxidante (ERO/ERN específicos o radicales estables no biológicos) a evaluar; el mecanismo de actuación del antioxidante (capacidad secuestradora de radicales, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad de reducir metales, etc.) o del sustrato oxidable utilizado (químico o biológico).

Los métodos más comúnmente usados por su facilidad, rapidez y sensibilidad son los que emplean radicales cromógenos naturales o radicales que simulan a una ERO o ERN. La presencia del antioxidante conduce a la desaparición de estos radicales cromógenos. Entre los radicales más ampliamente usados están el 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) y el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Ambos presentan excelente estabilidad bajo las condiciones de ensayo pero, también muestran diferencias importantes en su respuesta como antioxidante y en su manipulación (Arnao, 2000).

La determinación de la capacidad antioxidante por el método del ABTS utiliza al radical cromógeno ABTS^{•+} (color azul-verdoso), este presenta un espectro con 3 absorbancias máximas a 414, 752 y 842 nm en medio acuoso y 414, 730 y 873 nm en medio etanólico. El radical ABTS^{•+} puede ser generado vía enzimática (peroxidasa, mioglobina) o por medio de reacciones químicas (dióxido de manganeso, persulfato de potasio) y puede ser disuelto en un medio acuoso u orgánico (Arnao, 2000; Wojdylo *et al.*, 2007). Este método se basa en la actividad

de una molécula antioxidante para inhibir al radical ABTS^{•+}, producto de la reacción se observa un cambio de coloración de azul-verdoso a incoloro. El grado de esta decoloración refleja al radical ABTS^{•+} que fue atrapado y esto puede ser directamente monitoreado por detección espectrofotométrica (Lima *et al.*, 2005). Este método es capaz de determinar la capacidad antioxidante hidrofílica (en un medio buffer acuoso) y lipofílica (en medio orgánico) (Alcolea *et al.*, 2002).

Por otro lado, se conoce el método del DPPH, este radical DPPH[•] es adquirido directamente sin preparación. El DPPH[•] es disuelto en medio orgánico, especialmente en etanol, lo cual es una importante limitación al interpretar el rol de los antioxidantes hidrofílicos (Arnao, 2000 y Wojdylo *et al.*, 2007).

2.3 EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

2.3.1 Extracción

Una de las operaciones unitarias utilizadas en la industria alimentaria viene a ser el proceso de extracción. La cual es un proceso diseñado para la obtención de ciertos componente deseados (como compuestos fenólicos) por medio de la difusión a partir de una matriz sólida (alimento) empleando una matriz líquida (solvente) (Pinelo *et al.*, 2006).

La eficiencia del proceso de extracción está influenciada por la naturaleza química del solvente (polaridad); el método de extracción empleado (por solventes, asistida por microondas, con fluidos supercríticos, líquida a presión) (Tsao y Deng, 2004); el tamaño de partícula (partículas reducidas favorecen la extracción) (Moure *et al.*, 2001), el tiempo de extracción, el pH, la temperatura

(que afecta la estabilidad de los compuestos debido a su degradación química y/o enzimática, las pérdidas por volatilización o descomposición térmica), el número de etapas de extracción, la relación solvente/sólido, así como, la presencia de sustancias interferentes (Moure *et al.*, 2001; Naczk y Shahidi, 2004; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Martínez, 2005).

La extracción por solvente, viene a ser frecuentemente utilizada para el aislamiento de diversos compuestos que se encuentran en las plantas. El rendimiento de extracción y la capacidad antioxidante de los extractos son fuertemente dependientes del solvente (Moure *et al.*, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

La solubilidad de los compuestos fenólicos obedece a la polaridad del solvente usado, el grado de polimerización de los fenólicos, la interacción con otros constituyentes y su actividad para formar complejos. Por lo tanto, no existe un procedimiento completamente satisfactorio para extraer todos los fenólicos de un material vegetal, es por eso que los extractos fenólicos de las plantas son siempre una combinación de distintas clases de fenólicos que son solubles en el sistema solvente empleado (Naczk y Shahidi, 2004).

Según Chirinos *et al.* (2007), indican que los solventes de alta polaridad, como el agua o de una baja polaridad como el cloroformo o hexano no brindan buenos resultados de extracción de los polifenoles, por tanto, las mejores extracciones se realizan con solventes de polaridad intermedia, tales como mezclas a partir de la acetona o metanol.

La extracción por solventes ha sido ampliamente usada por diferentes autores en diversos productos. Parejo *et al.* (2004) logró extraer a la luteolina-7-

O-glucurónido, al ácido rosmarínico y al metil éster del ácido rosmarínico de la *Lepachinia graveolens* (planta parecida a la menta) con metanol. Los ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, siríngico; los flavonoles quercetina y rutina, y la flavona apigenina fueron extraídos de plantas aromáticas griegas con metanol al 62,5%. Los solventes más comúnmente usados para la extracción de ácidos fenólicos de las matrices de las plantas son el etil acetato, dietil éter, metanol o metanol acuoso (Häkkinen, 2000); para la extracción de las proantocianidinas, el más común de los solventes son la acetona y el metanol con diferentes proporciones de agua y con o sin la adición de ácido. El metanol como solvente de extracción es utilizado con más frecuencia debido a su alta eficacia de extracción en comparación del etanol (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Metanol acuoso al 50 y 80% se ha utilizado para la extracción de ácidos hidroxicinámicos y muchos grupos de flavonoides (Tsao y Deng, 2004). Las extracciones con solventes acidificados, tal como el metanol acidificado ha resultado ser mejor en la extracción de antocianinas que el empleo de la acetona acuosa (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.3.2 Purificación

El proceso de extracción no es un método selectivo, ya que es capaz de extraer un gran número de otros compuestos, como azúcares, ácidos orgánicos, entre otros. Por consiguiente, es necesario aplicar técnicas de purificación, a fin de aislar el compuesto de interés (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Entre los métodos de purificación más comúnmente empleados se tiene a la partición líquido-líquido.

a. Partición líquido – líquido

Se fundamenta en la separación de compuestos mediante partición entre dos líquidos inmiscibles, químicamente muy diferentes, lo que conduce a una separación de los componentes de acuerdo con sus propiedades físicas y químicas (Muffler y Ulber, 2005). Este procedimiento requiere de una mezcla vigorosa para un perfecto contacto y generación de turbulencias entre las fases líquidas, facilitando de tal forma la transferencia del soluto de una fase líquida a la otra (Najafpour, 2007). El punto de ebullición del solvente extractor debe ser bajo, ya que casi siempre es necesaria la concentración de las fases.

Se ha reportado el uso de esta técnica en el fraccionamiento de compuestos fenólicos, así como Kennedy (2002) indica que el acetato de etilo permite remover los monómeros de los flavanoles presentes en una solución acuosa; Paveto *et al.* (2004) utilizó el acetato de etilo para recuperar a la catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, catequina galato, epicatequina galato, galocatequina galato y epigalocatequina galato a partir de extractos acuosos de hojas de té verde; Zhou *et al.* (2004), utilizó la técnica de partición con acetato de etilo para recuperar a los ácidos ferúlico y ρ -cumárico, y en menor grado los ácidos gálico, vanílico, cafeico y siríngico de extractos de arroz. Pedreschi y Cisneros - Zevallos (2007), en extractos de maíz morado empleó la partición con agua y acetato de etilo obteniendo en la fracción acuosa antocianinas y en la fracción acetato de etilo principalmente ácidos fenólicos.

2.3.3 Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos

En la actualidad existe una creciente necesidad de cuantificar e identificar a los compuestos fenólicos presentes en la dieta, en diferentes plantas y entre las

distintas variedades de la misma planta; debido a su importancia en la contribución al mantenimiento de la salud humana, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico en diversos alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez – Valverde *et al.*, 2000; Tsao y Deng, 2004).

Las primeras técnicas desarrolladas para la cuantificación de compuestos fenólicos en materiales vegetales fueron las técnicas espectrofotométricas, que si bien tiene interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan la suficiente información para el completo análisis de la estructura absoluta y configuración de un compuesto fenólico, lo que generalmente es una tarea complicada que requiere de la aplicación de técnicas avanzadas y más precisas, que presenten alta sensibilidad y resolución como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), la cual se utiliza ampliamente tanto para la separación, identificación individualizada y cuantificación de compuestos fenólicos y que con la ayuda de la espectrometría de masas hace posible determinar diversos grupos estructurales presentes en los compuestos fenólicos (Martínez – Valverde *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Naczki y Shahidi, 2004; Tsao y Deng, 2004).

a. Métodos espectrofotométricos

Numerosos métodos espectrofotométricos han sido desarrollados para la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en materiales vegetales, los cuales son ensayos simples y rápidos, ya que no son necesarios procedimientos de limpieza de la muestra. Sin embargo, poseen ciertos inconvenientes, ya que

algunos de ellos no son específicos para fenoles, por lo tanto presentan mayor interferencia (Antolovich *et al.*, 2000; Naczk y Shahidi, 2004; Parejo *et al.*, 2004).

Ensayo de Folin – Ciocalteu

Los métodos tradicionales para la determinación de fenoles totales se han basado en la medición directa de la absorción de la radiación ultravioleta, o más frecuentemente, mediante métodos colorimétricos como el uso del reactivo Folin-ciocalteu (Antolovich *et al.*, 2000). Actualmente, el método de Folin-ciocalteu es el más utilizado para estimar el contenido total de compuestos fenólicos en extractos de plantas, alimentos y bebidas. Se basan en las propiedades óxido – reductoras de los compuestos fenólicos. Los polifenoles actúan como agentes reductores y donadores de hidrógeno o electrones (Stratil *et al.*, 2007) y en esta técnica se utiliza un reactivo compuesto por una mezcla de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico (Na_2CO_3) el cual se reduce al oxidar los compuesto fenólicos presentes en la muestra analizada, originando compuestos azules de wolframio y molibdeno que son detectados a 755 nm (Naczk y Shahidi, 2004). El color obtenido en el ensayo dependerá en gran medida del potencial redox de los grupos fenólicos. Las reacciones de los fenoles con el reactivo Folin–ciocalteu son estequiométricamente predecibles; sin embargo este no es específico y detecta todos los grupos fenólicos encontrados en los extractos incluyendo aquellos que forman parte de proteínas; otra desventaja de este ensayo es la interferencia de sustancias reductoras tales como ácido ascórbico (Naczk y Shahidi, 2004).

b. Métodos cromatográficos

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Las técnicas de cromatografía por HPLC están siendo ampliamente usadas para la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por su versatilidad, precisión, y costo relativamente bajo. Con mayor frecuencia, el método que se emplea es la cromatografía de reparto en fase reversa, pues permite una considerable separación de las diferentes clases de compuestos fenólicos, pues está compuesta de una fase estacionaria la cual es no polar y una fase móvil la cual es relativamente polar. La fase estacionaria no polar, está compuesta de un relleno (siloxano) recubierto de grupos hidrocarburos (una cadena de C8 o C18); el gradiente de elución es generalmente realizado con sistema binario de solvente, como el agua que contienen acetato o formiato de amortiguamiento, y el metanol o el acetonitrilo como modificador orgánico (el acetonitrilo es preferido al metanol ya que este último puede provocar un elevado ruido de interferencia). De otro lado, la elución isocrática se ha utilizado en algunas ocasiones, pero el procedimiento realmente sin excepción es la elución por gradiente debido a la diversidad de compuestos fenólicos en muchos extractos. Para obtener buenas resoluciones en un tiempo razonable, la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente (Antolovich *et al.*, 2000; Parejo *et al.*, 2004; Naczki y Shahidi, 2004; Rijke *et al.*, 2006).

La cromatografía líquida por lo general se realiza a temperatura ambiente, pero las temperaturas de hasta 40 °C a veces se recomienda para reducir el tiempo del análisis, si el principal propósito del estudio es determinar los principales flavonoides en una muestra, tiempos de corrida de 0,5-1 h generalmente son

suficiente para separar de cinco a diez compuestos de interés. Por otra parte, una separación más exhaustiva de los componentes es necesario tiempos de ejecución de hasta unas 2 h, en esas condiciones, algunos 30-50 compuestos pueden ser fácilmente separados (e identificados) en un sola corrida (Rijke *et al.*, 2006).

La identificación de los compuestos fenólicos requiere el empleo de detectores de UV-vis, arreglo de diodos (DAD) y UV fluorescencia (Naczki y Shahidi, 2004). El detector de DAD es capaz de detectar simultáneamente y registrar los cromatogramas en diferentes longitudes de onda, esta característica mejora significativamente el rendimiento de la separación, especialmente cuando los distintos grupos de antioxidantes fitoquímicos se mezclan en una muestra (Tsao y Deng, 2004). Todas las agliconas de los compuestos fenólicos contienen al menos un anillo aromático y, por consiguiente, son eficaces al absorber la luz ultravioleta. El primer rango máximo, se encuentra de 240-285 nm y se debe al anillo A y el segundo rango máximo, se encuentra en 300-550 nm, para la sustitución del patrón y la conjugación del anillo C (Havsteen, 2002; Tsao y Deng, 2004; Rijke *et al.*, 2006). Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance con un detector de arreglo de diodos (HPLC -DAD) la detección del compuesto fenólico se basa en el tiempo de retención del analito y su espectro de absorción en el rango de longitud de onda UV -Vis obtenido mediante el DAD.

Los datos del espectro UV-Vis de todos los picos de elución de una muestra se pueden escanear y almacenar: cada estándar (compuesto fenólico puro) tiene un tiempo de retención y un espectro de absorción en la región UV- Vis. Un compuesto puede ser identificado si existe concordancia de dichos factores con los de un patrón; pero se trata de una semi - identificación si solo existe coincidencia del analito con el espectro, mas no con el tiempo de retención, entonces el analito

es denominado como derivado de un grupo de fenólicos en particular. De ésta manera se obtiene una visión general de perfil de polifenoles en caso no se disponga del estándar (Tsao y Yang, 2003; Tsao y Deng, 2004).

Muchos autores afirman que el HPLC es una herramienta valiosa para la identificación de compuestos fenólicos y por ello su empleo está bastante difundido. Así, existen diversos artículos científicos de autores como Antolovich *et al.* (2000), Nackz y Shahidi (2004), Tsao y Deng (2004), Robbins y Bean (2004), Parejo *et al.* (2004) y Castañeda-Ovando *et al.* (2009); en los cuales se reportan técnicas de extracción de compuestos fenólicos de alimentos como semillas, hinojo, maní, pepas de uvas, bebidas (vino) y frutas (uvas, jugo de manzanas, fresas, frambuesas, aceituna, naranjas cítricos, pomelos, kiwi), soya y sus derivados, cebolla, tomate, lechuga, frijoles, cocoa, té verde, y su análisis mediante técnicas espectrofotométricas y por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

3.2 MATERIA PRIMA

Se empleó las hojas verdes de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze.), proveniente del Departamento de Puno Provincia de Yunguyo, respectivamente. La planta fue identificada por la Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel, profesora de la Facultad de Ciencias (MOL) y jefa del Herbario de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). Las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a -20 °C en bolsas oscuras hasta el momento de su respectivo análisis.

3.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.3.1 Equipos

- Agitador magnético (Ceramic midi Polimax 2010 Ika).
- Balanza electrónica de precisión (Ohaus Scout II).
- Balanza analítica (Ohaus Adventurer).
- Bomba de vacío (General Electric).
- Centrífuga (Heltich Zentrifugen).
- Congeladora (Electrolux).

- Detector de arreglo de diodos (Waters 2996).
- Espectrofotómetro (Genesys 5. Milton Roy).
- Estufa (Mermmert).
- HPLC Waters 2695
- Módulo de separaciones (Alliance Waters 2695).
- Columna Xterra RP C₁₈ (5µm; 250mm*4.6 mm d.i.; Waters).
- Potenciómetro (410 Aplus Termoorion).
- Propulsor de bomba peristáltica (Masterfelx L/s Cole Parmer Company).
- Refrigeradora (LG y G.C.A Corporation).
- Rotavapor (Laborota 4000 Heidolph).
- Sistema de liofilización (Freezone 4.5 Labconco).
- Ultrasonido (Ultrasonic Cleaners 2510 Branson).
- Vortex Mixer (Wizard & Classic Velp).

3.3.2 Materiales

- Frascos color ámbar de 30 mL
- Fiolas 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Filtros (0,22µm) milipore
- Jeringas
- Matraces de 250, 500 y 1000 mL
- Matraz esmerilado 250 mL
- Micropipetas de 5-50, 20-200 y 100-1000µL con tips
- Peras de decantación 250 mL
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Placas petri
- Probetas de 25, 50, 100 y 500 mL
- Tubos de ensayo de 5, 10 y 15 mL

- Vasos de precipitados de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Vasos para liofilizador (1200 mL) Labconco
- Viales
- Otros materiales necesarios para los diferentes ensayos

3.3.3 Reactivos

- ABTS 2,2 Azino-bis (3 ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) sal de amonio 98% (Sigma Aldrich)
- Acetato de etilo (Sigma Aldrich)
- Acetato de potasio (Mallinckrodt)
- Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific)
- Ácido acético glacial (Fermont)
- Ácido fórmico (Merck)
- Carbonato de sodio (Mallinckrodt)
- Cloruro de aluminio (J. T. Baker)
- Diclorometano (Sigma Aldrich)
- Etanol absoluto al 96% (Montana)
- Folin ciocalteau 2N (Sigma Aldrich)
- Hexano (J. T. Baker)
- Metanol 99,8% (Sigma Aldrich)
- Nitrógeno gaseoso (AGA)
- Persulfato de potasio (Mallinckrodt)
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-acido carboxílico) (Sigma Aldrich)

3.3.4 Estándares de compuestos fenólicos

- Ácidos hidroxicinámicos: ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxicinámico y ácido cafeico fueron adquiridos de ACROS; el ácido cinámico fue adquirido de FLUKA y el ácido clorogénico fue adquirido de Sigma Aldrich.
- Ácidos hidroxibenzoicos: ácido elágico, ácido siríngico y el ácido gálico fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido gentísico y el ácido *p*-hidroxibenzoico fueron adquiridos de ACROS.
- Flavanoles: Catequina, epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina, epigalocatequina galato, galocatequina, galocatequina galato fueron adquiridos de Chromadex.
- Flavonoles: Quercetina, kaempferol y rutina fueron adquiridas de Sigma Aldrich. La mirecitina fue adquirida de Chromadex.
- Flavanonas: La naringenina, chrisina y eriodictiol fueron adquiridos de Sigma Aldrich.
- Proantocianididas: Procianidina B₁ y procianidina B₂ fueron adquiridos de Chromadex.

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 Determinación de humedad

Se determinó según el método gravimétrico porcentual reportado por la A.O.A.C (1990).

3.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Se determinó según el método de ABTS descrito por Arnao (2000). Este método permite evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto frente a un radical libre previamente preparado; esta capacidad antioxidante es medida como la habilidad de los componentes de la muestra para disminuir la absorbancia a la longitud de onda de 734 nm. El procedimiento empleado fue el siguiente:

Se preparó la solución madre con partes iguales en volumen del reactivo: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) o ABTS y del reactivo persulfato de potasio; luego se homogenizó la solución y se dejó reposar por 12 horas en condiciones de oscuridad hasta su dilución con etanol (1:60). Esta solución (previo blanqueo del espectrofotómetro con etanol) debe dar una lectura a 734 nm de $1,1 \pm 0,02$, de lo contrario debe corregirse agregando etanol o solución madre, según sea el caso.

Para proceder a la cuantificación de la capacidad antioxidante se hizo reaccionar 150 μL de muestra con 2850 μL de la solución diluida de ABTS•+ a temperatura ambiente, luego se agitó la mezcla y se dejó reaccionar por un periodo de 1 h en un ambiente oscuro bajo agitación constante. Al concluir este tiempo, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm. El análisis requirió de un blanco, el cual se preparó reemplazando los 150 μl de muestra por etanol y se siguió el mismo procedimiento arriba mencionado.

La capacidad antioxidante se estimó a partir de una curva estándar elaborada con trolox como patrón (Anexo Ia). Los resultados se expresaron como μmol de Trolox equivalente (TE) por gramo o mL de muestra.

La ecuación de la curva estándar para la cuantificación de la capacidad antioxidante en etanol fue la siguiente:

$$Y = 0,7506 \times (\Delta \text{ Abs} - 0,0065)$$

Donde:

Y = Micromol (μmol) de Trolox equivalente (TE)/ml

$\Delta \text{ Abs}$ = Variación de la absorbancia ($\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}$)_{734 nm}

Para expresar los resultados en μmol de Trolox equivalente (TE)/g (b.s.) se procedió de la siguiente forma:

$$\text{CA} = \frac{Y \times (\text{Volumen extracto} \times \text{Fd} \times \% \text{ b.s.})}{\text{g muestra}}$$

Donde:

CA = Micromol (μmol) de Trolox equivalente (TE)/g (b.s.)

Fd = Factor de dilución

% b.s. = Base seca en porcentaje

3.4.3 Determinación de los compuestos fenólicos totales

Se empleó la metodología de Folin-ciocalteu reportada por Singleton y Rosi (1965). El método se basa en la reacción cromófora del extracto de la muestra con el reactivo Folin-ciocalteu en medio básico (Na_2CO_3), que fué determinada espectrofotométricamente a una absorbancia de 755 nm. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Se prepararon soluciones de carbonato de sodio 0,5 M y de Folin-ciocalteu 1N. Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se tomó 500 μL de la muestra y se hizo reaccionar con 250 μL del reactivo Folin-ciocalteu

1N, a ello se le adicionó 1 250 μ L de carbonato de sodio 0,5 M. La mezcla total fue agitada y dejada en reposo por 30 minutos bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente, paralelamente se preparó un blanco con agua en lugar de la muestra y se trabajó bajo las mismas condiciones. Este blanco fue utilizado para calibrar el espectrofotómetro y luego se procedió a leer la absorbancia a 755 nm.

El contenido de compuestos fenólicos totales se estimó a partir de una curva estándar elaborada con una solución acuosa de ácido gálico como patrón (Anexo Ib). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (AGE) por cada g o ml de muestra.

La ecuación de la curva estándar para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales fue la siguiente:

$$Y = 0,037 \times \text{Abs} - 0,0013$$

Donde:

Y = Miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (AGE)/ ml.

Abs = Absorbancia a 755 nm.

Para expresar los resultados en mg de ácido gálico equivalente (AGE) /g (b.s.) se procedió de la siguiente forma:

$$CF = \frac{Y \times (\text{Volumen extracto} \times Fd \times \% \text{ b.s.})}{\text{g muestra}}$$

Donde:

CF = Miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (AGE) /g (b.s.)

Fd = Factor de dilución

% b.s. = Base seca en porcentaje

3.4.4 Determinación de flavonoles y flavonas

Se utilizó el método propuesto por Chang *et al.* (2002). El método estima la cantidad de flavonoides del tipo flavonoles y flavonas presentes en una muestra. El cloruro de aluminio reacciona y forma complejos estables con el grupo keto C4 y con los grupos hidroxil que se encuentran en los carbonos C3 o C5 de las flavonas y flavonoles, así como con los grupos dihidroxil de los anillos A y B de los mismos. El procedimiento fue el siguiente:

Para la determinación del contenido de flavonoles y flavonas se mezclaron 250 μL del extracto, 750 μL de etanol al 96%, 50 μL de cloruro de aluminio al 10% (en el caso del blanco se agregó 50 μL de agua destilada), 50 μL de acetato de potasio 1M y por último 1 400 μL de agua destilada; el conjunto se homogenizó y se dejó reposar por unos 30 minutos en oscuridad, luego del cual se procedió a la lectura de la absorbancia a 415 nm.

El contenido de flavonoles y flavonas se estimó a partir de una curva estándar elaborada con una solución de quercitina como patrón (Anexo Ic). Los resultados se expresaron como mg de quercitina equivalente (QE) por cada gramo o ml de muestra.

La ecuación de la curva estándar para la cuantificación de los compuestos del tipo flavonoles y flavonas fue la siguiente:

$$Y = 0,263 \times (\Delta \text{ Abs} + 0,002)$$

Donde:

Y = Miligramos (mg) de quercitina equivalente (QE)/ml

$\Delta \text{ Abs} = \text{Variación de la absorbancia (Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}})_{515 \text{ nm}}$

Para expresar los resultados en mg de quercitina equivalente (QE)/g (b.s.) se procedió de la siguiente forma:

$$\text{CFF} = \frac{Y \times (\text{Volumen extracto} \times \text{Fd} \times \% \text{ b.s.})}{\text{g muestra}}$$

Donde:

CFF = Miligramos (mg) de quercitina equivalente (QE)/g (b.s.)

Fd = Factor de dilución

% b.s. = Base seca en porcentaje

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para la ejecución de la presente investigación se siguió el siguiente procedimiento:

3.5.1 Selección y Limpieza

Operación que permitió trabajar con las hojas de la inca muña que presentaron las mejores condiciones para la investigación, de modo que no presentaron daños físicos ni microbiológicos.

3.5.2 Liofilización

El objetivo de esta operación fue evaporar el agua que se encuentra en el tejido de las hojas de la inca muña mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas (-50 °C), por un tiempo de 24 a 48 horas.

3.5.3 Molienda

Una vez liofilizada la muestra, se procedió a moler el producto con una licuadora a fin de reducir el tamaño de partícula de las hojas secas. En la muestra molida se determinó: humedad.

3.5.4 Extracción y fraccionamiento de los compuestos fenólicos

En esta etapa se procedió a la extracción y fraccionamiento de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de la inca muña de la siguiente manera:

a. Extracción

La metodología que se siguió para la extracción de los compuestos fenólicos de la muestra de la familia Lamiaceae fue la recomendada por Parejo *et al.* (2004) y Chirinos *et al.* (2007), con ligeras modificaciones (Figura N° 09).

Previo a la extracción, las hojas fueron pasadas por hexano con la finalidad de eliminar componentes de carácter lipofílico como aceites, esteroides y clorofilas, evitando así interferencias en el análisis (Ziaková *et al.*, 2003; Parejo *et al.*, 2004). Los lavados con hexano (lixiviación) fueron realizados en dos etapas (asegurando la eliminación del color verde de las hojas) y bajo una relación hojas/hexano de 1/40 a temperatura ambiente por 1 hora. Luego del lavado se procedió a eliminar el hexano por centrifugación, quedando como material a ser sujeto a la extracción las hojas desgrasadas.

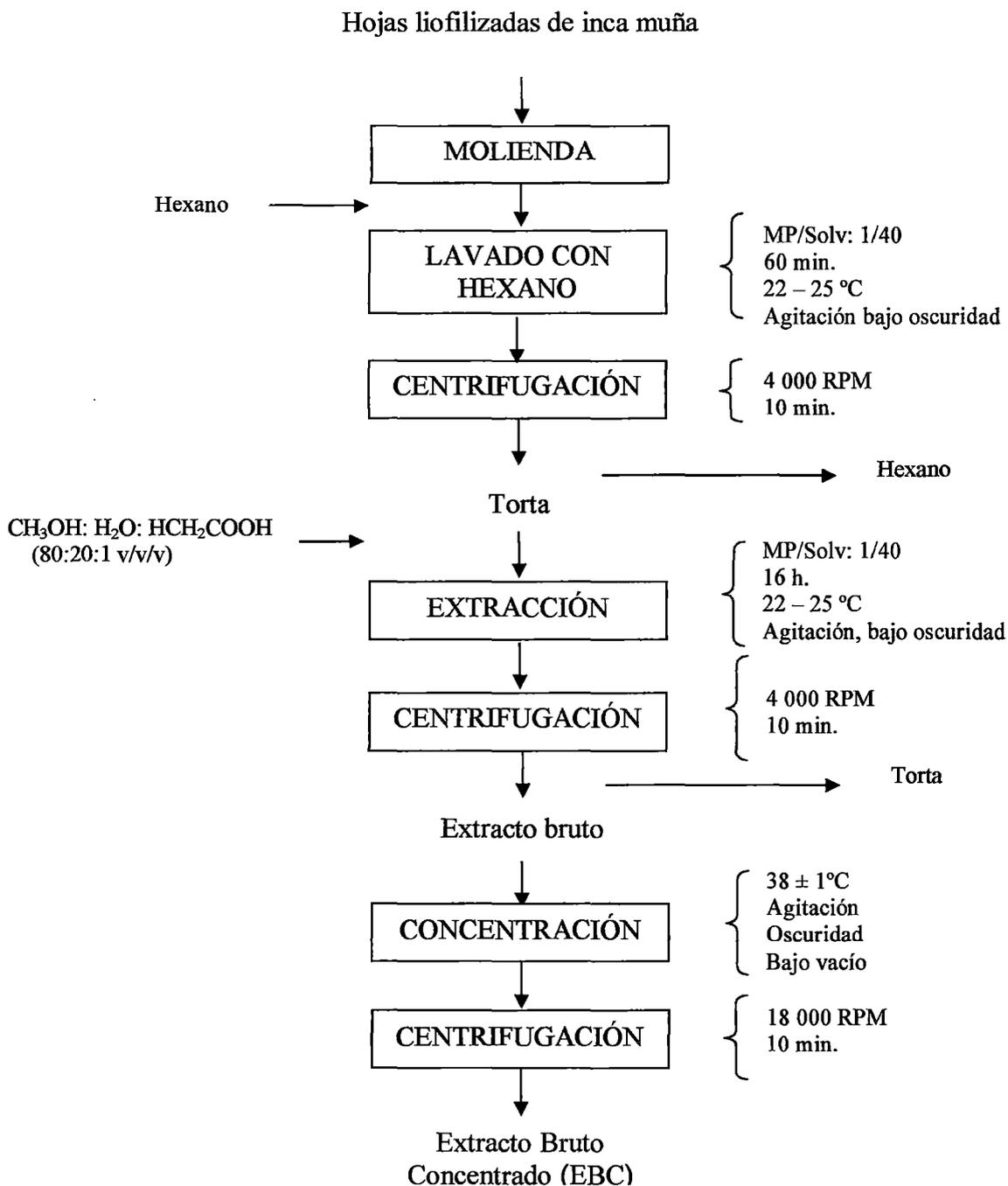


Figura N° 09: Proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de inca muña (Fuente: Elaboración propia)

La extracción de los compuestos fenólicos de las muestras se realizó en las siguientes condiciones:

- Solvente de extracción: mezcla de metanol, agua y ácido acético glacial (80:20:1,v/v/v)
- Relación materia prima/solvente de 1/40.
- Oscuridad, agitación constante y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- Tiempo de extracción de 16 horas.

Una vez finalizado el proceso de extracción, se procedió a centrifugar la mezcla (4 000 rpm por 10 minutos). El sobrenadante obtenido se concentró al vacío hasta un volumen de 5 mL a una temperatura aproximada $38 \pm 1^\circ\text{C}$ con la finalidad de remover el solvente de extracción. El producto residual obtenido fue suspendido en un volumen aproximado de 15 mL de agua miliQ; el extracto acuoso fue llevado a centrifugar (18 000 rpm por 10 minutos) obteniéndose el extracto bruto concentrado (EBC).

b. Fraccionamiento

En esta etapa se procedió a fraccionar a los compuesto fenólicos de las hojas de inca muña presentes en el extracto bruto concentrado, con la finalidad de evitar problemas de coelusión durante el proceso de identificación por HPLC – DAD.

Para esta etapa se empleó la metodología basada en la separación de los compuestos fenólicos en función a la solubilidad de los mismos en dos líquidos inmiscibles: el agua y acetato de etilo (Kennedy, 2002). El EBC se sometió a una

partición líquido-líquido con acetato de etilo bajo una relación 1:1(v/v). La mezcla fue agitada por un minuto, luego del cual hubo una separación de fases por decantación. Este proceso se realizó dos veces. Las fracciones recuperadas en acetato de etilo fueron combinadas y evaporadas a sequedad (bajo vacío a la temperatura de 38 ± 1 °C). El producto residual se resuspendió en metanol grado HPLC, a esta fracción se le denominó fracción acetato de etilo (Fae). De otro lado, la fracción acuosa fue recolectada cuidadosamente y a esta fracción se le denominó fracción acuosa (Fac).

En los extractos y fracciones obtenidas se procedió a determinar el contenido de flavonoles y flavonas, compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante por medio de los ensayos espectrofotométricos mencionados en el punto 3.4. Adicionalmente se determinó la contribución de la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones a los extractos iniciales. En las fracciones también se procedió a la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD.

3.5.5 Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Se empleó la metodología reportado por Tsao y Yang (2003) con ligeras modificaciones. Los estándares, extractos y fracciones de fenólicos fueron separados en una columna de fase reversa instalada en un módulo de separación Waters 2695 el cual está equipado con un auto inyector, un detector de tipo arreglo de diodos (DAD) y el software Empower. Los espectros de absorción se registraron en el rango de 200 – 700 nm durante todas las corridas cromatográficas. Se empleó una columna de C₁₈ XTerra RP₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm. d.i.) y un guarda columna (5 µm; 2,0 x 4,6 mm. d.i.). La fase móvil binaria estuvo compuesta de ácido fórmico al 5 % (A) y acetonitrilo (B). El gradiente de

elusión empleado fue la siguiente: 0 – 15 % de B hasta el minuto 40, 15 – 45 % de B hasta el minuto 45, 45 – 100 % de B hasta el minuto 100. El volumen de la muestra inyectada fue de 20 μ L y el flujo fue de 0,5 mL / min.

Los compuestos fenólicos fueron identificados de acuerdo a su espectro de absorción en la longitud de onda UV – Vis y tiempo de retención al compararlos con los estándares de fenólicos previamente inyectados.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis espectrofotométricos se realizaron por triplicado. Se calculó el promedio aritmético y la desviación estándar del contenido de los compuestos fenólicos, los flavonoles y flavonas y la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones obtenidas. La prueba t se usó para comprobar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias. Las evaluaciones se hicieron con el programa Statgraphics Plus versión 5.

IV. HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

4.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Es posible lograr la identificación, cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) aplicando la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento con el detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

4.2. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

4.2.1. VARIABLES

Las variables que se consideraron en el diseño experimental fueron de tipo cualitativo y cuantitativo.

VARIABLE INDEPENDIENTE: tipo cualitativo

Se consideró 1 variable de estudio, la cual es:

- La inca muña.

VARIABLES DEPENDIENTES: tipo cuantitativo

Como variable dependiente se consideró:

- Fenólicos totales (mg de ácido gálico equivalente (AGE) /g (b.s.))
- Flavonoles y flavonas (mg de quercetina equivalente (QE) /g (b.s.))

- Capacidad antioxidante (μ mol de Trolox equivalente (TE)/g (b.s.))

4.2.2. INDICADORES

Dado que no existe en la bibliografía una norma técnica específica de la incafina que sirva como indicador para las variables consideradas en este trabajo, se mencionó como indicadores a las investigaciones realizadas de las especies pertenecientes a la familia de las lamiaceae (Cuadros N° 01 y 02).

Cuadro N° 01: Compuestos fenólicos totales de especies de la familia lamiaceae

Especie	mg de AGE/g (b.s.)	Autor
<i>Satureja cuneifolia</i>	151	Dorman <i>et al.</i> (2004)
<i>Origanum vulgare</i>	186	Skerget <i>et al.</i> (2005)
<i>Salvia officinalis</i>	8,2	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)
<i>Melisa officinalis</i>	13,2	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 02: Capacidad antioxidante de especies de la familia lamiaceae

Especie	μmol TE/g (b.s.)	Autor
<i>Camellia sinensis (L.) Kuntze</i>	283,0	Luximon – Ramma <i>et al.</i> (2006)
<i>Salvia officinalis</i>	0,17	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)
<i>Origanum vulgare</i>	0,199	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)
<i>Melisa officinalis</i>	0,106	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Elaboración propia

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Extracción de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña

Para la extracción de los compuestos fenólicos se consideró la metodología reportada por Dorman y Hiltunen (2004) y Parejo *et al.* (2004), donde definieron parámetros de extracción de los compuestos fenólicos de plantas aromáticas como *Satureja hortensis* y *Lepechinia graveolens*. En el presente trabajo, además de las condiciones de extracción reportadas por los autores arriba mencionados, se incluyó, previa a la extracción, un lavado con hexano a las muestras, debido a que el material de la planta contiene una enorme variedad de diferentes compuestos lipofílicos como aceites esenciales, esteroides y clorofilas que podrían interferir en el proceso de extracción y en los análisis (Ziaková *et al.*, 2003).

Los resultados de los análisis espectrofotométricos realizados para la inca muña se presentan en el Cuadro N° 03. Respecto al contenido de fenólicos totales la inca muña presentó 91,8 mg de AGE/g (b.s.).

Cuadro N° 03: Determinación de compuestos fenólicos totales, flavonoles y flavonas y capacidad antioxidante del extracto de inca muña

Especie	Fenólicos totales ^a	Flavonoles y flavonas ^b	Capacidad antioxidante ^c
Inca Muña	91,8 ± 8,3	16,0 ± 0,7	1004,1 ± 36,7

^a mg de ácido gálico equivalente (AGE) por gramo de hoja seca. ^b mg de quercetina equivalente (QE) por gramo de hoja seca. ^c μmol equivalente de Trolox (TE) por gramo de hojas (b.s.). ^d Promedio aritmético de tres repeticiones ± desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia

Comparando los valores encontrados para las hojas de la inca muña con lo encontrado en la literatura para plantas de la misma familia, se tiene que las especies *Satureja hortensis* (ajedrea de jardín), *Satureja cuneifolia* y *Origanum syriacum* de Finlandia reportaron un contenido de fenólicos totales de 166 (Dorman y Hiltunen, 2004); 151 y 119 mg de AGE/g (b.s.), respectivamente (Dorman *et al.*, 2004); de igual modo Skerget *et al.* (2005) reportaron un valor de 186 mg AGE/g para el *Origanum vulgare* de Slovenia y Parejo *et al.* (2004) un contenido de 314 AGE/mg para la *Lepechinia graveolens*. Como se puede deducir todas las cifras presentadas son mayores a la obtenida por la especie Lamiaceae evaluada en este estudio.

De otro lado, autores como Proestos *et al.* (2006) encontraron en la especie de *Origanum dictamnus* de Grecia un contenido fenólicos totales de 13,6 mg de AGE/g (b.s.) y Wojdylo *et al.* (2007) reportaron valores de 8,2; 0,1; 1,7; 13,2 y 0,5 mg de AGE/100 g (b.s.) para la salvia (*Salvia officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*), toronjil (*Melisa officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), respectivamente. En este caso las cifras presentadas son bajas comparadas con la encontrada en la presente investigación.

En función a los valores presentados se observa que la inca muña mostró grandes diferencias encontrados con los valores presentados en los párrafos anteriores para las plantas de la misma especie como el romero, orégano, salvia, toronjil y tomillo; estos resultados pudieron deberse a la diferencia entre las especies, a las condiciones del medio ambiente donde se desarrolló la planta (clima, localización, temperatura, fertilidad, enfermedades y exposición a plagas), al tiempo de toma de muestra, los métodos de determinación empleados para la cuantificación, entre otros (Wojdylo *et al.*, 2007).

En el Cuadro N° 03 se reportaron del mismo modo los resultados del análisis de flavonoles y flavonas, así para la inca muña de 16,0 mg de QE/g (b.s.). La relación entre el contenido flavonoles y flavonas respecto al de los compuestos fenólicos para la inca muña fue de 17,4%; lo que indicaría que estas familias participan de forma considerable dentro del conjunto de compuestos fenólicos de la materia prima. También se procedió a evaluar la presencia de los compuestos del tipo flavanol o flavan-3-ol, pero ellos no fueron detectados, indicando que este tipo de compuestos fenólicos no estaría presente en las hojas de la planta estudiada.

Los resultados del análisis para la determinación de la capacidad antioxidante (Cuadro N° 03) dieron valores para la inca muña de 1004,1 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.). Investigadores como Luximon – Ramma *et al.* (2006), reportaron valores de capacidad antioxidante de 283 $\mu\text{mol TE g}$ (b.s.) para el té negro; mientras que en infusiones de agua y extractos orgánicos de mates comerciales se han reportado valores que fluctúan en el rango de 414,1 y 454,3 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (b.s.) (Bravo *et al.*, 2007); finalmente en una solución acuosa de *Satureja hortensis* se determinó una capacidad antioxidante de 0,26 $\mu\text{mol TE/ml}$ de solución (Dorman y Hiltunen, 2004). Por los resultados encontrados, la inca muña presentó una elevada capacidad antioxidante comparada con los resultados reportados para otras hierbas o productos empleados como infusiones.

5.2. Fraccionamiento de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña

Esta etapa se llevó a cabo con la finalidad de fraccionar los compuestos fenólicos presentes en la especie de Lamiaceae en estudio; para ello se utilizó la metodología de la partición líquido – líquido, basada en la solubilidad de ciertos

compuestos fenólicos entre dos líquidos inmiscibles (químicamente muy diferentes): el acetato de etilo y agua (Kennedy, 2002; Paveto *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Producto del fraccionamiento se obtuvieron dos fracciones: la fracción acetato de etilo (Fae) y la fracción acuosa (Fac).

En el Cuadro N° 04 y Figuras N° 10, 11 y 12 se observan los valores del contenido de fenólicos totales, flavonoles y flavonas, y la capacidad antioxidante para la inca muña, de donde se puede evidenciar que hubo una mayor concentración de todas las características evaluadas en las Fae en comparación a las Fac de la inca muña.

Cuadro N° 04. Determinación de compuestos fenólicos totales, flavonoles y flavonas y capacidad antioxidante de las fracciones acetato de etilo (Fae) y acuosa (Fac) de la inca muña

Fracción	Fenólicos totales	Flavonoles y flavonas	Capacidad antioxidante
Fae	64,3 ± 2,0 ^y	10,4 ± 2,0 ^y	647,0 ± 9 ^y
Fac	11,0 ± 0,8 ^x	2,6 ± 0,1 ^x	141,9 ± 9 ^x

^a mg de ácido gálico equivalente (AGE) por gramo de hoja seca. ^b mg de quercitina equivalente (QE) por gramo de hoja seca. ^c μmol equivalente de Trolox (TE) por gramo de hojas secas. * Promedio aritmético de tres repeticiones ± desviación estándar. Las letras diferentes en superíndice dentro de cada columna del cuadro para cada planta indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Altas recuperaciones de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante en el solvente acetato de etilo han sido reportados en otros estudios realizados en plantas aromáticas; así Dorman y Hiltunen (2004), realizaron una partición líquido-líquido en extractos acuosos de *Satureja hortensis* y se observó que la fracción acetato de etilo presentó un alto contenido de fenólicos totales (500 mg de AGE/g) y capacidad antioxidante (2,64 mM TE/ml) en comparación a la fracción acuosa (67,2 mg de AGE/g y 0,41 mM TE/ml, respectivamente);

también Parejo *et al.* (2004), mencionaron que la fracción acetato de etilo obtenida de la *Lepechinia graveolens* presentó una alta concentración de fenólicos totales (686,5 AGE /mg extracto) respecto a la fracción acuosa (303,2 AGE /mg extracto).

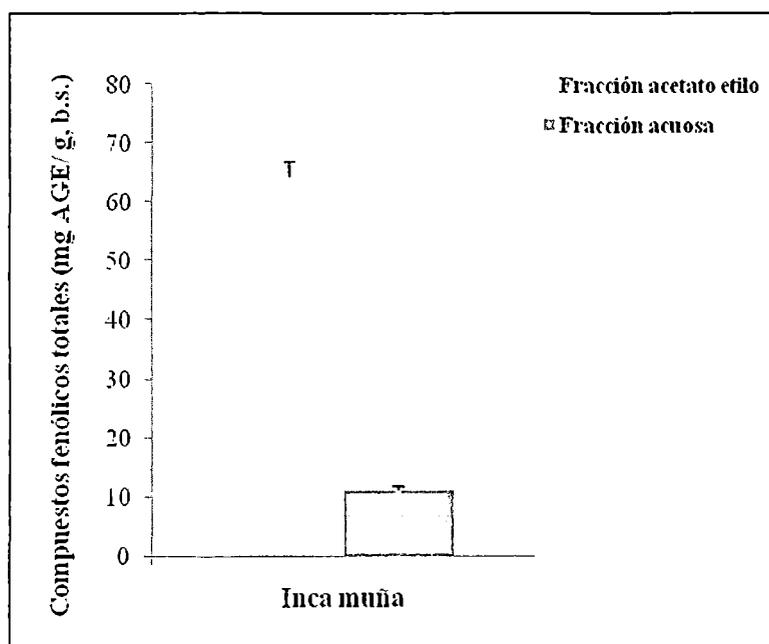


Figura N° 10: Contenido de compuestos fenólicos totales de las fracciones obtenidas para la inca muña (Fuente: Elaboración propia)

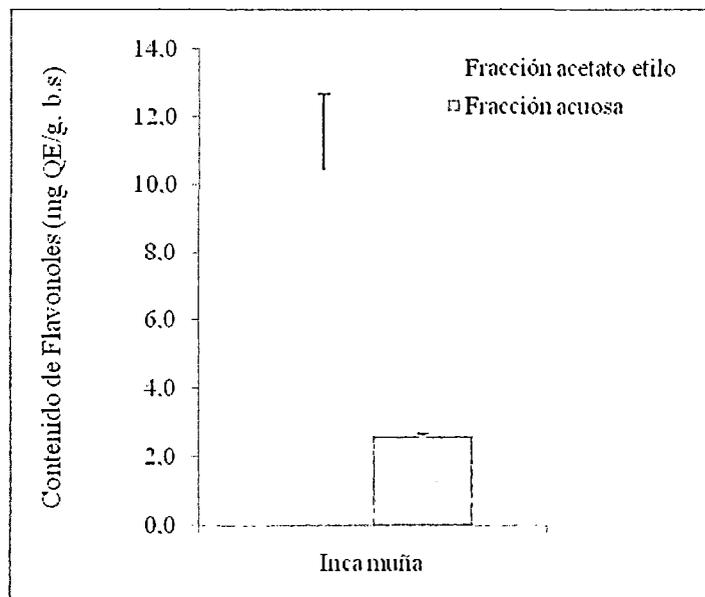


Figura N° 11: Contenido de flavonoles y flavonas en las fracciones obtenidas de la inca muña (Fuente: Elaboración propia)

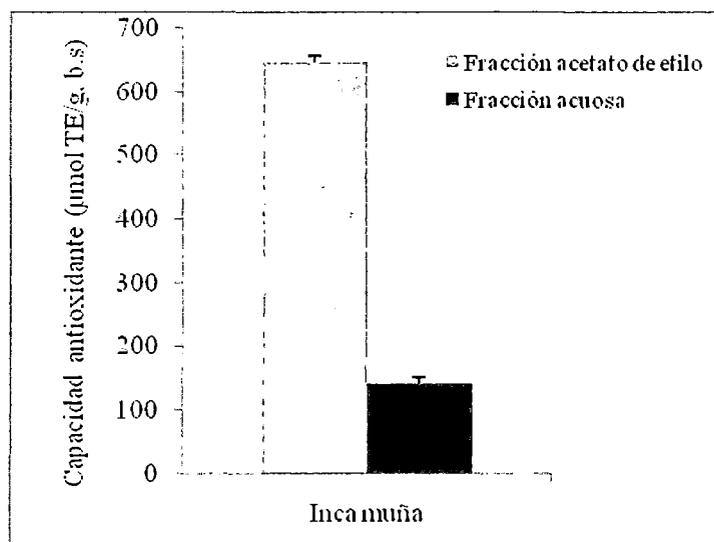


Figura N° 12: Valores de capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas de la inca muña (Fuente: Elaboración propia)

El análisis estadístico indicó que las fracciones: Fae y Fac de la inca muña presentaron diferencias significativas para todos los análisis realizados. Lo que fue confirmado con la prueba t, la que muestra un valor de $p = 0,000$ para capacidad antioxidante y fenólicos totales y flavonoles y flavonas (Anexo IIa).

Tomando en cuenta los valores iniciales encontrados en contenido de compuestos fenólicos, flavonoles y flavonas, y capacidad antioxidante de la inca muña, se determinó que en las Fae se recuperaron en un 70,1%; 65,0% y 64,4%, respectivamente; mientras que las Fac presentaron valores de recuperación de 12,0%; 16,3% y 14,1%, respectivamente.

De otro lado, el fraccionamiento trajo consigo pérdidas para todas las características evaluadas, así la inca muña mostró pérdidas en compuestos fenólicos, flavonoles y flavonas y capacidad antioxidante de 18,0%; 18,8% y 21,4%; las pérdidas podrían deberse al tipo de fraccionamiento utilizado.

De acuerdo al método de fraccionamiento empleado y considerando que los flavonoles y ácidos fenólicos han sido encontrados en fracciones extraídas con acetato de etilo (Pedreschi y Cisneros – Zevallos, 2007) es muy posible que los fenólicos presentes en la Fae posean esas estructuras y sean representativas en la especie en estudio.

En función a los resultados encontrados, las Fae fue la que presentó potenciales características antioxidantes; así la actividad de los componentes fenólicos solubles de esta fracción presentarían buenas propiedades para ser utilizados como agentes antioxidantes y/o preservantes en futuras aplicaciones.

Con la finalidad de elucidar a las principales familias de compuestos fenólicos y al tipo de compuesto fenólico presentes en ambas fracciones de la inca muña se procedió a realizar el análisis de HPLC en fase reversa.

5.3. Identificación de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de inca muña

El perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones obtenidas después de la partición líquido – líquido con acetato de etilo para la inca muña fueron determinadas a 280 y 320 nm debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos detectados presentaron máximas absorbancias a esas longitudes de onda.

La identificación de los picos de los compuestos fenólicos en las hojas de la especie evaluada se realizó con el detector de DAD que es capaz de detectar y registrar simultáneamente cromatogramas a diferentes longitudes de onda, logrando obtener en primer lugar los espectros de absorción en un amplio rango UV – visible (de 200 a 700 nm) de los picos de interés y en segundo lugar de los cromatogramas obtenidos se pueden determinar los tiempos de retención para cada pico; estas dos características fueron comparadas con la de los estándares de compuestos fenólicos previamente inyectados para lograr identificar a los principales fenólicos presentes en la muestra. Se consideraron como “derivados” a los compuestos fenólicos que presentaron el mismo espectro de absorción al de un estándar fenólico más no el mismo tiempo de retención, de esta forma se obtuvo un panorama del tipo de familias de compuestos fenólicos presentes.

Cuando la muestra está compuesta por una gran cantidad de compuestos, la sensibilidad para la identificación de los compuestos fenólicos es menor, debido a la complejidad que presentan los cromatogramas así como a los posibles efectos

de co-elusión, evitando una clara identificación de los compuestos de interés. Por ello el propósito del fraccionamiento empleado fue separar a los compuestos fenólicos en función a sus características de solubilidad en acetato de etilo y agua; y de este modo facilitar la identificación por HPLC-DAD. Los procesos de fraccionamiento brindan ventajas al detector DAD, pues mejoran su selectividad, eficiencia y sensibilidad, reduciendo la complejidad del cromatograma y permitiendo la identificación de muchos compuestos al compararlos con los estándares.

a. Identificación de los compuestos fenólicos en la fracción acuosa

En la Figura N° 13 se muestran los cromatogramas de la Fac de las hojas de inca muña a 280 y 320 nm. Un total de 10 principales picos fueron detectados, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 30,6 y 64,2 minutos. En esta fracción no se identificó a ningún compuesto fenólico, sin embargo se encontraron a las familias de fenólicos del tipo: ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavonoles (Cuadro N° 05).

Los picos detectados fueron designados como derivados del ácido cafeico (picos 1, 2, 3 y 10), del ácido *p*- cumárico (picos 4, 5 y 6), del eriodictiol (pico 7 y 9) y de la rutina (pico 8) debido a la similitud de las características espectrales con los respectivos estándares. La cantidad total de ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavonoles para la Fac de las hojas de inca muña fue de: 1,05; 1,56 y 0,28 mg/g (b.s.) respectivamente, haciendo un total de compuestos fenólicos de 2,89 mg/g (b.s.). El pico más representativo para esta fracción fue el pico 9 (derivado de eriodictiol).

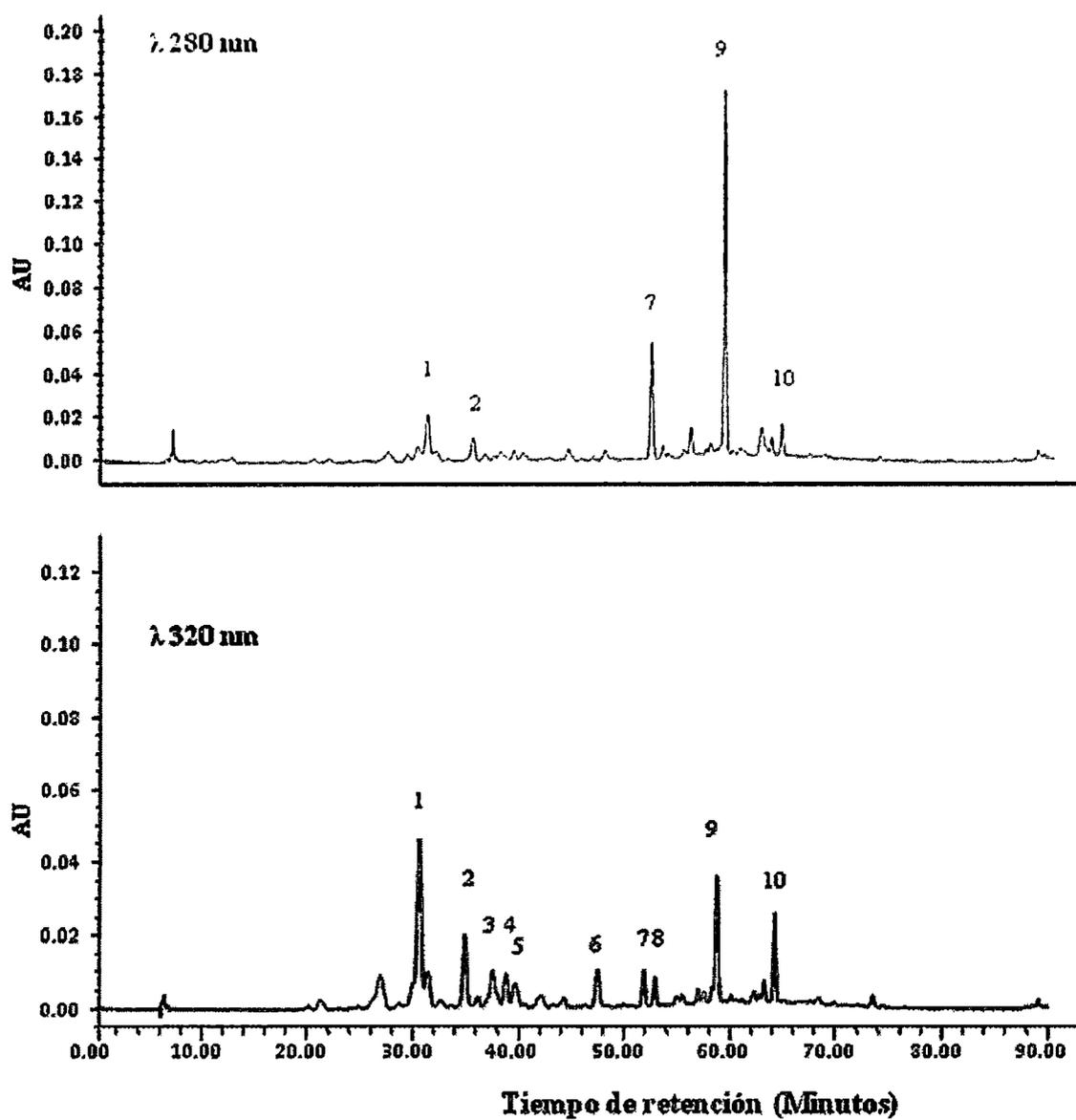


Figura N° 13: Perfil cromatográfico HPLC-DAD de la fracción acuosa de las hojas de la inca muña (Fuente: Elaboración propia)

De forma general, se observó que la Fac destacó por la mayor presencia de derivados de flavanonas del tipo eriodictiol seguida de los hidroxicinámicos y finalmente de los flavonoles.

Cuadro N° 05: Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la fracción acuosa de las hojas de la inca muña

N° Pico	Tiempo de retención (min)	λ_{\max} (nm)	Compuesto fenólico asignado	Total (mg/g, b.s.)
1	30,6	329,5	Derivado de ácido hidroxicinámico ^a	0,49
2	34,9	329,5	Derivado de ácido hidroxicinámico ^a	0,17
3	37,5	333,1	Derivado de ácido hidroxicinámico ^a	0,05
4	38,8	316,4	Derivado de ácido hidroxicinámico ^b	0,06
5	39,7	317,6	Derivado de ácido hidroxicinámico ^b	0,07
6	47,5	316,4	Derivado de ácido hidroxicinámico ^b	0,07
7	51,8	285,5	Derivado de Flavanona ^c	0,41
8	52,9	255,9;349,8	Derivado de Flavonol ^d	0,28
9	58,8	284,3;331,9	Derivado de Flavanona ^c	1,15
10	64,2	330,7	Derivado de ácido hidroxicinámico ^a	0,14

Los ácidos hidroxicinámicos fueron cuantificados a 320 nm usando su correspondiente estándar aglicón. Las flavanonas fueron cuantificadas a 280 nm usando su correspondiente aglicón estándar. Los flavonoles fueron cuantificados a 360 nm usando su correspondiente aglicón estándar. ^a Cuantificado como ácido cafeico, ^b Cuantificado ácido *p*-cumárico. ^c Cuantificado como eriodictiol. ^d Cuantificado como rutina.

Fuente: Elaboración propia

b. Identificación de los compuestos fenólicos en la fracción acetato de etilo

En la Figura N° 14 se muestran los cromatogramas de la Fae de las hojas de inca muña a 280 y 320 nm. Un total de 4 principales picos fueron detectados, los cuales presentaron tiempos de retención entre los 58,7 y 80,0 minutos. En esta fracción, al igual que en la fracción acuosa, se encontraron compuestos fenólicos del tipo: ácidos hidroxicinámicos del tipo ácido cafeico (pico 10), flavanona del tipo eriodictiol (pico 9) y flavonas del tipo apigenina (picos 1' y 2') (Cuadro N° 06). Como se puede observar en esta fracción se hizo presente dos nuevos picos, el 1' y 2', la cual no estuvo presente en la fracción acuosa

La cantidad total de ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavonas para la Fae de las hojas de inca muña fue de: 18,5; 2,1 y 3,9 mg/g (b.s.), respectivamente. El total de compuestos fenólicos comprendidos en esta fracción fue de 24,5 mg/g (b.s.). Como se observa fue superior al de la Fac de la misma especie.

La destacada participación del pico 10, derivado del ácido hidroxicinámico, en las fracciones acetato de etilo de la inca muña, se debería a la presencia del ácido rosmarínico (éster del ácido cafeico conformado por el ácido 2-hidroxi-dihidrocafeico más el ácido cafeico), el cual ha sido elucidado en casi todas las especies pertenecientes a la familia Lamiaceae y al que se le atribuye potentes propiedades antioxidantes, por lo que a este pico se le podría atribuir las altas capacidades antioxidantes encontradas en las fracciones acetato de etilo de la inca muña.

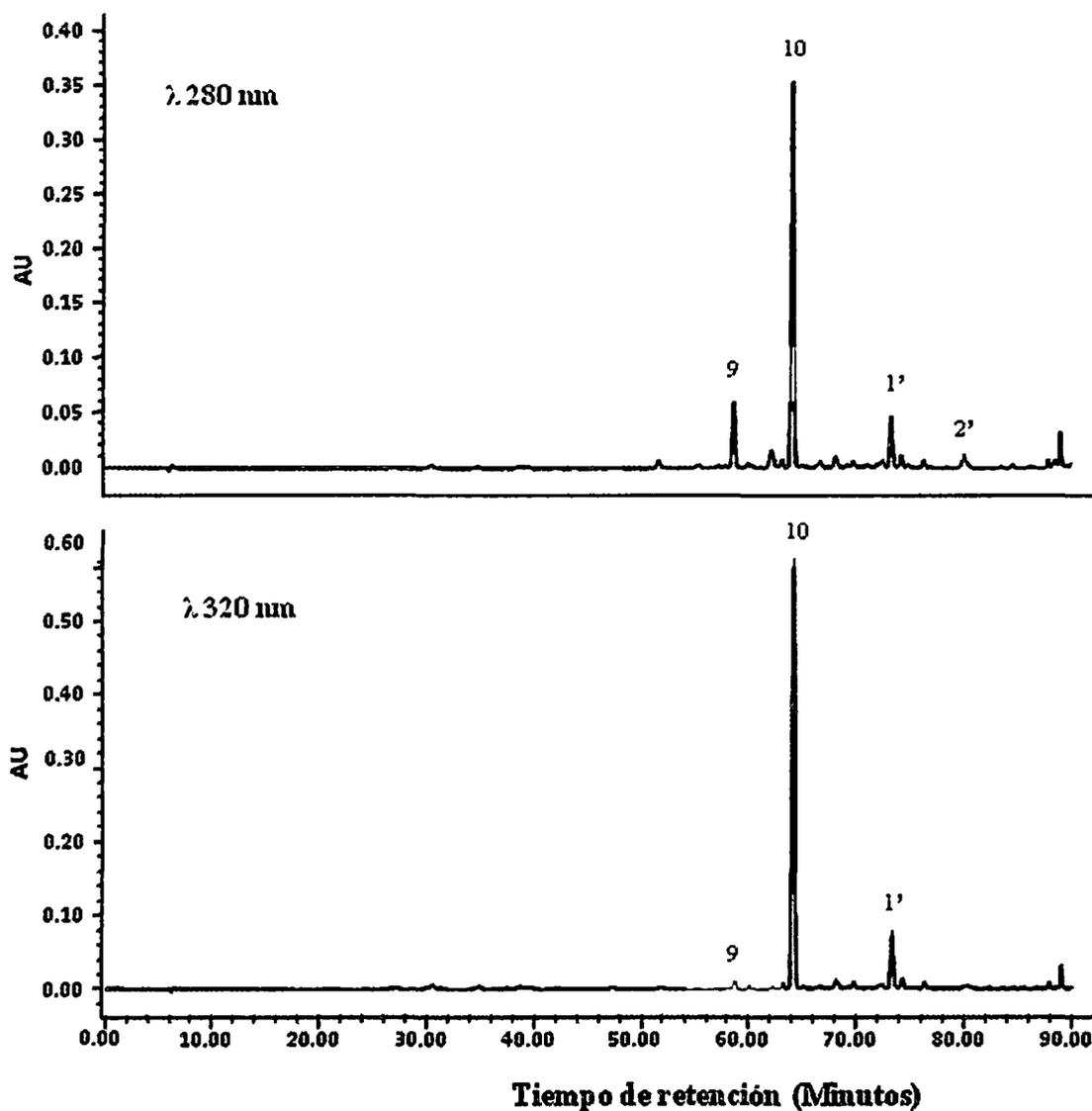


Figura N° 14: Perfil cromatográfico HPLC-DAD de la fracción acetato de etilo de las hojas de la inca muña (Fuente: Elaboración propia)

Cuadro N° 06: Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos detectados en la fracción acetato de etilo de las hojas de inca muña

N° Pico	Tiempo de retención (min)	λ_{\max} (nm)	Compuesto fenólico asignado	Total (mg/g b.s.)
9	58,7	284,3;328,3	Derivado de Flavanona ^b	2,16
10	64,1	330,7	Derivado de ácido hidroxicinámico ^a	18,51
1'	73,3	245,3;318,8	Derivado de Flavona ^c	3,90
2'	80,0	287,9	Derivado de Flavona ^c	Tr

Los ácidos hidroxicinámicos y la flavona fueron cuantificados a 320 nm usando su correspondiente estándar aglicón. Las flavanonas fueron cuantificadas a 280 nm usando su correspondiente aglicón estándar. ^a Cuantificado como ácido cafeico, ^b Cuantificado eriodictiol. ^c Cuantificado como apigenina. Tr: trazas.

Fuente: Elaboración propia

Ambas fracciones de la inca muña (Fac y Fae) mostraron perfiles cromatográficos diferentes, pero contenían el mismo tipo de familia de compuestos fenólicos, aunque la Fac presentó únicamente a la familia de los flavonoles y ácidos hidroxicinámicos de tipo ρ -cumarico, sin embargo la Fae presentó a la familia de las flavonas; diferencias en la distribución y concentración de los picos detectados también se evidenciaron.

En general para la especie en estudio la fracción acetato de etilo destacó por sobre la fracción acuosa en concentración de compuestos fenólicos de derivados de ácidos hidroxicinámicos seguido de las flavonas y flavanonas, mientras que la fracción acuosa destacó en contenido de derivados de flavanonas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

Investigaciones realizadas en diferentes especies de la familia Lamiaceae han evidenciado la presencia de los compuestos fenólicos encontrados en el presente estudio. Así Regnault – Roger *et al.* (2004), indicaron que el ácido

cafeico fue encontrado en la *Satureja hortensis*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* en concentraciones de 1,0; 1,1 y 0,87 mg/g (b.s.), respectivamente, mientras que derivados de eriodictiol se presentaron en la *Satureja hortensis* (0,18 mg/g, b.s.). Dorman *et al.* (2004), reportaron en la especie *Satureja cuneifolia* de Finlandia al ácido cafeico (0,07 mg/g) y apigenina (0,29 mg/g); también Parejo *et al.* (2004), evidenciaron en la *Lepechinia graveolens* a derivados de flavanonas y flavonas (eriodictiol-7-O-rutinósido, apigenina-7-O-rutinósido). En un trabajo realizado por Kosar *et al.* (2005), el ácido cafeico fue detectado en la *Salvia officinalis* y *Satureja hortensis* (0,97 y 1,38 mg/g, respectivamente); el eriodictiol en la *Satureja hortensis* y *Thymus vulgaris* (0,88 y 3,70 mg/g, respectivamente) y apigenina en el *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja hortensis* y *Thymus vulgaris* (1,51; 1,80; 5,78 y 5,28 mg /g, respectivamente). La presencia de apigenina en el *Origanum vulgare* también ha sido indicado por Skerget *et al.*, (2005). Skoula *et al.* (2005), encontraron en la *Satureja thymbra* de Grecia al eriodictiol (0,64mg/g, b.s.) y apigenina (0,31 mg/g, b.s.) y Proestos *et al.* (2006), reportaron en el *Origanum dictamnus* de Grecia al ácido cafeico (0,23 mg/g, b.s.) y ácido *p*-cumárico (0,04 mg/g, b.s). Finalmente Wojdylo *et al.* (2007), encontraron en la *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Melisa officinalis* al ácido cafeico a las concentraciones de 2,96; 6,49; 4,06 y 8,58 mg/g (b.s.), mientras que el ácido *p*-cumárico fue detectado en la *Salvia officinalis* (0,10 mg/g, b.s.) y la apigenina en la *Salvia officinalis* y *Rosmarinus officinalis* (0,22 y 0,43 mg/g, b.s, respectivamente).

Como se observa la gran mayoría de investigaciones citadas hacen referencia a los mismos tipos de compuestos fenólicos detectados para la inca muña, donde diferencias en el tipo y concentración de compuesto fenólico se hacen presente, lo que hace particular el perfil de compuestos fenólicos para cada especie.

VI. CONCLUSIONES

1. La capacidad antioxidante de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) fue 1004,1 $\mu\text{mol TE/g}$ (b.s.). El contenido de compuestos fenólicos totales fue 91,8 mg de AGE/g (b.s.). Flavonoles y flavonas se presentó en cantidad de 16,0 mg de QE/g (b.s.).
2. Después de la partición líquido – líquido (agua:acetato de etilo), la capacidad antioxidante, el contenido de fenólicos totales, flavonoles y flavonas se concentró mayormente en la Fae comparado a la Fac de inca muña.
3. En la Fac de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) se detectaron 10 picos, de las familias de compuestos fenólicos con similitud a los derivados de ácidos hidroxicinámicos del tipo cafeico, *p*- cumárico, flavanonas del tipo eriodictiol y flavonoles del tipo rutina. El pico más representativo fue el derivado de eriodictiol. La cantidad total de ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavonoles para la Fac fue de: 1,05; 1,56 y 0,28 mg/g (b.s.), respectivamente, haciendo un total de compuestos fenólicos de 2,89 mg/g (b.s.).
4. En la Fae de la inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) 4 picos de compuestos fenólicos se detectaron, encontrándose derivados de ácidos hidroxicinámicos del tipo ácido cafeico, flavanona del tipo eriodictiol y flavonas del tipo apigenina en cantidades de: 18,51; 2,16 y 3,90 mg/g (b.s.), respectivamente; haciendo un total de 24,57 mg/g (b.s.). El pico más representativo fue el derivado de ácido cafeico.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar los análisis de espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear para la identificación completa de los derivados de los compuestos fenólicos detectados en la presente investigación.
2. Evaluar el uso potencial de los compuestos fenólicos de la inca muña como producto funcional o nutraceutico, por medio de investigaciones *in vivo*, incluyendo estudios de absorción y el metabolismo en el tracto gastrointestinal.
3. Evaluar el potencial antimicrobiano de los compuestos fenólicos de la inca muña con un panel de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas putida*.
4. Evaluar la aplicación de la fracción acetato de etilo de la inca muña como agente antioxidante y/o preservante natural en diversos sistemas alimenticios.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ABAD, M. J., BERMEJO, P., GONZALES, E., IGLESIAS, I., IRURZUN, A., Y CARRASCO, L. (1999). Antiviral activity of bolivian plant extracts. *General Pharmacology*, 32, 499-503.
2. AHERNE, N. A., Y O'BRIEN, N. M. (2002). Review article: dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
3. ALARCÓN, E., CAMPOS, A. M., EDWARDS, A. M., LISSI, E., Y LÓPEZ-ALARCÓN, C. (2007). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: a comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*, 107, 1114-1119.
4. ALCOLEA, J., CANO, A., ACOSTA, M., Y ARNAO, M. (2002). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 46, 353-356.
5. ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K., Y RYAN, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst Critical Review*, 125, 989-1009.
6. ARNAO, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 419-421.
7. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., Y SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
8. BAZINET, L., LABBÉ, D., Y TREMBLAY, A. (2007). Production of green tea EGC- and EGCG-enriched fractions by a two-step

- extraction procedure. *Separation and Purification Technology*, 56, 53-56.
9. BRAVO, L., GOYA, L., Y LECUMBERRI, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393-405.
 10. CABRITA, M. J., TORRES, M., PALMA, V., ALVES, E., PATAO, R., Y COSTA FREITAS A. M. (2007). Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*, 74, 1281-1286.
 11. CADENAS, E. (2001). Sustancias flavonoides. Disponible en: www.antioxidants.com.ar/12/Art020.htm. [Accesado el 28 de Mayo de 2007].
 12. CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., Y GALÁN-VIDAL, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113, 859-871
 13. CHANG, H. C., HUNG, W. C., HUANG, M. S., Y HSU, H. K. (2002). Extract from the leaves of (*Toona sinensis*) roemor exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 30, 307-314.
 14. CHIRINOS, R., ROGEZ, H., CAMPOS, D., PEDRESCHI, R., Y LARONDELLE, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaelum tuberosum Ruiz & Pavón*) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55, 217-225.

15. DASTMALCHI, K., DORMANA, H. J. D., OINONENA, P. P., DARWISD, Y., LAAKSOA, I., Y HILTUNENA, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 391-400.
16. DICKO, M. H., GRUPPEN, H., TRAORÉ1, A. S., VORAGEN, A. G. J. Y VAN BERKEL, W.J.H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 21-38.
17. DIMITRIOS, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 505-512.
18. DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., KOSAR, M., Y HILTUNEN, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grow in turkey. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.
19. DORMAN, H.J.D. Y HILTUNEN, R. (2004). Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, 88, 193-199.
20. DREOSTI, I.E. (2000). Functional foods: antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16, 692-694.
21. EZOUBEIRI, A., GADHI, C. A., FDIL, N., BENHARREF, A., JANA, M., Y VANHAELEN, M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 287-292.
22. HÄKKINEN, S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation of the Faculty of Medicine. University of Kuopio. En línea.

<http://www.uku.fi/vaitokset/2000/shakkinen.PDF>. [citado el 12 de setiembre del 2008].

23. HALLIWELL, B., Y GUTTERIDGE, J.M.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 125-126.
24. HAVSTEEN, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
25. HOU, Z., LAMBERT, J. D., CHIN, K-V. Y YANG, C. S. (2004). Review: effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555, 3-19.
26. KÄHKÖNEN, M. P., Y HEINONEN, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628-633.
27. KENNEDY, J.A. (2002). Proanthocyanidins. Extraction, purification and determination of subunit composition by HPLC. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1-11). New York: John Wiley and Sons, 2002, Unit I 1.4.
28. KOSAR, M., DORMAN, H. J. D., Y HILTUNEN, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry* 91, 525-533.
29. LIMA, M. J. R., TÓTH, I., Y RANGEL, A. (2005). A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*, 68, 207-213.
30. LIYANA-PATHIRANA, C. Y SHAHIDI, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, 47-56.

31. LIZARRAGA, E., Y ABDALA, L. R. (2004). Compuestos fenólicos mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 23, 198-200.
32. LUXIMON – RAMMA, A., NEERGHEEN, V., BAHORUNT, T., CROZIER, A., ZBARSY, V., DATLA, K., DEXTER, D., Y AUROMA, O. (2006). Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: A potential contributor to their antioxidant functions. *Biofactors*, 27, 79 – 91.
33. MACBRIDE, J.F. (1960). Flora of Peru. Botanical series field museum of natural history, 12, 754.
34. MACHEIX, J-J., FLEURIET, A., Y BILLOT, J. (1990) Fruit phenolics. Boca Raton, Fla: CRS Press, 19.
35. MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C., Y JIMENEZ, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
36. MATKOWSKI, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants a review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.
37. MARTÍNEZ, A. (2005). Flavonoides. En línea. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>. [citado el 16 de noviembre del 2007].
38. MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M., Y ROS, G. (2000). Significad nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. En *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 5-18.
39. MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NUÑEZ, M. J., Y PARAJÓ, J. C. (2001). Review: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.

40. MUFFLER, K. Y ULBER, R. (2005). Marine biotechnology II. Advances in Biochemical engineering/biotechnology, 97, 63-103. Series Editor T. Scheper. Published online: 8 august 2005.
41. NACZKA, M. Y SHAHIDI, F. (2004). Review extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.
42. NAJAFPOUR, G. (2007). Biochemical Engineering and Biotechnology. Elsevier publications. The Netherlands
43. NINGAPPA, M. B., DINESHA, R., Y SRINIVAS, L. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. Food Chemistry, 106, 720-728.
44. PAREJO, I., CAPRAI, E., BASTIDA, J., VILADOMAT, F., JÁUREGUI, O., Y CODINA, C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. Journal of Ethnopharmacology, 94, 175-184.
45. PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., Y CODINA, C. (2004). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. Analytica Chimica Acta, 512, 271-280.
46. PAVETO, C., GÜIDA M. C, ESTEVA M. I, MARTINO V., COUSSIO J., FLAWIA M. M, Y TORRES H. N. (2004). Anti-Trypanosoma cruzi activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 69-74.
47. PEDRESCHI, R., Y CISNEROS-ZEVALLOS, L. (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). Food Chemistry, 100, 956-963.

48. PETERSON, J. Y DWYER, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18, 1995-2018.
49. PINELO, M., SINEIRO, J., Y NÚÑEZ, M .J. (2006). Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77, 57-63.
50. PROESTOS, C., SERELI, D., Y KOMAITIS, M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95, 44-52.
51. PROESTOS, C., BOZIARIS, I.S., NYCHAS, G.-J.E., Y KOMAITIS, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, 664-671.
52. REGNAULT-ROGER, C., RIBODEAU, M., HAMRAOUI, A., BAREAU, I., BLANCHARD, P., GIL-MUNOZ, M. I., Y BARBERAN, F. T. (2004). Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40, 395-408
53. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., Y PAGANGA, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
54. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., Y PAGANGA, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2, 152-159.
55. RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W. M. A., ARIESE, F., GOOIJER, C., Y BRINKMAN. U. A. TH. (2006). Review: Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63

56. RIZZO, M., VENTRICE, D., VARONE, M. A., SIDARI, R., Y CARIDI, A. (2006). HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 46-55.
57. ROBBINS, R. J. Y BEANB, S. R. (2004). Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1038, 97-105.
58. SINGLETON, V. L., Y ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with hosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, 16,144-158.
59. SKOULA M., GRAYER R. J. Y KITE G. C. (2005). Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 541-544.
60. SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., RIZNER, A., SIMONIC, M., Y KNEZ, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
61. STRATIL, P., KLEJDUS, B., Y KUBÁN, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 1741-1751.
62. SNIJMAN, P., SWANEVELDER, S., JOUBERT, E., GREEN, I., Y GELDERBLOM, W. (2007). The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose–response effects on mutagen activation–flavonoid interactions. *Mutation Research*, 631, 111-123.
63. TAKHTAJAN, A. (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review*, 295.

64. TARNAWSKI, M., DEPTA, K., GREJCIUN D., Y SZELEPIN, B. (2006). HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 182–188.
65. TEODORO, A. F. (2003). *Fitomedicina, 1100 plantas medicinales*. Lima, 271.
66. TRONCOSO, N., SIERRA, H., CARVAJAL, L., DELPIANO, P., Y GÜNTHER, G. (2005). Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. *Journal of Chromatography*, 1100, 20-25.
67. TROUILLAS, P., MARSAL, P., SIRI, D., LAZZARONI, R., Y DUROUX, J-L. (2006). A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*, 97, 679–688.
68. TSAO, R. Y DENG, Z. (2004). Review: Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.
69. TSAO, R., YANG, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex ad real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high- performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 1018, 29-40.
70. VRCHOVSKÁ, V., SOUSA, C., VALENTÃO, P., FERRERES, F., PEREIRA, J. A., SEABRA, R. M. Y ANDRADE, P. B. (2006). Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chemistry*, 98, 416-425.

71. WANG, H., CAO, G., Y PRIOR, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309.
72. WANG, S. Y., Y LIN, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
73. WOJDYLO, A., OSZMIANSKI, J., Y CZEMERYS, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
74. YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M. T., Y NEWMARK, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381-406.
75. ZHOU, Z., ROBARDS, K., HELLIWELL, S., Y BLANCHARD, C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87, 401-406.
76. ZIAKOVÁ, A., BRANDSTETEROVÁ, E., Y BLAHOVA, E. (2003). Short communication matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 983, 271-275.
77. ZIRENA, L. (1945). Estudio botánico y químico de la *Satureja boliviana*. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima - Perú.

ANEXOS

ANEXO I. CURVA ESTANDAR

a. Curva estándar para la capacidad antioxidante

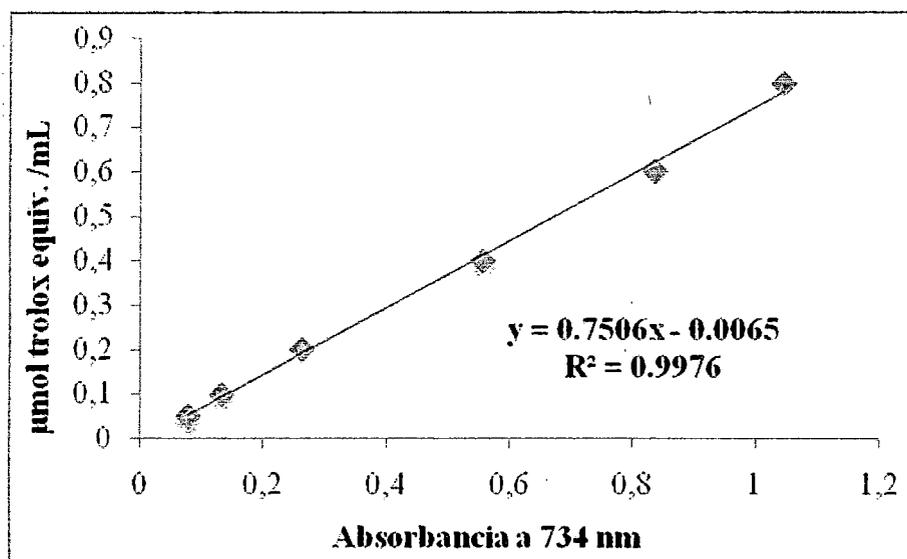


Figura N° 01: Curva estándar de trolox para el ensayo de ABTS (actividad antioxidante) a 734 nm (Fuente: Elaboración propia)

$$Y = 0,7506 \times \Delta \text{ Abs} - 0,0065$$

Donde:

Y = Micromol (μmol) de trolox equivalente (TE)/ ml.

$\Delta \text{ Abs}$ = Variación de la absorbancia.

b. Curva estándar para los compuestos fenólicos

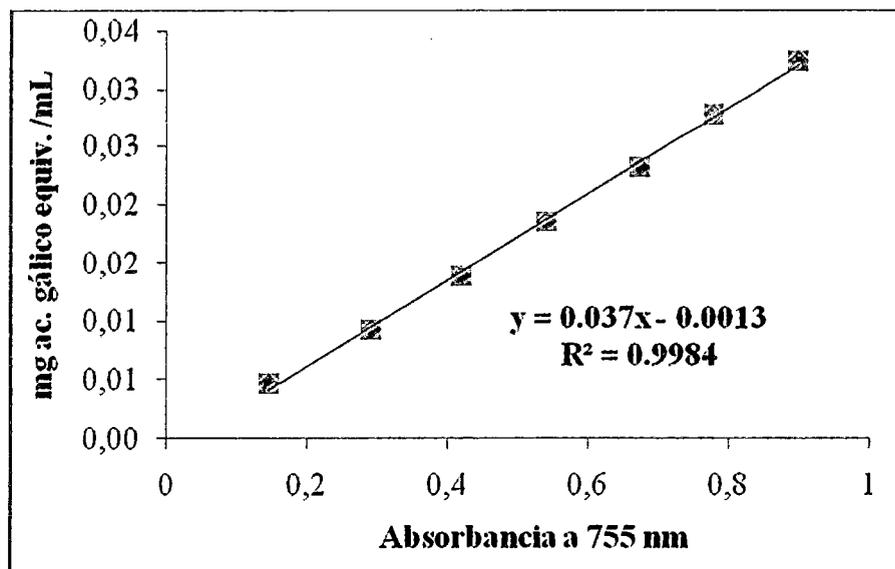


Figura N° 02: Curva estándar de ácido gálico para el ensayo de compuestos fenólicos totales a 755 nm (Fuente: Elaboración propia)

$$Y = 0,037 \times \text{Abs} - 0,0013$$

Donde:

Y = Miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (AGE)/ ml.

Abs = Absorbancia a 755 nm.

c. Curva estándar para los flavonoles y flavonas

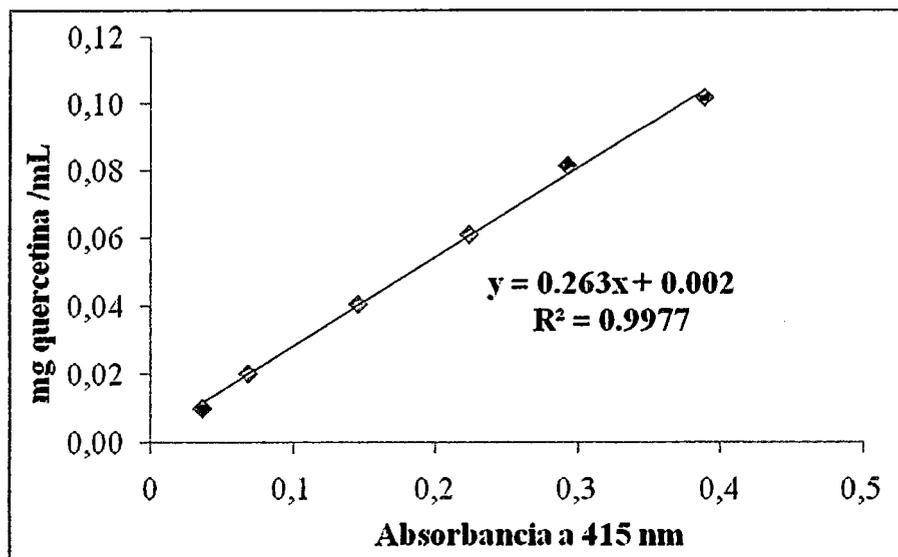


Figura N° 03: Curva estándar de quercitina para el ensayo de flavonoles y flavonas a 415 nm (Fuente: Elaboración propia)

$$Y = 0,263 \times \text{Abs} + 0,002$$

Donde:

Y = Miligramos (mg) de Quercitina/ ml.

Abs = Absorbancia. A 415 nm.

ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

a. Prueba de t entre fracciones

Comparación de dos muestras – F.ae CA & F.ac CA

Resumen del procedimiento

Muestra 1: Fae CA

Muestra 2: Fac CA

Muestra 1: 9 valores 633,316 hasta 673,788

Muestra 2: 9 valores 135,324 hasta 156,322

El StatAdvisor

Este procedimiento está diseñado para comparar dos muestras de datos.

Resumen Estadístico

	F.ae CA	F.ac CA
Frecuencia	9	9
Media	646,997	141,935
Varianza	203,171	68,1805
Desviación típica	14,2538	8,25715
Mínimo	633,316	135,324
Máximo	673,788	156,322
Rango	40,472	20,998
Asimetría tipi.	1,27378	1,23399
Curtosis típificada	-0,0333041	-0,531845

El StatAdvisor

Esta tabla muestra el resumen estadístico para las dos muestras de datos. Pueden usarse otras opciones tabulares dentro de este análisis para probar si las diferencias entre las estadísticas de las dos muestras son estadísticamente significativas.

Comparación de Medias

95,0% intervalo de confianza para la media de F.ae CA: 646,997 +/- 10,9565
→[636,041; 657,953]

95,0% intervalo de confianza para la media de Fac CA: 141,935 +/- 6,34702
→[135,588; 148,282]

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: 505,062 +/- 11,6403 [493,421; 516,702]

Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

Suponiendo varianzas iguales: $t = 91,9812$ P-Valor = 0,0

El StatAdvisor

Esta opción ejecuta el t-test para comparar las medias de las dos muestras. También establece los intervalos de confianza o los límites para cada media y para la diferencia entre las medias. De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde 493,421 hasta 516,702. Dado que el intervalo no contiene el valor 0,0, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras para un nivel de confianza del 95,0%. También puede aplicarse un t-test para probar una hipótesis específica sobre la diferencia entre las medias de las poblaciones de las

que proceden las dos muestras. Puesto que el p-valor calculado es inferior a 0,05, podemos rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa.

Comparación de dos muestras – F.ae FT & F.ac FT

Resumen del Procedimiento

Muestra 1: Fae FT

Muestra 2: Fac FT

Muestra 1: 9 valores 60,903 hasta 67,156

Muestra 2: 9 valores 10,224 hasta 11,949

El StatAdvisor

Este procedimiento está diseñado para comparar dos muestras de datos.

Resumen Estadístico

	F.ae FT	F.ac FT
Frecuencia	9	9
Media	64,2794	10,9959
Varianza	5,3801	0,453136
Desviación típica	2,3195	0,673153
Mínimo	60,903	10,224
Máximo	67,156	11,949
Rango	6,253	1,725
Asimetría tipi.	-0,348122	0,601395
Curtosis típicada	-0,782621	-0,971427

El StatAdvisor

Esta tabla muestra el resumen estadístico para las dos muestras de datos. Pueden usarse otras opciones tabulares dentro de este análisis para probar si las

diferencias entre las estadísticas de las dos muestras son estadísticamente significativas.

Comparación de Medias

95,0% intervalo de confianza para la media de Fae FT: 64,2794 +/- 1,78293 →
[62,4965; 66,0624]

95,0% intervalo de confianza para la media de Fac FT: 10,9959 +/- 0,517433 →
[10,4785; 11,5133]

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: 53,2836 +/- 1,70668 [51,5769; 54,9902]

Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis alt.: $media1 < media2$

Suponiendo varianzas iguales: $t = 66,185$ P-Valor = 0,0

El StatAdvisor

Esta opción ejecuta el t-test para comparar las medias de las dos muestras. También establece los intervalos de confianza o los límites para cada media y para la diferencia entre las medias. De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde 51,5769 hasta 54,9902. Dado que el intervalo no contiene el valor 0,0, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras para un nivel de confianza del 95,0%. También puede aplicarse un t-test para probar una hipótesis específica sobre la diferencia entre las medias de las poblaciones de las que proceden las dos muestras. Puesto que el p-valor calculado es inferior a 0,05, podemos rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa.

Comparación de dos muestras – F.ae FF & F.ac FF

Resumen del Procedimiento

Muestra 1: Fae FF

Muestra 2: Fac FF

Muestra 1: 9 valores 7,51 hasta 12,634

Muestra 2: 9 valores 2,485 hasta 2,718

El StatAdvisor

Este procedimiento está diseñado para comparar dos muestras de datos.

Resumen Estadístico

	F.ae FF	F.ac FF
Frecuencia	9	9
Media	10,4454	2,62
Varianza	3,88507	0,00552675
Desviación típica	1,97106	0,0743421
Mínimo	7,51	2,485
Máximo	12,634	2,718
Rango	5,124	0,233
Asimetría tipi.	-0,911753	-0,687251
Curtois típificada	-0,876512	-0,229035

El StatAdvisor

Esta tabla muestra el resumen estadístico para las dos muestras de datos. Pueden usarse otras opciones tabulares dentro de este análisis para probar si las diferencias entre las estadísticas de las dos muestras son estadísticamente significativas.

Comparación de Medias

95,0% intervalo de confianza para la media de Fae FF: 10,4454 +/- 1,51509 →
[8,93035; 11,9605]

95,0% intervalo de confianza para la media de Fac FF: 2,62 +/- 0,0571445 →
[2,56286; 2,67714]

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: 7,82544 +/- 1,39381 [6,43163; 9,21926]

Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis alt.: $\text{media1} \neq \text{media2}$

Suponiendo varianzas iguales: $t = 11,9021$ P-Valor = 2,31664E-9

El StatAdvisor

Esta opción ejecuta el t-test para comparar las medias de las dos muestras. También establece los intervalos de confianza o los límites para cada media y para la diferencia entre las medias. De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde 6,43163 hasta 9,21926. Dado que el intervalo no contiene el valor 0,0, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras para un nivel de confianza del 95,0%. También puede aplicarse un t-test para probar una hipótesis específica sobre la diferencia entre las medias de las poblaciones de las que proceden las dos muestras. Puesto que el p-valor calculado es inferior a 0,05, podemos rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa.



CONSTANCIA

Quien suscribe, Líder del Área de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Hace Constar:

Que la **Srta. ROXANA YAPUCHURA MAMANI**, Bachiller de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de la Ciudad de Tacna, ha realizado sus análisis en el Instituto Biotecnología en el Área Biotecnología Industrial - UNALM, con los siguientes análisis:

- Determinación de humedad: reportado por la A.O.A.C. de (1990).
- Capacidad Antioxidante: Método de ABTS – reportado por Arnao (2000).
- Fenólicos Total: Método Folin-Ciocalteu - reportado por Singleton y Rosi (1965).
- Determinación de Flavonoles y Flavonas, reportado por Chang et al. (2002).
- Determinación de Flavanoles, reportado por Mc Murrough y Mc Dawell (1978).
- Identificación de compuestos Fenólicos por HPLC-DAD, reportado por Tsao y Yang (2003).

Por tanto, se expide la presente solicitud de la interesada, para que los resultados del trabajo sean utilizados únicamente como parte de su Tesis.

La Molina, 13 de agosto del 2010


Dr. David Campos Gutiérrez
Líder, Biotecnología Industrial
Instituto Biotecnología

