

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS,
BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERIA
BIOTECNOLOGICA



TESIS:

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, SOLVENTE Y
TIPO DE VAINA EN LA EXTRACCION DE TANINOS
DE *Caesalpinia spinosa* (Tara) POR PERCOLACION Y
RELACION CON SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**

PRESENTADO POR LAS BACHILLERES
**CESPEDES LOAYZA, ANDREA LUCIA
MUÑOZ GUILLEN, GABRIELA DEL
ROSARIO**

Para optar el Título Profesional de
INGENIERA BIOTECNOLOGA

**AREQUIPA – PERÚ
2013**

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres y familia por todo su apoyo, su paciente espera y por creer siempre en nosotras.

A AGROINCA PPX por permitirnos ingresar a su fundo para recolectar las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Al Dr. José Villanueva, nuestro asesor, por todo su apoyo, sus consejos y paciencia.

A los encargados de los laboratorios del primer piso del pabellón H, por las facilidades brindadas para desarrollar nuestro trabajo de tesis.

Gracias totales.

ÍNDICE

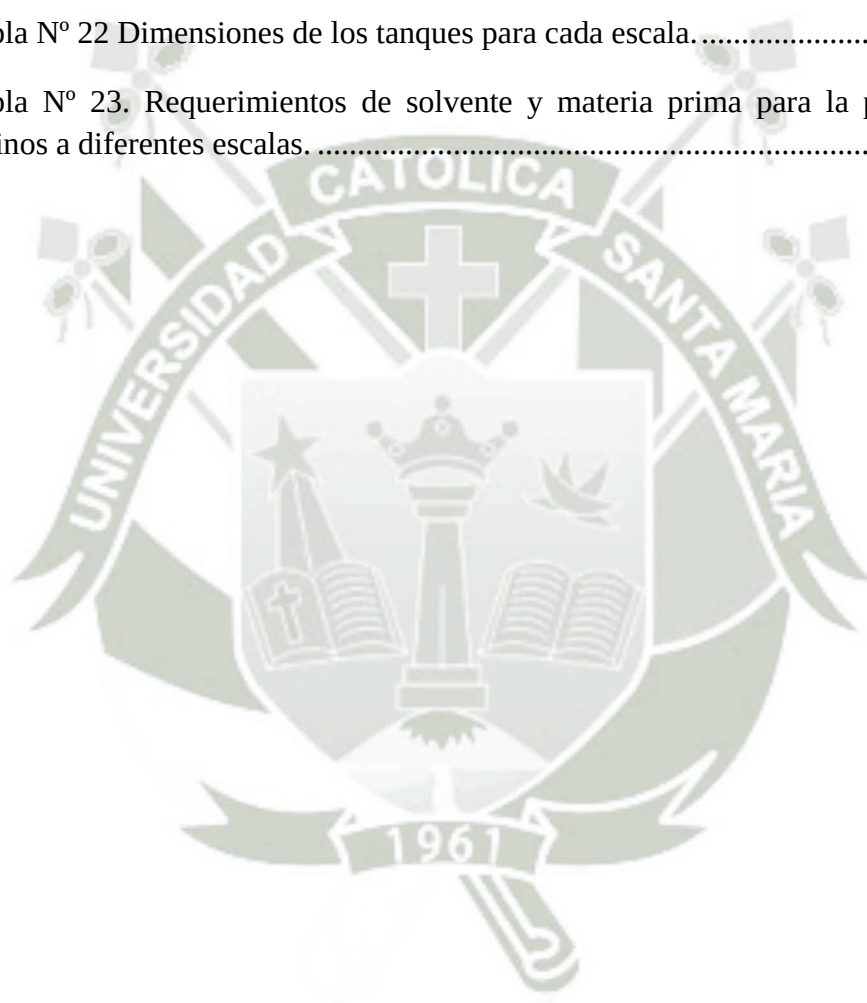
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	6
HIPOTESIS	6
CAPITULO I	7
MARCO TEORICO.....	7
1.1 <i>Caesalpinia spinosa</i> (TARA).....	7
1.1.1. Descripción botánica.....	8
1.1.2. Distribución geográfica.....	11
1.1.3. Variables climáticas	11
1.1.4. Variables edáficas y topográficas.....	13
1.1.6. Aprovechamiento integral de la Tara.....	15
1.2. COMPUESTOS FENOLICOS	17
1.2.1. Clasificación de polifenoles	18
1.3. TANINOS	20
1.3.1. Clasificación de los taninos.....	21
1.3.2. Propiedades de los taninos	24
1.3.3. Uso industrial de taninos.....	25
1.3.4. Características químicas de los taninos.....	26
1.3.5. Biodegradación de los taninos	27
1.3.6. Métodos de extracción de taninos	30
1.3.7. Lixiviación	33
1.3.8. Diseño del percolador	42
1.3.9. Proceso productivo para la obtención de concentrado tánico	44
1.3.10. Métodos de identificación de taninos.....	45

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO.....	47
1.4.1. Los radicales libres.....	48
1.4.2. Los antioxidantes	52
1.4.3. Capacidad antioxidante de los taninos	56
1.4.4. Métodos de cuantificación de antioxidantes	57
CAPITULO II	60
MATERIALES Y METODOS	60
2.1. MATERIALES.	60
2.1.1. Material Biológico	60
2.1.2. Material de vidrio.....	60
2.1.3. Reactivos.....	61
2.1.4. Otros.....	62
2.1.5. Equipos	62
2.2. METODOLOGÍA	63
2.3. ANALISIS ESTADISTICO.....	75
CAPITULO III.....	76
RESULTADOS Y DISCUSION	76
3.1. DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS VAINAS DE <i>Caesalpinia spinosa</i> (TARA)	76
3.2. CONTENIDO DE TANINOS	79
3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TANINOS EXTRAIDOS	93
CONCLUSIONES	108
RECOMENDACIONES.....	109
RECOMENDACIONES PRÁCTICAS.....	110
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Microorganismos productores de tanasas	30
Tabla N° 2. Variables tomadas en cuenta para la elaboración del extracto tánico.....	68
Tabla N° 3. Preparación del blanco, control y patrones de Trolox	73
Tabla N° 4. Características físicas del fruto de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).....	77
Tabla N° 5 Características químicas del fruto <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara)	78
Tabla N° 6 Resultados de los análisis físico-químicos realizados a los extractos obtenidos de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara) molida.	80
Tabla N° 7 Prueba de Tukey de la densidad de los distintos extractos obtenidos de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).....	83
Tabla N° 8 Prueba de Tukey para el índice de refracción de los distintos extractos obtenidos de la vaina de Tara.....	83
Tabla N° 9 Cantidad de extracto liofilizado obtenido a partir de los extractos de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).	85
Tabla N° 10 Absorbancia promedio de los patrones de ácido gálico.....	86
Tabla N° 11 Cantidad de polifenoles presentes en los extractos liofilizados de vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).	88
Tabla N° 12 Prueba de Tukey para la cantidad de polifenoles de los distintos extractos obtenidos de la vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).	89
Tabla N° 13 Límites de detección y cuantificación de polifenoles de vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara) para el método de Folin-Ciocalteu.....	92
Tabla N° 14 Lecturas espectrofotométricas (absorbancia) de los patrones de Trolox para la elaboración de la curva patrón de DPPH.....	94
Tabla N° 15 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).	97
Tabla N° 16 Prueba de Tukey para la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).....	98
Tabla N° 17 Valores de la actividad antioxidante de distintas frutas reportadas por Marta Kuskoski	100

Tabla N° 18 Porcentaje remanente y de inhibición de DPPH a distintas concentraciones de Trolox.	100
Tabla N° 19 Porcentaje de DPPH inhibido por la actividad antioxidante de cada uno de los extractos liofilizados de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).....	102
Tabla N° 20 Prueba de Tukey para el porcentaje de inhibición de DPPH por la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).103	
Tabla N° 21 Límites de detección y cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara) para el método de DPPH.	105
Tabla N° 22 Dimensiones de los tanques para cada escala.....	107
Tabla N° 23. Requerimientos de solvente y materia prima para la producción de taninos a diferentes escalas.	107



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Árbol de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara) (41).....	9
Figura N° 2 Estructuras moleculares de los taninos hidrolizables. (22)	28
Figura N° 3 Estructuras moleculares de los taninos condensados. (22).....	29
Figura N° 4 Reacción del DPPH con el antioxidante.....	58
Figura N° 5. Diagrama de flujo de la metodología desde la recolección de la materia prima hasta la determinación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara).....	64
Figura N° 6 Frutos de Tara utilizados en la investigación.	65
Figura N° 7 Diseño detallado del percolador con chaqueta	67
Figura N° 8 Extractos líquidos de las 12 muestras obtenidas de las vainas de Tara. 69	
Figura N° 9 Percolador de Acero para la extracción de Taninos.	69
Figura N° 10 Diferencia de color entre las vainas sujetas al árbol(a) y las vainas caídas (b) de <i>Caesalpinia spinosa</i>	77
Figura N° 11 Determinación de la presencia de taninos mediante prueba de cloruro férrico.	81
Figura N° 12 Determinación de la presencia de taninos mediante prueba de Acetato de plomo.....	81
Figura N° 13 Curva patrón para ácido gálico.....	87
Figura N° 14 Cantidad de polifenoles totales (mg/g de muestras) presentes en los extractos liofilizados de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).....	89
Figura N° 15 Curva de concentración vs. desviación estándar de ácido gálico para la determinación de los límites de cuantificación y detección.....	92
Figura N° 16. Coloración de los patrones de Trolox utilizados para elaborar la curva patrón de DPPH	93
Figura N° 17. Curva patrón para el DPPH.	95
Figura N° 18 Coloración de las 12 muestras leídas en el espectrofotómetro en la prueba de DPPH.....	95
Figura N° 19 Actividad antioxidante de los Polifenoles totales extraídos de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara).	99

- Figura N° 20. Curva patrón del porcentaje de inhibición de DPPH a distintas concentraciones de Trolox. 101
- Figura N° 21. Porcentaje de DPPH inhibido por la actividad antioxidante de cada uno los extractos liofilizados de *Caesalpinia spinosa* (Tara). 102
- Figura N° 22 Curva de la concentración vs. desviación estándar de DPPH para determinar los límites de detección y cuantificación. 104



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto de la temperatura, solvente y tipo de vaina, parámetros, que influyen la extracción de taninos de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara) y evaluar su actividad antioxidante. Las vainas de Tara con las que se trabajó en la investigación fueron recolectadas del distrito de la Joya, provincia de Arequipa. La materia prima fue limpiada, despepitada, molida y tamizada. La extracción de los taninos de *Caesalpinia spinosa* (Tara) se realizó mediante la operación unitaria de separación sólido-líquido en un percolador con chaqueta de acero inoxidable de diseño propio utilizando un tamaño de partícula de 1.18 mm, temperaturas de 25 y 40°C, solventes: agua, etano al 50% y etanol al 80%; y dos tipos de vaina, vaina sujeta al árbol y vaina caída.

A los extractos líquidos se les realizó pruebas cualitativas de cloruro férrico y acetato de plomo, con las cuales se identificó la presencia y tipo de taninos, clasificándolos como taninos de tipo hidrolizables. Por último los extractos etanólicos fueron concentrados en un rotavapor a 40°C y 66 KPa de presión; y todos los extractos fueron sometidos a un proceso de liofilización.

Con las muestras liofilizadas se determinó la cantidad de polifenoles totales utilizando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, determinando que el mejor tratamiento es aquel que considera una temperatura de 25°C, fruto sujeto al

árbol y etanol al 80%. Con dicho tratamiento se logró obtener 717.8423 mg de polifenol/g de muestra.

Finalmente se determinó la capacidad antioxidante de los taninos extraídos de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara), utilizando el método del DPPH, determinando que el mejor tratamiento es aquel que considera una temperatura de 25°C, vaina sujeta al árbol y etanol al 80% . Con dicho tratamiento se logró obtener 35.1935 mg de Trolox/g de muestra, consiguiéndose con esta muestra un porcentaje de inhibición del radical libre de 75.25%. Con lo que se corrobora que a mayor cantidad de polifenoles presentes en la muestra mayor es la capacidad antioxidante de la misma.



ABSTRACT

The objective of this research was to determine the effect of temperature, solvent and sheath type, parameters influencing the extraction of tannins pod *Caesalpinia spinosa* (Tara) and evaluate their antioxidant activity.

Tara pods which worked on the study were collected in the district of La Joya, Arequipa province. The raw material was cleaned, cored, ground and sieved. The extraction of the tannins of *Caesalpinia spinosa* (Tara) was performed by the operation unit of solid-liquid separation in a percolator with stainless steel jacket own design using a particle size of 1.18 mm, temperatures of 25 to 40 ° C, solvent: water, 50% ethanol and 80% ethanol, and two kinds of sheath attached to the shaft and sheath sheath drop.

A liquid extracts were tested qualitative ferric chloride and lead acetate, which was identified with the presence and type of tannins and classified as type hydrolysable tannins. Finally the ethanolic extracts were concentrated in a rotary evaporator at 40°C and 66 kPa pressure, and the extracts were subjected to a lyophilization process.

With the lyophilized samples was determined the amount of total polyphenols using the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu, determining that the best

treatment is one that considers a temperature of 25 ° C, fruit tree and subject to 80% ethanol. Such treatment was able to obtain 717.8423 mg of polyphenol / g sample. Finally we determined the antioxidant capacity of tannins extracted from the pod *Caesalpinia spinosa* (Tara), using the method of DPPH, determining that the best treatment is one that considers a temperature of 25 ° C, sheath attached to the tree and 80% ethanol. With such processing is achieved to obtain 35.1935 mg of Trolox / g of sample, this sample was obtained with a percentage of inhibition of free radical 75.25%. Thus confirms that the higher amount of polyphenols present in the sample the higher the antioxidant capacity of the same.



INTRODUCCIÓN

La Tara es un árbol silvestre originario de la región andina, normalmente son individuos aislados, aunque pueden estar formando bosquetes. Su fruto es una vaina que se recolecta cuando está madura y seca, momento en que adquiere una coloración rojiza. Fue empleado desde las culturas pre incas e incas en la elaboración de tintes para textilería, cerámica, curtido de pieles y medicina, que dan cuenta del potencial que tiene la especie para usos no maderables. (57)

La Tara posee taninos que son compuestos polifenólicos que tienen diversas aplicaciones en la industria textil, de alimentos, farmacéutica, además de ser una medicina natural. Estos taninos son de gran importancia mundial; siendo el Perú el principal exportador, y existiendo mercado para exportar de 5 a 6 veces mayor cantidad de productos derivados de este recurso. Existen diversos métodos de extracción de taninos como la percolación, siendo de importancia mejorar dicho proceso para la obtención de este compuesto en mayor cantidad. (11,43). Dentro de los métodos de cuantificación de compuestos fenólicos se menciona el método de Folin-Ciocalteu el cual se basa en la transferencia de electrones formando complejos de color azul. (69)

Como antioxidantes, los taninos pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. (33)

Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia

Por todo lo expuesto anteriormente, se planteó el presente trabajo con la finalidad de mejorar el proceso de extracción de taninos teniendo en cuenta las variables que influyen la operación unitaria de percolación; y la evaluación de su actividad antioxidante para otorgarle un valor agregado al recurso Tara, lo que contribuirá al aumento de las exportaciones de antioxidantes naturales.

OBJETIVOS

1. Determinar los parámetros eficientes de temperatura, tipo de solvente y tipo de vaina que influyen el proceso de extracción sólido-líquido de taninos de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara), utilizando un prototipo de percolador de diseño propio.
2. Identificar la presencia y tipo de taninos en los extractos de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara) mediante pruebas cualitativas.
3. Determinar los polifenoles totales en las muestras de extractos liofilizados de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).
4. Analizar la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara) y relacionarla con el contenido de polifenoles totales.

HIPOTESIS

Dado que existen parámetros que influyen el proceso de extracción de taninos de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara), es probable que al modificar este proceso se obtenga mayor cantidad de taninos que se relacionen con la actividad antioxidante.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 *Caesalpinia spinosa* (TARA)

El nombre Tara proviene del aimara y significa “achatada” o “aplanada”, por la forma de la semilla (30). Con ese nombre se le conoce en Perú y Bolivia. En el Perú se le conoce también como taya, y en Ecuador como guarango, vinillo. Hay otros nombres vernáculos menos comunes para la especie. (30)

El nombre botánico de la especie es *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, se encuentra en la vertiente occidental de la cordillera de los Andes y en los valles interandinos, formando parte del monte ribereño y el monte espinoso, desde los 800 msnm hasta los 3200 msnm, y de la asociación atmosférica denominada Lomas u Oasis de Neblinas, desde los 500 hasta los 750 msnm (6).

Se trata de un árbol silvestre originario de la región andina, normalmente son individuos aislados, aunque pueden estar formando bosquetes. Su fruto es una vaina que se recolecta cuando está madura y seca, momento en que adquiere una

coloración rojiza; fue empleado desde las culturas pre incas e incas en la elaboración de tintes para textilera, cerámica, curtido de pieles y medicina, que dan cuenta del potencial que tiene la especie para usos no maderables (57).

El Perú es el principal exportador a nivel mundial. Su producción viene principalmente de bosques naturales en varias regiones que, en orden de importancia son: Cajamarca, Ayacucho, La Libertad, Huánuco, Apurímac, Ancash y Cusco. En Ecuador y Bolivia ha sido una especie que ha venido desapareciendo debido a que la mayoría de ejemplares han sido talados, tanto por el desconocimiento de su potencial y usos como, principalmente, por la carencia de un mercado local. Actualmente los árboles que han sobrevivido en estado silvestre se encuentran en su mayor parte en lugares alejados, de difícil acceso y de topografía irregular (43).

1.1.1. Descripción botánica

La tara es una leguminosa fijadora de nitrógeno que pertenece a la familia Caesalpiniaceae (a veces considerada la subfamilia Caesalpinioideae de la familia Leguminosae o Fabaceae). (57)

La Tara es una planta originaria del Perú utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica o popular y en años recientes, como materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios; de nombre científico *Caesalpinia spinosa* o *Caesalpinia tinctoria* (57).

Sus características botánicas son las siguientes (26):

- Es un árbol pequeño, de dos a tres metros de altura, de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso, y su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente pobladas. En muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos. La copa de la Tara es irregular, aparasolada y poco densa, con ramas ascendentes.

- Sus hojas son en forma de plumas, parcadadas ovoides y brillantes ligeramente espinosas de color verde oscuro y miden 1.5 cm de largo.
- Sus flores son de color amarillo rojizo, dispuestos en racimos de 8 a 15 cm de largo.
- Sus frutos son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja de 8 a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente, que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeada de 0.6 a 0.7 cm de diámetro y son de color pardo negruzco cuando están maduros.
- Inflorescencia con racimos terminales de 15 a 20 cm. de longitud de flores ubicadas en la mitad distal, flores hermafroditas, zigomorfas, cáliz irregular provisto de un sépalo muy largo de alrededor de 1 cm, con numerosos apéndices en el borde, cóncavo, corola con pétalos libres de color amarillento, dispuestas en racimos de 8 a 20 cm de largo.

En la figura N° 1 se observa el árbol de *Caesalpinia spinosa* (Tara) con sus frutos.



Figura N° 1. Árbol de *Caesalpinia spinosa* (Tara) (41)

- Cada árbol de Tara puede rendir un promedio de 20 a 40 kg de vaina cosechándolos dos veces al año.

o Factores que explican la alta variación de productividad en la tara (kg/árbol)

Existen condiciones ambientales que acompañan a lo genético, tales como:

- Los suelos influyen significativamente. Los rendimientos no son los mismos en suelos arcillosos o arenosos o con contenidos de materia orgánica. Al parecer, un suelo ideal es el de estructura limosa y con contenido de materia orgánica.
 - La temperatura posiblemente afecta a la ovulación de todos los óvulos ofertados.
 - La humedad: años secos o años muy lluviosos disminuyen la productividad.
 - El manejo silvicultural podría ser determinante, por ejemplo, en cuanto a la poda de formación y fructificación.
 - El control de plagas y enfermedades, especialmente en la fructificación: el ataque severo afecta significativamente el rendimiento de las vainas y también la densidad de la plantación.
- (26)

Generalmente, un árbol de Tara da frutos a los tres años; y si es silvestre, a los cuatro años. Su promedio de vida es de cien años y el área que ocupa cada árbol es de 10 metros cuadrados (17).

1.1.2. Distribución geográfica

Se distribuye entre los 4° y 32° S, abarcando diversas zonas áridas, en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Chile. En forma natural, se presenta en lugares semiáridos con un promedio de 230 a 500 mm de lluvia anual. También se le observa en cercos o linderos, como árbol de sombra para los animales dentro de cultivos de secano, y como árbol ornamental (17).

En el Perú se distribuye en casi toda la costa, desde Piura hasta Tacna, y en algunos departamentos de la sierra. En la vertiente del pacífico se halla en los flancos occidentales, valles, laderas, riberas de los ríos, y lomas entre los 800 y 2800 msnm; llegando en algunos casos como en los valles de Apurímac, hasta los 3150 msnm. De acuerdo al mapa forestal del Perú, la Tara se encuentra ocupando el estrato del matorral arbustivo, en donde se asocia con especies como: *Capparis prisca* (Palillo), *Salís humboldtiana* (Sauce), *Schinus molle* (Molle), *Puya sp.*, *Acacia sp.* y algunas gramíneas, y una gran diversidad de especies de los géneros *Calliandra*, *Rubus*, *Cortón*, entre otras (34).

Los suelos favorables para el cultivo de la Tara son los silíceos y arcillosos que predominan en la cuenca de Ayacucho (34).

1.1.3. Variables climáticas

Es una planta denominada «rústica» porque resiste la sequía, plagas y enfermedades, y es considerada como una especie bastante plástica (35).

Las dos principales variables climáticas son:

- Temperatura: Varía entre los 12 a 18 °C, pudiendo aceptar hasta 20 °C. En los valles interandinos la temperatura ideal es de 16 a 17 °C.
- Precipitación: Para su desarrollo óptimo requiere de lugares con una precipitación de 400 a 600 mm, pero también se encuentra en zonas que presentan desde 200 a 750 mm de promedio anual.

De acuerdo a la clasificación del L. Holdridge, la Tara se ubica en las siguientes zonas de vida (45):

- Estepa espinosa: bajo: Precipitación de 250-500 mm de promedio anual y la biotemperatura de 12 a 18 °C, en donde ocupa toda la zona.
- Bosque seco bajo: Precipitación 500-700 mm de promedio anual y una biotemperatura de 12 a 18 °C ocupando el sector de menor precipitación.
- Matorral desértico bajo: Precipitación 200-250 mm de promedio anual y biotemperatura de 13 a 18 °C, encontrándose en sector de mayor precipitación y en las lomas, que son asociaciones que se asemejan a esta zona de vida.
- Monte espinoso: Precipitación de 350-500 mm de promedio anual y biotemperatura de 18 a 20 °C, en donde ocupa el sector superior de mayor precipitación.
- Matorral desértico: Precipitación de 250-280 mm de promedio anual y biotemperatura de 18 a 21 °C, ocupando el sector de mayor precipitación y humedad.

1.1.4. Variables edáficas y topográficas

La Tara es una especie poco exigente en cuanto a la calidad del suelo, aceptando suelos pedregosos, degradados y hasta lateríticos, aunque en esas condiciones reporta una baja producción; sin embargo, se desarrolla en forma óptima y con aporte arbóreo robusto en los suelos de «chacra»; es decir, suelos francos y francos arenosos, ligeramente ácidos a medianamente alcalinos. Se encuentra desde los 800 a 2800 msnm en la vertiente del pacífico y hasta los 1600 a 2800 msnm de la cuenca del atlántico, y en microclimas especiales hasta los 3150 msnm (47).

En sectores encerrados por cerros continuos que modifican principalmente la temperatura, se evidencian especies como la Tara que desarrollan normalmente a menor altitud. Las áreas de mayor volumen de producción en el país por su ecología favorable y buena infraestructura de acopio son:

- Zona Norte: Su centro de acopio más importante es Cajamarca.
- Zona Central: Su centro de acopio más importante es Ayacucho.

Se tiene conocimiento que la Tara de la zona norte tiene menor contenido de taninos que la del sur, a pesar de poseer vainas grandes, aunque son semillas más picadas (47).

1.1.5. Susceptibilidad a daños y enfermedades

Generalmente no presenta mayores problemas de control fitosanitario, salvo en algunas zonas donde pueden aparecer afecciones en las ramas y tallo así como deformaciones en las hojas, flores, frutos, impidiendo su aceptación en el mercado. (17)

- **Plagas:** Las plagas de la Tara son ocasionadas por insectos y ácaros que pertenecen a las órdenes Lepidóptera, Díptera, Homóptera, Ortóptera,

Acarina, Hymenóptera y Hemíptera. Los pulgones o áfidos (Homóptera) atacan a las hojas, flores, vainas verdes y al tallo, particularmente a los brotes más tiernos, succionando la savia, lo que ocasiona la caída de yemas y frutos pequeños.

Entre los pulgones que más atacan a la Tara está el *Aphis cracciovia*, cuyo ataque es la causa más frecuente de la baja producción de vainas. Estos insectos producen una sustancia azucarada, donde se desarrolla el hongo denominado como «fumagina», enfermedad en donde se presenta la asociación plaga-hongo, además limita la capacidad de fotosíntesis de las hojas. El ataque de los áfidos a las vainas producen encurvamiento y a las hojas un encrespamiento y, por ende, el debilitamiento de la planta. Los productores denominan a estos insectos como: «piojera», «pulgón chupador», «mosquilla», «mosquitos», «pulgón negro», etc. La «mosca blanca» perteneciente a la familia *Aleurodidae*, es un insecto picador chupador que generalmente se ubica en el envés de la hoja de Tara produciendo secreciones melosas, se asocia con ataque del hongo o fumagina. Las polillas (*Lepidóptera*) ocasionan daños, pues sus larvas se comen la hojas y sus brotes; en el campo, los agricultores denominan a las larvas «gusano cortador-masticador», «gusano negro», «utuskuro», «corte larva», «gusano blanco» y «gusanera».

En el orden Díptera de la familia *Agromicidae*, la mosca minadora, ataca a las hojas haciéndole minas. Las hormigas del orden Hymenóptera, probablemente del género *Atta* sp, denominadas por los agricultores: «coqui», «hormiga negra» o «anayllu» atacan a las hojas, flores, vainas y tallos.

Los chinches (Hemíptero) son insectos que pican las hojas y producen el encogimiento de éstas al consumir la savia. En el orden Acarina, probablemente el ácaro más frecuente es el *Tetranychus urticae*, que produce una mancha blanquecina en la parte superior de la hoja, la cual llega a secarse produciéndose finalmente la defoliación.

- **Enfermedades:** Las enfermedades más frecuentes son las fungosas, ocasionadas frecuentemente por fumagina y oidium y; en menor frecuencias, las virósicas, no evidenciándose la presencia de nematodos en el suelo.

También existen plantas y criptógamas parásitas, las cuales se observan en árboles de mayor edad. Las epifitas, que conviven con la Tara y que mayormente no hacen daño, son la «salvajina», los líquenes y los musgos que sólo se adhieren al tallo. En cambio, las cuscutas, parásitas cubren la superficie por donde respira la planta y la ahogan hasta matarla, como por ejemplo, la «pacha pacha» que se adhiere a las vainas, denominada también «cabello de ángel». Además, se tiene el «huijunto» y la «tullama», que enrollan la planta. (17)

1.1.6. Aprovechamiento integral de la Tara

La Tara se encuentra tanto en estado silvestre como cultivado y posee un inmenso potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros. (57)

Además, es utilizada en la protección de suelos, especialmente cuando no se dispone de agua de riego, a fin de dar buena protección a muchas tierras que hoy están en proceso de erosión y con fines comerciales (11).

Se usa frecuentemente en asociación con cultivos como el maíz, papa, habas, alfalfa, sorgo o pastos. No ejerce mucha competencia con los cultivos, por su raíz pivotante y profunda y por ser una especie fijadora de nitrógeno; así como tampoco por su copa, que no es muy densa y deja pasar la luz (17).

Debido a su pequeño porte y a su sistema radicular profundo y denso, es preferida para barreras vivas, control de cárcavas y otras prácticas vinculadas

a conservación de suelos en general, sobre todo en zonas áridas o semiáridas.
(17)

El aprovechamiento de los frutos permite obtener numerosos productos de interés. La vaina representa el 62% del peso de los frutos y es la que precisamente posee la mayor concentración de taninos que oscila entre 40 y 60%. Estos taninos se utilizan en la industria para la fabricación de diversos productos, o en forma directa en el curtido de cueros, fabricación de plásticos y adhesivos, galvanizados y galvanoplásticos, conservación de aparejos de pesca de condición bactericida y fungicida, como clarificador de vinos, como sustituto de la malta para dar cuerpo a la cerveza; en la industria farmacéutica por tener un amplio uso terapéutico, para la protección de metales, cosmetología, perforación petrolífera, industria del caucho, mantenimiento de pozos de petróleo y como parte de las pinturas dándole una acción anticorrosiva (7).

Otro elemento que se obtiene de los taninos de la Tara, es el ácido gálico que es utilizado como antioxidante en la industria del aceite y en la industria cervecera como un elemento blanqueante o decolorante, en fotografía, tintes, como agente curtiembre, manufactura del papel, en productos de farmacia y otros relacionados al grabado o litografía. Las semillas de uso forrajero tienen en su composición porcentual en peso el 28% de cáscara, 34% de gomas y 37.5% de germen (almendra) como altísimo contenido de proteínas de gran concentración de metionina y triptófano de buena calidad, grasas y aceites que podrían servir para el consumo humano. De esta parte del fruto se obtiene aceite, goma (usada para dar consistencia a los helados), harina proteica y derivados como: jabones, pinturas, barnices, esmaltes, tintes de imprenta, mantecas y margarinas comestibles, pues presenta un contenido de ácidos libres de 1.4% (ácido oleico) es aceptable comercialmente por su baja acidez.
(20,50)

Industrialmente se integra como parte de los medicamentos gastroenterológicos, para curar úlceras; cicatrizantes, por sus efectos astringentes, antiinflamatorios, antisépticos, anti diarreicos, antimicóticos, antibacterianos, antiescorbúticos, siendo más utilizados aquellos que producen constricción y sequedad (60).

La madera sirve para la confección de vigas, viguetas o chaclas, para construir viviendas; mangos de herramientas de labranza de buena calidad y postes para cercos, así como leña y carbón debido a sus bondades caloríficas (50).

1.2. COMPUESTOS FENOLICOS

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos.

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos.

Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También

pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos. (60)

1.2.1. Clasificación de polifenoles

a) Fenoles y ácidos fenólicos

En este grupo tenemos los fenoles sencillos que son poco frecuentes y están en las plantas en forma de heterósidos. Los principales son el arbutósido, vainillósido y el salicósido que por hidrólisis liberan hidroquinona, vainillina y alcohol salicílico respectivamente junto con glucosa. (63)

b) Cumarinas

Las cumarinas que son derivados de benzo- α -pirona, sus estructuras son muy variadas y, debido a ello, se observa gran variabilidad en sus acciones farmacológicas: disminuyen la permeabilidad capilar y refuerzan los capilares, antiinflamatorios, antiespasmódicos, anticoagulantes (dicumarol), entre otras. (63)

c) Lignanós

Los lignanos, son compuestos que tienen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano. (63)

d) Flavonoides y compuestos relacionados

Los flavonoides constituyen la fuente más importante de polifenoles de las plantas. Se han encontrado en raíces, tallos, flores, frutos y semillas. La distribución cuantitativa varía entre los diferentes órganos de la planta y entre las diferentes especies. Esta variabilidad está condicionada por la genética y por otros factores, entre los que se incluyen la climatología, estado de madurez, la posición en el árbol, el origen y las prácticas agrícolas.

La estructura común de los flavonoides y los compuestos relacionados antocianos, catequinas y leucoantocianidinas, procede del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. (63).

e) Taninos

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente. Son también agentes quelantes; por esta razón se utilizan como antídoto en intoxicaciones causadas por metales pesados (mercurio, plomo, estaño, cinc). Se oxidan con facilidad, sobre todo en medio ácido, y pueden actuar como reductores de ciertos compuestos. (63).

f) Quinonas y antracenosidos

Las quinonas, son compuestos aromáticos con dos grupos cetona. Estas dicetonas insaturadas por reducción se convierten en polifenoles. Sus acciones son muy variadas, las plastoquinonas intervienen en la fotosíntesis de las plantas, las ubiquinonas intervienen en los procesos de respuesta vegetal. Las antraquinonas destacan por sus propiedades laxantes y las antraciclinaonas por sus propiedades antibióticas. Los antracenosidos son heterósidos con el sistema tricíclico del antraceno pero con el anillo central más o menos oxidado, lo cual permite diferenciar los distintos tipos de derivados: oxantronas (con una función cetona y una función alcohol en el anillo central), antronas (con sólo una función cetona en el anillo central) y dihidroantranoles (con sólo una función alcohol en el anillo central, son muy inestables y se degradan con facilidad). Generalmente en las plantas se encuentran las formas combinadas y reducidas y en muestras desecadas se encuentran las formas oxidadas. (63).

1.3. TANINOS

Compuestos fenólicos hidrosolubles que tienen un peso molecular comprendido entre 500 y 3.000, que presentan, junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. (67)

Los taninos o extractos curtientes son mezclas de compuestos de composición química muy diversa. Son extraídos de cortezas, maderas, frutos, hojas o vainas de diversas especies vegetales y tienen la propiedad de combinarse, bajo ciertas condiciones, con la proteína de la piel (colágeno o corium), para obtener un producto de estabilidad hidrotérmica, muy resistente a las acciones mecánicas, comúnmente llamado cuero (42).

Los taninos tienen un ligero olor característico y un color que va desde el amarillo al castaño oscuro. La exposición a la luz oscurece su color. Todos los taninos tienen un sabor amargo y son astringentes. Se disuelven con facilidad en agua, acetona o alcohol, pero son insolubles en benceno, éter o cloroformo. Cuando se calientan a 210 °C, se descomponen, y producen pirogalol y dióxido de carbono. La propiedad química que determina la mayoría de sus aplicaciones es la rápida precipitación que se produce al mezclarlos con albúmina, con gelatina y con un buen número de sales alcales y metálicas (28).

La formación del tanino en el vegetal estaría ligada a la función clorofiliana: fenómenos de fotosíntesis dependientes de la luz solar, la clorofila y el CO₂. Se constata en efecto que las partes del vegetal expuestas al sol son las más ricas en tanino. Se admite que los taninos se formarían por una transformación de los sacáridos que producirían derivados cíclicos, los que sufrirían enseguida condensaciones y oxidaciones variables, pero cuyos detalles no son aún bien conocidos (44).

No se conoce a perfección la influencia que pueden ejercer los taninos sobre la vida de la célula y en cuanto a las transformaciones que ellos sufren después de su

aparición. En ciertos vegetales los taninos sufrirían transformaciones que los llevarían a tomar parte en la elaboración de la lignina. En otros vegetales constituirían un producto intermediario en la elaboración de resinas vegetales y se ha constatado que en primavera cuando la formación de la resina se vuelve más activa, el tanino disminuye a medida que la resina aumenta (2).

El tanino, en ciertos vegetales, tendría funciones de protección contra insectos, caracoles y microorganismos de la putrefacción. En efecto en partes ricas en tanino de un vegetal son pocos o nada atacados. Los tubérculos y los troncos ricos en tanino resisten largo tiempo a los fenómenos de putrefacción. En los fenómenos de germinación el tanino parece ser una sustancia de reserva. Parece verdadero que el rol de un mismo tanino puede ser diferente según las condiciones en las cuales se encuentra la célula que lo contiene (2).

1.3.1. Clasificación de los taninos

Los taninos no son idénticos en todos los vegetales, ellos difieren en cuanto a su composición y a sus propiedades químicas especiales según el género botánico donde se encuentren (23).

La clasificación más acertada es la propuesta por Freudenberg en 1920 y que considera dos grupos:

1.3.1.1. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables parecen ser los de mayor distribución en el reino vegetal. Generalmente constituyen mezclas complejas que contienen diferentes ácidos fenólicos esterificados en diferentes posiciones.

Los extractos tánicos hidrolizables o pirogálicos son aquellos que por hidrólisis en medio ácido y a ebullición forman productos solubles en agua.

Su constitución está caracterizada por el hecho de que el núcleo bencénico está unido al segundo compuesto por intermedio de átomos de oxígeno (77).

Depositán, habitualmente, ácido elágico (compuesto amarillento, cristalizado y poco soluble en agua) finamente dividido que forma eflorescencias en el cuero. Con sales de hierro dan coloración negro-azulada (77).

Estos taninos como su denominación indica se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática y son generalmente de formación patológica. Se localizan en algunas dicotiledóneas especialmente en *Fagaceae*, *Anacardiaceae* y *Leguminosae* (77).

Los extractos tánicos hidrolizables se pueden clasificar en dos grandes grupos (77):

- I. Aquellos que forman ácido gálico y glucosa a través de hidrólisis llamados extractos gálicos.
- II. Aquellos otros que dan ácido elágico y glucosa llamados extractos elágicos.

1.3.1.2. Taninos condensados o proantocianidinas.

Debido a su gran dispersión en el reino vegetal, se ha tomado como característica de este grupo la propiedad de producir antocianinas y catequinas cuando se calienta en medio ácido diluido. Las proteínas de los taninos condensados dependen de la naturaleza y de la manera como se enlazan las unidades moleculares, pero sobre todo, del peso molecular. Los taninos condensados se encuentran presentes en cortezas de quina, pinos, cedros, etc.

Los extractos condensados o catequínicos que en las mismas condiciones forman precipitados. Sus núcleos constituyentes están reunidos entre sí con

intervención de átomos de carbono. Se los llama catequínicos porque sometidos a destilación seca, casi todos, dan pirocatequina (77).

Los taninos condensados son una clase de flavonoides (sintetizados por las plantas por la vía biosintética de los flavonoides) que son los pigmentos principales de muchas semillas, y también están presentes en los tejidos vegetativos de algunas plantas de forrajeo (77).

Son polímeros formados por unidades de antocianidina (un flavonoide). Como pueden ser hidrolizados en sus antocianidinas constituyentes si se los trata con ácidos fuertes, a veces son conocidos como proantocianidinas (77).

1.3.1.3. Otros tipos de taninos

Para algunos autores existe un tercer tipo de taninos, los florotaninos, que se han aislado de diversas especies de algas pardas y están constituidos por acoplamiento oxidativo únicamente de unidades de floroglucinol C-C y/o C-O. Se habla también de los llamados taninos complejos que son elagitaninos más o menos modificados.

Resultan de la unión de un derivado fenilcrománico sobre un éster de glucosa con el ácido hexahidroxidifénico. Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos) (77).

Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal (77).

1.3.2. Propiedades de los taninos

A pesar de su constitución química muy variable, los taninos presentan un cierto número de propiedades comunes (44):

- I. La mayor parte son compuestos no cristalizables, de naturaleza coloidal y dotados de propiedades astringentes.
- II. Son solubles en el agua y el alcohol; sus soluciones acuosas tienen carácter ligeramente ácido.
- III. Forman con las proteínas combinaciones insolubles e imputrescibles, particularidad que es usada en la industria de curtidos.
- IV. Producen, en contacto con sales de hierro, combinaciones fuertemente coloreadas en azul o verde oscuros y más o menos solubles en agua.
- V. Sus soluciones son precipitadas por muchas sales metálicas (hierro, cobre, plomo, estaño, mercurio, etc.) y forman compuestos pardos con soluciones de bicromato de potasio y ácido crómico.
- VI. Sus soluciones son precipitados por diversas sustancias básicas tales como: colorantes orgánicos básicos, el agua de cal, el agua de barita, los alcaloides, etc.
- VII. Las soluciones de tanino expuestas al aire absorben el oxígeno oxidándose, tomando rápidamente tintes oscuros y perdiendo parcialmente sus cualidades curtientes. La tendencia a la oxidación de los taninos se manifiesta cuando el pH sube por encima de 6. Esta es la razón por la cual el curtido en licores básicos no ha respondido a las esperanzas que se habían fundado en ese proceso. La oxidación se manifiesta netamente sobre el cuero en el momento en que se expone al aire. Después de poco tiempo de curtida la piel

la oxidación es mayor. Ella aumenta con la concentración de los taninos y disminuye con la concentración de no taninos. Además es máxima con ciertos taninos como el castaño y mínima con otros como el quebracho y el zumaque. La oxidación es acelerada por los álcalis, excepción hecha de la mezcla bórax-sulfito. Es más lenta con los ácidos y ciertas sales neutras que precipitan los taninos como el sulfato de magnesio.

1.3.3. Uso industrial de taninos

1.3.3.1. Industria del curtido de pieles

En la industria de curtido se utilizan para la fabricación de tintas y el curtido de pieles, gracias a la capacidad de los taninos para transformar las proteínas en productos resistentes a la descomposición. En este proceso se emplean determinados taninos, los más utilizados son los procedentes de la acacia, el castaño, la encina, el pino o la bastarda (78).

1.3.3.2. Industria textil

Se emplean en la industria textil por su capacidad de reaccionar con las sales férricas, los cuales dan lugar a productos negro-azulados adecuados para tintes. Igualmente son utilizados como mordientes para la aplicación de tintes en tejidos, coagulantes de gomas, o aprestos para papeles o sedas (78).

1.3.3.3. Industria de alimentos

En alimentación, los taninos originan el característico sabor astringente a los vinos tintos (de cuyo *bouquet* son, en parte, responsables), al té, al café o al cacao. Las propiedades de precipitación de los taninos son utilizadas para limpiar o aclarar vinos o cerveza (78).

1.3.3.4. Industria farmacéutica

Externamente, los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides, etc. Internamente, son útiles contra la diarrea, enfriamiento intestinal y afecciones vesiculares, aunque pueden producir alguna intolerancia en personas con estómago delicado, por ello es conveniente administrar en forma de tisanas maceradas, con objeto de extraer también de la planta otras sustancias activas (78).

Los taninos también son útiles como contraveneno en caso de intoxicación por alcaloides vegetales. (78)

En las figuras N° 2 y N° 3, se presentan las estructuras moleculares de los taninos hidrolizables y taninos condensados respectivamente. (22)

1.3.4. Características químicas de los taninos

Químicamente, los taninos se caracterizan por su contenido de grupos funcionales fenólicos. En algunos casos, están en forma de glucósidos, con diferentes azúcares en su molécula, en otros están exentos de ellos. Forman

agrupaciones moleculares complejas de peso generalmente alto (2000 y más) son solubles en agua e insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, producen soluciones de carácter coloidal y no son cristalizables (24).

La actividad de los taninos causa gran impacto negativo sobre la fisiología de las células debido a su capacidad de formar complejos con numerosos tipos de moléculas, tales como: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, membranas celulares y enzimas y por esa razón su presencia es indeseable en las descargas líquidas de origen industrial, cuyo destino final sean los lagos, ríos o mares circundantes a las tenerías. (14)

1.3.5. Biodegradación de los taninos

Se han realizado estudios de la degradación de los taninos y se han encontrado microorganismos resistentes a ellos, entre los que destaca el deuteromiceto *Aspergillus niger*, pues se tiene noticia que puede tolerar hasta 100 g/L de ácido tánico (48). Pero no se tienen datos de su tolerancia a los taninos condensados, aunque se sabe que puede degradarlos en menor grado que los hidrolizables, tanto en ambientes aerobios como anaerobios (40 y 9).

Se sabe que para la biodegradación de los taninos hidrolizables se sintetizan enzimas llamadas tanasas (tanin-acil-hidrolasa, EC3.1.1.20). El mecanismo de acción es la hidrólisis de los enlaces éster del ácido gálico, que en los taninos hidrolizables puede ser de dos tipos: esterasa, cuando la hidrólisis se da entre una molécula de ácido gálico y glucosa, o bien entre un grupo metilo y una molécula de ácido gálico; depsidasa, cuando la hidrólisis se da entre dos moléculas de ácido gálico y la enzima actúa despolimerizando la molécula, como ocurre en el ácido tánico (8).

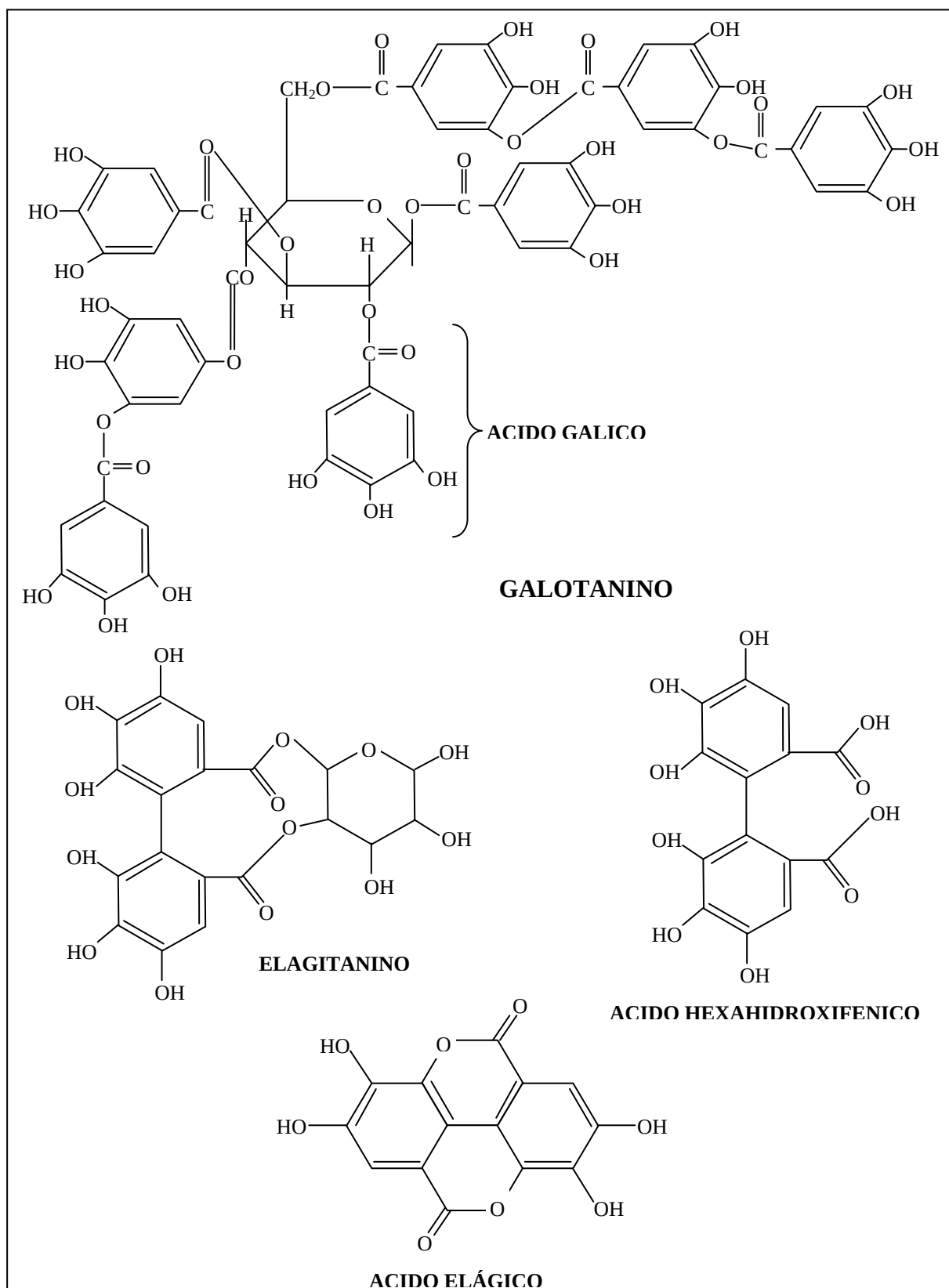


Figura N° 2 Estructuras moleculares de los taninos hidrolizables. (22)

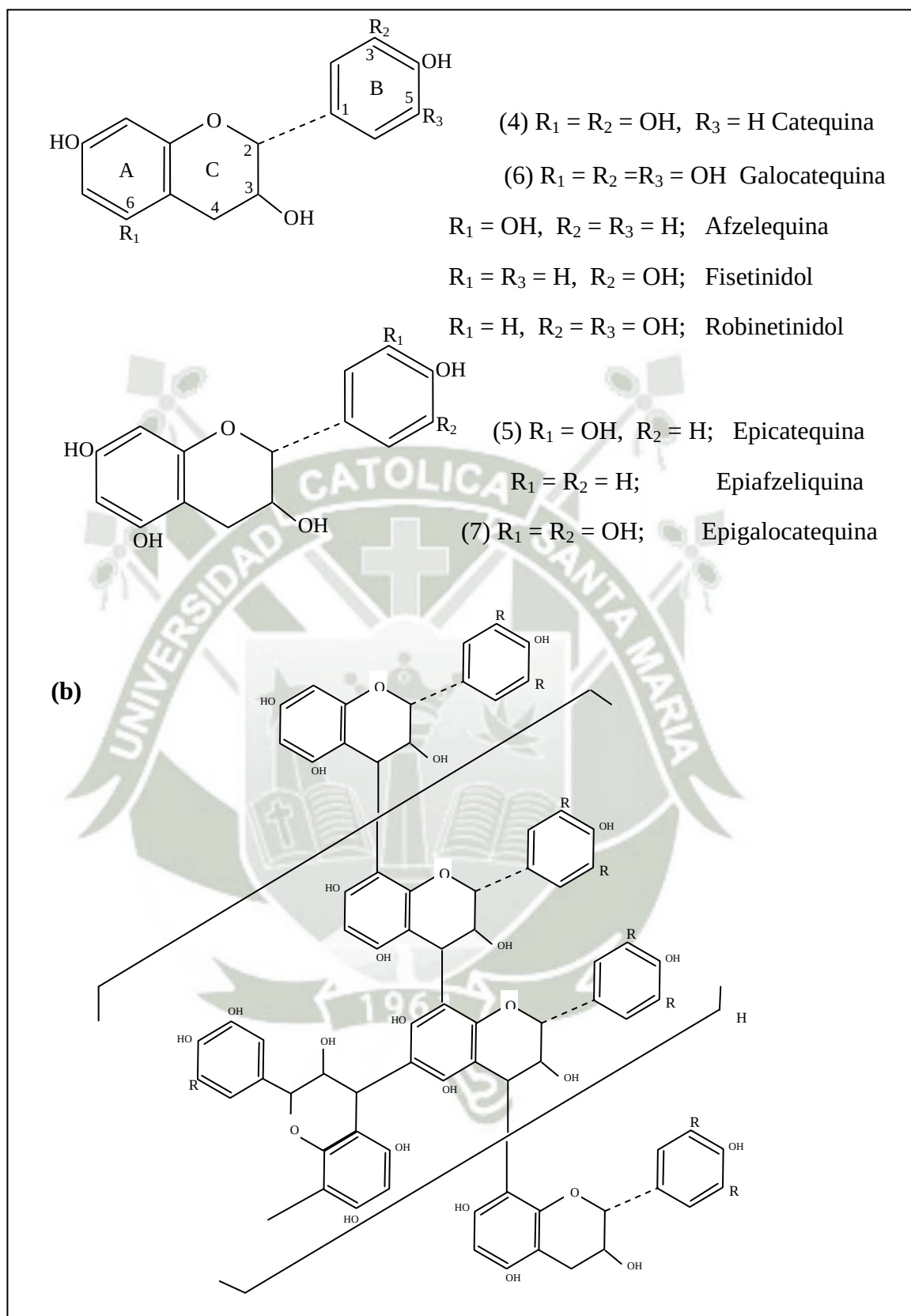


Figura N° 3 Estructuras moleculares de los taninos condensados. (22)

Se han encontrado diversos microorganismos (Tabla N° 1) que producen tanasas, entre los cuales se puede mencionar a trece especies del género *Aspergillus*. Estas enzimas son inducibles, porque su biosíntesis requiere de la presencia de algún derivado de los taninos como sefial para producir la enzima, aunque se ignora la estructura química de las moléculas inductoras (4).

Tabla N°1. Microorganismos productores de tanasas

Microorganismo	Referencia
Levaduras	
Candida sp K1	Aoki et al., 1976, 1979a,b
Hongos	
Ascochyta boltshauseri	Reshetnikova et al., 1984
A. pisi	Reshetnikova et al., 1984
A. biochemica	Reshetnikova et al., 1984
A. viciae	Reshetnikova et al., 1984
Aspergillus carneus	Ganga et al., 1977
A. flaviceps	Ganga et al., 1977
A. flavus	Chae and Yu, 1973
A. fumigatus	Lewis and Starkey, 1962

Fuente: Lekha y Lonsane, 1997

1.3.6. Métodos de extracción de taninos

Por su carácter polar, los taninos son extraídos generalmente con mezclas de alcoholes con agua en diversas proporciones. Sin embargo la mezcla más usada es acetona-agua (70:30) o isopropanol-agua (65:35) utilizando ultrasonido en cuatro extracciones. Además existen otros métodos no convencionales. (3)

1.3.6.1. Extracción de taninos con solución metanol-agua

Se toman 10.00 g de muestra cortada en trozos de 0.50 cm de longitud y se someten a secado al vacío a temperatura de 40 °C, por espacio de 15 minutos. Se coloca en un recipiente de vidrio de 1 L, 2.00 g de la muestra seca con 200 mL de una solución 1:1 de metanol-agua (100 mL de metanol + 100 mL de agua destilada). Todo el sistema se dispone sobre un baño de hielo y se agita con un rodete de dos palas accionado por un motor de ½ hp por 3 horas. La mezcla resultante del proceso de agitación, se centrifuga por 40 minutos a 200 rpm, obteniéndose como producto de esta operación mecánica dos fases. La fase sólida conformada por muestra con menos contenido de polifenoles y la fase líquida formada por metanol, agua y taninos (55).

Por último se recolecta el sobrenadante en un recipiente con tapa y se almacena en el refrigerador a 4 °C, hasta el instante previo de su uso en la cuantificación de taninos (*fracción metanólica*) (55).

1.3.6.2. Extracción con agua

1. Pesar una muestra de 10 g de corteza seca y agregarla al reactor (*beaker*), que contendrá 70 mililitros de agua desmineralizada a 70 °C, para obtener una relación de corteza – solvente de 1:5.
2. Realizar la extracción durante 45 minutos a 70 °C, colocando el reactor en la plancha de calentamiento con agitación.
3. Filtrar el producto de la extracción.
4. Someter la corteza residual a dos extracciones más con el mismo solvente cada una, en iguales condiciones.

5. Evaporar el solvente del filtrado a 70 °C, utilizando la plancha de calentamiento con agitación.

6. Secar el producto final a temperaturas no mayores de 70 °C en el secador eléctrico (21).

1.3.6.3. Maceración. El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente de 2 a 14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto (28).

1.3.6.4. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU). Se basa en el empleo de la energía derivada de los ultrasonidos (ondas de sonido con frecuencias superiores a 16 kHz) para facilitar la extracción, a partir de la muestra sólida, de los analitos por el disolvente orgánico seleccionado en función de la naturaleza de los solutos a extraer. La extracción se ve facilitada y acelerada gracias a esa energía. Los resultados obtenidos son similares a los de una extracción soxhlet pero la duración no es superior a los 30 minutos en la mayoría de los casos (28).

1.3.6.5. Extracción asistida por microondas (EAM). Las microondas son ondas de alta frecuencia electromagnética situadas entre las regiones de radio-frecuencia e infrarroja en el espectro electromagnético (con un rango de frecuencias entre 0.3-300 GHz). A diferencia del calentamiento convencional donde el calor penetra lentamente desde el exterior al interior de un objeto, la energía de microonda es “fría” produciendo calor, el calentamiento aparece justo en el núcleo del objeto que está siendo calentado, y el calor se extiende desde el interior al exterior del cuerpo (28).

1.3.7. Lixiviación

Lixiviación es la separación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o absorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso; con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas pueden ser de poros abiertos, de celdas con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas. (68)

Los principales métodos para extracción de partículas trituradas son:

- Extracción en el sitio
- Extracción de montón
- Tanques percolados
- Sistema de multietapa en contracorriente.

Mecanismo

El mecanismo de lixiviación puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a lixiviar o de la fracción soluble en el disolvente o de la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de esas velocidades, pueden ser importantes. Es posible que exista una resistencia externa. Como el que una reacción química puede afectar a la velocidad de la lixiviación. (68)

Factores que influyen en el proceso de extracción solido-liquido

Entre los factores que influyen en todo proceso de extracción solido-liquido se encuentran:

- **Solvente:** es la variable que determina en mayor medida el resultado de la extracción. Un buen solvente ha de poseer no solo una elevada solubilidad del soluto que se desea extraer, sino también una elevada selectividad, lo que implica que no debe disolver al resto de componentes presentes en el sólido. (62)
- **Temperatura:** es una variable que afecta la velocidad de la extracción. Un aumento de la temperatura provoca un incremento en la solubilidad del soluto, favorece la desnaturalización de las paredes celulares, haciéndolas más permeables y acelera las etapas físicas de transporte. No obstante, una temperatura alta daña los componentes termo sensibles o produce disolución de compuestos indeseables, con la consiguiente pérdida de selectividad e impurificación del extracto. (62)
- **Tamaño de partícula:** Las partículas deben ser de tamaño pequeño ya que de esta forma, se incrementa la superficie útil de transferencia de materia y se favorece el transporte interno del soluto y solvente. Por lo tanto, la extracción debe ir precedida de una operación de disminución de tamaño del solido mediante corte, trituración, molienda, etc. No obstante un tamaño de partícula muy pequeño no es aconsejable porque dificulta la circulación relativa de las fases liquidas y solidas. (62)

Método de operación y equipo

Los equipos utilizados para el proceso de lixiviación se clasifican según el tipo de contacto que realicen; es decir, aquellos en que las partículas sólidas se dispersan en un líquido y posteriormente, se

separan de él y aquellos que realizan la lixiviación por percolación. (68)

Por otra parte se debe tener en cuenta que las operaciones de lixiviación se realizan por lotes o semilotes (estado no estacionario) y también en condiciones totalmente continuas (estado estacionario). En cada categoría se encuentran equipos del tipo de etapas y de contacto continuo. Se utilizan dos técnicas principales de manejo: la aspersion o goteo del líquido sobre el sólido y la completa inmersión del sólido en el líquido. En cualquier caso, la elección del equipo que se va a utilizar depende bastante de la forma física de los sólidos y de las dificultades y costo de manejo. (68)

Equipos de Operación en Estado No Estacionario.

- **Lecho estacionario de sólidos o Tanque de Percolación:**

- Principio de Operación: Este tipo de tanques es utilizado para la lixiviación de sólidos de tamaño intermedios ya que, pueden lixiviarse adecuadamente con métodos de percolación en tanques abiertos. Se trata de un gran tanque circular o rectangular de fondo falso. Los sólidos que se van a lixiviar se dejan caer al tanque hasta una profundidad uniforme. Se rocían con un disolvente hasta que su contenido de soluto se reduce hasta un mínimo y a continuación se excavan. El flujo en contracorriente del disolvente a través de una serie de tanques es habitual, entrando nuevo disolvente al tanque que contiene el material más agotado. En algunos casos la velocidad de disolución es tan rápida que es suficiente un solo paso del disolvente a través del material, pero es más frecuente utilizar flujo en contracorriente del disolvente a través de una batería de tanques. (68)

En este método, el disolvente fresco se introduce en el tanque que contiene el sólido ya tratado, fluye a través de varios tanques en serie y finalmente se retira del tanque por el que se carga la alimentación de sólido. Una serie de tanques de este tipo recibe el nombre de batería de extracción. (68)

El sólido contenido en uno cualquiera de los tanques es estacionario hasta que se extrae completamente. Los demás tanques de la batería se mantienen en operación en contracorriente, avanzando los tanques de entrada y descarga a medida que se carga y retira el material. Tal proceso se llama a veces proceso Shanks. (68)

En algunos casos de lixiviación el disolvente es volátil, siendo preciso utilizar recipientes cerrados operados a presión. También se requiere presión para forzar el paso de disolvente a través del lecho en el caso de sólidos poco permeables. Una serie de estos tanques de presión operados con flujo de disolvente en contracorriente recibe el nombre de batería de difusión. (68)

- Características de diseño: La construcción de estos tanques varía bastante, según la naturaleza del sólido y del líquido que se van a manejar y el tamaño de la operación, pero son relativamente baratos. Los tanques pequeños frecuentemente se hacen de madera, siempre y cuando este material no sea atacado químicamente por el líquido de lixiviación. Las partículas sólidas por lixiviar descansan sobre un fondo falso. El fondo falso de estos tanques soporta el sólido y permite la salida de disolvente. La construcción más sencilla que presenta este tipo de fondos, consiste en una rejilla de tiras de madera colocadas en forma paralela unas con respecto a otras y lo suficientemente cercanas para sostener al sólido. Éstas, a su vez, pueden descansar sobre tiras similares colocadas en ángulos rectos, separadas 150 mm o

más, de forma que el licor de lixiviación pueda fluir hasta un conjunto de tuberías que llevan al fondo del tanque. Para sostener partículas muy finas, la rejilla de madera puede cubrirse mediante una estera de coco y un filtro de lona muy tenso y sujeto con una cuerda metida en una ranura alrededor de la periferia del fondo falso. Los tanques pequeños también pueden hacerse completamente de metal, con fondos falsos perforados, sobre los cuales se coloca una tela filtro, como en la lixiviación de productos farmacéuticos a partir de plantas. Los tanques de percolación muy grandes (45 por 34 por 5.5 m de profundidad) para la lixiviación de minerales de cobre, se han fabricado de concreto reforzado revestidos con cemento de plomo o bituminoso. (68)

- Aplicaciones: Este equipo se usa en la industria del azúcar de remolacha, en la extracción de taninos de corteza curtiente, en la extracción de productos farmacéuticos de cortezas y semillas, y en otros procesos. (68)

- **Tanque agitado por carga**

- Principio de operación: La principal función del agitador es proporcionar disolvente no agotado a las partículas de material durante el período que se encuentran en el tanque y circular suavemente los sólidos a través del fondo del tanque o suspenderlos simplemente por encima del fondo. (68)

Después de producida la lixiviación se pueden separar los sólidos mediante el asentamiento y la decantación, o con filtros externos, centrífugas o espesadores. Los sólidos que forman lechos impermeables, bien antes o durante la lixiviación, se tratan dispersándolos mediante agitación mecánica en un tanque o

mezclador de flujo. El residuo lixiviado se separa después de la disolución concentrada por sedimentación o filtración. (68)

De esta forma se pueden lixiviar pequeñas cantidades de material por cargas en un tanque agitado, con una salida en el fondo para retirar el residuo sedimentado. La lixiviación continua en contracorriente se obtiene con varios espesadores de gravedad conectados en serie, o bien, cuando el contacto en un espesador no resulta adecuado, colocando un tanque de agitación entre cada pareja de espesadores. (68)

- Características de diseño: Estos tanques son agitados mediante impulsores coaxiales (turbinas, paletas o hélices) que se utilizan habitualmente para la disolución por cargas de sólidos en líquidos.
- Aplicaciones: Estos equipos se han utilizado bastante en las instalaciones europeas mas antiguas y en las sudamericanas, para la lixiviación de aceites vegetales a partir de semillas; empero, son raros en Norteamérica (68)

- **Tanque Pachuca**

- Principio de operación: Los sólidos finamente divididos se pueden suspender en los disolventes de lixiviación por agitación; para la operación por lotes se utiliza una gran variedad de tanques con agitación. La agitación se lleva a cabo pasando aire a través de la suspensión: las burbujas de aire ascienden a través del tubo central y causan el flujo ascendente de líquido y del sólido suspendido en el tubo; en consecuencia, provocan la circulación vertical del contenido del tanque. (68)

Los agitadores mecánicos estándar, con impulsores del tipo de turbina también pueden utilizarse para mantener los sólidos

finamente divididos en suspensión en el líquido. Después de terminar la lixiviación, la agitación se detiene, el sólido se deja sedimentar en el mismo tanque o en uno separado y el líquido sobrenadante, claro, puede decantarse mediante sifoneo sobre la parte superior del tanque, o separándolo a través de tuberías de descarga colocadas a un nivel apropiado a un lado del tanque. Si los sólidos están finamente divididos y se sedimentan en un sólido comprimible, la cantidad de solución retenida en los sólidos sedimentados será considerable. La agitación y la sedimentación con varios lotes de disolvente de lavado serán necesarias para recuperar las últimas huellas de soluto; esto puede hacerse a contracorriente. (68)

La intensidad de la agitación en estos tanques es uniforme y no muy alta, lo que supone una menor abrasión. El aire utilizado para la agitación también ayuda a la oxidación. Sin embargo, la agitación leve puede no ser adecuada si la fricción entre las partículas para eliminar la superficie de revestimiento es deseada. Además, las partículas más gruesas pueden llegar a lijar. Agitación neumática requiere comparativamente más tiempo de reacción y tiene una reducida sensibilidad a cualquier variación, en el mineral de alimentación de entrada. (68)

- Características de diseño: Un tanque típico es un cilindro vertical con la sección de fondo cónica la vasija cilíndrica, normalmente de unos 3,5 m de diámetro y 15 m de altura con un fondo cónico. Un tubo vertical, abierto en ambos extremos, se proporciona a través de aire comprimido que se admite cuando el tanque está a cargo de la pulpa, causando la circulación de los materiales hasta el tubo central y el espacio anular, para que los sólidos se encuentren siempre en la fase operativa.

- Aplicaciones:

Este tipo de equipos se utiliza en la lixiviación de los minerales como oro, uranio y otros metales.

- **Tanques de Percolación Cerrados:**

Este tipo de equipos se utiliza cuando la caída de presión para el flujo del líquido es demasiado grande para el flujo por gravedad, se deben utilizar tanques cerrados y bombear el líquido a través del lecho de sólido. Algunas veces estos tanques reciben el nombre de “difusores”. Los tanques cerrados también son necesarios para evitar las pérdidas por evaporación cuando el disolvente es muy volátil o cuando se desean temperaturas superiores al punto normal de ebullición del disolvente. (68)

- **Filtro Prensa:**

- Principio de operación: Es un sistema de filtración por presión. Consisten en una serie de placas y marcos alternados con una tela filtrante a cada lado de las placas. Las placas tienen incisiones con forma de canales para drenar el filtrado en cada placa. Los sólidos se bombean entre cada par de bastidores o placas y una vez llenos se van oprimiendo mediante un tornillo, unos contra otros, obligando al sólido a expulsar el agua contenida a través de una tela. Los sólidos finamente divididos, demasiado finos para ser tratados por percolación en tanques de percolación relativamente profundos, pueden filtrarse y lixiviarse en el filtro prensa por bombeo del disolvente a través de la torta de la prensa. Evidentemente, esta práctica es común en el lavado de las aguas madres de precipitados que se han filtrado.

- Características de diseño: Los filtros prensa de placas y marcos están concebidos para suspensiones cargadas que forman una torta, están formados por una serie de platos verticales yuxtapuestos alternativamente con armazones huecos en los cuales se acumula la torta. El soporte de filtración está formado por telas que sujetan los platos acanalados. El filtrado fluye tras cruzar el tejido filtrante por las conducciones adecuadas. Los platos y los armazones reposan sobre tirantes de acero horizontales y robustos que se ajustan unos contra otros entre dos soportes, uno de los cuales es fijo y el otro móvil. El cierre del filtro es manual en los modelos pequeños: hidráulico y más o menos automatizado en los aparatos más importantes. Cuando los bastidores están completamente llenos de torta el caudal de filtración es prácticamente nulo y finaliza la filtración.

- Aplicaciones: Los filtro prensa tienen una amplia aplicación en la separación sólido-líquido. Se utilizan mucho para el filtrado y clarificación de numerosos líquidos, también tienen utilidad en las industrias químicas o en las de los textiles artificiales, industria azucarera, cervecería, vinificación, industrias aceiteras, industria cerámica o en ciertas industrias extractivas. Actualmente los filtros prensa tienen un uso preferencial en muchas industrias por los altos rendimientos obtenidos, factor determinante en la industria pesada y minera, donde se exigen respuestas muy efectivas con equipos de nivel técnico especial (68)

Percolación

La percolación es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas y extractos fluidos. Este método se

fundamenta en la extracción continua de los principios activos por medio de un solvente apropiado. (52).

El percolador es un recipiente cónico con una abertura superior en la cual se puede colocar una tapa circular horadada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Por la parte inferior posee un cierre regulable para permitir el paso del líquido a una velocidad conveniente. El material vegetal se humedece previo a su colocación en el percolador con una cantidad apropiada del menstuo colocado en un recipiente bien cerrado y se deja en reposo por espacio aproximado de cuatro horas (52).

Pasado ese tiempo se empaqueta convenientemente en el percolador de manera que permita el paso uniforme del líquido y el total contacto de éste con el material vegetal. Se llena de líquido y se tapa el percolador. Se abre la salida inferior hasta lograr un goteo uniforme y se cierra. Se adiciona más menstuo hasta lograr cubrir todo el material y se deja en maceración con el percolador cerrado por 24 horas. Pasado este tiempo se deja gotear lentamente y se adiciona suficiente menstuo hasta un volumen proporcional a las 3/4 partes del volumen total requerido para el producto final. Se presiona la masa húmeda residual para extraer el máximo del líquido retenido y se completa con suficiente menstuo hasta obtener la proporción adecuada, se filtra o se clarifica por decantación (52).

1.3.8. Diseño del percolador

El objetivo principal para el diseño de un proceso de lixiviación a cualquier nivel (conceptual, preliminar, etc.) se centra en el diseño de la operación unitaria y la unidad de proceso. Los principales aspectos que son particulares

para la operación de lixiviación son la selección del proceso y las condiciones de operación, así como el cálculo de las dimensiones del equipo de extracción.

Tanque de Percolación:

Este tipo de tanques es utilizado para la lixiviación de sólidos de tamaño intermedios ya que, pueden lixiviarse adecuadamente con métodos de percolación en tanques abiertos.

Se trata de un gran tanque circular o cónico de fondo falso. Los sólidos que se van a lixiviar se dejan caer al tanque hasta una profundidad uniforme. Se rocían con un disolvente hasta que su contenido de soluto se reduce hasta un mínimo y a continuación se excavan.

La construcción de estos tanques varía bastante, según la naturaleza del sólido y del líquido que se van a manejar y el tamaño de la operación. Las partículas sólidas por lixiviar descansan sobre un fondo falso.

El volumen del percolador se obtiene del volumen total de la mezcla más el 20% de este.

La relación altura, diámetro del percolador debe ser 1.2, esta recomendación hace que el tanque sea más alto que ancho, lo que favorece el tiempo de contacto entre las partículas y el líquido y por lo tanto la transferencia de masa pero no debe de ser demasiado alto para que no se vuelva inestable y requiera de costosos anclajes para evitar posibles volcamientos.

El acero inoxidable A.S.T.M serie 300, es el material más recomendable para este tipo de equipos por su alta resistencia a la corrosión en especial el 314, el cual es recomendado incluso para fines médicos, este material tiene una resistencia a la rotura de 220 Mpa lo cual muestra que es adecuado para soportar este peso, estos aceros tienen en general propiedades mecánicas bajas y en consecuencia requieren espesores fuertes, además su resistencia a

la abrasión es baja. Por lo tanto el espesor con el cual se construirá el reactor es de 3 mm. (68)

1.3.9. Proceso productivo para la obtención de concentrado tánico

De la Tara se obtiene el polvo de Tara que contiene un gran porcentaje de taninos. El polvo de Tara se consigue mediante un proceso mecánico simple de trituración de vaina, previamente despepitada, obteniendo como producto un aserrín fino de coloración amarilla clara, con un aproximado de 52 a 54% de taninos (17).

Posteriormente, se obtiene extracto de Tara o extracto tánico, mediante un proceso de concentración.

El proceso para la obtención del concentrado tánico es el siguiente:

- a) Las vainas de Tara pasan por el proceso de separación de materias extrañas.
- b) Las vainas de Tara son desviadas (usando una desviadora o despepitadora), obteniéndose porcentualmente: 33% de semilla, 45% de polvo y 22% de fibra.
- c) Posteriormente, la fibra y el polvo (que salen juntos de la despepitadora), con un contenido de taninos de 52 a 54% pasan por el proceso de extracción bajo los siguientes parámetros: temperatura de 65 a 67 °C, tiempo de 30 a 40 minutos, relación agua/polvo de 5/1 a 4/1, número de lavados de 4 a 5
- d) La purificación del extracto líquido se realiza por medio de decantación y filtración.

e) La concentración del extracto líquido purificado se lleva de 2 a 5 grados Berilio hasta 11 a 12 grados Berilio.

f) El secado del extracto se realiza por atomización.

Del extracto de Tara se puede obtener: ácido tánico y ácido galotánico (17).

1.3.10. Métodos de identificación de taninos

Numerosos métodos se han descripto para la evaluación de los taninos. Dada la heterogeneidad química de la constitución de los mismos y la variabilidad con que se encuentran en las distintas especies, resulta dificultoso establecer una metodología que los evalúe en su totalidad. (64)

1.3.10.1. Métodos cualitativos

a) Reacción con cloruro férrico

El elemento activo es el hierro. En esta reacción los taninos son reductores que al ser mezclados con las sales férricas van a formar complejos de Fe^{+++} dando lugar a coloraciones o precipitaciones de color verde y azul intensos. (64)

b) Reacción con acetato de plomo

Con el Acetato de plomo, los taninos hidrolizables forman un precipitado. (34).

c) Reacción de Stiansy

Observe la aparición de una coloración azul-violeta que indica la presencia de taninos gálicos. (69)

d) Reacción con solución de gelatina al 1%

La obtención de precipitado indica la presencia de taninos. (34)

e) Reacción con solución acuosa de gelatina y NaCl al 1%

La obtención de un precipitado indica la presencia de taninos en el extracto. Con esta solución es más fácil obtener precipitado que con la solución que únicamente contiene gelatina. (34)

d) Otras reacciones características: (34)

- Bicromato de potasio 5%
- Polvo de piel
- Prueba de catequina
- Formol clorhídrico
- Acetato de zinc
- Agua de bromo saturado

1.3.10.2. Métodos Cuantitativos

a) Método de Lowental

Uno de los primeros métodos para la determinación de taninos fue propuesto por Lowental, el cual consiste en dos titulaciones con permanganato de potasio, de dos alícuotas proveniente de una extracción acuosa del vegetal con tanino. Una de ellas se trata con gelatina para eliminar por precipitación los taninos presente. Se utiliza como indicador carmín de índigo y el agregado de permanganato se realiza hasta viraje a color amarillo. La diferencia entre las dos titulaciones correspondería a la oxidación por medio del permanganato de los taninos presentes. (60).

a) Método Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenólicos y otras especies reductoras al molibdeno formando complejos color azul que pueden detectarse espectrofotométricamente a 750-766 nm. (69)

Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. (65).

La concentración de fenoles totales se establece por comparación con un compuesto estándar (comúnmente ácido caféico o ácido gálico) y los resultados se expresan como equivalentes del estándar utilizado. (69)

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El envejecimiento celular es un proceso inevitable que se caracteriza por una disminución general en las funciones fisiológicas, lo que conduce a la morbilidad y a la muerte. Es un proceso multifactorial controlado por una combinación de factores genéticos y ambientales (16).

En 1956 el Dr. Denhan Harman de la universidad de Nebraska se convirtió en el primer investigador en sugerir que los radicales libres son una causa importante del envejecimiento celular. Su teoría decía así: “el envejecimiento resulta de los efectos nocivos generados por los radicales libres que se producen en el curso del metabolismo celular normal y que son acumulados a lo largo de toda la vida del organismo”. Esta hipótesis, muy cuestionada inicialmente, cuenta hoy en día con una amplia aceptación, con mucha evidencia experimental que la apoya, y se ha

convertido en uno de los principales focos de interés en la investigación científica del envejecimiento y las enfermedades degenerativas (16).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y su neutralización por los sistemas de defensa antioxidantes; pero cuando este equilibrio se rompe, bien por la sobreproducción de radicales libres, bien por la deficiencia de los sistemas antioxidantes o por ambas razones se produce el estrés oxidativo o daño oxidativo, mecanismo general de daño celular que conduce a una alteración en el funcionamiento celular directamente relacionada con la patogénesis de muchas enfermedades, y finalmente a la muerte celular (16).

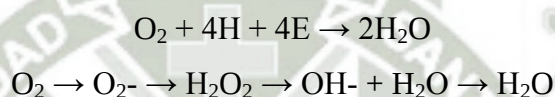
1.4.1. Los radicales libres

Se consideran radicales libres (RL) a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Esta configuración espacial les hace muy inestable, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares (16).

El metabolismo normal de cada célula es una fuente importante de RL (cuando se metaboliza el alimento para producir energía), pero además también se producen por influencias externas cuando nuestro organismo recibe el impacto de diversos contaminantes tales como los gases provenientes de los escapes de los automóviles, la contaminación ambiental y el humo del cigarrillo, algunos productos de limpieza, pesticidas, algunos fármacos, el ejercicio físico excesivo o los rayos ultravioletas del sol (16).

Los RL cumplen numerosas funciones útiles en el organismo (de hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar, por ejemplo, contra las infecciones), pero en cantidades excesivas tienen el potencial de dañar nuestras células y el material genético allí contenido (16).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano durante la respiración celular es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo un total de 4 electrones con producción de 2 moléculas de agua. La reacción global es la siguiente:



Una consecuencia de este proceso es la producción de intermediarios parcialmente reducidos que son los RL llamados especies reactivas de oxígeno (ERO):

O_2^- = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, OH^- = radical hidróxilo.

El radical hidróxilo es con diferencia el más dañino de los tres, con una vida media muy corta y una alta reactividad. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es estrictamente un RL, pero por su capacidad de generar el OH^- en presencia de metales como el hierro bivalente (reacción de Fenton) se le considera como tal (16).

Otros RL son los llamados especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON): NO = óxido nítrico y NO_2 = dióxido de nitrógeno. Ambos tienen su origen en el óxido nítrico, RL necesario a bajas concentraciones como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, y por su acción

vasodilatadora, que hace que sea considerado un protector vascular, pero tóxico a altas concentraciones. En el sistema cardiovascular el óxido nítrico producido por el endotelio es el responsable de la respuesta vasodilatadora esencial para la regulación de la presión arterial, inhibe la agregación plaquetaria, protege contra la hipoxia pulmonar y controla la circulación colateral. Además tiene efecto inmuno-modulador y citotóxico. Su acción lítica sobre varios tipos de células es utilizada por el sistema mononuclear fagocítico (monocitos, macrófagos y células de Von Kupffer) para destruir células extrañas (microorganismos) o propias degeneradas (25).

Los efectos protectores del NO se ejercen donde no haya una excesiva producción de superóxido, porque en su presencia ambos reaccionan rápidamente generando peroxinitrilo, que produce nitración de proteínas y peroxidación lipídica con la consiguiente disfunción endotelial y aterogénesis (25).

1.4.1.1. Fuentes de radicales libres

La mitocondria constituye la fuente principal de RL. Otras fuentes son las peroxisomas, y también los leucocitos polimorfonucleares que constituyen una fuente importante, cuando en los procesos inflamatorios se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleukinas, etc.). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de O_2^- que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico OH^- (54).

1.4.1.2. Toxicidad de los radicales libres

Por la alta inestabilidad atómica de los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. En el caso de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), los RL dañan las estructuras ricas en ellos como las membranas celulares y las lipoproteínas. En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), génesis de la placa ateromatosa (54).

Durante la oxidación lipídica por los RL, el ácido graso, al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, con lo que se propaga y perpetúa el proceso oxidativo. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, y genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo (54).

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.). Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño al gen específico (54).

1.4.2. Los antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (33).

Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación) (33).

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (5).

1.4.2.1. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden obtenerse mediante: i) síntesis química/sintética, o ii) extracción de fuentes naturales. Entre las sustancias antioxidantes sintéticas, se distinguen aquellos análogos a los que se encuentran en la naturaleza (ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferoles y carotenoides) y los que no presentan análogos en el medio natural. Es habitual, el empleo del apelativo de “antioxidante

natural” para las sustancias presentes en la naturaleza, aun siendo sintetizadas químicamente. (58)

Compuestos antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos se han aplicado en muchos productos, incluyendo farmacéuticos, cosméticos y alimentos de consumo humano y animal. Los más populares son aquellos derivados de estructuras fenólicas o que tienen una configuración fenólica en su estructura molecular. En las estructuras derivadas de fenoles, las más utilizadas como antioxidantes sintéticos alimentarios son: los ésteres del ácido gálico, BHA, BHT y TBHQ, identificados como antioxidantes primarios. En general, según el Codex Alimentarius, la dosis máxima permitida viene determinada por el tipo de producto al que se añade el antioxidante. (58)

o E-320. BHA (butilhidroxianisol)

Es quizá el antioxidante más utilizado en la industria alimentaria, aunque existe una tendencia a la reducción de su uso. Es un sólido blanco y ceroso, altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Puede desarrollar un color rojo en presencia de metales alcalinos en los productos alimentarios. Tiene funciones sinérgicas con otros antioxidantes: galatos, tocoferoles, BHT, TBHQ, ácido cítrico y ácido fosfórico. (58)

o E-321. BHT (butilhidroxitoluol)

Es muy utilizado en la industria alimentaria y similar al BHA en la mayoría de sus propiedades, aplicaciones y limitaciones legales, aunque no es tan efectivo. Es un sólido blanco cristalino, altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Tiene funciones sinérgicas con BHA, TBHQ y ácido cítrico pero no tiene actividad sinérgica con el galato de propilo. (58)

o E-319. TBHQ (terbutilhidroxiquinona)

Es un sólido blanco cristalino muy efectivo en la estabilización de grasas y aceites, especialmente en aceites vegetales poliinsaturados pero no contribuye en el olor y color de los mismos. Es estable a altas temperaturas y es menos volátil que el BHA y BHT. Tiene funciones sinérgicas con otros antioxidantes y quelatos como BHA, BHT, tocoferoles, palmitato de ascorbilo, ácido cítrico y AEDT. (58)

o Ésteres del ácido gálico

El ácido gálico y los alquil galatos, por su estructura fenólica y sus tres grupos hidroxilo, muestran considerable actividad antioxidante. El ácido gálico es soluble en agua y prácticamente insoluble en aceite. La esterificación de los grupos carboxílicos con alcoholes de distinta longitud de cadena da lugar a los alquil galatos, cuya solubilidad en aceite aumenta. (58)

Compuestos antioxidantes naturales

En los últimos años, se está dedicando un gran esfuerzo en la identificación de sustancias de origen natural con capacidad antioxidante, con la finalidad de minimizar el consumo de los antioxidantes de origen sintético. Algunos estudios con animales han evidenciado efectos nocivos de los antioxidantes sintéticos después de un largo período de ingestión. Los antioxidantes de origen natural constituyen a priori una alternativa más saludable y segura que los antioxidantes sintéticos. Pero, la inocuidad para la salud de los compuestos naturales no debe darse por supuesta, siendo necesario el estudio de los efectos tóxicos de las sustancias naturales aisladas y añadidas como sustancias puras. El ácido ascórbico y los tocoferoles son los antioxidantes naturales más empleados comercialmente. Los carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos y proteínas son otros constituyentes del reino vegetal y animal, con potencial actividad antioxidante. El reino vegetal ofrece una gran variedad de

compuestos de alto y bajo peso molecular con propiedades antioxidantes. La mayoría de los compuestos antioxidantes naturales que se han estudiado para su aplicación en la industria alimentaria son compuestos polifenólicos. Los polifenoles, grupo al que pertenecen los flavonoides, contienen al menos dos subunidades fenólicas. (58)

o Fenoles y ácidos fenólicos simples

Los fenoles simples se caracterizan por la presencia de un esqueleto fenólico: un anillo aromático con un grupo hidroxilo.

Los ácidos fenólicos simples más abundantes en la naturaleza son derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. Los ácidos fenólicos se encuentran de manera habitual conjugados, más frecuentemente como ésteres que como glicósidos. Los compuestos fenólicos pueden presentar actividad antioxidante en virtud, entre otros factores, de su capacidad donadora de electrones, es decir de su carácter reductor. La actividad reductora de los fenoles se debe a la presencia de los grupos hidroxilo en el anillo aromático, y su capacidad para deslocalizar los electrones del radical fenólico. (58)

o Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de polifenoles caracterizados por el esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆. La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente condensan para formar un anillo pirano, y menos comúnmente un anillo furano. Los flavonoides se subdividen habitualmente en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas, en función de sus características estructurales. Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, frutos secos, semillas, flores y distintas bebidas, y son por tanto constituyentes importantes de la dieta. Los flavonoides están presentes en muchos vegetales y

frutas en forma de glicósidos en los cuales un azúcar sustituye al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo. (58)

Son de gran importancia los polifenoles presentes en infusiones y extractos naturales, destacando las catequinas presentes en el té verde. En el aceite de oliva, fundamentalmente en el de oliva virgen, están presentes, sobre todo, los fenoles simples hidrotirosol y tirosol. Además contiene ácidos grasos monoinsaturados, que son más resistentes a la oxidación que los poliinsaturados. (16).

1.4.3. Capacidad antioxidante de los taninos

La capacidad antioxidante descrita para distintos polifenoles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial (23).

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido a estudios que les atribuyen efectos carcinógenos. Este hecho ha despertado un creciente interés en el estudio de los antioxidantes naturales entre los que se encuentran distintos compuestos fenólicos (23).

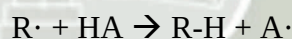
El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales .libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación "in vitro". Los compuestos fenólicos actúan como

pro oxidantes quelando metales, bien de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos. Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas. La primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, enlentecer o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores. Entre los compuestos fenólicos con una reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (23).

1.4.4. Métodos de cuantificación de antioxidantes

La eficiencia en la extracción de la especie donadora del hidrógeno es un factor importante en la evaluación de la actividad antioxidante.

Si representamos un radical como $R\cdot$ y el donador de hidrógeno como HA , la reacción que se lleva a cabo es



Donde $R-H$ es la forma reducida de $R\cdot$ y $A\cdot$ es un nuevo radical libre menos reactivo generado en este primer paso. En la reacción anterior se aprecia la reducción de un radical $R\cdot$ por una molécula de HA , es decir la estequiometría es 1:1. (69)

En los métodos FRAP, ABTS y DPPH ocurre una reacción con transferencia electrónica denominada *SET* (single electron transfer) mientras que el método ORAC implican una reacción denominada *HAT* (Hydrogen Atom Transfer). (69).

a) Ensayo DPPH. Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

Este método se basa en la reducción del radical DPPH $\cdot$ por los antioxidantes de la muestra. La molécula del DPPH es un radical libre químicamente estable que no forma dímeros como sucede con otros radicales libres.

La solución de DPPH es de color morado y da máximos de absorción en 328 y 517 nm; cuando se mezcla con una sustancia que puede donar uno o varios átomos de hidrógeno, la concentración del radical DPPH disminuye mientras aparece la forma reducida DPPH-H provocando un cambio en el color de morado a amarillo y la absorbancia de la solución decrece. La decoloración resultante esta directamente ligada a la estequiometría de la reacción mostrada en la figura N° 4. (69)

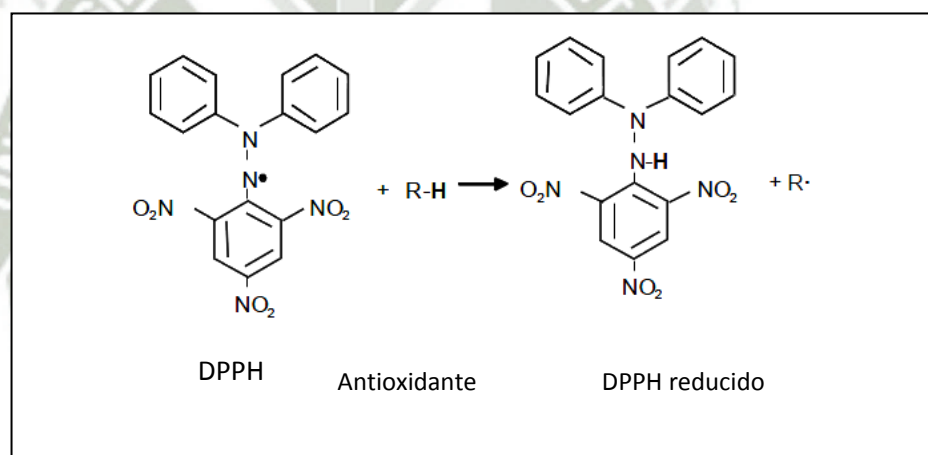


Figura N° 4 Reacción del DPPH con el antioxidante

La cuantificación se realiza por lo general empleando soluciones patrón de Trolox. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método. (65).

Este método no es específico a ningún tipo de antioxidante en particular, por lo tanto aplica para evaluar una capacidad antioxidante total. Es

importante mencionar que los resultados obtenidos presentan tendencias similares al reportado usando otros métodos. (69)

b) Ensayo TEAC o ABTS

El ensayo TEAC o ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-tilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS^{•+} generado en el medio de reacción.

Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820. Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm. (65)

c) Ensayo ORAC

El ensayo ORAC se realiza siguiendo el procedimiento descrito por Ou B. et al (2001). Este consiste en la cuantificación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición del ataque radicalario a la fluoresceína por parte del radical AAPH. (65)



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES.

2.1.1. Material Biológico

Vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) fueron recolectadas en el distrito de la Joya, en el departamento de Arequipa; las coordenadas geográficas del lugar de recolección son 16°43'32" latitud Sur y 71°51'38" longitud Oeste.

2.1.2. Material de vidrio

- Picnometro 10 ml

- Tubos de ensayo
- Beaker 25 ml, 50ml, 100 ml
- Pipeta volumétrica 2 ml, 5 ml, 10 ml.
- Probeta de 25ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml.
- Balón volumétrico 100ml
- Matraz aforado 25 ml
- Fiolas 10ml, 25 ml
- Bureta 25 ml
- Embudo
- Bagueta
- Pipeta Pasteur
- Frascos de vidrio
- Frascos de vidrio

2.1.3. Reactivos

- Etanol comercial 96% DIPROQUIM
- Cloruro férrico 10% MERCK
- Acetato de plomo trihidratado MERCK
- Acido acético 10% MERCK
- Tungstato de sodio dihidratado MERCK
- Acido fosfomolibdico MERCK
- Acido fosfórico 85% MERCK
- Acido gálico MERCK
- Solución de gelatina 25% MERCK
- Solución acida de cloruro de sodio MERCK
- Acido clorhídrico MERCK
- Caolín DIPROQUIM
- Carbonato de sodio DIPROQUIM
- DPPH (2,2-difenil-1-picryl hidrazil). Free Radical CALBIOCHEM
- Metanol Grado HPLC MERCK

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)
CALBIOCHEM

2.1.4. Otros

- Paños absorbentes
- Papel filtro
- Canicas de vidrio
- Agua destilada
- Pizeta
- Algodón
- Gradilla
- Espátula
- Soporte universal
- Pro-pipeta
- Bolsas Ziploc
- Tubos eppendorf
- Micro-pipetas 0-20 μ l, 20-100 μ l, 100-1000 μ l
- Puntas para micro-pipeta
- Cronometro

2.1.5. Equipos

- Balanza Electrónica OHAUS scout Pro 202, 0-200g
- Balanza analítica electrónica OHAUS AR2141 0-210g
- Balanza analítica OHAUS Pioneer 0-210g
- Estufa de secado y esterilización selecta conterm
- Tamiz N° 16 (1.18 mm) y N° 40 (425 μ m)
- Mufla 48000 FUMACE
- Campana extractora 1-30R-500
- Percolador con chaqueta (diseño propio)

- Refrigerador Coldex
- Refractometro ABBE
- Rotavapor RII BUCHI
- Baño Maria
- Cocinilla eléctrica
- Equipo de reflujo
- Agitador orbital Selecta Rotaterm
- Espectrofotometro Cary 60 UV-VIS
- Celdas 10mm Agilent Technology
- Liofilizador Free Zone 2.5 Litros LABCONCO
- Microceldas 90 µl 4mm x 1 mm Agilent Technology
- Analog Vortex Mixer
- Termómetro digital
- Ultrasonido Branson 2510 con Timmer digital
- Centrifuga Centra C12 Thermo IEC

2.2. METODOLOGÍA

En la figura N° 5 se muestra el diagrama de flujo de la metodología realizada para la extracción de taninos, cuantificación de polifenoles totales y determinación de su actividad antioxidante.

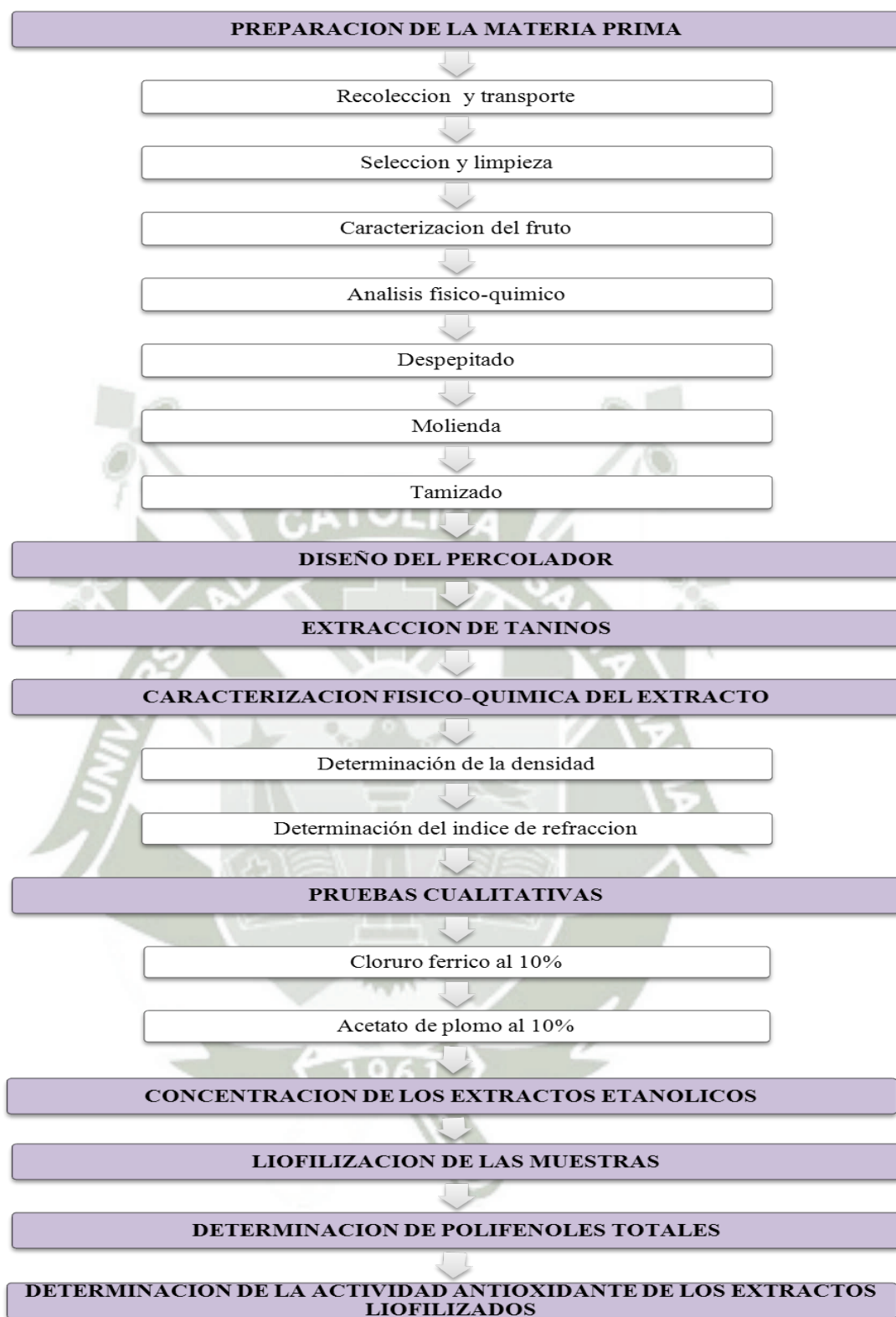


Figura N° 5. Diagrama de flujo de la metodología desde la recolección de la materia prima hasta la determinación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara)

2.2.1. Preparación de la materia prima

a) Recolección y transporte de vainas de “*Caesalpinia spinosa*”

Se recolectó manualmente aproximadamente 20 kg de vainas de “*Caesalpinia spinosa*” (Tara), en los meses de abril y mayo del 2012 en el Fundo AgroInka ubicado en el distrito de La Joya, departamento de Arequipa. Se transportó la materia prima en bolsas plásticas manteniendo diferenciadas las vainas recolectadas de árbol y piso. En la figura N° 6 se muestra los arboles de *Caesalpinia spinosa* (Tara) de los cuales se recolectaron las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).



Figura N° 6 Frutos de Tara utilizados en la investigación.

b) Selección de materia prima

Se seleccionaron las vainas secas que se encontraban en buen estado, eliminando las que estaban dañadas.

c) Limpieza

Se limpiaron manualmente utilizando un paño húmedo, eliminando el polvo y otras impurezas.

d) Caracterización del fruto

Se seleccionó aleatoriamente 30 vainas de Tara, de las cuales se tomó en cuenta su peso, tamaño y color. Luego se despepitó manualmente estas vainas y se procedió a caracterizar las semillas.

e) Análisis fisicoquímico de la fibra

- Humedad: Se realizó por el método gravimétrico.
- Cenizas: Se determinó por el método de incineración a temperatura de 550°C por 4 horas.

f) Despepitado

Se realizó el despepitado manualmente, separando las semillas y la fibra.

g) Molienda

Esta operación se realizó utilizando un molino eléctrico, donde se pulverizó la fibra vegetal.

h) Tamizado

La fibra pulverizada fue tamizada con tamices N° 16 y 40, obteniendo un tamaño de partícula 1.18 mm.

i) Pesado del material tamizado

Se pesó 300g de materia prima tamizada en bolsas Ziploc.

2.2.2. Diseño del percolador con chaqueta

El equipo fue diseñado para realizar operaciones de separación de sustancias contenidas en un sólido mediante la utilización de un disolvente que permite que se realice la separación.

El equipo que se diseñó es un percolador con chaqueta fabricado en acero inoxidable tipo 304, con forma de cono truncado, y provisto de una canastilla en donde se ubica el sólido al cual se le va a realizar la operación de extracción, el cual se muestra en la figura N° 7. El percolador tiene las siguientes especificaciones

- Tipo de operación: Por lotes
- Temperatura: 25°C y 40°C. Proceso isotérmico
- Accesorio: Chaqueta de calentamiento
- Tiempo de operación: 24 horas
- Material: Acero inoxidable 304
- Altura: 25 cm
- Diámetro: 14cm
- Relación altura/diámetro: H/D: 1.78
- Espesor de la lamina: 3.3 mm
- Capacidad del percolador: 3 L

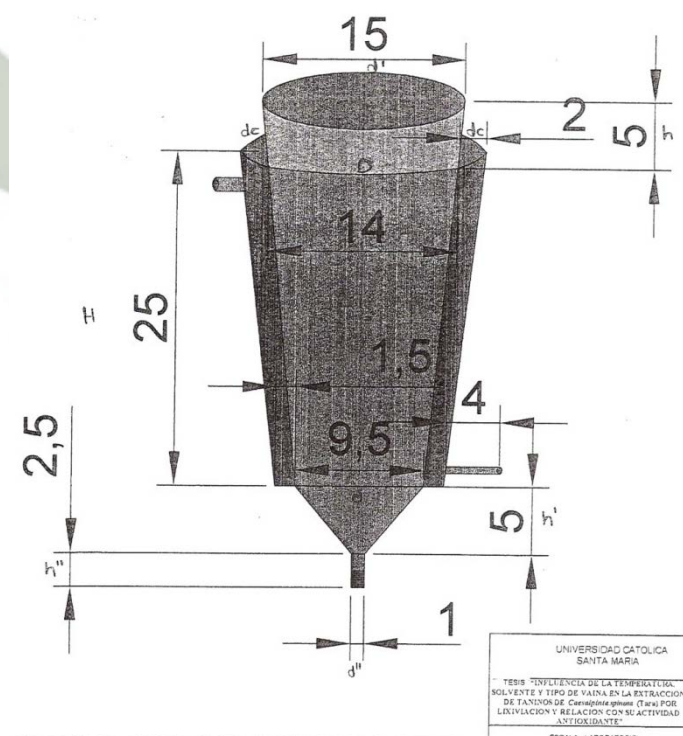


Figura N° 7 Diseño detallado del percolador con chaqueta

2.2.3. Extracción de taninos

Se realizó por el método de percolación. Se pesó 300g de fibra tamizada cubriendo la parte superior con papel filtro y canicas de vidrio, se adicionó el solvente hasta lograr cubrir todo el material y se dejó en maceración en el percolador cerrado por 24 horas. Pasado este tiempo se dejó gotear lentamente y se adicionó suficiente solvente hasta un volumen proporcional a las 3/4 partes del volumen total requerido para el producto final. Se presionó la masa húmeda residual para extraer el máximo del líquido retenido y se completa con suficiente solvente hasta obtener la proporción adecuada.

Los extractos se obtuvieron teniendo en cuenta los tipos de solvente, tipo de vaina y temperatura; los cuales se muestran en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Variables tomadas en cuenta para la elaboración del extracto tánico.

Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina
1	Agua	25	Vaina caída
2			Sujeta al árbol
3		40	Vaina caída
4			Sujeta al árbol
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída
6			Sujeta al árbol
7		40	Vaina caída
8			Sujeta al árbol
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída
10			Sujeta al árbol
11		40	Vaina caída
12			Sujeta al árbol

Los extractos se recolectaron en frascos de vidrio protegidos con papel aluminio a fin de proteger los extractos de la luz y conservados en refrigerador a 4 °C tal como se muestra en la figura N° 8 , así como también se muestra en la figura N° 9 el percolador utilizado para la obtención del extracto tánico.



Figura N° 8 Extractos líquidos de las 12 muestras obtenidas de las vainas de Tara.



Figura N° 9 Percolador de Acero para la extracción de Taninos.

2.2.4. Pruebas fisicoquímicas del extracto

a) Densidad

La determinación de la densidad de los extractos totales líquidos se realizó con un picnómetro de 10 ml a temperatura ambiente.

b) Índice de refracción

Se utilizó un refractómetro Abbe. Se limpió con etanol y se vertió una gota del extracto total en el prisma, tomando nota de la lectura del aparato.

2.2.5. Pruebas cualitativas

a) Cloruro férrico al 10%

Se colocó 5ml de solución al 25% de extracto en un tubo de ensayo, se añadió gota a gota la solución de Cloruro férrico al 10% y de inmediato se tomó nota de la reacción (Cambio de color).

b) Acetato de plomo al 10%

Se colocó 2.5ml de solución al 25% de extracto en un tubo de ensayo, seguidamente se añadió 5 ml de ácido acético al 10% y 2.5ml de acetato de plomo trihidratado y se tomó nota de la reacción (cambio de color).

2.2.6. Concentración de los extractos etanólicos

Los extractos etanólicos se concentraron en el rotavapor a una temperatura de 40°C y a una presión de 66 KPa.

2.2.7. Liofilización de las muestras

Se congelaron las muestras a una temperatura de -4°C , luego se colocó en el liofilizador a una temperatura de -47°C , a una presión de 0.120 mbar, durante 48 horas para cada muestra. Finalmente se almacenó el liofilizado en bolsas Ziploc en oscuridad.

2.2.8. Pruebas cuantitativas

a) Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu

Se disolvió 10g de tungstato de sodio dihidratado, 0.2g de ácido fosfomolibdico y 5ml de ácido fosfórico al 85% en 75ml de agua destilada. Se reflujo durante 2 horas y luego se completo el volumen a 100ml con agua destilada. Se almacenó en frasco ámbar a 4°C .

b) Preparación de soluciones patrón de Ácido Gálico.

Se preparó una serie de patrones con concentración de 40, 60, 80, 100, 120 ppm, utilizando una solución stock de ácido gálico de 200ppm. De cada patrón se pipeteo 4ml y se vertieron en una fiola de 25ml y se le añadió 2ml de agua destilada.

c) Preparación de las muestras

- Muestra A: Se midió 1.6ml del extracto total, se transfirió a una fiola de 100ml y se completó el volumen con agua destilada. De esta

solución se tomó una alícuota de 5ml, se llevo a una fiola de 25ml y se adicionó 4ml de agua destilada.

- Blanco de la muestra A: Se midió 5ml de agua destilada y se vertió en una fiola de 25ml.

d) Preparación de las soluciones con coloración

A cada fiola de 25ml con las respectivos patrones, muestras y blancos se le añadieron 2ml de solución tungsto-molibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos, luego se añadió 1ml de carbonato de sodio al 20% se agitó y se enrasó con agua destilada. Se dejó reposar durante 2 horas.

e) Medición espectrofotométrica

Transcurrido el tiempo se leyó las absorbancias de las soluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

2.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante

a) Preparación del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una disolución de DPPH de 2.5mmol/L en metanol para lo cual se pesaron 4.93 mg de DPPH en un matraz volumétrico de 5mL, se adicionaron 4ml del disolvente, se agitó en el vortex y se enrasó.

b) Preparación de curva patrón

Se realizó teniendo en cuenta tabla N° 3

Tabla N° 3. Preparación del blanco, control y patrones de Trolox

	DPPH (μl)	Metanol (μl)	Trolox mM/L (μl)
Blanco	---	1000	---
Control	100	900	---
Patrón 1	100	880	20
Patrón 2	100	860	40
Patrón 3	100	840	60
Patrón 4	100	820	80
Patrón 5	100	800	100
Patrón 6	100	780	120

Fuente: Oscar Mosquera.(72)

Cada patrón se dejó reposar por 20 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm.

c) Preparación de las muestras

Se pesó 10 mg de muestra liofilizada se agregó 1.5ml de metanol y se sonicó durante 10 minutos, luego se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Este proceso se repitió 3 veces. Se recolectó los sobrenadantes en un fiola y se enrasó con metanol a 10ml. (72)

d) Medición de las muestras

De cada muestra se tomó 10μl, se agregó 100μl de DPPH y 880μl de Trolox, se dejó reposar durante 20 minutos, transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 517nm.

2.2.10. Escalamiento del percolador a escala piloto y semi-industrial

El escalado constituye el proceso mediante el cual se logra exitosa puesta en marcha y la operación económica de una unidad a escala basándose, al menos en parte actual. De tal manera que, para la aplicación del concepto de escalado, es imprescindible que el diseño del proceso tenga algún grado de incertidumbre y que por ello tenga que realizarse sobre la base de experimentos que se lleven a cabo a una escala inferior a la industrial.

El objetivo de un escalamiento es producir las mismas condiciones de operación en el modelo y en el equipo a gran escala. (70)

Criterios de Escalamiento

El escalamiento involucra el estudio de los problemas asociados a transferir la información obtenida en el laboratorio (ml) a escala de planta piloto (lt) y desde escala de planta piloto (lt) a escala industrial (m^3). (71)

Factor de escala

El factor de escala es simplemente una medida intuitiva del tamaño del sistema o bioproceso; típicamente se definen: pequeña escala, mediana escala y gran escala. (70)

Variables adimensionales

Como su nombre lo indica son variables o parámetros que “no tienen dimensiones”; pero eso no significa que no tengan unidades; significa que es una razón de dos variables diferentes, pero con las mismas unidades, por lo cual, éstas se cancelan mutuamente. (70)

Para el escalamiento a nivel planta piloto y semiindustrial se utilizó un factor de escala volumétrico de 10 y 100 respectivamente.

Las variables adimensionales que se tomaron en cuenta, los cálculos realizados y diseño detallado se encuentran en resultados.

2.3.ANALISIS ESTADISTICO

Para la presente investigación se utilizó un diseño factorial de $3 \times 2 \times 2$. Los resultados fueron analizados de acuerdo a un Análisis de Varianza y una prueba de Tukey, las cuales fueron realizadas a un 95% de confianza o 5% de significancia.





CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS VAINAS DE *Caesalpinia spinosa* (TARA)

a) Características morfológicas y físicas

Para esta caracterización, se trabajó con 30 vainas de Tara elegidas al azar del lote de producción. Dichas vainas fueron caracterizadas fisicoquímicamente, analizando para tal caso el peso, tamaño, color. Cabe resaltar que se analizó dos tipos de vaina; vainas sujetas al árbol y vainas caídas, es decir de las vainas desprendidas del árbol de manera natural.

Los resultados de toda esta caracterización son mostrados en la tabla N° 4:

Tabla N° 4. Características físicas del fruto de *Caesalpinia spinosa* (Tara)

Característica	Vainas sujetas al árbol		Vainas caídas	
	Vaina	Semilla	Vaina	Semilla
Peso (g)	2.55 ± 0.53	0.18 ± 0.025	2.42 ± 0.41	0.18 ± 0.028
Longitud (cm)	9.19 ± 0.84	---	8.51 ± 0.60	---
Ancho (cm)	1.79 ± 0.15	---	1.74 ± 0.09	---
Color	Naranja a rojizo	Café oscuro de forma ovalada	Rojizo oscuro	Café oscuro forma ovalada

La diferencia de color entre las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sujetas al árbol y caídas son mostradas en la figura N° 10



Figura N° 10 Diferencia de color entre las vainas sujetas al árbol(a) y las vainas caídas (b) de *Caesalpinia spinosa*.

Al analizar las características físicas de la Tara, tanto las vainas sujetas al árbol como las vainas caídas, se puede notar que estas son similares en cuanto al peso con una

diferencia de 0.13 g. Observando que las vainas caídas han perdido peso debido a la pérdida de humedad. Observando los resultados de la longitud y ancho de las vainas de Tara, se puede concluir que dichas vainas son maduras, esto de acuerdo a lo dicho por De la Cruz (2007), quien menciona que los frutos maduros son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja de 8 cm a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente, que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeada de 0.6 cm a 0.7 cm de diámetro y son de color pardo negruzco cuando están maduros.

b) Características físico-químicas de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara)

La determinación de humedad se realizó mediante método gravimétrico y el contenido de cenizas por el método de incineración de la fibra. Los resultados se muestran en la tabla N° 5.

Tabla N° 5 Características químicas del fruto *Caesalpinia spinosa* (Tara)

Característica	Vaina sujeta al árbol	Vainas caídas
Humedad (%)	9.70 ± 1.67	6.08 ± 0.38
Cenizas (%)	4.12 ± 0.19	3.68 ± 0.05

Observando la tabla N° 5, se aprecia que las características químicas del fruto de Tara son diferentes en 2 puntos porcentuales para la humedad, y 0.5 puntos porcentuales para las cenizas, esto da a conocer que de alguna manera las vainas de Tara que se caen de los arboles van perdiendo sus características, afectando esto posiblemente en la obtención de los taninos.

Adicionalmente se calculó el rendimiento del fruto para la extracción de los taninos, para esto se pesó 1 kg de fruto teniendo en cuenta que el mismo está conformado por vainas y semillas. Se separó las semillas de las vainas, se pesó cada porción por

separado, se molió la vaina y se tamizó, seleccionando solo aquella de tamaño de partícula de 1.18 mm. Finalmente se calculó el rendimiento del fruto no caído y caído, obteniéndose un rendimiento de 13.79% y 13.94% respectivamente, como se observa no existe diferencia significativa en el rendimiento de los frutos.

3.2. CONTENIDO DE TANINOS

a) Extracción

En esta etapa del trabajo de investigación se utilizó la vaina de Tara tamizada, la cual se colocó en un percolador, el cual trabajó con dos tipos de solvente (agua y etanol) a dos diferentes temperaturas (25 °C y 40 °C) lo cual coincide con lo encontrado por Inga (1955), quien demostró que los taninos de la Tara deben ser extraídos a temperaturas inferiores a 65°C, ya que calentamientos mayores logran disolver componentes indeseables que tiene la vaina de la Tara en su composición, tales como gomas y resinas. De las combinaciones posibles con las variables mencionadas se logró obtener doce muestras, las cuales fueron comparadas para determinar similitudes entre sus efectos al extraer los taninos de la vaina de Tara molida. Este tipo de extracción fue hidrofílica, ya que el solvente empleado es soluble en agua y los compuestos presentes en el extracto son hidrosolubles.

A los extractos obtenidos se les realizó una serie de pruebas, las cuales son necesarias para comprobar la presencia de taninos presentes en la vaina de Tara. Dichas pruebas son las siguientes: densidad, índice de refracción, cloruro férrico al 10% y acetato de plomo al 10%. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla N° 6.

Tabla N° 6 Resultados de los análisis físico-químicos realizados a los extractos obtenidos de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara) molida.

N° de Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina	Densidad	Índice de Refracción
1	Agua	25	Vaina caída	1.0500	1.3462
2			Sujeta al árbol	1.0387	1.3399
3		40	Vaina caída	1.0580	1.3495
4			Sujeta al árbol	1.0400	1.3415
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída	0.9593	1.3757
6			Sujeta al árbol	0.9637	1.3624
7		40	Vaina caída	0.9427	1.3913
8			Sujeta al árbol	0.9453	1.3678
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída	0.8843	1.3898
10			Sujeta al árbol	0.8850	1.3673
11		40	Vaina caída	0.9433	1.3782
12			Sujeta al árbol	0.9220	1.3807

b) Pruebas cualitativas

Los extractos tánicos obtenidos fueron sometidos a dos pruebas cualitativas, una con cloruro férrico al 10% y otra con acetato de plomo al 10%, para determinar presencia de taninos, estas pruebas dieron resultados, para la primera una coloración negro azulado (Figura N° 11) y para la segunda se observó la presencia de precipitado (Figura N° 12), de este modo se identificó la presencia de taninos en los extractos al utilizar agua y solución acuosa de etanol al 50 y 80% como solventes, y de acuerdo con Guerrero (1997), se confirma que los taninos presentes en el extracto tánico son de tipo hidrolizables.



Figura N° 11 Determinación de la presencia de taninos mediante prueba de cloruro férrico.



Figura N° 12 Determinación de la presencia de taninos mediante prueba de Acetato de plomo.

Con los resultados de las pruebas fisicoquímicas (densidad e índice de refracción) mostrados en la tabla N° 6, se procede a realizar un análisis de varianza para determinar diferencias entre los tratamientos estudiados, todo esto bajo un 95% de confianza.

Encontrando que todas las significancias obtenidas son menores al 5% (0.05), lo cual establece evidencia estadística para indicar que los efectos de los solventes, las temperaturas y los tipos de fruto son diferentes sobre la densidad de los extractos. Para determinar cuál de los tratamientos es el que da mejores resultados, se decide hacer la prueba de Tukey con un 5% de significancia, la cual se muestra en la tabla N° 7.

Cabe destacar que tanto para la temperatura como para el tipo de vaina no se realiza la prueba de Tukey por solo considerar dos niveles para cada variable. En el caso del solvente, se observa en la tabla N° 7 de la prueba de Tukey que con los tres niveles de esta variable se forman tres subconjuntos, esto quiere decir que existe suficiente evidencia estadística para concluir que ninguno de los niveles para el tipo de solvente tiene el mismo efecto sobre la densidad de los extractos obtenidos.

En base a lo encontrado en el análisis estadístico de la densidad del extracto se decide escoger como adecuados aquellos niveles que reportan densidades con medias mayores, siendo en este caso para la temperatura de extracción el nivel de 40°C, para el caso del tipo de vaina, las vainas caídas, y por último el agua como solvente utilizado para la extracción de taninos de las vainas de Tara. Esta decisiones están basadas en lo dicho por Peña (2007), quien menciona que el valor de los densidad es una medida de la riqueza fenólica del medio, para los extractos considerados.

Otros de las variables dependientes que se evaluó en la presente investigación fue el índice de refracción, para lo cual también se realizó un análisis de varianza al 95% de confianza.

Tabla N° 7 Prueba de Tukey de la densidad de los distintos extractos obtenidos de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

SOLVENTE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Etanol al 80%	12	0.90865		
Etanol al 50%	12		0.95275	
Agua	12			1.04667
		A	B	C

Teniendo en cuenta que todas las significancias obtenidas son menores al 5% de significancia (0.05), entonces se puede concluir que existe suficiente evidencia estadística para decir que los efectos de los solventes, las temperaturas y los tipos de fruto son diferentes en función al índice de refracción de los extractos de taninos obtenidos de las vainas de Tara. Para determinar cuál de los tratamientos es el que da mejores resultados, se decide hacer la prueba de Tukey con un 5% de significancia, la cual se muestra en la tabla N° 8.

Tabla N° 8 Prueba de Tukey para el índice de refracción de los distintos extractos obtenidos de la vaina de Tara.

SOLVENTE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Agua	12	1.34428		
Etanol al 50%	12		1.3743	
Etanol al 80%	12			1.3790
		A	B	C

En el caso del solvente se observa en la tabla N° 8 de la prueba de Tukey que con los tres niveles de esta variable se forman tres subconjuntos, esto quiere decir que existe suficiente evidencia estadística para concluir que ninguno de los niveles para el tipo de solvente tiene el mismo efecto sobre el índice de refracción de los extractos obtenidos.

En función al análisis estadístico y teniendo en cuenta lo dicho por Carmona et al. (2009) quienes mencionan que a escala piloto e industrial, donde los volúmenes de extracto que se obtienen son mayores, resulta muy económica y factible la utilización del índice de refracción como parámetro de control de calidad, el cual da un criterio indirecto de la concentración del extracto en cuestión; se decide escoger aquellos niveles de las variables que son mayores ya que a mayor índice de refracción mayor será la concentración de los taninos en los extractos obtenidos. En tal sentido se decide escoger la temperatura de 40°C, el fruto proveniente del piso y el etanol al 80% como solvente para extraer los taninos de las vainas de la Tara.

Para realizar los siguientes análisis se trabajó con los extractos liofilizados, para lo cual en primer lugar se evaporó el etanol de los extractos líquidos etanólicos utilizando el rotavapor. Una vez obtenidos los extractos concentrados se sometieron al proceso de liofilización al igual que los extractos acuosos. Después de esta operación se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla N° 9. Como se observa en esta tabla los extractos etanólicos dieron un mayor rendimiento frente a los extractos acuosos, siendo los extractos etanólicos al 80% los que dieron mayor rendimiento, corroborando esto lo encontrado en las pruebas del índice de refracción, con el cual se encontró que los índices de refracción mayores eran los correspondientes al solvente etanol al 80%, concluyendo que con extractos etanólicos se obtiene mayor cantidad de taninos.

Tabla N° 9 Cantidad de extracto liofilizado obtenido a partir de los extractos de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina	Liofilizado (g)	Gramos de liofilizado/mililitro de extracto
1	Agua	25	Vaina caída	158	0.1
2			Sujeta al árbol	157	0.1
3		40	Vaina caída	221	0.1
4			Sujeta al árbol	164	0.1
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída	204	0.3
6			Sujeta al árbol	209	0.3
7		40	Vaina caída	238	0.3
8			Sujeta al árbol	236	0.3
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída	236	0.5
10			Sujeta al árbol	296	0.5
11		40	Vaina caída	256	0.5
12			Sujeta al árbol	247	0.4

Después se realizaron pruebas cuantitativas a los extractos liofilizados. Dichas pruebas se realizaron con la finalidad de hallar la cantidad de polifenoles totales en cada muestra utilizando el método de Folin-Ciocalteu en función a la curva patrón del ácido gálico. Para lo cual se preparó 6 estándares con concentraciones de 20 a 100 ppm. Los datos y curvas mencionadas son mostrados en la tabla N° 10 y figura N° 13.

Tabla N° 10 Absorbancia promedio de los patrones de ácido gálico.

Patrón	Concentración de ácido gálico (mg/L)	Absorbancia (3 repeticiones)	Promedio de Absorbancia
1	20	0.2015	0.2050 $\pm$ 0.0046
		0.2033	
		0.2103	
2	40	0.3631	0.3674 $\pm$ 0.0058
		0.3650	
		0.3740	
3	60	0.5192	0.5195 $\pm$ 0.0144
		0.5340	
		0.5052	
4	80	0.7095	0.6836 $\pm$ 0.0248
		0.6600	
		0.6814	
5	100	0.8755	0.8668 $\pm$ 0.0172
		0.8780	
		0.8470	

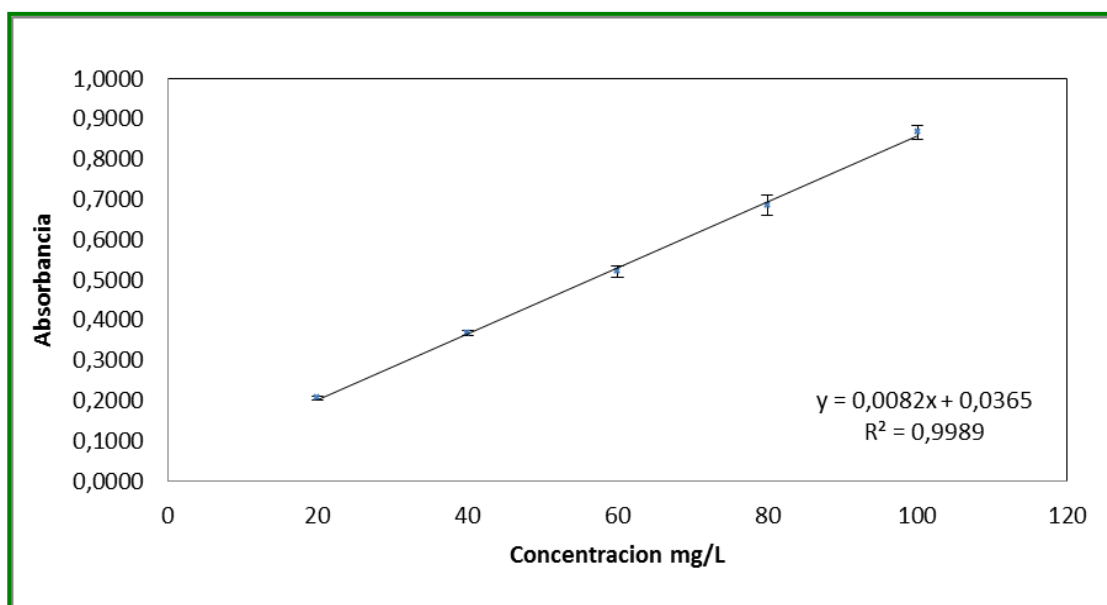


Figura N° 13 Curva patrón para ácido gálico.

Luego de obtenida la curva patrón, se procedió a preparar las 12 muestras liofilizadas para ser leídas en el espectrofotómetro. A partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de la curva patrón del ácido gálico, y de las absorbancias de las muestras, se procedió a encontrar la cantidad de polifenoles presentes cada una de las doce muestras generadas por las variables (solvente, temperatura y tipo de vaina).

Dichos resultados son mostrados en la tabla N° 11 con la cual se elaboró un gráfico de barras el cual muestra la cantidad de polifenoles que contiene cada muestra como se observa en la figura N° 14.

Se observa que a mayor absorbancia mayor es la concentración de polifenoles totales en las muestras; debido a su reacción con los agentes oxidantes del reactivo Folin-Ciocalteu formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de coloración azul, concordando con lo encontrado por Julkunen-Tiito, (1985) quien señala que la absorbancia está en relación directa con el contenido de polifenoles totales el cual se ve influenciado por el tipo de solvente de extracción.

Tabla N° 11 Cantidad de polifenoles presentes en los extractos liofilizados de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina	Promedio absorbancia	Concentración polifenoles totales (mg/L)	mg polifenol/g muestra
1	Agua	25	Vaina caída	0,3212	34,720	303,9513
2			Sujeta al árbol	0,2476	25,744	224,1418
3		40	Vaina caída	0,3416	37,207	455,8930
4			Sujeta al árbol	0,3153	34,000	309,0909
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída	0,3322	36,061	409,1478
6			Sujeta al árbol	0,3203	34,610	401,3103
7		40	Vaina caída	0,3020	32,378	427,2636
8			Sujeta al árbol	0,3238	35,037	458,6133
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída	0,3796	41,841	547,7745
10			Sujeta al árbol	0,3943	43,634	717,8423
11		40	Vaina caída	0,3408	37,110	527,8756
12			Sujeta al árbol	0,3659	40,171	551,4102

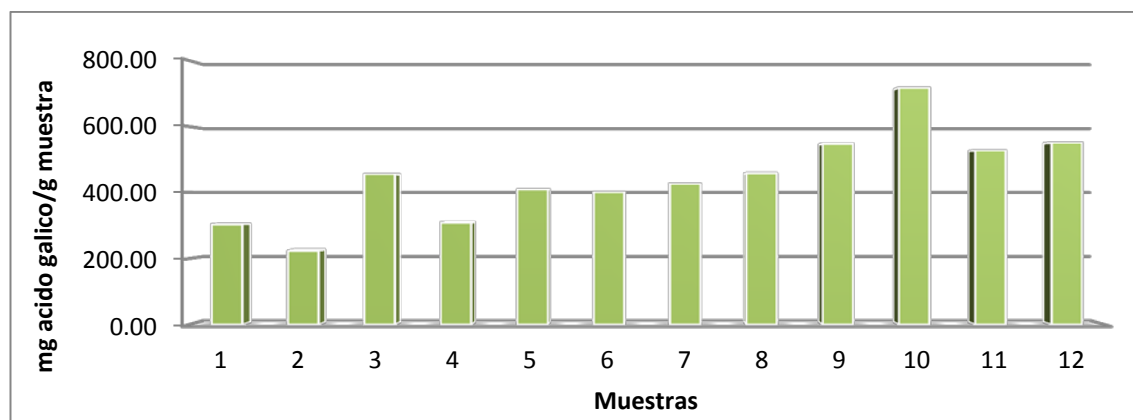


Figura N° 14 Cantidad de polifenoles totales (mg/g de muestras) presentes en los extractos liofilizados de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Para determinar la existencia de diferencias entre las muestras analizadas se procedió a realizar un análisis de varianza considerando un 5% de significancia.

Al observar las significancias obtenidas en el análisis de varianza, se nota claramente que todas son menores al 5% de significancia (0.05), encontrándose evidencia estadística para decir que los efectos de los solventes, las temperaturas y los tipos de fruto son diferentes en cuanto a la cantidad de polifenoles encontrados en los extractos de taninos obtenidos de las vainas de Tara. Para determinar cuál de los tratamientos es el que da mejores resultados se decide hacer la prueba de Tukey con un 5% de significancia, la cual se muestra en la tabla N° 12.

Tabla N° 12 Prueba de Tukey para la cantidad de polifenoles de los distintos extractos obtenidos de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

SOLVENTE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Agua	12	323.2725		
Etanol al 50%	12		424.0702	
Etanol al 80%	12			585.1767
		A	B	C

En el caso del solvente se observa en la tabla N° 12 de la prueba de Tukey que con los tres niveles de esta variable se forman tres subconjuntos, esto quiere decir que existe suficiente evidencia estadística para concluir que ninguno de los niveles para el tipo de solvente tiene el mismo efecto sobre la cantidad de polifenoles de los extractos obtenidos.

Teniendo como base los resultados estadísticos se decide escoger como mejor tratamiento o muestra aquella combinación que posea mayor cantidad de polifenoles; siendo la muestra N° 10 correspondiente a una temperatura de 25°C, vainas sujetas al árbol y el etanol al 80% usado como solvente para la extracción de taninos de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara). Estos resultados dan refutan lo encontrado en el análisis físico de los extractos, donde se determinó que a mayor densidad e índice de refracción, mayor será la cantidad o la concentración de taninos, no encontrándose esto en el análisis del contenido de polifenoles.

Los resultados obtenidos se ven afectados por la polaridad de los solventes empleados, pues el agua es una molécula muy polar, mientras que la mezcla de etanol-agua es moderadamente polar como indica Coulson (2003), esto permite que la energía electromagnética se convierta en energía cinética que posteriormente se pierde en calor por fricción de las moléculas. Esta pérdida de calor permite una mayor liberación de los compuestos fenólicos.

En el caso de la diferencia observada en la concentración de etanol al 80 % se debe a que solubiliza en mayor proporción los compuestos fenólicos que el etanol que se encuentra en concentraciones de 50%.

La cantidad de polifenoles totales encontrada para la muestra mencionada (717.84 mg/g) es mayor al encontrado por Campos et al. (2005) quienes determinaron que utilizando etanol al 80% como solvente para la extracción de taninos de la vaina de Tara, se obtiene 450 mg/g de polifenoles. Las diferencias pueden deberse posiblemente al método de extracción utilizado, considerándose el pH y tiempo de extracción. Además ellos mencionan que la mejor manera de extraer los compuestos

fenólicos es a través de un solvente orgánico, se escogió el etanol, debido a que es ampliamente usado en los diferentes procesos de extracción de compuestos fenólicos en diversas plantas, este fue diluido en agua, debido a que el agua en combinación con otros solventes orgánicos contribuye a la creación de un medio moderadamente polar que asegura la extracción de polifenoles.

Se comparó el contenido de polifenoles determinados en extractos liofilizados de Tara mostrados en la tabla N° 11, con los reportados según Vásquez, A et al. quienes trabajaron con extractos etanólicos liofilizados utilizando el método de Folin-Ciocalteu a 760 nm, comparando con una curva de calibración de ácido gálico. Se observa que la Tara presenta mayor contenido de polifenoles (717.84 mg/g) en relación con las especies mostradas en la Tabla N° 11. Resaltando que la Tara es una planta promisoría para el aislamiento de sustancias fenólicas con actividad antioxidante

Tabla N° 11. Contenido de polifenoles totales en los extractos etanólicos determinados mediante el método de Folin-Ciocalteu

Nombre	Concentración (mg polifenol / g de muestra)
Salvia aratocensis	3.1 ± 0.05
Bidens reptans	4.0 ± 0.04
Salvia sochensis	1.7 ± 0.01
Montanoa ovalifolia	1.3 ± 0.01

Fuente: Vásquez, A; Cala, M; Miranda, (74)

Por último, se determinó el límite de detección y límite de cuantificación de los polifenoles presentes en las vainas de Tara. En tal sentido se utilizaron las concentraciones mostradas en la tabla N° 10, además de los valores de la ecuación de la recta presentados en la figura N° 13. Con dichos resultados se procedió a graficar y linealizar las concentraciones versus las desviaciones estándar de las mismas.

En la figura N° 15, se muestra la relación anteriormente mencionada con su respectiva ecuación de la recta, la cual sirve para encontrar los límites de detección y cuantificación de los polifenoles presentes en las vainas de Tara.

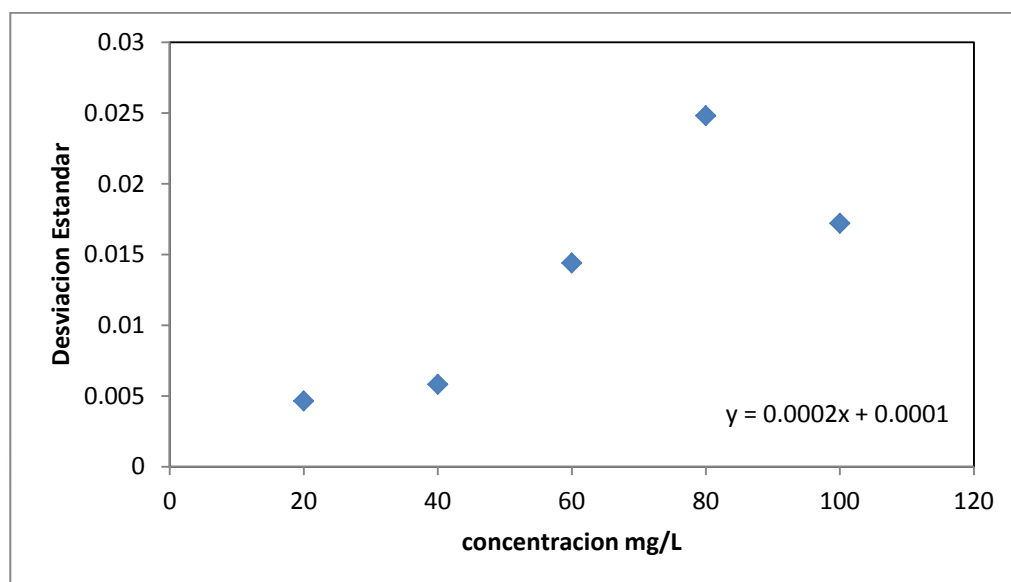


Figura N° 15 Curva de concentración vs. desviación estándar de ácido gálico para la determinación de los límites de cuantificación y detección.

Con los datos mencionados anteriormente y con el valor del intercepto de la ecuación de la recta mostrada en la figura N° 15, se procedió a calcular los límites de detección y cuantificación de los polifenoles de las vainas de Tara. Dichos límites son mostrados en la tabla N° 13.

Tabla N° 13 Límites de detección y cuantificación de polifenoles de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) para el método de Folin-Ciocalteu

Límite	Cantidad (mg de polifenol/g de muestra)
Detección	1,795
Cuantificación	1,829

Observando la tabla N° 13, se nota que el límite de detección es 1,795 mg de polifenol por gramo de muestra, el cual representa la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas para la extracción de polifenoles de las vainas de Tara. Además se observa que el límite de cuantificación es 1,829 mg de polifenol por gramo de muestra, el cual corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables de acuerdo a las condiciones establecidas para el análisis.

3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TANINOS EXTRAIDOS

Para determinar la capacidad antioxidante de los taninos extraídos de las vainas de Tara, se utilizó el método DPPH. Se elaboró la curva patrón de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), para lo cual se preparó patrones de Trolox de 0.02 a 0.12 mmol/L, luego se procedió a leer la absorbancia a 517 nm. La coloración obtenida de cada patrón se muestra en la figura N° 16



Figura N° 16. Coloración de los patrones de Trolox utilizados para elaborar la curva patrón de DPPH

Las absorbancias de los patrones son mostradas en la tabla N° 14.

Tabla N° 14 Lecturas espectrofotométricas (absorbancia) de los patrones de Trolox para la elaboración de la curva patrón de DPPH.

Patrón	Concentración de Trolox (mmol/L)	Absorbancia (3 repeticiones)	Promedio de la Absorbancia
1	0.02	0.2248	0.2322 $\pm$ 0.00697
		0.2387	
		0.2330	
2	0.04	0.2037	0.2095 $\pm$ 0.00600
		0.2157	
		0.2092	
3	0.06	0.1737	0.1784 $\pm$ 0.00520
		0.1776	
		0.1840	
4	0.08	0.1438	0.1498 $\pm$ 0.00616
		0.1494	
		0.1561	
5	0.10	0.1232	0.1258 $\pm$ 0.00460
		0.1311	
		0.1230	
6	0.12	0.0820	0.0831 $\pm$ 0.00378
		0.0873	
		0.0800	

Con las lecturas espectrofotométricas mostradas en la tabla N° 14, se graficó la curva patrón para el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), la cual se muestra en la figura N° 17.

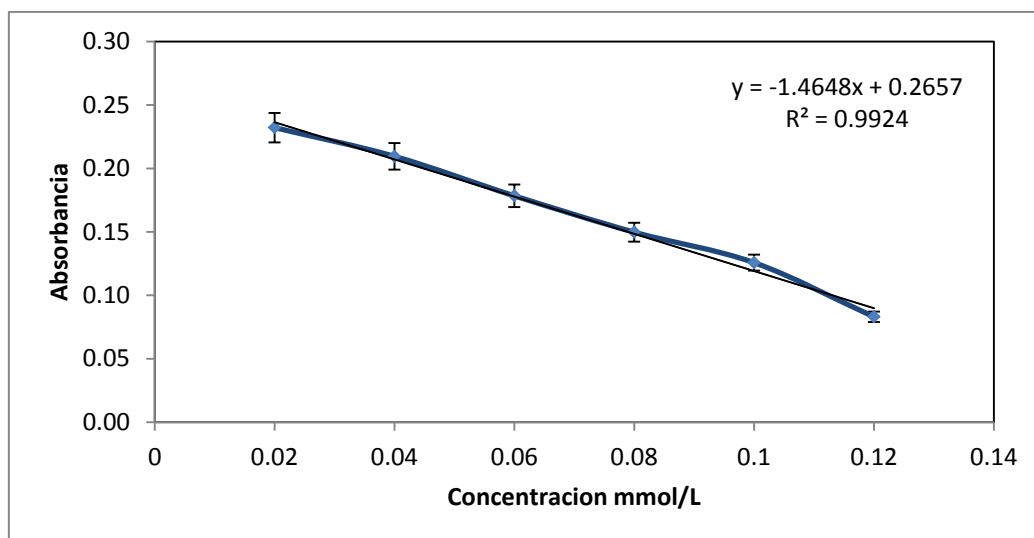


Figura N° 17. Curva patrón para el DPPH.

En la figura N° 17 se observa la curva patrón para el DPPH, el índice de correlación es cercano 1 lo que indica que los datos experimentales se ajustan a la recta.

Luego de obtenida la curva patrón de DPPH, se procedió a preparar las 12 muestras liofilizadas, las cuales fueron reconstituidas en metanol, y se trataron de igual manera que los patrones de Trolox, finalmente fueron leídas en el espectrofotómetro, el color obtenido se muestran en la figura N° 18.

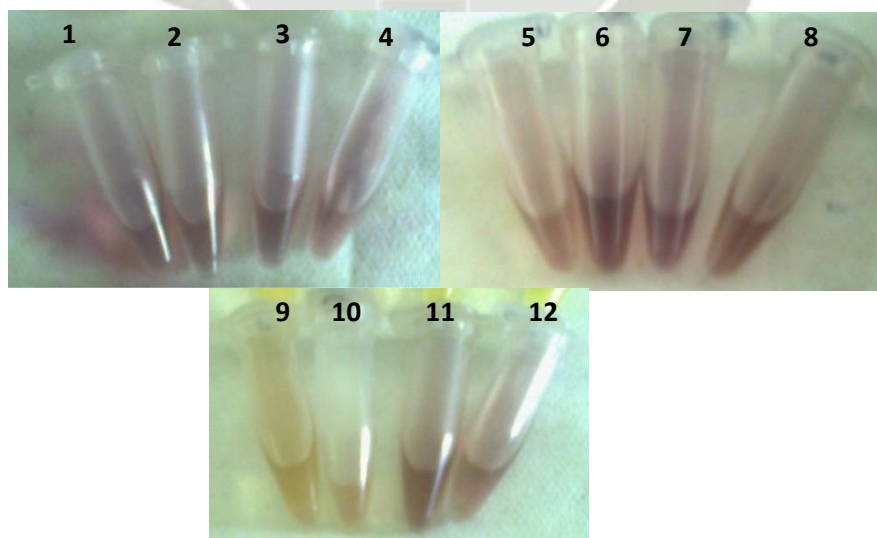


Figura N° 18 Coloración de las 12 muestras leídas en el espectrofotómetro en la prueba de DPPH

A partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de la curva patrón de DPPH y de las absorbancias de las muestras, se procedió a calcular la actividad antioxidante de las muestras expresadas como miligramos de Trolox por gramo de muestra. Dichos resultados son mostrados en la tabla N° 15.

Al observar la tabla N° 15, se puede observar que la combinación que mayor capacidad antioxidante tiene es la muestra 10, la que corresponde al etanol al 80%, una temperatura de 25°C y vainas sujetas al árbol. Esto se debe a que existe un mayor contenido de polifenoles los cuales actúan como antioxidantes reduciendo a la molécula de DPPH, provocando así un cambio de color de morado a amarillo.

Para corroborar esta observación se procedió a realizar un análisis estadístico considerando un 95% de acierto. Con estos resultados se puede notar que todas las significancias obtenidas son menores al 5% de significancia establecida para el presente experimento (0.05), encontrándose evidencia estadística para decir que los efectos de los solventes, las temperaturas y los tipos de fruto son diferentes.

Tabla N° 15 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina	Volumen utilizado (µl)	Absorbancia			Promedio Absorbancia	Concentración (mmol/L)	Actividad Antioxidante (mg de Trolox/g de muestra)
1	Agua	25	Vaina caída	10	0.1304	0.1302	0.1297	0.1301	0.0926	23.1699
2			Sujeta al árbol	10	0.1208	0.1209	0.1205	0.1207	0.0990	24.7704
3		40	Vaina caída	10	0.1287	0.1288	0.1287	0.1287	0.0935	23.4016
4			Sujeta al árbol	10	0.1671	0.1673	0.1673	0.1672	0.0672	16.8250
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída	10	0.1199	0.1199	0.1200	0.1199	0.0995	24.9052
6			Sujeta al árbol	10	0.1519	0.1517	0.1518	0.1518	0.0778	19.4621
7		40	Vaina caída	10	0.0909	0.0909	0.0909	0.0909	0.1193	29.8680
8			Sujeta al árbol	10	0.1704	0.1713	0.1698	0.1705	0.0650	16.2668
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída	10	0.0833	0.0834	0.0830	0.0832	0.1246	31.1780
10			Sujeta al árbol	10	0.0600	0.0597	0.0595	0.0597	0.1406	35.1935
11		40	Vaina caída	10	0.1255	0.1254	0.1253	0.1254	0.0958	23.9730
12			Sujeta al árbol	10	0.1100	0.1098	0.1096	0.1098	0.1064	26.6385

Para determinar cuál de los tratamientos es el que da mejores resultados se decide hacer la prueba de Tukey con un 5% de significancia, la cual se muestra en la tabla N° 16.

Tabla N° 16 Prueba de Tukey para la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

SOLVENTE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Agua	12	22.0417		
Etanol al 50%	12		22.6255	
Etanol al 80%	12			29.2458
		A	B	C

En el caso del solvente se observa en la tabla N° 16 de la prueba de Tukey que con los tres niveles de esta variable se forman tres subconjuntos, esto quiere decir que existe suficiente evidencia estadística para concluir que ninguno de los niveles para el tipo de solvente tiene el mismo efecto sobre la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. Después de todo el análisis estadístico realizado se corrobora lo observado, es decir, que la combinación que mayor capacidad antioxidante posee es la que corresponde al etanol 80% como solvente, una temperatura de 25°C y vainas sujetas al árbol. Sin embargo los resultados de la capacidad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de atrapar radicales DPPH de una manera dependiente de la concentración.

En la figura N° 19 se observa una clara relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de la planta estudiada, es decir a mayor contenido de polifenoles mayor es la actividad antioxidante. Gutiérrez (2008) señala que por lo general una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos

totales presenta una mayor actividad antioxidante, sin embargo algunas plantas presentan una actividad antioxidante superior a lo esperado o por el contrario, una baja actividad que no se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos. Esto es indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pro-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante. Así pues, un estudio completo de la actividad antioxidante de una planta requiere de la medición de diferentes magnitudes y por ende, del desarrollo y la normalización de métodos confiables para cada una de estas magnitudes.

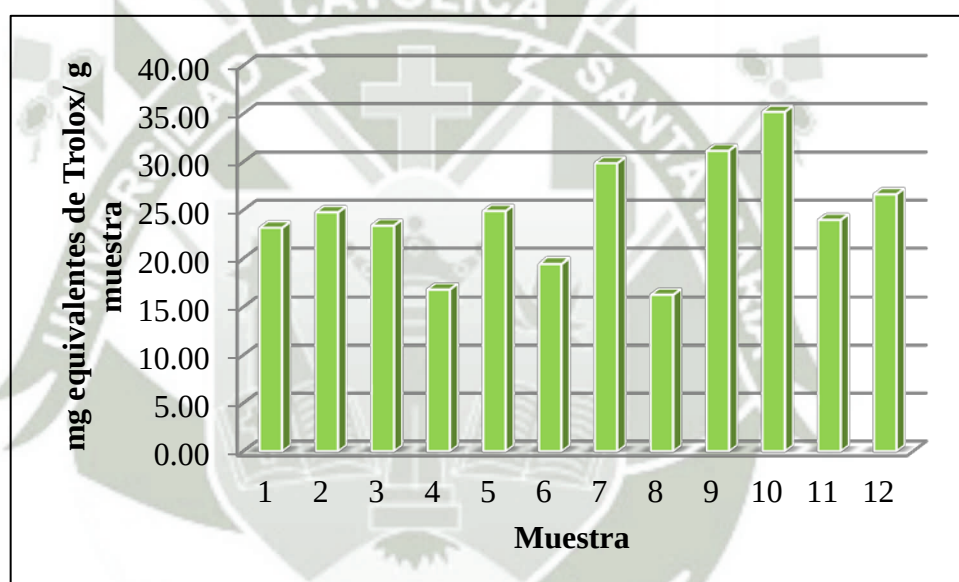


Figura N° 19 Actividad antioxidante de los Polifenoles totales extraídos de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

La mayor actividad antioxidante fue encontrada en la muestra N° 10 (35.19 mg eq. Trolox/g muestra). Este valor es superior en comparación a la actividad antioxidante de las frutas reportadas por Marta Kuskoski, quien trabajo con el método de DPPH a 515 nm y utilizando Trolox como patrón. (59). Los valores se muestran en la tabla N° 17.

Tabla N° 17 Valores de la actividad antioxidante de distintas frutas reportadas por Marta Kuskoski

Fruta	$\mu\text{mol eq. Trolox/ g}$ muestra	mg eq. Trolox/ g muestra
Mora	4.3	1.0762
Uva	7	1.7520
Guayaba	5.9	1.4767
Fresa	9.2	2.3027
Acerola	53.2	13.3154
Piña	12.9	3.2287
Maracuya	0.9	0.2253

Para determinar la efectividad de inhibición de DPPH por los taninos presentes en cada muestra, se calculó el porcentaje de inhibición de los patrones de Trolox. Los resultados se muestran en la tabla N° 18.

Tabla N° 18 Porcentaje remanente y de inhibición de DPPH a distintas concentraciones de Trolox.

Patrón	Concentración de Trolox (mmol/L)	DPPH remanente (%)	Inhibición (%)
1	0.02	96.2594	3.7406
2	0.04	86.8620	13.1380
3	0.06	73.9819	26.0181
4	0.08	62.0877	37.9123
5	0.10	52.1375	47.8625
6	0.12	34.4527	65.5473

Con los resultados del porcentaje de inhibición de Trolox, se procedió a elaborar la curva patrón del porcentaje de inhibición de DPPH, que se muestra en la figura N° 20.

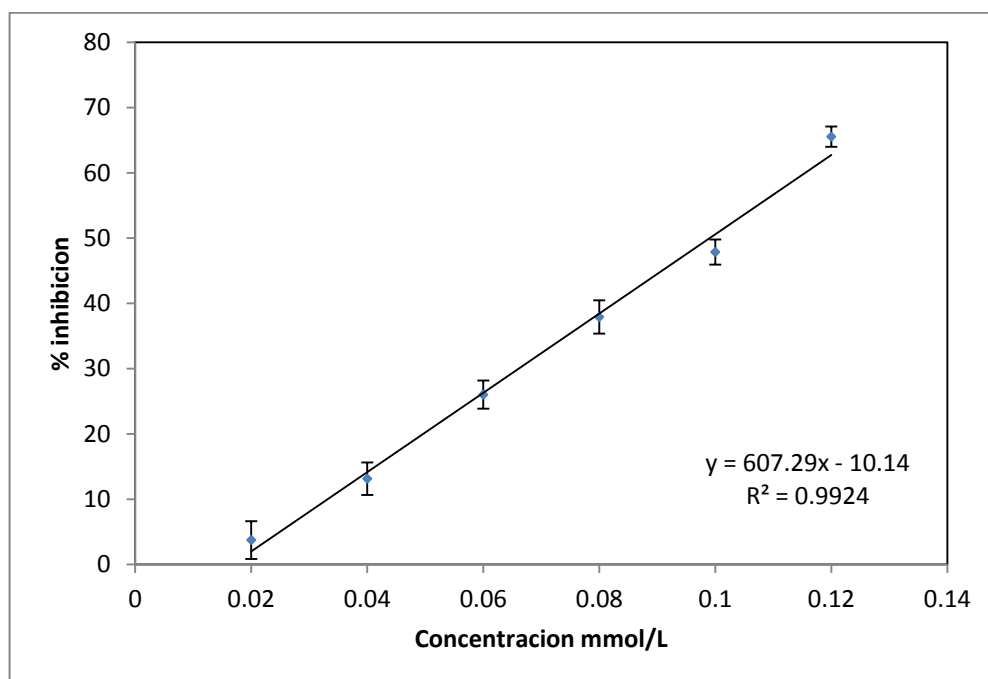


Figura N° 20. Curva patrón del porcentaje de inhibición de DPPH a distintas concentraciones de Trolox.

Al observar la figura N° 20, se puede notar claramente que a medida que aumenta la concentración de Trolox, el cual actúa como antioxidante, aumenta el porcentaje de inhibición de DPPH, debido a que existe una mayor reducción de dicho radical gracias a la donación de átomos de hidrógeno de parte del antioxidante.

Para determinar el porcentaje de inhibición que poseen los taninos presentes en los diferentes extractos obtenidos en la presente investigación, se tomó en cuenta la ecuación de regresión lineal. Los resultados se muestran en la tabla N° 19 y para su mejor comprensión se procedió a graficar el porcentaje de inhibición de cada muestra. Como se observa en la figura N° 21.

Tabla N° 19 Porcentaje de DPPH inhibido por la actividad antioxidante de cada uno de los extractos liofilizados de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Muestra	Solvente	Temperatura (°C)	Tipo de Vaina	Concentración mmol/L	Inhibición (%)
1	Agua	25	Vaina caída	0.0926	46.0783
2			Sujeta al árbol	0.0990	49.9616
3		40	Vaina caída	0.0935	46.6449
4			Sujeta al árbol	0.0672	30.6832
5	Etanol al 50%	25	Vaina caída	0.0995	50.2933
6			Sujeta al árbol	0.0778	37.0817
7		40	Vaina caída	0.1193	62.3302
8			Sujeta al árbol	0.0650	29.3289
9	Etanol al 80%	25	Vaina caída	0.1246	65.5087
10			Sujeta al árbol	0.1406	75.2515
11		40	Vaina caída	0.0958	48.0268
12			Sujeta al árbol	0.1064	54.4944



Figura N° 21. Porcentaje de DPPH inhibido por la actividad antioxidante de cada uno los extractos liofilizados de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Como se observó en la tabla N° 19 la muestra que posee mayor porcentaje de inhibición, corroborando lo encontrado en las pruebas anteriores, es la muestra o tratamiento que trabajó a 25°C de temperatura, vainas sujetas al árbol y etanol al 80% como solvente de extracción de los taninos provenientes de las vainas de Tara.

El porcentaje de inhibición de dicha muestra es de 75.25 %, este valor es inferior en comparación con la cascara de cacahuete que posee un porcentaje de inhibición de 89.3% según lo reportado por Yen y Duh (1994) (58).

Para corroborar el porcentaje de inhibición se realizó un análisis de varianza considerando un 95% de confianza. Los resultados muestran que todas las significancias obtenidas son menores al 5% de significancia (0.05), encontrándose evidencia estadística para decir que los efectos de los solventes, las temperaturas y los tipos de fruto son diferentes. Para determinar cuál de los tratamientos es el que da mejores resultados se decide hacer la prueba de Tukey con un 5% de significancia, la cual se muestra en la tabla N° 20.

Tabla N° 20 Prueba de Tukey para el porcentaje de inhibición de DPPH por la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

SOLVENTE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Agua	12	43.342		
Etanol al 50%	12		44.759	
Etanol al 80%	12			60.820
		A	B	C

En el caso del solvente se observa en la tabla N° 20 de la prueba de Tukey que con los tres niveles de esta variable se forman tres subconjuntos, esto quiere decir que existe suficiente evidencia estadística para concluir que ninguno de los niveles para

el tipo de solvente tiene el mismo efecto sobre el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos. De acuerdo a la evidencia estadística se escoge la muestra que considera 25°C de temperatura de extracción, vainas sujetas al árbol y etanol al 80% como solvente de extracción de taninos provenientes de las vainas de Tara.

En esta parte de la experimentación también se determinó el límite de detección y límite de cuantificación del porcentaje de inhibición de los polifenoles extraídos de las vainas de Tara. En tal sentido se utilizaron las concentraciones mostradas en la tabla N° 19, además de los valores de la ecuación de la recta presentados en la figura N° 20. Con dichos resultados se procedió a graficar y linealizar las concentraciones versus las desviaciones estándar de las mismas. En la figura N° 22, se muestra la relación mencionada con la respectiva ecuación de la recta, la cual sirve para encontrar los límites de detección y cuantificación del porcentaje de inhibición de los polifenoles extraídos de las vainas de Tara.

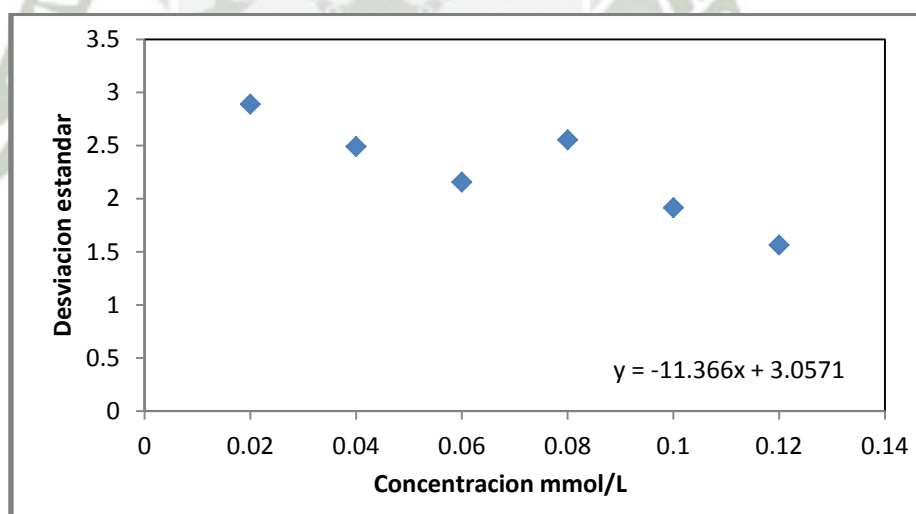


Figura N° 22 Curva de la concentración vs. desviación estándar de DPPH para determinar los límites de detección y cuantificación.

Con los datos mencionados anteriormente y con el valor del intercepto de la ecuación de la recta mostrada en la figura N° 22, se procedió a calcular los límites de detección

y cuantificación del porcentaje de inhibición de los polifenoles extraídos de las vainas de Tara. Dichos límites son mostrados en la tabla N° 21.

Tabla N° 21 Límites de detección y cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de *Caesalpinia spinosa* (Tara) para el método de DPPH.

Límite	Concentracion (mmol de Trolox/L)
Detección	0,0106
Cuantificación	0,0223

Observando la tabla N° 21, se nota que el límite de detección es 0,0106 mmol de Trolox/L, el cual representa la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas para la determinación del porcentaje de inhibición de los polifenoles de las vainas de Tara. Además se observa que el límite de cuantificación es 0,0223 mmol de Trolox/L, el cual corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables de acuerdo a las condiciones establecidas para el análisis. Al comparar con los resultados mostrados en la tabla N° 21 se observa que todas las muestras pueden ser detectadas y cuantificadas.

3.4.ESCALAMIENTO DEL PERCOLADOR

Debido a los buenos resultados obtenidos con el percolador a escala laboratorio se decidió realizar el diseño detallado del percolador a escala piloto y semi.industrial.

El escalamiento de los datos de laboratorio implicó dimensionar el equipo mediante el uso de ecuaciones de escala, este escalamiento se basó en el principio de similitud, el cual implica que en el sistema a diseñar, los fenómenos que ocurren en el sistema

de laboratorio, sean de la misma magnitud que en el sistema piloto, semi-industrial o industrial.

Los criterios de escalamiento dependen de la variable más importante para la obtención del producto, en este caso se tomó en cuenta el volumen, el cual para escala laboratorio fue de 3 litros, en base al cual se construyeron las relaciones adimensionales para el respectivo escalamiento.

Volumen total del tanque:

$$V = \frac{1}{12} \pi * H * (D^2 + d^2 + D * d)$$

$$V = 3 L$$

Se utilizó un factor volumétrico de 10 para escala piloto y 100 para escala semi-industrial.

Medidas del tanque escala laboratorio necesarias para hallar las relaciones adimensionales

$$H = 25$$

$$h = 5$$

$$h' = 5$$

$$h'' = 2.5$$

$$D = 14$$

$$d = 9.5$$

$$d' = 15$$

$$d'' = 1$$

$$dc = 18$$

Relaciones adimensionales:

$$\frac{H}{D} = 1.78$$

$$\frac{H}{h} = 5$$

$$\frac{d'}{D} = 1.07$$

$$\frac{H}{h'} = 5$$

$$\frac{H}{d} = 2.63$$

$$\frac{h'}{d} = 0.53$$

$$\frac{D}{d} = 1.47$$

$$\frac{h'}{d''} = 5$$

$$\frac{d'}{dc} = 0.83$$

$$\frac{h''}{d''} = 2.5$$

En la tabla N° 22 se muestran las medidas encontrados para cada escala de tanque.

Tabla N° 22 Dimensiones de los tanques para cada escala.

SCALE UP	V (L)	H (cm)	h (cm)	h' (cm)	h'' (cm)	D (cm)	d (cm)	d' (cm)	d'' (cm)	dc (cm)
Laboratorio	3	25	5	5	2.5	14	9.5	15	1	2
Piloto	30	55	11	11	5	31	21	33	2	4.5
Semi-industrial	300	120	24	24	12.5	67	46	72	5	10

Gracias al escalamiento que se realizó, se obtuvo las dimensiones de los tanques para escala piloto y semi-industrial los cuales permitirían la extracción de taninos a mayor escala. Los requerimientos para la producción se muestran en la tabla N° 23.

Tabla N° 23. Requerimientos de solvente y materia prima para la producción de taninos a diferentes escalas.

Scale up	Volumen (L)	Cantidad de Materia Prima (kg)	Cantidad de materia útil (Kg)	Cantidad de polifenol (g)
Laboratorio	3.0	2.200	0.30	215.4
Piloto	30.0	22.00	3.0	2154.0
Semi-Industrial	300.0	220.0	30.0	21540.0

CONCLUSIONES

1. Los parámetros eficientes para el proceso de extracción de taninos de vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara) mediante percolación son: temperatura de 25°C, solvente etanol al 80% y vainas sujetas al árbol como tipo de fruto. Debido a que con este tratamiento se obtuvo los mejores resultados en cuanto a la cantidad de taninos la cual se relaciona a la actividad antioxidante.
2. Mediante pruebas cualitativas de cloruro férrico y acetato de plomo se comprobó que las vainas de Tara contienen taninos de tipo hidrolizables.
3. El contenido de polifenoles totales de las muestras de extractos liofilizados evaluados mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu dio como mejor resultado el tratamiento de etanol al 80%, temperatura de 25 °C y vainas sujetas al árbol obteniendo 717.8423 mg de polifenol expresado como ácido gálico/g de muestra liofilizada comparado con el tratamiento que utiliza agua, temperatura de 25 °C y vainas sujetas al árbol con el cual se obtuvo 224.1418 mg de polifenol expresado como ácido gálico/g de muestra liofilizada.
4. En la prueba de capacidad antioxidante realizada mediante el método de DPPH, se encontró 35.1935 mg de Trolox/g de muestra, con el tratamiento de 25°C de temperatura, etanol al 80% como solvente y vainas sujetas al árbol; se obtiene la mayor capacidad antioxidante, encontrándose con el mismo un 75.25% de inhibición de DPPH comparado con el tratamiento que utiliza agua, temperatura de 25 °C y vainas caídas con el cual se obtuvo 23.1699 mg de Trolox/g de muestra y un porcentaje de inhibición de DPPH de 46.07%.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de la capacidad antioxidante de los taninos de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) in vitro, para su posterior evaluación in vivo.
- Debido a que se encontró diferencias en el contenido de polifenoles entre vainas sujetas al árbol y vainas caídas, se recomienda realizar estudios para verificar si existen diferencias en cuanto a las otras propiedades de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).
- Se recomienda realizar estudios sobre la influencia del color de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) en la extracción de taninos.
- Evaluar la cantidad de taninos y la capacidad antioxidante de otras frutas utilizando el método de percolación y los parámetros eficientes probados en la experimentación.
- Realizar un estudio de mercado para la implementación de una planta productora de taninos que cuente con una adecuada presentación final del producto para exportación.
- Realizar la extracción de otras sustancias provenientes de la tara como: goma y ácido gálico ya que estos poseen un inmenso potencial industrial.

RECOMENDACIONES PRÁCTICAS

- Para la recolección y selección de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara), se recomienda elegir aquellas que se encuentren sujetas al árbol, las cuales deben tener una coloración castaño oscuro, excluyendo aquellas que presenten daños por insectos u hongos.
- Se recomienda realizar la recolección de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara), entre los meses de Abril-Junio, Setiembre-Diciembre, debido a que en estos meses existe una mayor cantidad de frutos en los arboles.



REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Aguilar, C. (2000). “Inducción y represión de la síntesis de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20 en cultivo en medios líquido y sólido”. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
2. Aku, I. (2000). “Evaluación del contenido tánico en la corteza de dos especies forestales guatemaltecas, mangle colorado (*rhizophora mangle*) y pino blanco (*Pinus ayacahuite*) por medio de dos métodos de extracción”. Tesis facultad de ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. Alvarez, M. (2011). “Taninos y Flavonoides”. Facultad de ciencias químicas. Universidad Central del Ecuador.
4. Bajpai, B. y Patil, S. (1996). “Induction of tannin acyl hydrolase activity in some members of fungi imperfecti”. *Enzyme and Microbial Technology* Volume 20, Issue 8, Pages 612–614
5. Barbosa, K.; Bressan, J; Zulet, M. y Martinez Hernandez, J. (2008). “Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans”. *An Sist. Sanit Navar* 31: 259-280.
6. Barriga, C. (2008). “Cultivos y Aprovechamiento de la Tara (*Caesalpinia spinosa*) en la región andina”. Informe Técnico Ecobona – Lima.
7. Barriga, C. y Salazar, J. (1993). “El cultivo de la Tara”. Proyecto viveros forestales en la cuenca del río Rimac. U.N.A. La Molina. Perú.
8. Beverini, M. y Metche, M. (1990). “Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*”. *Sciences des aliments* 10: 807-816.

9. Bhat, T.; Singh, B. y Sharma, O. (1998). "Microbial degradation of tannins-A current perspective". *Biodegradation* 9: (5) 343-357.
10. Bradoo, S.; Gupta, R. y Saxena, R. (1997). "Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicas*". *Process Biochemistry* 32 (2): 135-139.
11. Cam, W. y Daugherty, T. (1999). "Manejo de nuestros recursos naturales". Editorial paraninfo. Madrid – España.
12. Campos, D.; Chirinos, R.; Ureña, M.; Betalleluz, I.; Aguilar, A.; Yavar, F.; Trellez, P.; Bravo, N. y Jallurana, C. (2005). "Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de Tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales". Instituto de Biotecnología – Biotecnología Industrial. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Perú.
13. Cancino, M.; Viniegra-González, G. y Loera, O. (2000). "Producción de taninos condensados monoméricos a partir de semilla de uva por una fermentación líquida usando la cepa Aa20 de *Aspergillus niger*". Simposium internacional de biotecnología UPIBIIPN.
14. Cannas, A. (1999). "Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules", de <http://ansci1.abc.comell.edu/plants/toxicagents/tannin/tannin.htm>
15. Chatterjee, R.; Dutta, A.; Banerjee, R. y Bhattacharyya, B. (1996). "Production of tannase by solid-state fermentation". *Bioprocess engineering* 14 (3): 159162.

16. Criado C. y Moya, M. (2009). “Vitaminas y antioxidantes”. Servicios de Medicina interna y urgencias. Hospital puerta de hierro-majadahonda. Universidad autónoma de Madrid. España.

17. De la Cruz, P. (2004). “Aprovechamiento integral y racional de la Tara”. Revista del Instituto de investigación FIGMMG. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

18. De la Cruz, R.; Aguilera, A.; Prado, A.; Rodriguez, R.; Contreras, J. y Aguilar, C. (2011). “Biodegradación microbiana de Elagitaninos”. Departamento de Investigación en alimentos. Universidad Autonoma de Coahuila. Mexico.

19. Deschamps, A.; Mahoudeau, G.; Conti, M. y Lebeault, J. (1980). “Bacteria degrading tannic acid and related compounds”. J. Ferment. Technol 58 (2): 93-97.

20. ECOBONA (2007). “Memoria y ponencias presentadas en el taller regional de la Tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la realidad de la cadena en los tres países”. Programa regional ECOBONA-INTERCOOPERATION. Cajamarca. Perú.

21. Equite (2004). “*Determinación del contenido de taninos en el extracto tánico de la corteza de melina, utilizando dos metros de extracción a nivel de laboratorio*”. Tesis presentada para optar el título de Ingeniero químico, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Facultad de Ingeniería.

22. Escarcega, S. (2001). “Biodegradación de taninos de curtidurías mediante cultivos de *Aspergillus niger*”. División de ciencias biológicas y de la salud. , Departamento de biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

23. Espinal, N. (2009). “*Extracción y caracterización fisicoquímica del contenido tánico en la corteza de cinco especies forestales procedentes del departamento de Peten, aprovechando el subproducto de la industria aserradero*”. Tesis para optar el título de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala,

24. Fessenden, R. y Fessenden, J. (1983). “Química orgánica”. Grupo editorial Iberoamérica. 2ª Edición. México.

25. Finkel, T. y Holbrook, N. (2000). “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing”. Nature 408: 239-247.

26. Fosefor; Intercooperation; Samiri (2006). “La Tara en el Ecuador. *Caesalpinea Spinosa*”. Cartilla técnica. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris. Ecuador.

27. Galiotou. Panayotou, M. y Macris, J. (1986). “Degradation of condensed tannins by *Cafvutia gigantea*”. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 502-506.

28. Gomez, E. (2004). “Comparación del porcentaje de extracto tánico de la corteza y la madera de encino (*Quercus tristis liebm*) proveniente de un bosque natural”. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de San Carlos de Guatemala.

29. Grant, W. (1976). "Microbial degradation of condensed tannins". Science 17: 1 137- 1139.
30. GTZ-SNV (2004). "Análisis de la Cadena Productiva de la taya en la región Cajamarca". Informe Técnico Ecobona – Lima.
31. Guerrero, M. (1997). "Polifenoles Curtientes en Corteza de Tres Especies Forestales". Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Escuela de Post Grado.
32. Hadi, T.; Banerjee, R. y Battacharyya, B. (1994). "Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus uryzaa*". Bioprocess engineering 11: 239-243.
33. Halliwell, B. y Gutteridge, J. (1998). "Free radicals in biology and medicine". Tercera edición. Oxford Science Publications. Oxford. 936 pp.
34. Dollfus, O. (1981). "*El reto del espacio andino*". Perú, Lima : Instituto de Estudios Peruanos/IEP
35. INRENA (1997). "Estudio Nacional de la diversidad biológica". Ministerio de Agricultura. Lima – Perú.
36. Isaza, J. (2007). "Taninos o polifenoles vegetales". Scientia et technica XIII. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira – Colombia.
37. Jacob, R. y Soutodeh, G. (2002). "Vitamin C, function and status in chronic disease". Nutr Clin Care. 5:47-49.

38. Lane, R.; Yamakoshi, J.; Kikuchi, M.; Mizusawa, K.; Henderson, L. y Smith, M. (1997). "Safety evaluation of tanase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*". Food and Chemical toxicology 35: 207-212.
39. Lekha, P. y Lonsane, B. (1997). "Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art". Advances in applied microbiology 44: 215-260.
40. Lewis, J. y Starkey, R. (1962). "Influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils". Soil Sci. 707: 241-247.
41. Lock de Ugaz, O. y Unten, L. (1991). "Taninos de Tara: su ácido gálico y esterres". Revista el Ingeniero Químico, 5, 17-21.
42. López, L. y Hernández, J. (1986). "Manual de métodos de análisis para el químico curtidor. C.I.A.T.E.G., A.C. Guanajuato, México. pag 233-278.
43. Mancero, L. (2009). "Estudio de la cadena del guarango del ecuador". Ecobona – Ecuador
44. Marroquin, A. (2008). "Obtención del extracto tánico por maceración dinámica de la corteza de arboles jóvenes de cuatro especies forestales, a nivel laboratorio". Escuela de Ingeniería química. Universidad San Carlos de Guatemala
45. Armas, E. (1980). "*Los recursos naturales del Perú*". Lima, Perú editorial Onern.
46. Pulgar, J. (1998). "Las ocho regiones naturales de nuestro Perú" Lima, Perú editorial Peisa.

47. Quispe, H. (2010). “Proyecto de prefactibilidad para la instalación de 100 hectareas de Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Jayanca”. Lambayeque. Perú.

48. Ramírez C. (2000). “*Purificación y caracterización de una tanasa de Aspergillus niger Aa20, producida por fermentación en medio sólido*”. Tesis de Maestría, UAM-I., México, D.F.

49. Saravia, J.; Cano, T.; Chavez, B.; Cano, E. y Cerezo, O. (2002). “Extracción y caracterización de taninos en corteza de tres especies forestales cultivadas en Guatemala, Pino ocote (*Pinus oocarpa schiede*), encino negro (*Quercus brachystachys benth*) y aliso común (*Alnus jorulensis HBK*) una alternativa de desarrollo agroindustrial para el uso de taninos naturales”. Centro de investigaciones de ingeniería. Facultad de Ingeniería y Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.

50. Seinfeld, J. Cuzquend, G., Farje, G., Zaldivar, S. (1999). “Introducción a la Economía de los Recursos Naturales y del Medio Ambiente”. Univ. Pacífico-Perú.

51. Shekelle, P.; Hardy, M.; Coulter, I.; Udani, J.; Spar, M. y Oda, K. (2003). “Effect of the supplemental use of antioxidants, vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q₁₀ for the prevention and treatment of cancer”. Evid Rep Technol Assess (Summ) 75:1-3.

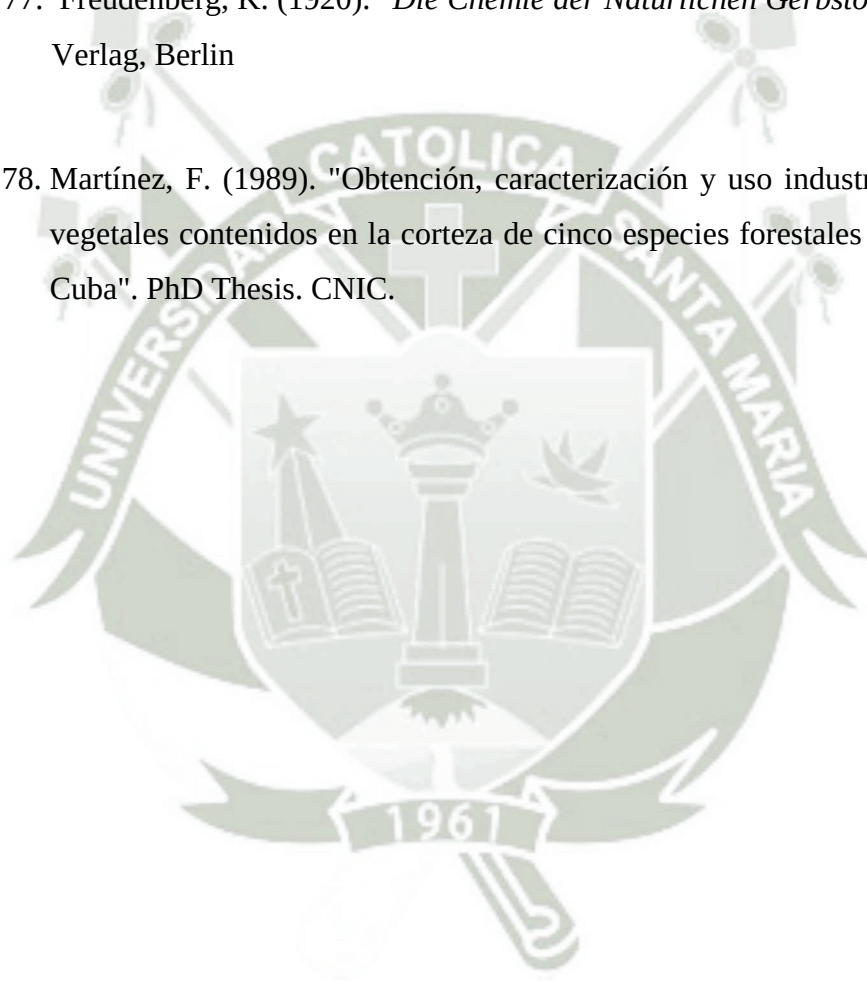
52. Cruz, L. (2009). “La percolación es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas y extractos fluidos.”, de <http://infofartecnologia.blogspot.com/2013/03/la-percolacion-es-el-procedimiento-mas.html>.

53. Traber, M. y Atkinson, J. (2007). “Vitamine E, antioxidant and nothing more”. *Free radic biol med* 43: 4-15.
54. Ugartondo, V. (2009). “Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales, citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares”. Facultad de Farmacia. Departamento de Fisiología. Universidad de Barcelona. España.
55. Velásquez, A. (2004). “Extracción de Taninos presentes en el banano verde”. *Revista Lasallista de investigación*. Colombia.
56. Vijayalaxmi, T.; Reiter, R. y Herman, T. (2002). “Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics”. *J. Clin. Oncol.* 20: 2575-2601.
57. Villanueva, C. (2007). “La Tara – el oro verde de los incas”. Universidad Nacional Agraria La Molina”. Lima – Perú.
58. Conde Piñeiro, E. (2009). “Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica”. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química, Universidade De Vigo, Ouro Preto.
59. Kuskoski E. Marta, Agustín G. Asuero, Ana M. Troncoso, Jorge Mancini-Filho, Roseane Fett. (2005). “Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos” *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.25 no.4 Campinas Oct./Dec.

60. Agapito T, Sung I. (1998). *“Fitomedicina: 1100 plantas medicinales”*. Lima, Perú, Editorial Isabel, Primera Edición.
61. Molina, R. (2000). *“Teoría de clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas”*. Madrid, España, Primera Edición.
62. Bravo, N. (2010) “Estudio de la extracción de taninos a partir de la Tara aplicando los métodos Taguchi y superficie de respuesta”, *Bioquímica de Alimentos*, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.
63. Robinson, D. S.(1991). *“Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos”*, Zaragoza, España. Ed. Acribia, Primera edición.
64. Sandoval, E. (2005). *“Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal”*. Distrito Federal, Mexico. Instituto de Biología de UNAM primera edición.
65. Peterson, G.L (1979) “Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*”, Vol.100 No.2.
66. Vernon, E. (2008). “Desarrollo de un producto nutraceutico a partir del extracto de chilacayote” Universidad Autónoma Metropolitana.
67. Membreño, G. (2009) *“Propuesta de tres pre-formulaciones de un jarabe antidiarreico a base de los extractos de hojas secas de psidium guajava, l. (guayabo)”*. Tesis para obtener licenciatura en Química y Farmacia, San Salvador. Universidad De El Salvador, Facultad De Química Y Farmacia

68. Geankoplis, C. (1998). *“Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias”*. México, Editorial CECSA. Tercera Edición.
69. Ibarra, Pedro. (2010) *“Determinación del contenido fenólicos en extractos naturales mediante sensores enzimáticos”*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa.
70. Acuña, R. (2008) “Adimensionamiento Y Escalamiento De Bioprocesos Industriales”, de <http://bioreactorcrc.wordpress.com/2008/08/14/adimensionamiento-y-escalamiento-de-bioprosesos/>
71. Lienqueo, M. (2011) “Diseño de Biorreactores y Escalamiento de Bioreactores”. Fermentación e Ingeniería Metabólica, Universidad de Chile.
72. Mosquera O., Niño J., Correa Y., Buitrago D. (2005). “Estandarizacion del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales”. Revista Scientia et Technica Vol 1, No 27.
73. R. Julkunen-Tiito, (1985) “Phenolic constituents in the leaves of Nothern willows: Methods for the analysis of certain phenolics”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 33 No.2, 213-217.
74. Vásquez, A; Cala, M; Miranda, I.; Tafurt, G.; Marinez, J.; Stashenko, E. (2007) “Actividad antioxidante y contenido total de polifenoles de los extractos etanólicos de *Salvia Arotocensis*, *Salvia ochensis*, *Bidens Reptons* y *Montanoa Ovalifolia*”. Revista Scientia et Technica Vol 1, No 33.

75. Gutiérrez, D; Ortiz C; Mendoza A. (2008), “Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal” Universidad Autónoma de Querétaro.
76. J. M. Coulson and J. F. Richardson. (1954) “Chemical engineering”. Nueva York.
77. Freudenberg, K. (1920). “*Die Chemie der Naturlichen Gerbstoffe*”. Springer-Verlag, Berlin
78. Martínez, F. (1989). "Obtención, caracterización y uso industrial de taninos vegetales contenidos en la corteza de cinco especies forestales que crecen en Cuba". PhD Thesis. CNIC.



ANEXOS

Rendimiento del material útil para la extracción.

Componente	Vainas sujetas al árbol (g)	Vainas caídas (g)
Peso del fruto	1000.00	1114.62
Peso de vaina	640.49	635.49
Peso de semilla	350.56	458.28
Perdida	8.95	20.85
Peso de vaina molida	516.94	589.70
Peso de vaina utilizada	137.85	155.41
Rendimiento (%)	13.79	13.94

Fuente: Elaboración propia (2012)

Análisis de varianza para densidad de los extractos tánicos

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _{calculado}	Significancia
SOLVENTE	0.119	2	0.060	7078.366	5.52×10^{-34}
TEMPERATURA	0.001	1	0.001	146.650	1.03×10^{-11}
FRUTO	0.000	1	0.000	54.612	1.25×10^{-7}
SOLV.* TEMP	0.007	2	0.003	395.258	4.28×10^{-19}
SOLVENTE * FRUTO	0.001	2	0.000	31.975	1.70×10^{-7}
TEMP. * FRUTO	0.000	1	0.000	27.604	2.19×10^{-5}
SOLV.*TEMP.* FRUTO	0.000	2	$8.327E^{-5}$	9.883	7.39×10^{-4}
Error	0.000	24	$8.425E^{-6}$		
Total	0.129	35			

Fuente: Elaboración propia (2012)

**Análisis de varianza para el índice de refracción de los extractos en las
diferentes muestras**

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _{calculado}	Significancia
SOLVENTE	0.009	2	0.004	425883.2	1.00×10^{-37}
TEMPERATURA	0.000	1	0.000	19182.25	2.00×10^{-36}
FRUTO	0.001	1	0.001	126380.2	1.00×10^{-37}
SOLV. * TEMP.	0.000	2	7.968 E^{-5}	7968,25	1.34×10^{-34}
SOLVENTE * FRUTO	0.000	2	0.000	10262.25	6.00×10^{-36}
TEMP. * FRUTO	4.3 E^{-5}	1	4.29 E^{-5}	4290.25	1.42×10^{-28}
SOLV.*TEMP.* FRUTO	0.001	2	0.000	25302.25	1.00×10^{-37}
Error	2.4 E^{-7}	24	1.000 E^{-8}		
Total	0.011	35			

Fuente: Elaboración propia (2012)



Informe Análisis Concentración Acido Gálico

Condiciones del Instrumento

Instrumento	Cary 60
Nº Versión Intrumento.	2.00
Long.de onda (nm)	760.0
Modo Ordenadas	Abs
T Prom (seg)	0.1000
Replicados	3
Media Patrón/Muestra	Apag.
Correcciones de peso y volumen	Apag.
Tipo Ajuste	Lineal
Mín R ²	0.95000
Unidades Concentración	mg/L

Medición Nº 1

Estándar	Conc mg/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2000 0.2050 0.2050
	20		0.2033			
Patrón2						0.3634 0.3632 0.3627
	40		0.3631	0.00036	0.09931	
Patrón3						0.5212 0.5182 0.5181
	60		0.5192	0.00176	0.33932	
Patrón4						0.7095 0.7089 0.7100
	80		0.7095	0.00055	0.07763	
Patrón5						0.8743 0.8768 0.8753
	100		0.8755	0.00126	0.14373	

Medicion N° 2

Estándar	Conc mg/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2000 0.2028 0.2017
	20		0.2015	0.00141	0.00700	
Patrón2						0.368 0.365 0.362
	40		0.3650	0.00036	0.09931	
Patrón3						0.539 0.532 0.531
	60		0.5340	0.00176	0.33932	
Patrón4						0.662 0.658 0.660
	80		0.6600	0.00055	0.07763	
Patrón5						0.874 0.883 0.877
	100		0.8780	0.00126	0.14373	

Medición N° 3

Estándar	Conc mg/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2104 0.2098 0.2108
	20		0.2103	0.00050	0.00239	
Patrón2						0.3740 0.3690 0.3790
	40		0.3740	0.00036	0.09931	
Patrón3						0.5100 0.5010 0.5047
	60		0.5052	0.00176	0.33932	
Patrón4						0.6822 0.6796 0.6825
	80		0.6814	0.00055	0.07763	
Patrón5						0.8478 0.8431 0.8502
	100		0.8470	0.00126	0.14373	

Promedio de las tres mediciones para la curva patrón de Acido gálico

Estándar	Conc mg/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2015 0.2033 0.2103
	20		0.2050	0.0046	0.0227	
Patrón2						0.3631 0.3650 0.3740
	40		0.3674	0.0058	0.0158	
Patrón3						0.5192 0.5340 0.5052
	60		0.5195	0.0144	0.0277	
Patrón4						0.7095 0.6600 0.6814
	80		0.6836	0.0248	0.0363	
Patrón5						0.8755 0.8780 0.8470
	100		0.8668	0.0172	0.0199	

Medición de las absorbancias de los extractos liofilizados de Tara mediante el método de Folin-Ciocalteu

Muestra	Conc g/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Muestra1		U				0,3213
		U				0,3216
		U				0,3208
		U	0,3212	0,0004	0,12581	
Muestra2		U				0,2476
		U				0,2479
		U				0,2472
		U	0,2476	0,00035	0,14186	
Muestra3		U				0,3417
		U				0,3420
		U				0,3412
		U	0,3416	0,0004	0,1183	
Muestra4		U				0,3152
		U				0,3151
		U				0,3155
		U	0,3153	0,00021	0,06602	
Muestra5		U				0,3322
		U				0,3321
		U				0,3324
		U	0,3322	0,00015	0,04598	
Muestra6		U				0,3209
		U				0,3201
		U				0,3198
		U	0,3203	0,00057	0,17755	

Muestra7	U			0,3027
	U			0,3014
	U			0,3019
	U	0,302	0,00066	0,21713
Muestra8	U			0,3240
	U			0,3238
	U			0,3235
	U	0,3238	0,00025	0,07772
Muestra9	U			0,3406
	U			0,3407
	U			0,3410
	U	0,3408	0,00021	0,06108
Muestra10	U			0,3659
	U			0,3659
	U			0,3658
	U	0,3659	0,00006	0,01578
Muestra11	U			0,3800
	U			0,3796
	U			0,3792
	U	0,3796	0,0004	0,10537
Muestra12	U			0,3940
	U			0,3939
	U			0,3950
	U	0,3943	0,00061	0,15427

Análisis de varianza para la cantidad de polifenoles de los extractos en las diferentes muestras

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F_{calculado}	Significancia
SOLVENTE	418837,2	2	209418,6	577500,3	$6,48 \times 10^{-57}$
TEMPERATURA	32369,7	1	32369,7	89263,7	$2,29 \times 10^{-44}$
FRUTO	151,4	1	151,4	417,6	$1,09 \times 10^{-16}$
SOLV. * TEMP.	15679,4	2	7839,7	21619,1	$8,49 \times 10^{-40}$
SOLVENTE * FRUTO	62800,9	2	31400,4	86590,9	$5,00 \times 10^{-47}$
TEMP. * FRUTO	9903,7	1	9903,7	27310,8	$3,38 \times 10^{-38}$
SOLV*TEMP*FRUTO	16613,8	2	8306,9	22907,4	$4,24 \times 10^{-40}$
Error	8,7	24	0,363		
Total	556364,8	35			

Fuente: Elaboración propia (2012)



Informe Análisis Concentración DPPH

Condiciones del Instrumento

Instrumento	Cary 60
Nº Versión Intrumento.	2.00
Long.de onda (nm)	517.0
Modo Ordenadas	Abs
T Prom (seg)	0.1000
Replicados	3
Media Patrón/Muestra	Apag.
Correcciones de peso y volumen	Apag.
Tipo Ajuste	Lineal
Mín R ²	0.95000
Unidades Concentración	mmol/L



Medición N°1

Estándar	Conc mmol/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2248 0.2249 0.2248
Patrón2	0.02		0.2248	0.00006	0.02568	0.2037 0.2036 0.2037
Patrón3	0.04		0.2037	0.00006	0.02835	0.1737 0.1736 0.1738
Patrón4	0.06		0.1737	0.00010	0.05759	0.1426 0.1438 0.1450
Patrón5	0.08		0.1438	0.00120	0.83449	0.1233 0.1231 0.1232
Patrón6	0.10		0.1232	0.00010	0.08117	0.079 0.082 0.085
	0.12		0.0820	0.00300	3.65854	

Medición N° 2

Estándar	Conc mmol/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2387 0.2387 0.2387
Patrón2	0.02		0.2387	0.00000	0.00000	0.2157 0.2156 0.2157
Patrón3	0.04		0.2157	0.00006	0.02677	0.1776 0.1775 0.1776
Patrón4	0.06		0.1776	0.00006	0.03252	0.1494 0.1494 0.1493
Patrón5	0.08		0.1494	0.00006	0.03865	0.1311 0.1311 0.131
Patrón6	0.10		0.1311	0.00006	0.04405	0.0873 0.0874 0.0873
	0.12		0.0873	0.00006	0.06611	

Medición N° 3

Estándar	Conc mmol/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2332 0.2329 0.2330
Patrón2	0.02		0.2330	0.00015	0.06555	0.2093 0.2091 0.2092
Patrón3	0.04		0.2092	0.00010	0.04780	0.1842 0.1838 0.1841
Patrón4	0.06		0.1840	0.00021	0.11313	0.15630 0.15610 0.15590
Patrón5	0.08		0.1561	0.00020	0.12812	0.1230 0.1230 0.1231
Patrón6	0.10		0.1230	0.00006	0.04693	0.0801 0.0801 0.0799
	0.12		0.0800	0.00012	0.14428	

Promedio de las mediciones para la curva patrón de DPPH

Estándar	Conc mmol/L	F	Media	DE	%DSR	Lecturas
Patrón1						0.2248 0.2387 0.2330
Patrón2	0.02		0.2322	0.00697	3.00215	0.2037 0.2157 0.2092
Patrón3	0.04		0.2095	0.00600	2.86351	0.1737 0.1776 0.1840
Patrón4	0.06		0.1757	0.00520	2.96062	0.14380 0.14940 0.15610
Patrón5	0.08		0.1498	0.00616	4.11186	0.1232 0.1311 0.1230
Patrón6	0.10		0.1258	0.00460	3.65757	0.0820 0.0873 0.0800
	0.12		0.0831	0.00378	4.54874	

Análisis de varianza para la capacidad antioxidante de los extractos en las diferentes muestras

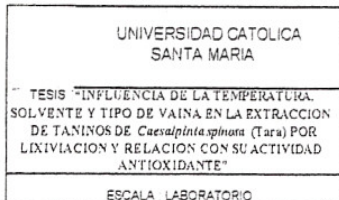
Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _{calculado}	Significancia
SOLVENTE	384,268	2	192,134	85048,125	$6,22 \times 10^{-47}$
TEMPERATURA	117,789	1	117,789	52139,407	$1,45 \times 10^{-41}$
FRUTO	75,164	1	75,164	33271,516	$3,17 \times 10^{-39}$
SOLV. * TEMP.	115,462	2	57,731	25554,549	$1,14 \times 10^{-40}$
SOLVENTE * FRUTO	248,900	2	124,450	55087,796	$1,14 \times 10^{-44}$
TEMP. * FRUTO	78,190	1	78,190	34610,781	$1,98 \times 10^{-39}$
SOLV*TEMP* FRUTO	23,241	2	11,620	5143,740	$2,53 \times 10^{-32}$
Error	0,054	24	0,002		
Total	1043,07	35			

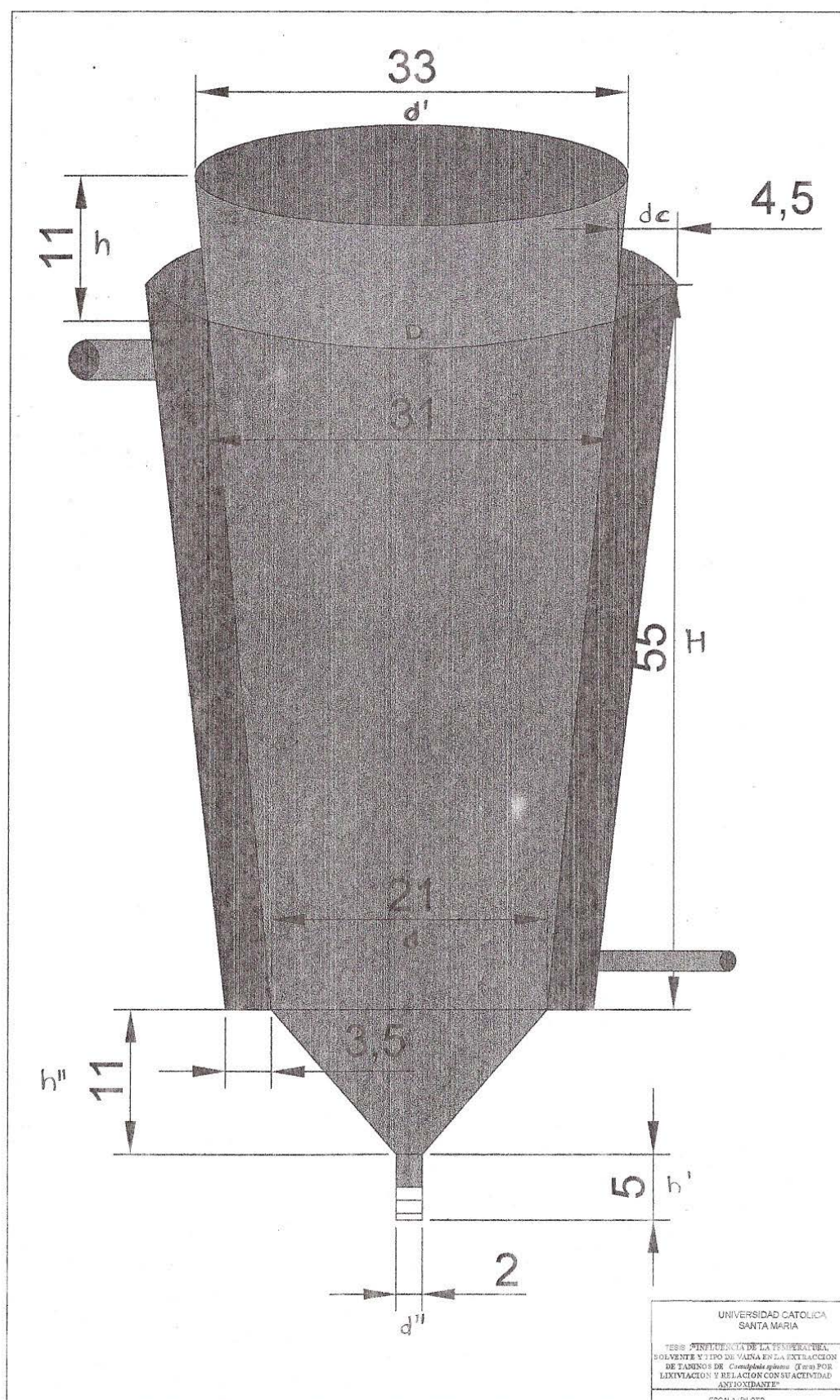
Fuente: Elaboración propia (2012)

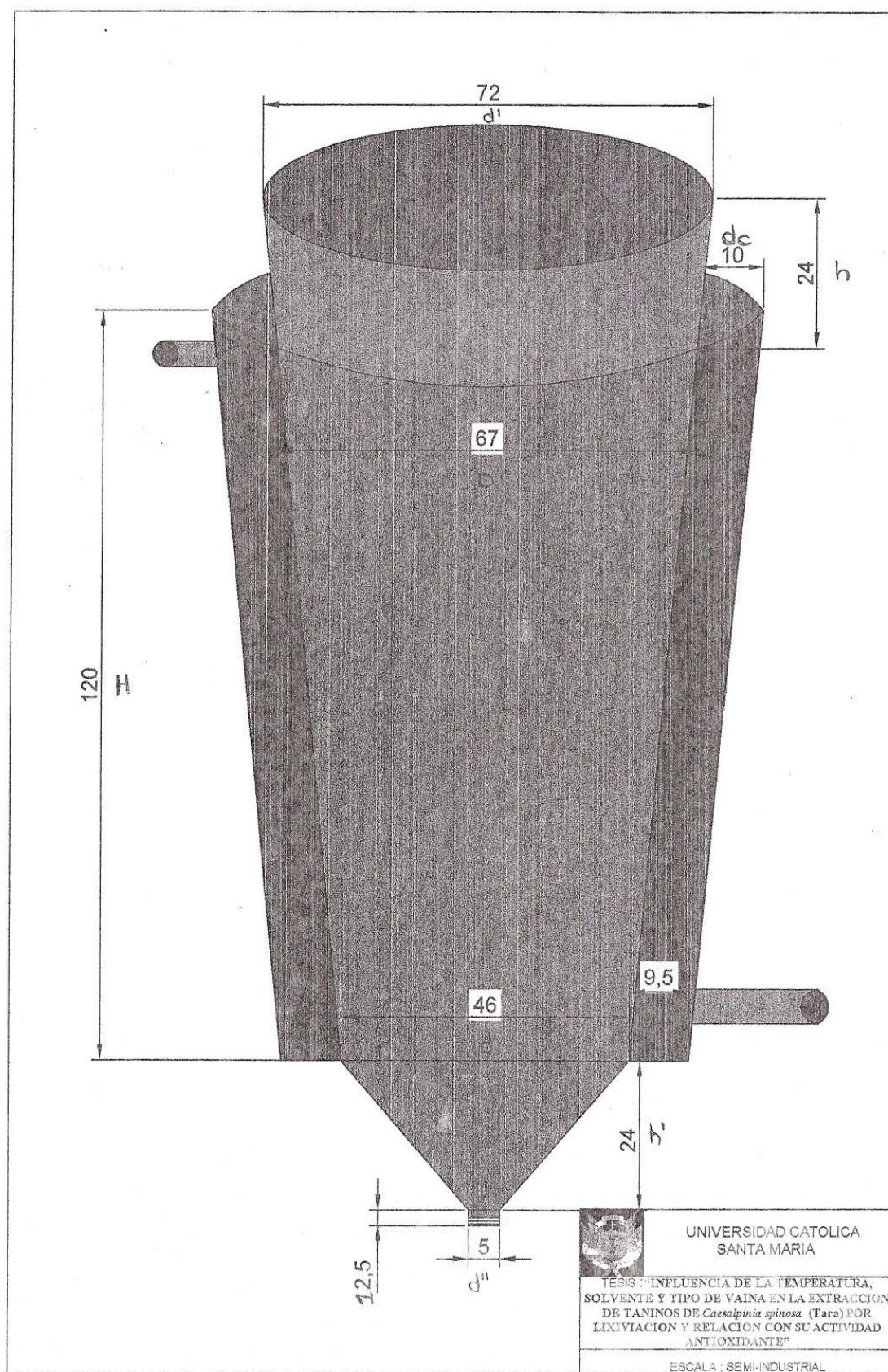
Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de los extractos en las diferentes muestras

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	C.M.	F _{calculado}	Significancia
SOLVENTE	2261,926	2	1130,963	$1,131 \text{ E}^{11}$	$2,04 \times 10^{-120}$
TEMPERATURA	693,445	1	693,445	$6,934 \text{ E}^{10}$	$4,76 \times 10^{-115}$
FRUTO	442,701	1	442,701	$4,427 \text{ E}^{10}$	$1,04 \times 10^{-112}$
SOLV. * TEMP.	679,584	2	339,792	$3,398 \text{ E}^{10}$	$3,76 \times 10^{-114}$
SOLV. * FRUTO	1465,522	2	732,761	$7,328 \text{ E}^{10}$	$3,72 \times 10^{-118}$
TEMP. * FRUTO	460,315	1	460,315	$4,603 \text{ E}^{10}$	$6,50 \times 10^{-113}$
SOLV*TEMP* FRU	136,823	2	68,411	$6,841 \text{ E}^{09}$	$8,48 \times 10^{-106}$
Error	$2,4 \text{ E}^{-07}$	24	$1,00 \text{ E}^{-08}$		
Total	6140,316	35			

Fuente: Elaboración propia (2012)









UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



"AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA"

CONSTANCIA N° 005-2013-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra presentada por las Srtas. Andrea Céspedes Loayza y Gabriela Muñoz Guillen Bachilleres del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis, obtenida de la localidad de La Joya ha sido determinada en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie:

***Caesalpineia spinosa* (Molina) Kuntze**

Se expide la presente solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 14 de Marzo del 2013.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 631987
Apartado Postal: 0028