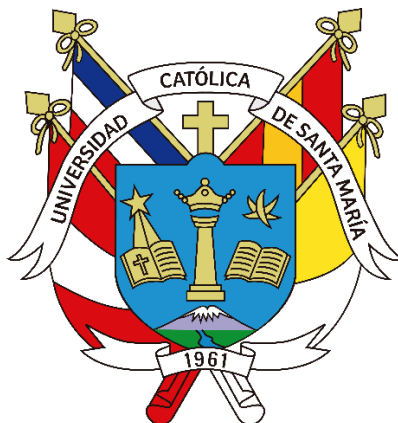


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODALES DE *Alternanthera porrigens* (MORADILLA) Y DETERMINACIÓN DE ACIDO VANILICO Y ACIDO CAFEICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (RP-HPLC)

Tesis presentada por la Bachiller:

Bustinza Fernández, Xiomara Vanessa

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

PhD Ponce Soto, Luis Alberto

Arequipa - Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 06 de Octubre del 2023

Dictamen: 007388-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 007388, presentado por:

2011100242 - BUSTINZA FERNANDEZ XIOMARA VANESSA

Titulado:

**ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE ALTERNANTHERA PORRIGENS
(MORADILLA) Y DETERMINACIÓN DE ACIDO VANILICO Y ACIDO CAFEICO MEDIANTE
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (RP-HPLC)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29520165 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE *Alternanthera porrigens* (MORADILLA) Y DETERMINACIÓN DE ACIDO VANILICO Y ACIDO CAFEICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (RP-HPLC)

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

25%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

12%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	idoc.pub Fuente de Internet	4%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
4	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
5	repositorio.yachaytech.edu.ec Fuente de Internet	2%
6	1library.co Fuente de Internet	1%
7	docplayer.es Fuente de Internet	1%

journal.upao.edu.pe

8	Fuente de Internet	1 %
9	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	1 %
10	repositorio.unemi.edu.ec Fuente de Internet	1 %
11	repositorio.upla.edu.pe Fuente de Internet	1 %
12	es.wikipedia.org Fuente de Internet	1 %
13	unibe.ac.cr Fuente de Internet	1 %
14	ciencias.bogota.unal.edu.co Fuente de Internet	1 %
15	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1 %
16	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

Dedicatoria



A mi abuela Flora por ser mi guía.

A la Dra. Jesús María Zambrano por su memorable apoyo.

Agradecimientos

A Dios, por darme la fortaleza y oportunidad de persistir.

A mis padres, por su inmensurable apoyo.

A mis hermanos, por ser mi principal motivación.

A la Dra. Jesús María Zambrano Salas, por su tiempo y respaldo incondicional a lo largo de la realización del proyecto, así como al Ing. Keny y equipo de investigación.

Al Dr. Luis Ponce Soto, por su asesoría durante el trabajo de investigación.

A la Sra. Janeth, por su gentil disposición con los materiales de laboratorio.

Al Dr. Ricardo Abril, Ing. Rodrigo Ramos y al equipo de Control de Calidad de la UCSM, por su gran apoyo y valiosos aportes para la realización de esta investigación.

Índice de Contenido

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS.....	18
CAPITULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	19
1. ESPECIFICACIONES DE LA ESPECIE VEGETAL	20
1.1 Descripción botánica.....	20
1.2 Distribución geográfica de <i>Alternanthera porrigens</i>	20
1.3 Importancia de la <i>Alternanthera porrigens</i> y especies relacionadas	21
2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES <i>IN VITRO</i>	22
2.1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales	22
2.1.1 Explante	22
2.1.1.1 Objetivos del cultivo	22
2.1.1.2 Posibilidad de contaminación con microorganismos.....	22
2.1.1.3 Edad fisiológica	23
2.1.1.4 Tamaño	23
2.1.1.5 Época del año.....	23
2.1.2 Asepsia.....	24
2.1.3 Medio de Cultivo	24
2.2 Micropropagación <i>in vitro</i>	26
2.2.1 Cultivo de segmentos nodales.....	26
3. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	27
Clases de metabolitos secundarios en plantas.....	27
3.1 Terpenos.....	27
3.2 Alcaloides.....	28
3.3 Compuestos fenólicos	29
3.3.1 Ácido cafeico	31
3.3.2 Ácido vanílico.....	31
4. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	32
4.1 Ensayos espectrofotométricos.....	32
4.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)	32

4.3 Ventajas de la cromatografía de alto rendimiento.....	33
4.4 Componentes del sistema HPLC.....	34
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. Materiales.....	37
1.1 Material vegetal.....	37
1.2 Material de laboratorio.....	37
1.3 Equipos.....	37
1.4 Reactivos químicos	38
1.5 Otros.....	39
2. Métodos.....	40
2.1 Localización del trabajo de investigación.....	40
2.2 Recolección de la Especie vegetal	40
2.3 Determinación taxonómica	40
2.4 Establecimiento <i>in vitro</i> de los tejidos vegetales de <i>Alternanthera porrigens</i>	40
2.4.1 Ensayos de desinfección superficial de los segmentos nodales.....	40
2.4.2 Condiciones y preparación de soluciones stock y medio de cultivo MS.....	41
2.5 Propagación <i>in vitro</i> de los explantes de <i>Alternanthera porrigens</i>	42
2.5.1 Evaluación del efecto de las fitohormonas AIA y BAP.....	42
2.6 Determinación de compuestos fenólicos por espectrofotometría	42
2.6.1 Extracción de la muestra vegetal	42
2.6.2 Preparación de soluciones.....	43
2.7 Determinación de compuestos fenólicos mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase reversa.....	45
2.7.1 Preparación de la solución estándar.....	45
2.4.1 Extracción de la muestra vegetal	45
2.4.2 Condiciones de análisis.....	45
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSION	47
RESULTADOS Y DISCUSION.....	48
1. Recolección del material vegetal	48
2. Determinación taxonómica	48
3. Pruebas de desinfección superficial durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Alternanthera porrigens</i>	49
4. Evaluación de los efectos de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes y elongación del tallo.....	53

5. Determinación de compuestos fenólicos por espectrofotometría	57
6. Identificación de compuestos fenólicos mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase reversa (HPLC-RP)	61
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	78



Abreviaturas

AC:	Ácido cafeico
AV:	Ácido vanílico
AIA:	Ácido 3- Indol-Acético
abs:	Absorbancia
atm:	Atmósfera
BAP:	6-Bencilaminopurina
cm:	Centímetro
EAG:	Equivalente de ácido gálico
Luz UV:	Luz Ultravioleta
L:	Litro
MS:	Medio de cultivo Murashige & Skoog
mL:	Mililitro
mg:	Miligramo
min:	Minuto
m.s.n.m.:	Metros sobre el nivel del mar
nm:	Nanómetros
ppm:	Parte por millón
ps:	Peso seco
RP-HPLC:	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de fase reversa
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	Segundo(s)
TFA:	Ácido trifluoroacético
TR:	Tiempo de retención
Uds.:	Unidades
°C:	Grados Centígrados
λ :	Longitud de onda
μm :	Micrómetros
%:	Porcentaje

Índice de Tablas

Tabla N°1. Composición de medios básicos más utilizados en cultivo <i>in vitro</i>	25
Tabla N°2. Clases de terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno.	28
Tabla N°3. Clases de compuestos fenólicos según el número de carbonos en la estructura.	30
Tabla N° 4. Pruebas de desinfección vegetal evaluadas.	41
Tabla N° 5. Concentraciones de AIA y BAP utilizados.	42
Tabla N° 6. Volúmenes utilizados para la preparación de la curva de calibración.....	43
Tabla N°7. Volúmenes utilizados para la determinación de polifenoles totales en extracto de Moradilla.....	44
Tabla N° 8. Gradientes utilizadas para la determinación de metabolitos secundarios mediante HPLC.	46
Tabla N°9. Clasificación taxonómica del material vegetal recolectado.....	48
Tabla N°10. Porcentaje de viabilidad de segmentos nodales de <i>A. porrigens</i>	50
Tabla N°11. Efectos de las diferentes concentraciones de AIA y BAP en la elongación del tallo e inducción de brotes de segmentos nodales de <i>A. porrigens</i> cultivados durante 20 días.	55
Tabla N° 12. Absorbancias obtenidas con el método Folin-Ciocalteu.	58
Tabla N° 13. Concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto metanólico de <i>Alternanthera porrigens</i>	59
Tabla N°14. Áreas y tiempos de retención del estándar ácido vanílico mediante HPLC. ...	61
Tabla N°15. Áreas y tiempos de retención del estándar ácido cafeico mediante HPLC. ...	63
Tabla N° 16. Áreas, tiempos de retención y concentración de ácido vanílico y ácido cafeico en muestras de Moradilla.....	65

Índice de Figuras

Figura N°1. Ácido cafeico formado en plantas a partir del ácido 4-hidroxicinámico.	31
Figura N°2. Estructura química del ácido vanílico.	31
Figura N°3. Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.	35
Figura N°4. Material vegetal “Moradilla” recolectado en Mollebaya, Arequipa.	48
Figura N°5. Evaluación de la viabilidad de explantes <i>in vitro</i> de <i>A. porrigens</i> según las pruebas de desinfección según HSD.	49
Figura N°6. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Alternanthera porrigens</i> según las pruebas de desinfección.	50
Figura N°7. Segmentos nodales de <i>A. porrigens</i> expuestos a diferentes pruebas de desinfección durante 20 días. Explante contaminado por A) bacterias, C) hongos, D) levaduras y B) explantes con presencia de oxidación.	52
Figura N°8. Evaluación de la elongación del tallo de explantes de <i>A. porrigens</i> a diferentes concentraciones de AIA y BAP según HSD.	54
Figura N°9. Evaluación de la inducción de número de yemas de los explantes de <i>A. porrigens</i> a diferentes concentraciones de AIA y BAP según HSD.	54
Figura N°10. Altura alcanzada de los explantes de <i>A. porrigens</i> tratadas con diferentes concentraciones de fitohormonas después de 20 días.	55
Figura N°11. Número de yemas obtenidas de cada explantes de <i>A. porrigens</i> tratadas con diferentes concentraciones de fitohormonas después de 20 días.	56
Figura N°12. Efectos de las diferentes concentraciones de AIA y BAP de segmentos nodales de <i>A. porrigens</i> cultivados durante 20 días. Elongación del tallo e inducción de brotes de los explantes según los tratamientos A) T1, B) y F) T2, C) y G) T3, D) y H) T4, E) T5. I) Explante <i>in vitro</i> visto en el macroscopio.	57
Figura N°13. Curva de calibración para la determinación de polifenoles totales.	59
Figura N°14. Curva de calibración del estándar ácido vanílico.	62
Figura N°15. Cromatograma del ácido vanílico en muestra de Moradilla.	63
Figura N°16. Curva de calibración del estándar ácido cafeico.	64
Figura N°17. Cromatograma del ácido cafeico en muestra de Moradilla.	65

RESUMEN

En este trabajo de investigación se evaluaron las condiciones para el establecimiento *in vitro* y el efecto de reguladores de crecimiento de los segmentos nodales de la especie vegetal nativa de la región Arequipa, *Alternanthera porrigens* (Moradilla), y se determinó el contenido fenólico (antioxidantes) específicamente ácido vanílico y ácido cafeico presentes en tallo y hojas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC).

Para la etapa de establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales, se seleccionó el medio Murashige & Skoog (MS), se evaluaron tratamientos de desinfección vegetal con etanol 70% y diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1.0%, 1.5% y 2%) donde la aplicación de etanol 70% con NaClO 2.0 % durante 2 y 7 minutos, respectivamente, presentó mayores porcentajes de viabilidad. Una vez obtenido el método más eficiente de desinfección vegetal, se realizó la etapa de propagación *in vitro* de segmentos nodales en medio de cultivo sólido MS suplementado con reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 3-indol-acético (AIA) con el objetivo de evaluar los efectos en la elongación del tallo y generación de brotes (yemas axilares y apicales) bajo condiciones de luz durante 20 días a $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Los medios MS se suplementaron con 0 (testigo), 0.1, 0.5 mg/L de AIA y 0, 0.5 y 1 mg/L de BAP donde el tratamiento con concentraciones 0.5 mg/L AIA y 1 mg/L BAP fue la combinación de fitohormonas que presentó resultados óptimos para esta etapa.

Posteriormente, se realizó una extracción sólido-líquido utilizando el equipo Soxhlet para la determinación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu en el que se obtuvo un valor de 6.81 mg EAG/g de extracto de moradilla, equiparable a valores reportados en otros trabajos con la misma especie vegetal.

Así mismo, se evaluó los compuestos fenólicos ácido vanílico y ácido cafeico presentes en hojas y tallo de *Alternanthera porrigens* mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC). Se inició por la preparación de los extractos vegetales, donde 1g de peso seco (ps) de la planta (hojas y tallo) fue diluida en metanol: agua: TFA (50:50:0.1) seguido de 30 min de sonicación a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se filtró con filtros RephiQuik nylon 0.45 μm .

Además, se realizó la preparación de los estándares de ácido vanílico y ácido cafeico para obtener la curva de calibración. Los estándares y las muestras vegetales fueron identificados mediante HPLC, empleando una columna RP-18.

La separación cromatográfica se corrió a un flujo de 1000 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, con un volumen de inyección de 20 μL y una fase móvil que consistió en lo siguiente: una mezcla del eluyente A (agua ultrapura más TFA) y eluyente B (Metanol más TFA). La gradiente utilizada fue la siguiente: 0 min, 75% de A y 25% de B; 5 min, 75% de A, 25% de B, 15 min, 55% de A y 45% de B, 30 min, 20% de A y 80% de B, 40 min, 75% de A y 25% de B a una longitud de onda de entre 254 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Finalmente, con este análisis se logró determinar y cuantificar ácido vanílico y ácido cafeico obteniendo 67.83 ppm AV/g y 26.53 ppm AC/g, respectivamente, de los extractos preparados.

Palabras claves: *Alternanthera porrigens*, compuestos fenólicos, propagación *in vitro*

ABSTRACT

The first objective of this study was to evaluate the conditions for the *in vitro* establishment and the effect of growth regulators of the nodal segments of the plant species *Alternanthera porrigens* (Moradilla) and the phenolic content (antioxidants) present in stem and leaves by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

For the *in vitro* establishment stage of the nodal segments, the Murashige & Skoog (MS) medium was selected, subsequently plant sterilization treatments with 70% ethanol and different concentrations of sodium hypochlorite (1.0%, 1.5% and 2%) were evaluated, where the application of 70% ethanol and 2.5% NaClO for 2 and 7 minutes, respectively, presented higher percentages of viability. Once the most efficient method of plant sterilization had been obtained, the *in vitro* propagation stage of Moradilla nodal segments was carried out in solid MS culture medium supplemented with growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and 3-indole-acetic acid (IAA) with the objective of evaluating the effects on stem elongation and shoot generation (axillary and apical buds) under light conditions for 20 days at 20 ± 3 ° C. The MS media were supplemented with 0 (control), 0.1, 0.5 mg/L of IAA and 0, 0.5 and 1 mg/L of BAP where the treatment with concentrations of 0.5mg/L IAA and 1 mg/L BAP was the combination of phytohormones which presented optimal results for propagation.

Subsequently, a solid-liquid extraction was carried out using the Soxhlet equipment for the determination of total phenols using the Folin-Ciocalteu method, in which a value of 6.81 mg GAE/g of Moradilla extract was obtained, comparable to values reported in other works. with the same plant species.

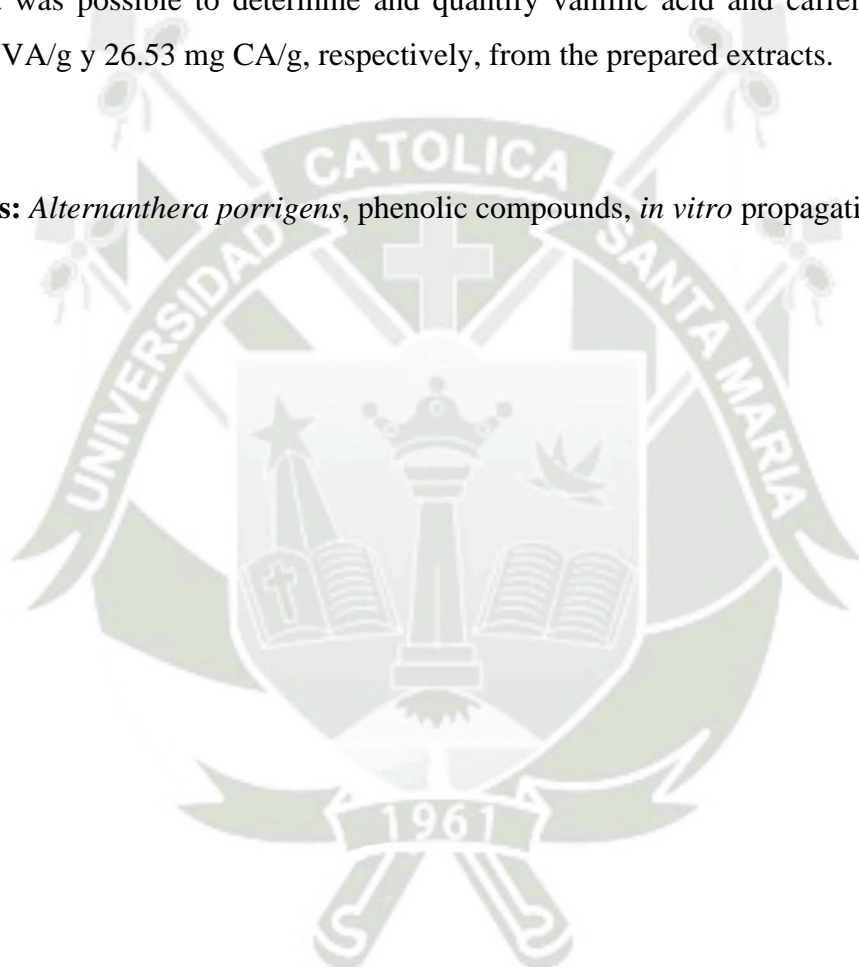
Likewise, the phenolic compounds vanillic acid and caffeic acid present in leaves and stem of *Alternanthera porrigens* were determined by means of reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). It began with the preparation of plant extracts, where 1g of dry weight (ps) was weighed to carry out the extraction by sonication with a methanol: water: TFA (50: 50: 0.1) mixture then centrifuged at 3000 rpm for 5 min and filtered with 0.45 μ m nylon RephiQuik filters. Moreover, the preparation of the vanillic acid and caffeic acid standards was carried out to obtain the calibration curve. The standards and plant samples were identified by HPLC, using a RP-18 column.

The chromatographic separation was run at a flow of $1000 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, with an injection volume of $20 \mu\text{l}$. A mobile phase that consisted of the following: a mixture: eluent A (ultrapure water and TFA) and eluent B (Methanol and TFA).

The gradient used was the following: 0 min, 75% of A and 25% of B; 5 min, 75% A, 25% B, 15 min, 55% A and 45% B, 30 min, 20% A and 80% B, 40 min, 75% A and 25% B at a 254 nm. The determinations were made in duplicate.

Finally, it was possible to determine and quantify vanillic acid and caffeic acid, obtaining 67.83 mg VA/g y 26.53 mg CA/g , respectively, from the prepared extracts.

Keywords: *Alternanthera porrigens*, phenolic compounds, *in vitro* propagation



INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los recursos naturales está ligado al hombre desde su aparición en la tierra, donde las plantas son un componente vital para la diversidad y la sostenibilidad mundial, debido a que proporcionan alimento, combustible, medicina entre otras utilidades para el hombre; además, forman la base de la pirámide trófica en todos los ecosistemas terrestres; sin embargo, esta diversidad de especies se está perdiendo debido a muchos factores, en su mayoría antrópicos como: el crecimiento de la población, las altas tasas de modificación del hábitat y deforestación, la explotación excesiva, la contaminación y el cambio climático (1). Algunas de estas plantas son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes culturas alrededor del mundo y su preparación es básicamente en forma de extractos e infusiones (2).

Las plantas medicinales son organismos que están naturalmente dotados de compuestos químicos (metabolitos secundarios) con propiedades de alto valor terapéutico, lo que produce avances en el desarrollo de fármacos sintéticos con acción fisiológica beneficiosa para el ser humano (2). Las que tienen una cantidad significativa de compuestos fenólicos son de gran interés ya que a estos compuestos se les atribuyen diversas actividades; el más relevante es la actividad antioxidante, que es importante para contrarrestar el estrés oxidativo. El estrés oxidativo surge principalmente como consecuencia de la sobreproducción de radicales libres debido al desequilibrio en la producción de antioxidantes por parte de las células (3). Es así que, los metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales son uno de los agentes terapéuticos más valiosos para reducir las enfermedades desencadenadas por el estrés oxidativo. Además de tener actividades antioxidantes, los metabolitos encontrados en plantas también ejercen un papel eficaz como antiinflamatorios observando sus actividades en varios estudios y numerosos estudios preclínicos. Los extractos bio-activos de plantas y sus constituyentes identificados han mostrado una variedad de propiedades farmacológicas contra diversas enfermedades.

En nuestro país se ha realizado un progreso considerable en el estudio de las plantas medicinales durante las últimas décadas (4) encontrándose publicaciones importantes sobre plantas nativas de la sierra sur (5).

En la región Arequipa, se han reportado la presencia de algunas especies medicinales nativas como las del género *Alternanthera*, que son plantas herbáceas ampliamente estudiadas a nivel mundial gracias a sus propiedades medicinales, nutricionales y fitorremediadoras. Así mismo, hay algunos estudios sobre otras especies del mismo género, y la mayoría de las especies coinciden en que la variedad de componentes fitoquímicos del género *Alternanthera* es bastante amplia. Entre los metabolitos secundarios, los más estudiados en este género son los flavonoides, glucósidos, alcaloides, azúcares, aminoácidos, hidrocarburos y esteroides (6).

La especie *Alternanthera porrigens*, conocida como Moradilla, es nativa de la región Arequipa y es utilizada comúnmente como antiinflamatorio, purgante, atenuador de la gripe, trastornos circulatorios y cólicos menstruales (7). No obstante, la mayor demanda de estas plantas, especialmente con fines alimentarios y medicinales, es una de las causas de su rápido agotamiento de los hábitats primarios (8).

El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original. Esto permite obtener numerosos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos con el empleo de reguladores de crecimiento, como auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas, los cuales originan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés en la biotecnología vegetal (9). Como se sabe, los procesos de propagación convencionales de plantas dependen de la estación y solo pueden lograrse durante períodos húmedos y cálidos (10) siendo afectada en su reproducción por periodos desfavorables donde permanecen en latencia o pierden sus hojas para producir flores y frutos, dificultando así su recuperación (11). Por esta razón, las técnicas de cultivo de tejidos del género *Alternanthera* se estudian cada vez más para la multiplicación clonal y la conservación *in vitro* de valioso germoplasma autóctono en vías de peligro de extinción.

Este trabajo está orientado a la investigación de *Alternanthera porrigens* con base en la identificación de la especie y el posterior establecimiento y propagación *in vitro* de sus segmentos nodales, así como de evidenciar el contenido polifenólico presentes en extractos de hojas y tallos utilizando el método de Folin-Ciocalteu y técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento, permitiendo así una ampliación básica de los estudios del potencial nutracéutico de esta especie vegetal nativa de la región Arequipa.

HIPÓTESIS

Dado que a la especie vegetal *Alternanthera porrigens* (Moradilla) se le atribuyen propiedades antioxidantes, es posible desarrollar un protocolo apto para el establecimiento y propagación *in vitro* y además determinar el contenido de compuestos fenólicos mediante la técnica de Folin-Ciocalteu y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Fase Reversa (RP-HPLC).



OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer y propagar *in vitro* segmentos nodales de *Alternanthera porrigens* (Moradilla) y determinar compuestos fenólicos de sus extractos mediante la técnica de Folin-Ciocalteu y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de fase reversa (RP-HPLC).

Objetivos Específicos

1. Localizar e identificar alguna especie *Alternanthera* nativa de la región Arequipa.
2. Determinar el método de desinfección óptimo para el establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de *Alternanthera porrigens* en cultivo MS sólido.
3. Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento AIA y BAP para la propagación *in vitro* de los segmentos nodales de *Alternanthera porrigens* en medio de cultivo MS sólido.
4. Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto de hojas y tallo de *Alternanthera porrigens* mediante el método de Folin-Ciocalteu
5. Identificar compuestos fenólicos derivados de los extractos de *Alternanthera porrigens* mediante HPLC mediante la determinación de condiciones adecuadas de gradiente para la separación cromatográfica, así como el tiempo de retención.



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. ESPECIFICACIONES DE LA ESPECIE VEGETAL

1.1 Descripción botánica

Pertenciente a la familia *Amaranthaceae*, el género *Alternanthera* son descritas como plantas herbáceas que poseen especies tanto terrestres como acuáticas.

Alternanthera porrigens, es una planta anual o perenne originaria de la región andina, encontrado en su mayoría en toda la cordillera. Esta planta, también conocida como “Lancetilla”, “Sanguinaria”, “Alcancel” pero la más común “Moradilla” (12) pertenece a la familia del amaranto. Las flores tienen cinco tépalos y su color es púrpura oscuro cuando la planta está madura (13). Hay de 3 a 5 estambres que se fusionan en un borde en las bases y cinco pseudostaminodes, apéndices entre los estambres que no son verdaderos estaminodios. Sus hojas son alargadas y opuestas y los frutos son indehiscentes en utrículo. La fruta es un utrículo que contiene una semilla. Se puede confundir con, por la similitud en la posición de las hojas, *Alternanthera halimofilia*; pero se diferencia por el color de las brácteas de color morado que rodean a las flores. También es una especie considerada como ruderal y tiene cierto valor ornamental (7).

1.2 Distribución geográfica de *Alternanthera porrigens*

La mayor diversidad se encuentra en América del Sur (14) pero también existen muchas especies en el Caribe, América Central y México. Cerca de 20 taxones nuevos fueron descritos recientemente en Argentina, Paraguay y Brasil (15).

La especie *Alternanthera porrigens* se distribuye desde los 600 m en Arequipa, hasta más de 3500 m de elevación en varios lugares del Perú; en la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca se la encuentra creciendo principalmente en laderas rocosas y arbustivas (16). Su presencia en las Lomas de Lúcumo está relacionada con la dispersión por el ganado. También, se la ha encontrado en las Lomas de Yuta, provincia de Islay, Arequipa (11) en la región Cajamarca (17) y en la Loma Mongón, provincia de Casma, departamento de Ancash (18).

1.3 Importancia de la *Alternanthera porrigens* y especies relacionadas

Alternanthera porrigens (Moradilla) es utilizada ampliamente en la medicina tradicional, que le atribuye propiedades contra la inflamación, circulación, purgante, gripe y cólicos menstruales (7). La moradilla se utiliza comúnmente para disminuir el dolor en el útero después del parto (12), dolor hepático, la influenza, problemas renales (19), reacciones inflamatorias, mejorar la circulación, como purgante, para atenuar la influenza y los trastornos menstruales (20). Además, los estudios toxicológicos indican que contiene buena cantidad de aceites esenciales, flavonoides, quinonas y taninos por lo que podría ser muy útil en problemas de infección de la piel. Las saponinas, junto con las otras sustancias, son útiles como antialérgico, antiinflamatorio y antiséptico (17).

La familia *Amaranthaceae* abarca muchas especies que se utilizan en la medicina popular tradicional para el tratamiento de numerosas enfermedades que causan infecciones, inflamaciones y fiebre (21) (22) (23). Los miembros de esta familia de plantas se utilizan en la extracción de pigmentos naturales como betaxantina y betalaínas para su aplicación como colorantes alimentarios y antioxidantes (22). Los análisis químicos han demostrado la presencia de antraquinonas, aurona, betacianinas, betalaínas, betaxantinas, cromoalcaloides, ecdisteroides, flavonoides, protoalcaloides, saponinas, esteroides y triterpenos (24) (21) (25) (26).

Otras especies relacionadas son utilizadas con fines ornamentales, alimentarios y medicinales en Europa, África, Asia y Australia (27). Se han reportado especies como *A. tenella* colla que es utilizada como agente antiinflamatorio (28) y *A. repens* (L.) utilizada para tratar infecciones gastrointestinales debido a su probada actividad antiprotozoaria, localizadas en Brasil Y México respectivamente (29). *Alternanthera philoxeroides* y *A. sessilis* se comen como vegetales en algunas partes de Asia y otras especies se utilizan como plantas ornamentales (30).

2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

El cultivo de tejidos puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos - células desprovistas de pared celular- células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (31).

2.1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales

Para el establecimiento de los cultivos es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. Posterior a las condiciones mencionadas, la aclimatación está estrechamente relacionada con las plantas regeneradas *in vitro*, que es de gran importancia en la mayoría de las aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura.

2.1.1 Explante

Varios factores se deben tener en cuenta en la elección del explante apropiado:

2.1.1.1 Objetivos del cultivo

El explante que se utilizará estará condicionado por lo que se quiere estudiar, por si se desea la obtención de plantas libres de virus, aplicarlas solo para micropropagación, para la obtención de híbridos interespecíficos, plantas de semillas con embriones rudimentarios, plantas haploides, híbridos somáticos. producción y/o conversión de sustancias útiles, conservación e intercambio de germoplasma, establecimiento de suspensiones celulares (32).

2.1.1.2 Posibilidad de contaminación con microorganismos

De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, para reducir sustancialmente las tasas de contaminación.

Por otra parte, es recomendable evitar el uso de explantes con raíces, rizomas que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos.

2.1.1.3 Edad fisiológica

Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes.

2.1.1.4 Tamaño

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.

2.1.1.5 Época del año

Es un factor que suelen tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos (33).

2.1.2 Asepsia

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus).

El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación, es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican.

Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que, en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias. Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y, por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos.

2.1.3 Medio de Cultivo

Antes de realizar la asepsia del material vegetal que se va a introducir *in vitro*, es necesario disponer de medios de cultivo esterilizados y dosificados en recipientes adecuados. Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos (32), que suministran carbono, nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante (en el caso de medios semisólidos), sustancias reguladoras del crecimiento y otros compuestos.

En la Tabla 1 se presentan tres medios que son muy utilizados en la actualidad. Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran: una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras del crecimiento y un agente gelificante (en el caso de medios semisólidos).

Tabla N°1. Composición de medios básicos más utilizados en cultivo *in vitro*.

Adaptado de Roca y Mogrinski (34)

Compuestos	Medio Básico ¹		
	MS	N6	B5
NH ₄ NO ₃	1650	---	---
KNO ₃	1900	2830	2500
KH ₂ PO ₄	170	400	---
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	166	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	463	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	250
NaH ₂ PO ₄ .4 H ₂ O	---	---	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO ₄ . H ₂ O	---	---	10,0
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	3,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	4,40	---
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	1,50	2,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	---	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	---	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	---	0,025
Glicina	2,00	2,00	---
Tiamina-HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina-HCl	0,50	0,50	1,0
Ácido nicotínico	0,50	0,50	1,0
Mioinositol	100,0	---	100,0
Sacarosa	30000	50000	20000

¹: Composición en mg/L

MS: Medio de Murashige y Skoog (35)

N6: Medio de Chu (36)

B5: Medio de Gamborg (37)

El medio de cultivo más conocido y utilizado es quizá el creado por Murashige y Skoog (1962) quienes desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con mucho éxito en casi todas las especies.

2.2 Micropropagación *in vitro*

La micropropagación es un sistema de propagación asexual, a partir de un segmento de una planta madre, que da como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Con esta biotécnica las células vegetales son capaces de generar una planta a partir de una simple célula, proceso conocido como totipotencialidad.

Es imprescindible conocer perfectamente la biología de la reproducción de la planta para aprovechar aquellos explantes que en forma natural son propágulos. En cambio, si se pretende micropropagar mediante el empleo de semillas sintéticas el explante original deberá posibilitar la inducción de la embriogénesis somática. En este caso, la utilización de embriones zigóticos inmaduros u hojas, suelen ser frecuentes como explantes.

2.2.1 Cultivo de segmentos nodales

Este sistema consiste en aislar los segmentos nodales del tallo de la planta y transferirlos a un medio apropiado para su desarrollo. En ocasiones, la micropropagación por esta vía permite sembrar explantes con más de un segmento, para activar todos los puntos meristemáticos que se encuentren en el tejido y obtener un mayor número de plantas.

A través de este sistema es posible diseñar medios de cultivo empleando concentraciones hormonales balanceadas adecuadas para obtener la proliferación de brotes, es decir que a partir del punto de crecimiento se obtenga un gran número de plántulas idénticas a la planta madre. En el caso de plantas monocotiledóneas, casi siempre la propagación se realiza aislando la yema central, debido a que presentan los segmentos nodales muy cortos para establecer el sistema de propagación por esta vía.

3. METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas son organismos autótrofos. Además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, tienen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de muy diversa naturaleza química. Los compuestos derivados del metabolismo secundario en las plantas se denominan metabolitos secundarios (38).

Los metabolitos secundarios de las plantas constituyen un grupo amplio y variado de compuestos orgánicos que se sintetizan en pequeñas cantidades. Y no tienen una función directa en procesos esenciales como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes y la diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Aparecen en las plantas como resultado de conversiones químicas. E, incluso cuando se desconocen muchas de sus funciones, se cree que los metabolitos secundarios están relacionados con la defensa de la planta contra depredadores y patógenos, también actúan como agentes alelopáticos que influyen en el crecimiento, supervivencia y reproducción de otras plantas, atraen a los polinizadores de semillas. y sirven para afrontar la adaptación a cambios bruscos de temperatura, humedad, intensidad lumínica y sequía (39) (40) (41). Los metabolitos secundarios de las plantas tienen una distribución diferencial entre grupos taxonómicos en el Reino de las plantas, y por tanto son útiles para la Botánica Sistemática (42).

Clases de metabolitos secundarios en plantas

Se han considerado varios criterios para la clasificación de los metabolitos secundarios: estructura química (presencia de anillos o azúcares), composición (que contenga nitrógeno o no), su solubilidad en disolventes orgánicos o agua y la vía biosintética. De ellos, el criterio más utilizado para agrupar los metabolitos secundarios en las plantas ha sido la vía biosintética. Según esto, los metabolitos secundarios en las plantas se pueden dividir en tres grandes grupos: terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos.

3.1 Terpenos

Los terpenos constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios en plantas a las que se asignan más de 40.000 moléculas diferentes (43).

Desde el punto de vista químico, son lípidos no saponificables ya que los ácidos grasos no intervienen en su formación. También se les conoce como isoprenoides ya que la unidad estructural básica que los forma es la molécula de isopreno. Se clasifican según el número de unidades de isopreno que contienen. La clase más simple de todas son los hemiterpenos con una sola unidad de isopreno y cinco carbonos en su estructura. El hemiterpeno más conocido es el isopreno, un producto volátil que surge de los tejidos fotosintéticamente activos. Con dos unidades, los terpenos se clasifican en monoterpenos, con tres unidades en sesquiterpenos, con cuatro en diterpenos, con seis en triterpenos, con ocho en tetraterpenos y con más de 10 en politerpenos (44) (45).

Tabla N°2. Clases de terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno.

Adaptado de Gonzáles (13).

Clase	Número de unidades de isopreno	Numero de átomos de carbono en la estructura	Ejemplos
Hemiterpeno	1	5	Isovaleramida
Monoterpeno	2	10	Geraniol
Sesquiterpeno	3	15	Farnesol
Diterpeno	4	20	Vitamina E
Triterpeno	6	30	Escualeno
Tetraterpeno	8	40	Caroteno
Politerpeno	>9	>40	Rubber

3.2 Alcaloides

Los alcaloides constituyen otro grupo grande y diverso de SM que incluye moléculas aisladas principalmente de plantas vasculares. Las plantas generalmente producen una mezcla compleja de alcaloides, en la que domina un constituyente principal. En una planta dada, el origen biosintético de los alcaloides presentes es común, incluso si sus estructuras son levemente diferentes (46). Se ha observado que la concentración de alcaloides varía considerablemente en partes de la misma planta, e incluso en algunas partes, puede no contenerlos en absoluto. Incluyen un átomo de nitrógeno en su estructura, son compuestos tóxicos y responden a reacciones de precipitación comunes (47).

3.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están presentes en todos los tejidos vegetales. Estos metabolitos secundarios constituyen uno de los grupos de micronutrientes que forman parte de la dieta humana. En la actualidad es fundamental el estudio de los fenoles por sus propiedades antioxidantes, su posible aplicación beneficiosa para la salud humana como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y patologías inflamatorias (48).

Son compuestos químicos que contienen un grupo hidroxilo directamente unido a un hidrocarburo aromático. Químicamente, los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios. El representante más simple de esta clase es el fenol (49) (50).

El criterio más importante para clasificar los compuestos fenólicos es el número de carbonos presentes en la molécula. Según este criterio, los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples, fenoles ácidos, acetofenonas y ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, flavonoides, biflavonilos, benzofenonas, xantonas, estilbenos, quinonas y betacianinas. Los lignanos, neolignanos, taninos y flobafenos también pertenecen a este grupo. Estos últimos son polímeros y tienen estructuras más complejas (49) (51).

Los compuestos fenólicos se sintetizan en las células vegetales mediante la vía del ácido shikímico o la vía del malonato/acetato (o ambas, por ejemplo, los flavonoides) (52). La vía del ácido shikímico proporciona la síntesis de fenilalanina y ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) (50) (53). La vía del poliacetato proporciona quinonas y xantonas. Las vías mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la vía del poliacetato. Este es el caso de los flavonoides (54) (55).

Tabla N°3. Clases de compuestos fenólicos según el número de carbonos en la estructura. Adaptado de Gonzáles (13).

Carbonos	Clase	Ejemplos
C6	Fenólicos simples	Resorcinol
C6-C1	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados	Ácido gálico
C6-C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	2-hidroxiacetofenona
C6-C3	Ácidos cinámicos, aldehídos cinamílicos, alcoholes cinamílicos	Sinapoil colina
C6-C3	Cumarinas, isocumarinas y cromonas	Umbeliferona
C6-C3-C6 (C15)	Chalconas, auronas, dihidrochalconas	Buteína
	Flavonas	Kaempferol
	Flavonoles	Taxifolina
	Antocianidinas	Cianidina
	Antocianinas	Pentanina
C30	Biflavonilos	Ginkgetin
C6-C1-C6	Benzofenonas	Benzofenona
	Xantonas	Xantona
C6-C2C6	Estilbeno	Resveratrol
C6, C10, C14	Quinona	2,6-dimetoxibenzoquinona
C18	Betacianinas	Betanidina

Los compuestos fenólicos cumplen diversas funciones en las plantas: se oxidan fácilmente y actúan como antioxidantes (56) (57) (58), actúan como inhibidores del crecimiento vegetal (59), las semillas acumulan cantidades importantes de fenoles que actúan como filtro para que el oxígeno no llegue al embrión e inhiban su germinación (60). Los fenoles también se acumulan en la superficie de las hojas captando hasta el 90% de la radiación UV (61). Los fenoles confieren aromas y colores a los frutos haciéndolos atractivos para los herbívoros, lo que favorece la dispersión de las semillas a través de las heces.

3.3.1 Ácido cafeico

El ácido cafeico (ácido 3, 4-dihidroxicinámico) es un ácido cinámico y se considera un fenilpropanoide importante que se encuentra en las plantas. También está siendo ampliamente estudiado por su aspecto farmacológico para la salud humana (84). Los estudios han demostrado que el consumo de alimentos ricos en ácido cafeico produce un efecto protector contra la carcinogénesis al prevenir la formación de nitrocompuestos (nitrosaminas y nitrosamidas) que son los principales inductores de esta patología (85, 86). La acción anticancerígena del ácido cafeico se asocia principalmente con sus capacidades antioxidantes y prooxidantes (87, 88) y esto se atribuye a su estructura química.

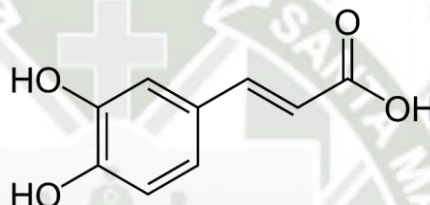


Figura N°1. Ácido cafeico formado en plantas a partir del ácido 4-hidroxicinámico.

3.3.2 Ácido vanílico

También denominado ácido 4-hidroxi-3 metoxibenzoico) es un ácido dihidroxibenzoico derivado usado como un agente aromatizante. Se trata de una forma oxidada de vainillina. También es un intermedio en la producción de vainillina a partir de ácido ferúlico (89). Se sabe que tiene diversas propiedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatoria, inmunoestimulante, neuroprotectora, hepatoprotectora, cardioprotectora y antiapoptótica (90).

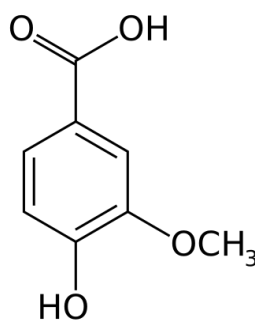


Figura N°2. Estructura química del ácido vanílico.

4. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

A pesar de una gran cantidad de investigaciones publicadas, la cuantificación de varios grupos fenólicos estructurales sigue siendo difícil (63) (64), por lo que, existe un gran margen para desarrollar métodos de cuantificación basados en el tipo de grupo fenólico (65). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), o sus combinaciones, con espectrometría de masas son los dos métodos más comúnmente aplicados para cuantificar compuestos fenólicos. Otras técnicas relevantes incluyen ensayos espectrofotométricos (66).

4.1 Ensayos espectrofotométricos

La espectrofotometría es una de las técnicas relativamente simples para la cuantificación de fenoles en plantas. Los dos ensayos espectrofotométricos ampliamente utilizados para medir fenoles totales en materiales vegetales durante muchos años fueron los métodos Folin-Denis y Folin Ciocalteu (67) (68). Ambos métodos se basan en una reducción química que involucra reactivos que contienen tungsteno y molibdeno (69). Los productos de esta reducción en presencia de compuestos fenólicos tienen un color azul con un amplio espectro de absorción de luz alrededor de 760 nm. Los reactivos de ambos métodos no reaccionan específicamente solo con fenoles, sino también con otras sustancias como ácido ascórbico, aminas aromáticas y azúcares (70). La cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales, proantocianidina (tanino condensado) y tanino hidrolizable también se pueden estimar por métodos colorimétricos. Los extractos metanólicos o etanólicos de fenoles vegetales mezclados con $AlCl_3$ permiten medir los flavonoides totales en el rango de 410 a 423 nm (71) (72).

4.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

Es la técnica preferida tanto para la separación como para la cuantificación de compuestos fenólicos (66). Varios factores afectan el análisis HPLC de fenoles, incluida la purificación de la muestra, la fase móvil, los tipos de columna y los detectores (69).

En general, los compuestos fenólicos purificados se aplican a un instrumento de HPLC que utiliza una columna C18 de fase inversa (RP-C18), un detector de matriz de fotodiodos (PDA) y disolventes orgánicos acidificados polares (63). Existen diversas revisiones disponibles sobre la aplicación de HPLC y la cuantificación de compuestos fenólicos. Normalmente, la sensibilidad y detección de HPLC se basan en la purificación de fenoles y la preconcentración a partir de matrices complejas de extractos de plantas crudas.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (o cromatografía líquida de alta performance, HPLC) es una forma específica de cromatografía en columna generalmente utilizada en bioquímica y análisis para separar, identificar y cuantificar los compuestos activos (73).

La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electrostáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido (74).

4.3 Ventajas de la cromatografía de alto rendimiento

- Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada (75).

- Alta precisión en sus resultados (± 0.5 % o menor) (75).
- Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular (74).
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil (74).
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras (74).
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada (74).
- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos (76).
- Alto poder de separación con detección sensible (76).
- La operación es flexible, personalizable y automatizada (76).
- No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra (77).

4.4 Componentes del sistema HPLC

Un sistema de HPLC está compuesto por cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (Fig.Nº3).

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración (75). La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μ L y 5 mL (75).

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados. El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma (75).

Por otro lado, la columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μm (78). Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna. El detector, ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador.

Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados), y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil) (79). Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación (78).

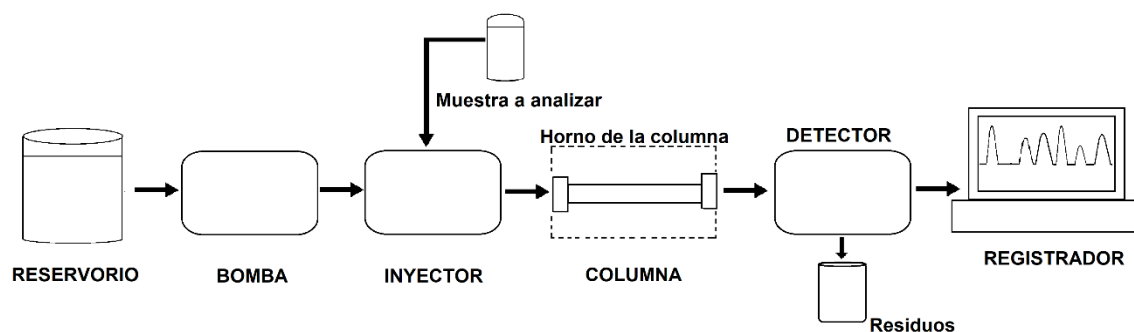


Figura N°3. Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.

Adaptado de Giri (78).



CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Material vegetal

Hojas y tallos de *Alternanthera porrigens* (Moradilla)

1.2 Material de laboratorio

- Fiolas de 5 mL, 10 mL, 100 mL
- Frascos 200 mL
- Matraz de 250 y 500 mL
- Pinzas
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Placas Petri
- Probetas de 50 y 100 mL
- Tubos de ensayo 16x 125 mm

1.3 Equipos

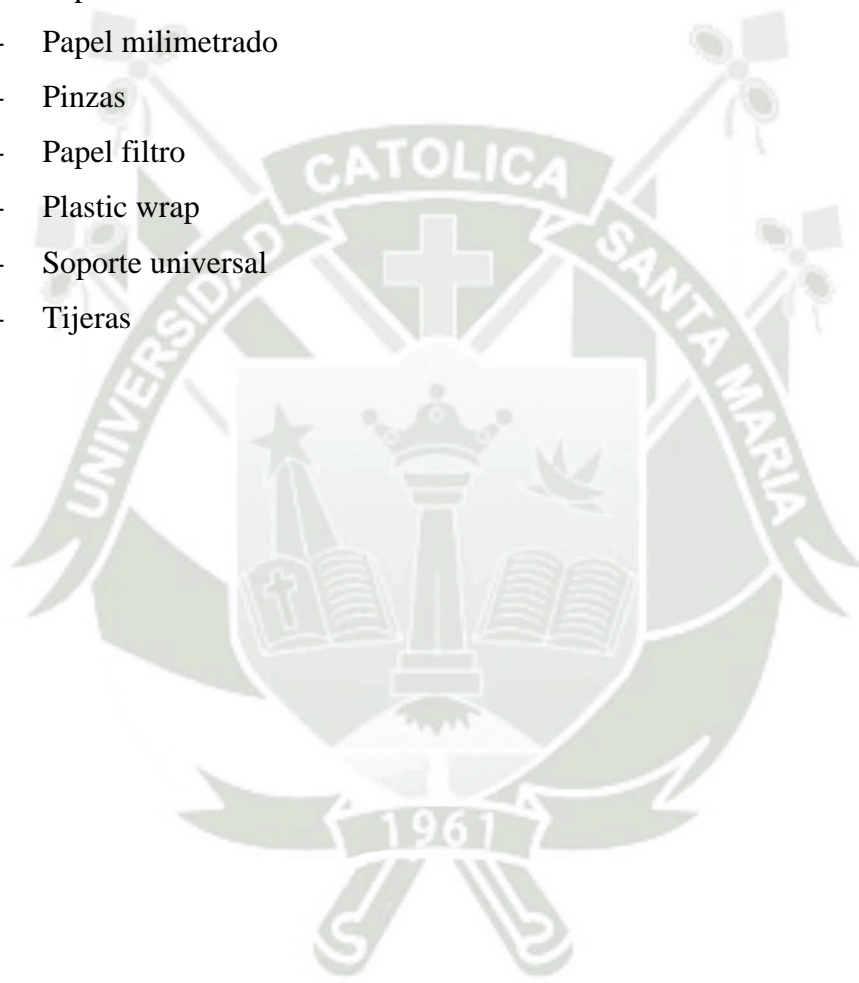
- Autoclave
- Balanza analítica
- Bombas de aire
- Cámara de flujo laminar
- Campana extractora de gases HNG
- Equipo de cromatografía Líquida de Alto rendimiento
- Equipo de filtración al vacío
- Equipo Soxhlet
- Estereoscopio
- Estufa
- Luxómetro
- Microscopio
- Microondas
- Cintas papel pH
- Refrigerador
- Rotavapor
- Sonicador

1.4 Reactivos químicos

- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido gálico ($C_6H_2(OH)_3COOH$)
- Ácido nicotínico
- Agua destilada
- Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Cloruro de Mercurio ($HgCl_2$)
- Etanol 96% v/v
- Fosfato de potasio (KH_2PO_4)
- Glicina
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Hipoclorito de sodio NaClO 2.5%
- Mio inositol
- Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)
- $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$
- Nitrato de amonio (NH_4NO_3)
- Nitrato de potasio (KNO_3)
- Piridoxina-HCl
- Sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- Sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)
- Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Tiamina-HCl
- Yoduro de potasio (KI)

1.5 Otros

- Bolsas de polipropileno y polietileno
- Bisturí
- Cocinilla
- Jeringas descartables de 5mL
- Ligas elásticas
- Papel aluminio
- Papel milimetrado
- Pinzas
- Papel filtro
- Plastic wrap
- Soporte universal
- Tijeras



2. Métodos

2.1 Localización del trabajo de investigación

Este trabajo de investigación fue realizado en los laboratorios del pabellón H y F de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2.2 Recolección de la Especie vegetal

Después de indagar la ubicación de esta especie en la región Arequipa, se tomó como muestra aquellas ramas con características morfológicas vitales y vigorosas, con estabilidad climática, con el fin de no modificar los niveles de carbohidratos, proteínas y reguladores hormonales endógenos evitando además la alteración de los procesos *in vitro*. Una vez cortados los tallos, con tijeras previamente desinfectadas, se colocaron en bolsas herméticas para una correcta conservación. Esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible.

2.3 Determinación taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó según la propuesta por el grupo Angiosperm Phylogeny Group en “An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG IV” (2016)

2.4 Establecimiento *in vitro* de los tejidos vegetales de *Alternanthera porrigens*

2.4.1 Ensayos de desinfección superficial de los segmentos nodales

Una vez seleccionado el material vegetal, y previamente al establecimiento *in vitro*, es conveniente someterlo a una serie de tratamientos para reducir al máximo los microorganismos superficiales. Estos ensayos de desinfección se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar previamente sanitizados con etanol al 70%. A los explantes de *Alternanthera porrigens*, se le retiraron las hojas y fueron lavados rigurosamente con agua potable y agua destilada durante 10 y 5 minutos, respectivamente, en un matraz de 500 mL, luego fueron colocados en otro matraz con soluciones de distintos tratamientos de desinfección según como se muestra a continuación:

Tabla N° 4. Pruebas de desinfección vegetal evaluadas.

Prueba	Método
P1	EtOH 70%, NaClO 1,0% (30 s, 5min)
P2	EtOH 70%, NaClO 1,0% (60 s, 6min)
P3	EtOH 70%, NaClO 1,0% (90 s, 7min)
P4	EtOH 70%, NaClO 1,0% (120 s, 8min)
P5	EtOH 70%, NaClO 1,0% (150 s, 9min)
P6	EtOH 70%, NaClO 1,5% (90 s, 7min)
P7	EtOH 70%, NaClO 1,5% (120 s, 7min)
P8	EtOH 70%, NaClO 1,5% (90 s, 8min)
P9	EtOH 70%, NaClO 1,5% (120 s, 8min)
P10	EtOH 70%, NaClO 1,5% (90 s, 9min)
P11	EtOH 70%, NaClO 1,5% (120 s, 9min)
P12	EtOH 70%, NaClO 2,0% (90 s, 5min)
P13	EtOH 70%, NaClO 2,0% (120 s, 7min)

2.4.2 Condiciones y preparación de soluciones stock y medio de cultivo MS

Para la preparación de los componentes del medio de cultivo MS (Murashigue y Skoog), las sales se pesan y preparan sobre un 70% de agua del volumen final deseado, y sobre ella se van añadiendo uno por uno todos los componentes hasta su completa disolución. Posteriormente se ajusta el volumen final requerido con agua y se almacenan en frascos color ámbar en el conservador. De este modo, para la elaboración de la cantidad deseada del medio MS, se diluyen las soluciones stock previamente realizadas, además de agregar la fuente de carbono y el agente gelificante (Anexo N°2). El pH se ajustó a 5.0 regulado HCl 1N, o NaOH 1N. Los cultivos fueron mantenidos bajo fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 2000 a 2500 Lux proporcionada por tubos fluorescentes y mantenidos a una temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Seguidamente, en la cámara de flujo laminar, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril o hasta eliminar los residuos de los reactivos utilizados en los ensayos de desinfección, y se tomaron como explantes los segmentos nodales. Se colocó un explante en cada tubo de ensayo de vidrio conteniendo aproximadamente 8 mL de medio de cultivo MS.

2.5 Propagación *in vitro* de los explantes de *Alternanthera porrigens*

2.5.1 Evaluación del efecto de las fitohormonas AIA y BAP

Para la evaluación de la longitud del tallo e inducción de brotes de los explantes de *Alternanthera porrigens* se utilizó el medio MS suplementado con AIA y BAP a diferentes concentraciones (Tabla N°5) con 3 repeticiones por tratamiento a los 20 días.

Tabla N° 5. Concentraciones de AIA y BAP utilizados.

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración</i> (mg/L)	
	AIA	BAP
1 (Testigo)	0,0	0,0
2	0,5	0,0
3	0,0	0,5
4	0,5	1,0
5	0,1	1,0

2.6 Determinación de compuestos fenólicos por espectrofotometría

2.6.1 Extracción de la muestra vegetal

Se pesó 10 g de tallos y hojas secas de la Moradilla previamente secadas y pulverizadas en un mortero. Se procedió a armar el equipo Soxhlet donde en la cámara de extracción se colocó un paquete o cartucho de papel filtro conteniendo los 10 g de muestra, en el balón se colocó 150 mL del solvente metanol que, con ayuda de un soporte universal, se colocó encima de una cocinilla eléctrica como fuente de calor para alcanzar el punto de ebullición.

El disolvente en estado gaseoso asciende por el sifón para luego llegar al refrigerante donde se condensa y cae hasta ponerse en contacto con el cartucho, el disolvente recircula por el equipo repetidamente, extrayendo en cada recorrido una fracción de los metabolitos. Este procedimiento se repitió las veces necesarias. Transcurrido el tiempo establecido de la extracción, se eliminó el solvente presente en el extracto llevándolo al rotavapor. Obtenido el peso del extracto contenido en el balón, se reconstituyó con 10 mL.

del mismo solvente colocados en un frasco color ámbar para su posterior análisis.

2.6.2 Preparación de soluciones

La solución de carbonato de sodio se preparó pesando 5 g de carbonato sódico, se agregó agua destilada y se agitó en el vórtex hasta obtener una disolución completa y se enrasó hasta un volumen de 25 mL. Se almacenó y refrigeró. Se preparó una solución stock de ácido gálico de 1000 ppm para lo cual se pesó 0.05 g de ácido gálico y se transfirió a una fiola de 50 mL se disolvió y se enrasó con agua destilada. A partir de esta solución madre se preparó 5 diluciones de diferentes concentraciones para la obtención de la curva de calibración de ácido gálico.

Tabla N° 6. Volúmenes utilizados para la preparación de la curva de calibración.

N° Tubo de ensayo	Blanco	1	2	3	4	5
Sol. estándar ácido gálico (µL)	0	20	40	60	80	100
Agua destilada (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Reactivo de Folin Ciocalteu (µL)	200	200	200	200	200	200
Na ₂ CO ₃ (mL)	2	2	2	2	2	2
Concentración final (mg/L)	0	2	4	6	8	10

Para la determinación del contenido total de polifenoles presentes en la muestra de Moradilla, se utilizó el método según Singleton et al. (94). Se tomó 2 mL de Carbonato de sodio, 200 μ L de muestra y 200 μ L de Reactivo de Folin (1:1 agua destilada). Su absorbancia fue medida a 750 nm luego de 30 min de reacción.

Tabla N°7. Volúmenes utilizados para la determinación de polifenoles totales en extracto de Moradilla.

N° Tubo de ensayo	1	2	3	4
Muestra (μ L)	200	200	200	200
Agua destilada (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
Reactivo de Folin Ciocalteu (μ L)	200	200	200	200
Na ₂ CO ₃ (mL)	2	2	2	2

El contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado como miligramo de ácido gálico equivalente por gramo de extracto de Moradilla (mg EAG/g). Se utilizó la ecuación de la recta del estándar ácido gálico:

$$Y = b \cdot x + a$$

Así mismo, se calculó la concentración de las diluciones hechas previamente:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Donde:

- C1 = concentración de compuestos fenólicos en el volumen tola del matraz aforado.
- V1 = volumen total en matraz aforado
- V2 = volumen de extracto empleado
- C2 = concentración de compuestos fenólicos en el volumen de extracto empleado.

2.7 Determinación de compuestos fenólicos mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase reversa

2.7.1 Preparación de la solución estándar.

Para realizar la curva de calibración del estándar de ácido vanílico (Sigma Aldrich, USA) con ≥ 99.0 % de pureza, se preparó una solución stock de 1000 ppm para después trabajar con diluciones de 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm y 120 ppm, mientras que para realizar la curva de calibración del estándar de ácido cafeico (Sigma Aldrich, USA) con ≥ 99.0 % de pureza, se preparó una solución stock de 1000 ppm para después trabajar con diluciones de 50 ppm, 80 ppm, 110 ppm, 140 ppm y 170 ppm.

Ambos ensayos se analizaron por duplicado mediante el equipo HPLC-UV serie L-2350 (Hitachi High Technologies, Elite LaChrom, América) a una longitud de onda de 254 nm.

2.4.1 Extracción de la muestra vegetal

Se pesó 7,7 g de material vegetal fresco (hojas y tallo) de la Moradilla y se llevó a estufa a 100°C. Transcurrido el tiempo se molió finamente en un mortero y se pudo obtener 1g de peso seco (ps) al que le fue añadido una mezcla de metanol: agua: TFA (50:50:0.1) en una fiola de 10 mL. Se prosiguió a sonicar durante 30 min a temperatura ambiente, se trasvasaron a tubos Falcon y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Con ayuda de una jeringa se tomó como muestra el sobrenadante, se colocaron los filtros RephiQuik nylon de 0.45 μm y fueron filtrados en viales de vidrio ámbar de 1.5 mL.

2.4.2 Condiciones de análisis

El estándar se analizó mediante la fase estacionaria establecida por una columna Merck LiChrocar 250 mm x 4 mm RP-18 (5 μm) en HPLC-DAD-UV modelo L-2450 (Hitachi High Technologies, Elite LaChrom). La separación cromatográfica se corrió a un flujo de 1000 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, con un volumen de inyección de 20 μL y una fase móvil que consistió en lo siguiente:

Una mezcla del eluyente A (agua ultrapura) y eluyente B (Metanol). La gradiente utilizada fue la siguiente: 0 min, 75% de A y 25% de B; 5 min, 75% de A, 25% de B, 15 min, 55% de A y 45% de B, 30 min, 20% de A y 80% de B, 40 min, 75% de A y 25% de B a una longitud de onda de entre 254 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla N° 8. Gradientes utilizadas para la determinación de metabolitos secundarios mediante HPLC.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Bomba A</i>		<i>Flujo (mL/min)</i>
	<i>%Agua + TFA</i>	<i>%Metanol + TFA</i>	
0	75	25	1
5	75	25	1
15	55	45	1
30	20	80	1
40	75	25	1



CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Recolección del material vegetal

Se logró localizar y recolectar la especie *Alternanthera porrigens* de su hábitat natural ubicado en el distrito de Mollebaya, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa con coordenadas 16°29'54,6"S 71°28'08,5"W. Aproximadamente se recolectaron 5 kg del material vegetal (tallos enteros con hojas y flores).



Figura N°4. Material vegetal “Moradilla” recolectado en Mollebaya, Arequipa.

Fuente: Registro fotográfico propio de la investigación.

2. Determinación taxonómica

La especie vegetal recolectado fue determinado taxonómicamente en las instalaciones del Herbario del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), “Herbario Sur Peruano” (HSP) de la ciudad de Arequipa, y corresponden a: (Anexo N°1)

Tabla N°9. Clasificación taxonómica del material vegetal recolectado.

Clase	Equitopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Caryophyllales
Familia	<i>Amaranthaceae</i> (Caryophyllaceae)
Genero	<i>Alternanthera</i>
Especie	<i>Alternanthera porrigens</i> (Jacq.) Kuntze

3. Pruebas de desinfección superficial durante el establecimiento *in vitro* de explantes de *Alternanthera porrigens*

Según el análisis de varianza para un nivel de confianza del 95% se encontró que no hay diferencia significativa entre los porcentajes de contaminación de las repeticiones por prueba de desinfección ($p > 0.05$). Sin embargo, existen diferencias significativas al 95% entre un nivel y otro de las pruebas de desinfección generados por el test de diferencia significativa de Tukey (HSD) (Figura N°5). Pocos autores han demostrado resultados óptimos con el uso de agentes desinfectantes como el etanol e hipoclorito de sodio para el género *Alternanthera*, así como lo señala Pikulthong et al. (80), donde el método más adecuado para la esterilización de superficies de tejidos meristemáticos de *Alternanthera sp.* fue con el uso de etanol al 70% durante 1 min e hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos, proporcionando una tasa de contaminación del 5% y una tasa de supervivencia del 95%. En tal sentido, para los ensayos de desinfección de segmentos nodales de *A. porrigens*, se compararon 13 pruebas con etanol al 70% e hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de desinfección (Tabla N°10).

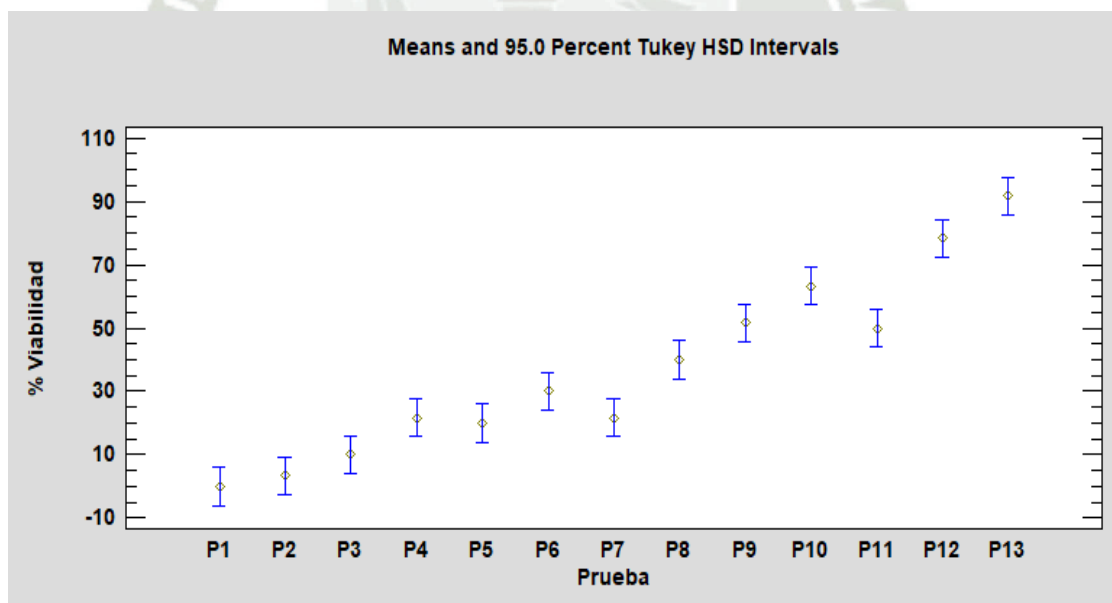


Figura N°5. Evaluación de la viabilidad de explantes *in vitro* de *A. porrigens* según las pruebas de desinfección según HSD.

Tabla N°10. Porcentaje de viabilidad de segmentos nodales de *A. porrigens*.

Prueba	% Contaminación				% Viabilidad
	Hongos	Bacterias	Oxidación	Levaduras	
P1	35	40	0	25	0
P2	30	35	0	30	5
P3	25	40	5	20	10
P4	25	40	0	15	20
P5	20	40	5	15	20
P6	20	30	5	15	30
P7	15	40	5	15	25
P8	20	25	10	5	40
P9	10	20	10	10	50
P10	10	10	15	5	60
P11	10	25	5	5	55
P12	5	15	0	0	80
P13	0	5	0	0	95

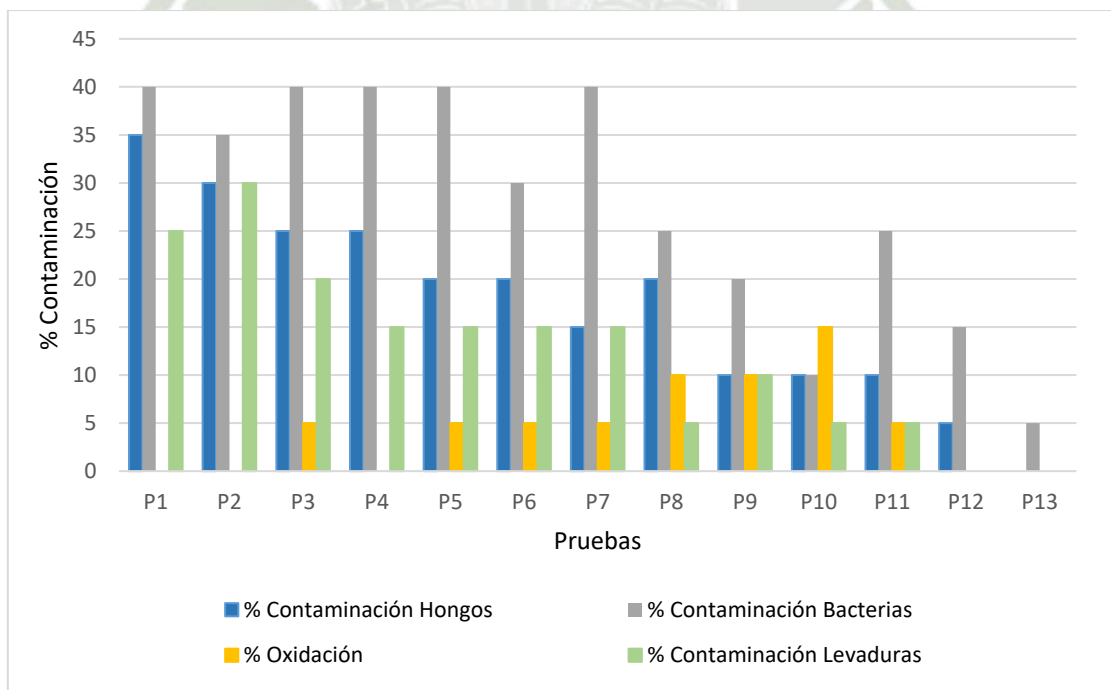


Figura N°6. Porcentaje de contaminación de explantes de *Alternanthera porrigens* según las pruebas de desinfección.

Como se observa, los resultados revelaron que los explantes nodales esterilizadas con etanol 70% e hipoclorito de sodio 1.0% durante 30, 60, 90, 120, 150 s y 5, 6, 7, 8,9 min respectivamente, tenían un porcentaje promedio de contaminación fúngica del 27%, bacteriana del 39%, con levaduras del 21% y oxidación del 2%, con un 11% de explantes viables. Esto denotó que la concentración de los agentes desinfectantes pudo no ser la adecuada, propiciando la proliferación de estos microorganismos (Fig. N°7-A, C, D).

Se procedió entonces con las pruebas de etanol 70% e hipoclorito de sodio al 1.5% durante 90, 120 s y 7, 8, 9 respectivamente, revelando contaminación fúngica del 14.2%, bacteriana del 25%, con levaduras del 9.2% y oxidación del 8.3% y una tasa de supervivencia del 43.3%. Como se muestra, el porcentaje de contaminación inducida por hongos, bacterias y levaduras disminuye considerablemente al elevar la concentración del hipoclorito de sodio al 1.5% durante los tiempos propuestos. Sin embargo, el porcentaje de explantes que presentan oxidación se elevó en un 6.3% respecto a las pruebas utilizando hipoclorito 1.0%, probablemente a que los tejidos de los explantes fueron dañados durante la etapa de preparación, propiciando la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación debido a que los compuestos fenólicos que están en grandes cantidades en las vacuolas, se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas (81). Estos compuestos son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática, lo cual puede resultar en un oscurecimiento letal de los explantes. (Fig. N°7-B).

Seguidamente, se obtuvieron los resultados de la prueba con etanol 70% e hipoclorito de sodio 2.0% durante 90, 120s y 5, 7 min respectivamente. Se encontró que los segmentos nodales de *A. porrigens*, presentaron el porcentaje promedio más bajo de contaminación fúngica (2.5%), bacteriana (10%), con levaduras y oxidación (0%), obteniendo así un 87.5% de explantes viables.

Esto concuerda con lo propuesto por Alfaro et al. (82), donde para la reducción de la población microbiana de plantas medicinales se emplean dosis mínimas de hipoclorito de sodio, entre 0,5 - 2,0% y el tiempo de inmersión también debe ser breve, entre 5 y 10 minutos. Estas pruebas de desinfección conllevaron a los siguientes experimentos de evaluación de los efectos de los reguladores de crecimiento.

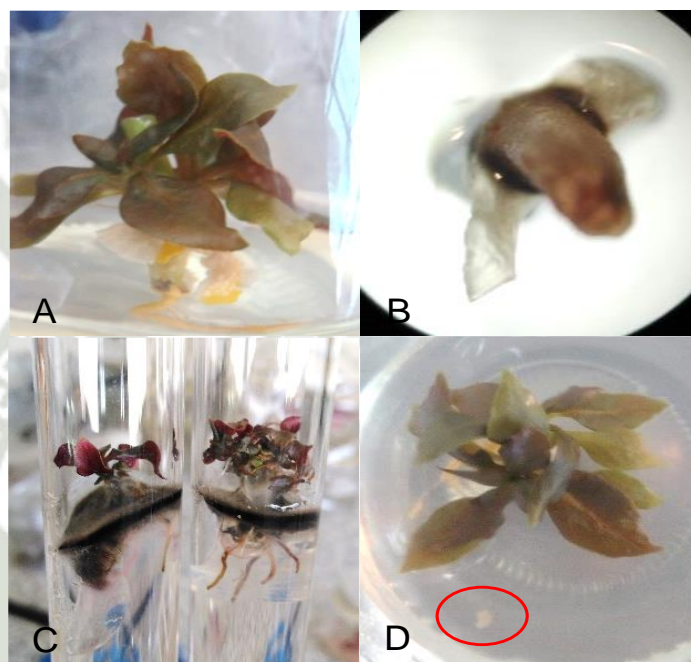


Figura N°7. Segmentos nodales de *A. porrigens* expuestos a diferentes pruebas de desinfección durante 20 días. Explante contaminado por A) bacterias, C) hongos, D) levaduras y B) explantes con presencia de oxidación.

El periodo de evaluación de cada vitroplanta fue de 20 días, en todas las pruebas de desinfección se pudo determinar en su mayoría la presencia de bacterias, probablemente debido a que éstas entran al cultivo de tejidos con los explantes iniciales, pero otras son claramente introducidas en el laboratorio. Se observaron con crecimiento superficial en el medio del cultivo, alrededor de los explantes y dentro del propio medio de cultivo; dividiéndose en algunas ocasiones como una masa bacteriana en forma de pliegues, halos o rosetas en el interior del medio sólido algunas abundantes y otras con escaso crecimiento sobre la superficie. Por estas razones se optó por elevar la concentración del hipoclorito de sodio como biocida de amplio espectro y utilizarlas para la desinfección de los explantes. Por otro lado, la oxidación es producida por los radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (ppo) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular.

4. Evaluación de los efectos de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes y elongación del tallo

Los resultados mostraron que los segmentos nodales cultivados en medios MS suplementados con AIA y BAP a diferentes concentraciones tuvieron longitudes de tallo significativamente diferentes ($p < 0.05$). Sin embargo, como se muestra en la Figura N°8 la generación de brotes (yemas apicales y axilares) no tuvieron diferencia entre un tratamiento y otro ($p > 0.05$). Los mejores resultados para el establecimiento *in vitro* de explantes de *A. porrigens*, fueron bajo condiciones de fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 2000 a 2500 Lux proporcionada por tubos fluorescentes y mantenidos a una temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Como se observa en la Tabla N°11, el tratamiento 4 que consiste en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de AIA y 1.0 mg/L de BAP, indujo el número de brotes promedio más alto con 5.7 brotes/explante, presentando también la más alta elongación promedio del tallo 2.7 cm/explante seguido por el tratamiento 5 con 0.1mg/L de AIA y 1.0 mg/L de BAP que indujo el número de brotes y elongación del tallo con 4.3 brotes /explante y 2.2 cm/explante, respectivamente.

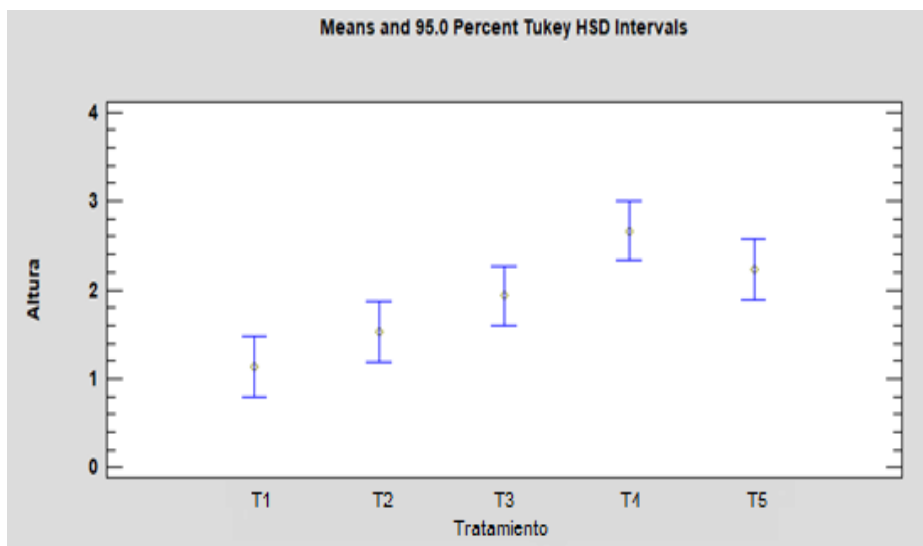


Figura N°8. Evaluación de la elongación del tallo de explantes de *A. porrigens* a diferentes concentraciones de AIA y BAP según HSD.

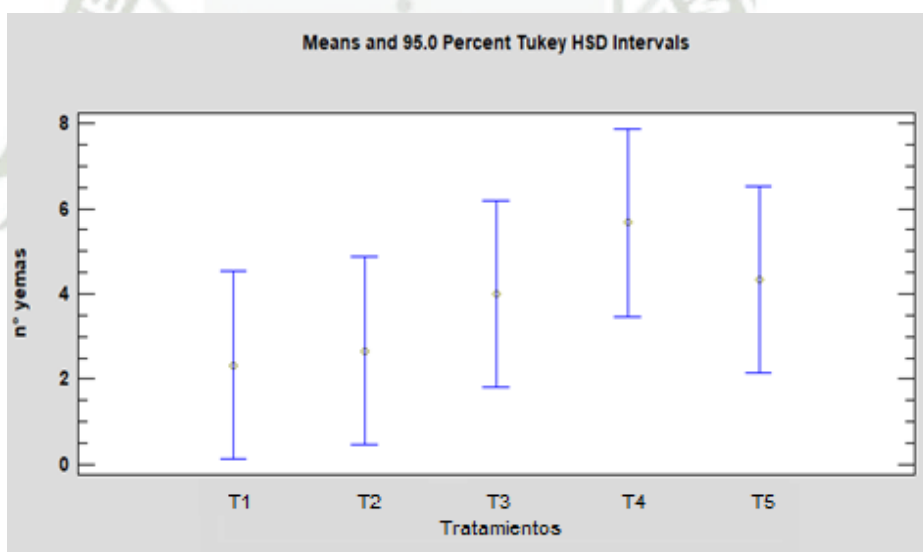


Figura N°9. Evaluación de la inducción de numero de yemas de los explantes de *A. porrigens* a diferentes concentraciones de AIA y BAP según HSD.

El tratamiento 1, sin suplementación de hormonas, indujo el número más bajo de brotes con 2.3 brotes/explante y elongación de tallo 1.1 cm/explante (Tabla N°11 y Figura N°12A). En todos los tratamientos se observó la coloración rojiza presentes en las hojas y tallo verde del explante.

Se presenció también una buena inducción radicular en todos los tratamientos, sobre todo en el tratamiento 4, así como la mayor generación de hojas. Contrariamente a la generación de raíces, los tratamientos 1, 2 y 3 presentaron menor número de hojas (datos no mostrados).

Tabla N° 11. Efectos de las diferentes concentraciones de AIA y BAP en la elongación del tallo e inducción de brotes de segmentos nodales de *A. porrigens* cultivados durante 20 días.

N° Tratamiento	Concentración (mg/L)		Altura tallo (cm)	N° yemas (uds.)
	AIA	BAP		
T1	0,0	0,0	1,1	2,3
T2	0,5	0,0	1,5	2,7
T3	0,0	0,5	1,9	4,0
T4	0,5	1,0	2,7	5,7
T5	0,1	1,0	2,2	4,3

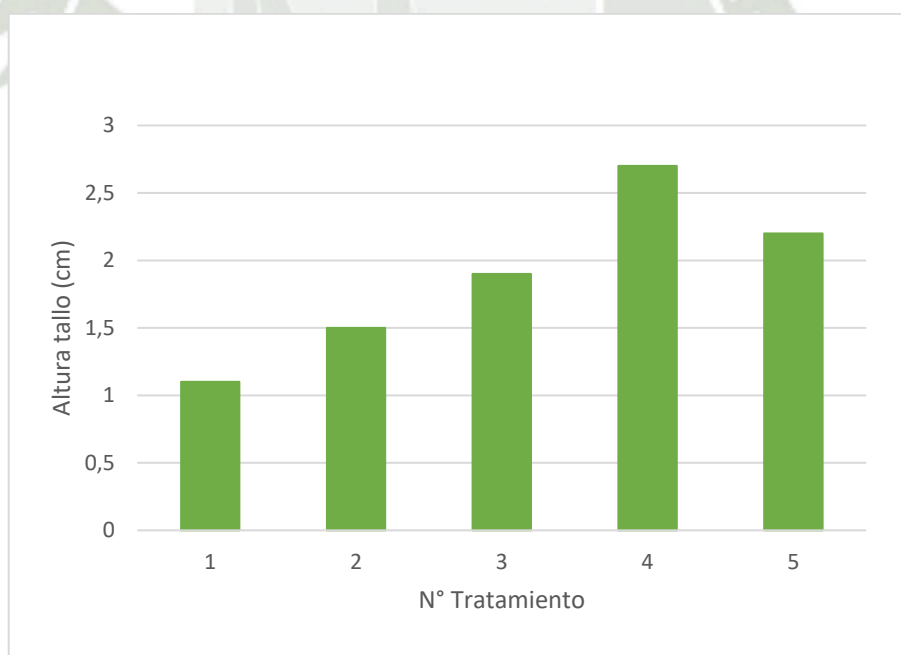


Figura N°10. Altura alcanzada de los explantes de *A. porrigens* tratadas con diferentes concentraciones de fitohormonas después de 20 días.

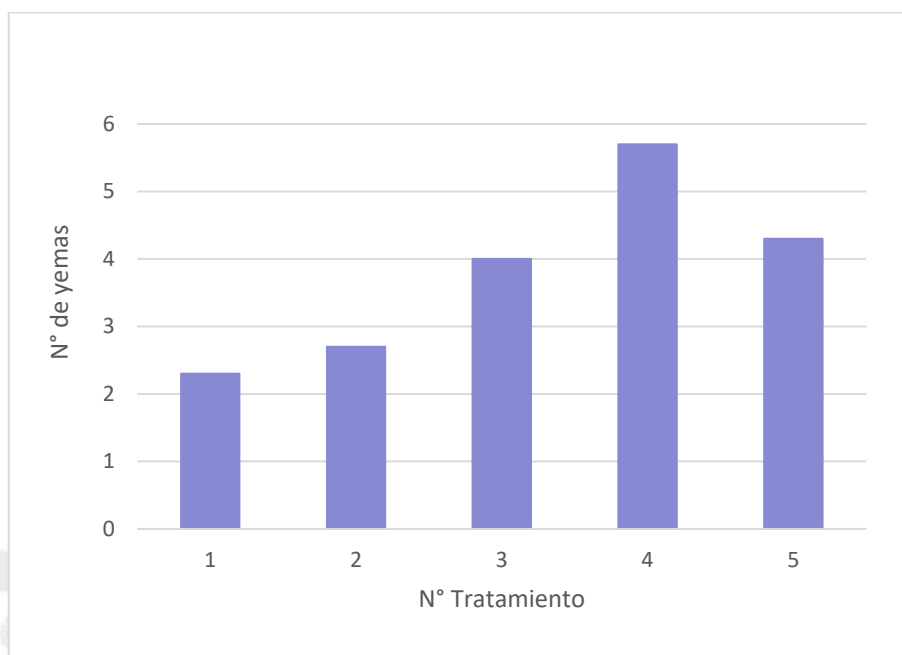


Figura N°11. Número de yemas obtenidas de cada explantes de *A. porrigens* tratadas con diferentes concentraciones de fitohormonas después de 20 días.

Según trabajos realizados con la misma especie, Bennici et al. (20) encontraron que una alta relación citoquinina:auxina favorece la regeneración de brotes en *Amaranthus*. Gnanaraj et al. (16), utilizaron el medio MS con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal (BAP (0,5-2 mg/L), Kin (0,5-2 mg/L) y BAP (1,5 mg/L) + Kin (0,05-2 mg/L) 0,1 mg/L)) para la generación de brotes múltiples a partir de yemas y segmentos nodales obteniendo el porcentaje más alto ($94,3 \pm 0,43$ %) y el número máximo ($23,4 \pm 0,38$) de inducción de brotes en medio MS suplementado con 2,0 mg/L de BAP a partir de yemas, mientras que el porcentaje más alto ($90,4 \pm 0,82$ %) y número máximo ($15,2 \pm 0,63$) de generación de brotes a partir de segmentos nodales, se observó en medio MS enriquecido con 1,5 mg/L de BAP.

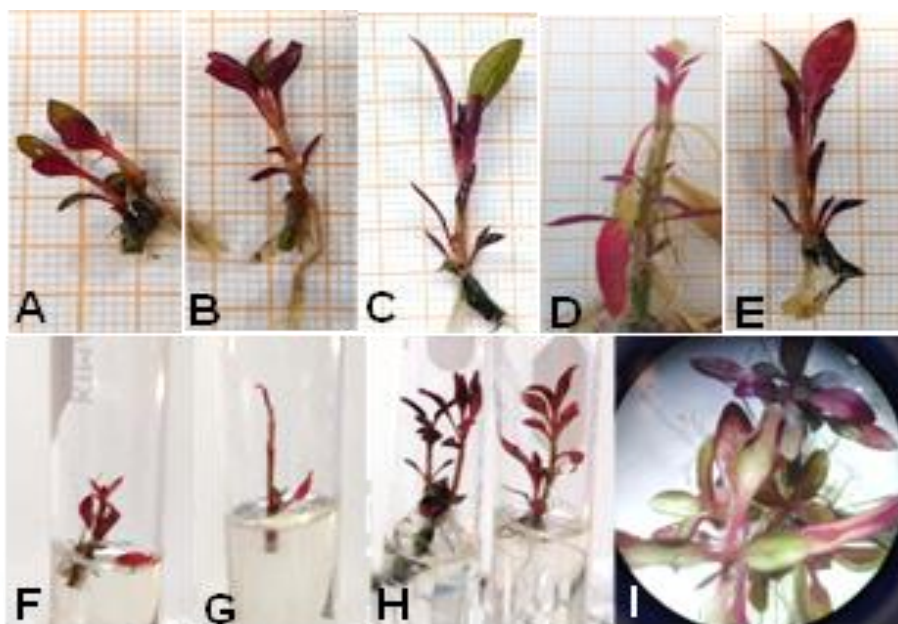


Figura N°12. Efectos de las diferentes concentraciones de AIA y BAP de segmentos nodales de *A. porrigens* cultivados durante 20 días. Elongación del tallo e inducción de brotes de los explantes según los tratamientos A) T1, B) y F) T2, C) y G) T3, D) y H) T4, E) T5. I) Explante *in vitro* visto en el macroscopio.

En este trabajo, se encontró que la combinación de auxina: citoquinina (0.5 mg/L: 1 mg/L) durante 20 días de evaluación tiene concordancia con lo propuesto por Singh et al. (21) donde encontraron una máxima generación de brotes de *Alternanthera sessilis* utilizando medio MS suplementado con 1 mg/L de AIA más 1 mg/L BAP a los 14 días de inoculación en el medio.

5. Determinación de compuestos fenólicos por espectrofotometría

Para la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin Ciocalteu se realizó la curva de calibración a partir de los valores de absorbancia obtenidos de cada concentración de ácido gálico según el procedimiento antes descrito en la Tabla N°6, los ensayos fueron realizados por triplicado bajo las mismas condiciones. En la tabla N°12 se evidencia los valores obtenidos de las absorbancias medidas a 750 nm. Estos datos obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico de regresión lineal con el objetivo de obtener la curva de calibración.

Tabla N° 12. Absorbancias obtenidas con el método Folin-Ciocalteu.

<i>n° tubo</i>	<i>Concentración (mg/)</i>	<i>Absorbancias a 760 nm</i>			<i>Absorbancia promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
		<i>Abs. 1</i>	<i>Abs. 2</i>	<i>Abs. 3</i>		
1	2	0,013	0,013	0,014	0,013	0,00015
2	4	0,034	0,034	0,034	0,034	0,00012
3	6	0,056	0,053	0,055	0,055	0,00191
4	8	0,075	0,079	0,076	0,077	0,00236
5	10	0,105	0,105	0,105	0,105	0,00040

Obtenidas las absorbancias, se realizó la curva de calibración donde se obtuvo la ecuación que vincula las variables de absorbancia y concentración de ácido gálico a través de la aplicación de la técnica estadística de regresión lineal. El análisis de regresión permite predecir el valor de una variable dependiente basado en el valor de una variable independiente (82). En este caso se pudo vincular una variable dependiente “y” (absorbancia) con una variable independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/L). El coeficiente de determinación R^2 indica cual es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.

Se puede observar en la Figura N°13 que la respuesta es lineal ya que se obtiene un coeficiente de determinación cercano a la unidad, indicando que hay una relación directa entre la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto de *Alternanthera porrigens* y la absorbancia.

El contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en los extractos metanólicos obtenido por el método de extracción continua por Soxhlet será expresado en miligramos (mg) de ácido gálico equivalente en 100 g de extracto de *Alternanthera porrigens* (EAG/100 g).

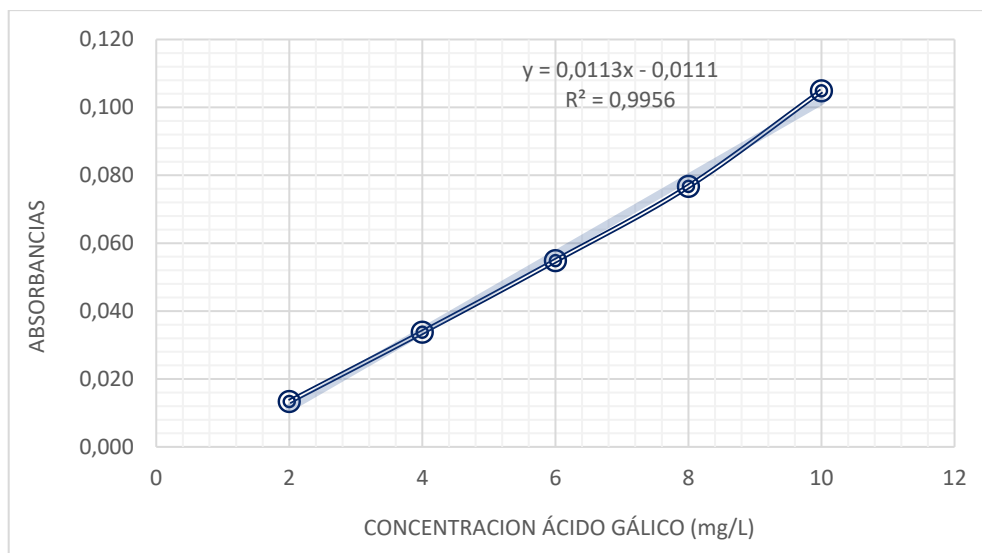


Figura N°13. Curva de calibración para la determinación de polifenoles totales.

Como se observa, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.9956, una pendiente (b) de 0.0113 y un intercepto (a) de -0.0111 por lo que la ecuación de regresión queda de la siguiente manera:

$$y = b(x) + a$$

$$y = 0.0113(x) + (-0,0111)$$

En la Tabla N°13 se muestra los resultados de las absorbancias realizadas por cuadruplicado y las concentraciones finales del extracto metanólico de Moradilla.

Tabla N° 13. Concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto metanólico de *Alternanthera porrigens*.

N°tubo	Absorbancias	Concentración (mg/L)	ppm	Concentración del extracto (mg EAG/g)
1	0,191	17,88	1788,5	6,698
2	0,200	18,68	1868,1	6,997
3	0,169	15,94	1593,8	5,969
4	0,218	20,27	2027,4	7,593
<i>promedio</i>	0,195	18,19	1819,5	6,814

Gonzáles (13), destaca los resultados obtenidos donde la muestra de *A. porrigens* fue tratada con solventes etanólico y acuoso en hojas y flores donde el extracto etanólico de flores de *Alternanthera porrigens* da como resultado $7,4076 \pm 0,1171$ mg EAG/g lo que es comparable al resultado obtenido en este estudio, contrastando a los resultados obtenidos donde las muestras de hojas y flores fueron tratadas con cloroformo obteniendo $2,1089 \pm 0,5112$ mg EAG/g y $0,1115 \pm 0,0733$ mg EAG/g respetivamente.

Según lo realizado por Jara (92), el extracto etanólico de toda la planta *Alternanthera porrigens* resulta $14,0 \pm 0,7$ mg EAG/g de extracto.

Por otro lado, Salvador (93) analizó el contenido fenólico total del extracto etanólico de *Alternanthera tenella* y fue bastante alto en comparación con los resultados de esta investigación, obteniendo $216,36 \pm 3,62$ mg EAG/g de extracto. Esta gran diferencia entre los valores obtenidos puede deberse a que la extracción de *Alternanthera tenella* se realizó primero con hexano y luego con etanol.

Referente a la investigación de Othman (91), el contenido fenólico total del extracto etanólico de *A. sessilis* roja fue de $35,92 \pm 0,70$ mg EAG/g de extracto, y el contenido fenólico total del extracto acuoso fue de $4,46 \pm 0,16$ mg EAG/g de extracto. En cambio, se obtuvieron valores más bajos para *A. sessilis* verde $3,70 \pm 0,21$ mg EAG/g extracto y $0,86 \pm 0,02$ mg EAG/g extracto con los solventes mencionados respectivamente. La diferencia entre estos resultados y los del extracto etanólico de *Alternanthera porrigens* pueden deberse al tratamiento de la muestra, ya que fueron liofilizadas. La liofilización facilita la cuantificación del contenido fenólico total porque preserva la concentración de compuestos presentes en el extracto y la mezcla puede variar muy poco con el tiempo.

6. Identificación de compuestos fenólicos mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase reversa (HPLC-RP)

Como se sabe, en la actualidad los equipos cromatográficos disponen de integradores electrónicos los cuales integran los picos de los perfiles cromatográficos mostrándose la altura y el área de cada pico. Esto se puede utilizar para cuantificar los distintos compuestos siendo el área del pico el más utilizado y en el que se basan los resultados de concentración del ácido vanílico y ácido cafeico.

Primeramente, utilizando la metodología descrita en la sección 2.7.1 se obtuvo la curva de calibración del ácido vanílico (Figura N°14), con un coeficiente R^2 de 0.9998, con una desviación estándar de los replicados de 1,69 %, y con un tiempo de retención entre 10.23 y 10.74 minutos. El uso de la solución amortiguadora en la fase móvil fue necesario para estabilizar el pH de la muestra evitando cambios en la forma o resolución de picos. Los valores de las concentraciones del estándar de ácido vanílico se observan en la Tabla N°14, los cuales se realizaron por duplicado.

Tabla N°14. Áreas y tiempos de retención del estándar ácido vanílico mediante HPLC.

<i>Ácido vanílico (ppm)</i>	<i>R1</i>		<i>R2</i>		<i>Promedio de áreas ± DS</i>
	<i>Área</i>	<i>TR</i>	<i>Área</i>	<i>TR</i>	
20	5286687	10.23	5286687	10.23	5286687 ± 0
40	11189319	10.60	11122642	10.72	11155981 ± 47148
60	16428464	10.73	16477754	10.74	16453109 ± 34853
80	21743675	10.75	21690767	10.79	21717221 ± 37412
100	27001584	10.74	27084210	10.84	27042897 ± 58425
120	32587708	10.78	32671889	10.74	32629799 ± 59525

Con el análisis de regresión lineal de las concentraciones del estándar de ácido vanílico, se pudo obtener la curva de calibración en la Figura N°14, emitida también por el equipo mostrado en el Anexo N°9:

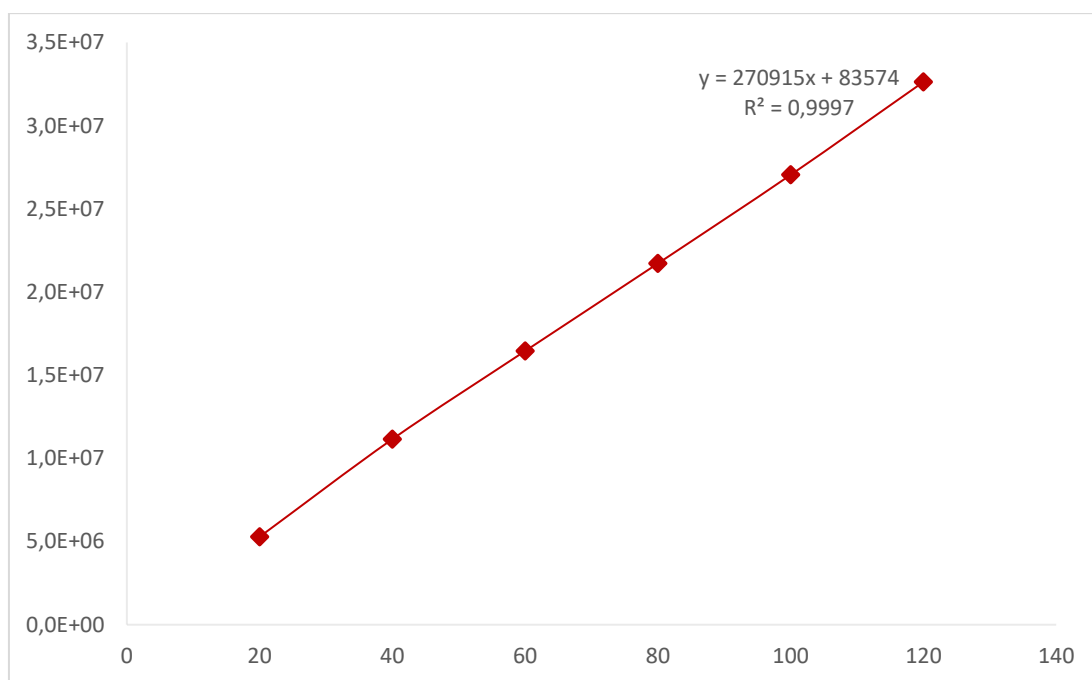


Figura N°14. Curva de calibración del estándar ácido vanílico.

Según los valores obtenidos, el análisis evidencia un R^2 mayor a 0.995 por lo que existe una aceptación de la linealidad indicando una alta correlación entre la concentración y el área.

Se puede obtener además la Ecuación 1 siguiente:

$$Y = 270915 \cdot x + 83574$$

Así mismo, se obtuvo el perfil cromatográfico según las condiciones indicadas en la metodología, se observa la presencia de picos registrados con sus tiempos de retención. Como se puede apreciar los compuestos obtenidos son de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica, siendo que ácido vanílico cuyo tiempo de retención corresponde a los 10.35 ± 0.18 min presente en la muestra estudiada, fue encontrado de acuerdo al estándar empleado del mismo.

Con el análisis de regresión lineal de las concentraciones del estándar de ácido vanílico, se pudo obtener la curva de calibración en la Figura N°15, emitida también por el equipo mostrado en el Anexo N°12:

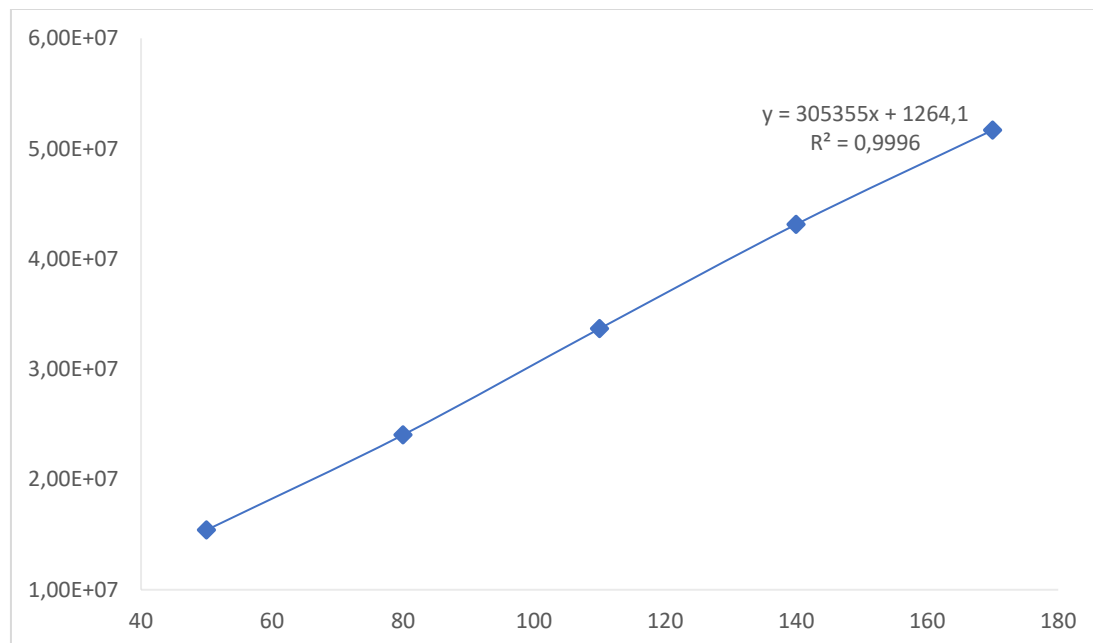


Figura N°16. Curva de calibración del estándar ácido cafeico.

Según los valores obtenidos, el análisis evidencia un R^2 mayor a 0.995 por lo que existe una aceptación de la linealidad indicando una alta correlación entre la concentración y el área.

Se puede obtener además la Ecuación 2 siguiente:

$$Y = 305355 \cdot x + 1264.1$$

De igual manera, se obtuvo el perfil cromatográfico según las condiciones indicadas en la metodología, se observa la presencia de picos registrados con sus tiempos de retención, siendo que ácido cafeico cuyo tiempo de retención corresponde a los 11.80 min presente en la muestra estudiada, fue encontrado de acuerdo al estándar empleado del mismo.

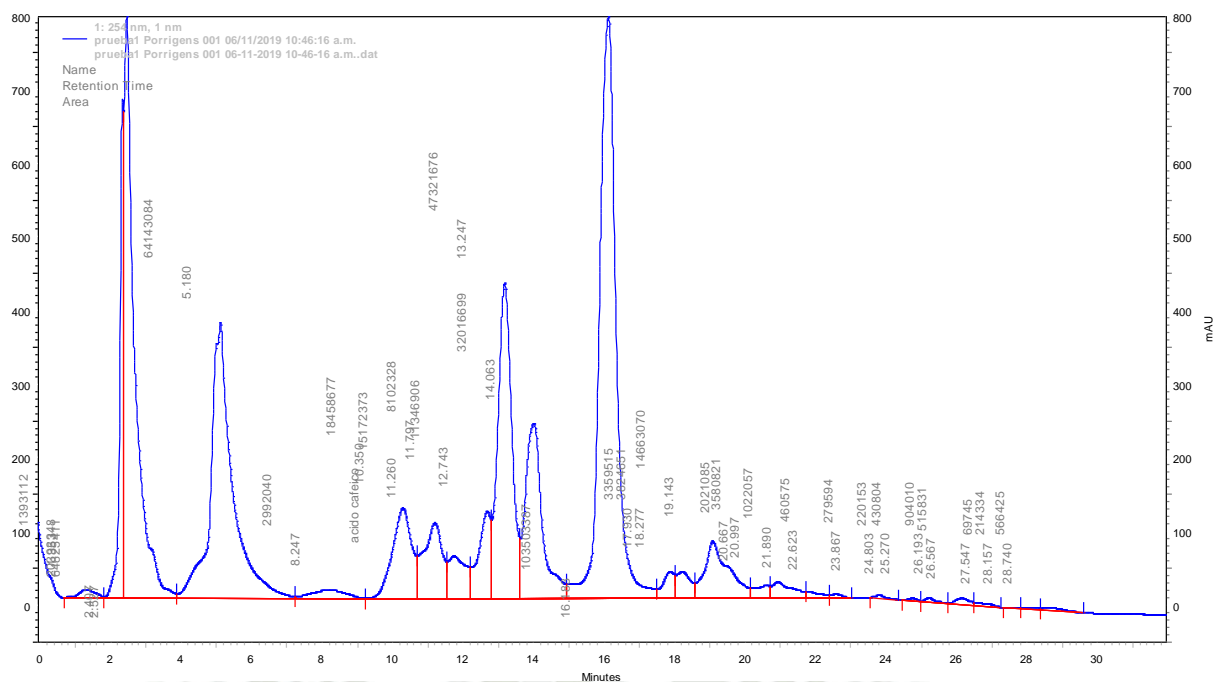


Figura N°17. Cromatograma del ácido cafeico en muestra de Moradilla.

Para la determinación de ácido vanílico y ácido cafeico en el extracto metanólico, se utilizó la metodología descrita en la sección 2.4.1. Se muestra el área de integración con sus respectivos tiempos de retención, mismos que se encuentran en el Anexo N°10 y N°13, los cuales son proporcionados por el equipo HPLC.

Utilizando la expresión lineal de la ecuación 1 y 2, se calculan las concentraciones encontradas de ácido vanílico y ácido cafeico en las muestras de *Alternanthera porrigens*, expresadas en mg AV/g y mg AC/g, visualizadas en la tabla N°17.

Tabla N° 16. Áreas, tiempos de retención y concentración de ácido vanílico y ácido cafeico en muestras de Moradilla.

<i>Extracto</i>	<i>Área</i>	<i>TR</i>	<i>Concentración (mg/g)</i>
<i>Ácido vanílico</i>	18458677	10,35	67.83
<i>Ácido cafeico</i>	8102328	11.80	26.53

Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que el contenido total de polifenoles está estrechamente relacionado con la actividad antioxidante expresada como poder reductor (17) y actividad antioxidante. Esto significa que cuantos más polifenoles haya, mayor será la actividad antioxidante, pero la evaluación y la determinación de compuestos fenólicos dependerán del método utilizado y de los parámetros medidos.

Cabe mencionar que la información respecto a la determinación de estos compuestos fenólicos (ácido vanílico y ácido cafeico) en extractos de *Alternanthera porrigens* y especies relacionadas es muy limitada. Sin embargo, el trabajo realizado por Othman et al., (91) determina 10.36 mg/100g de ácido vanílico presente en toda la planta de *A. sessilis* roja mientras que en logra obtener 10.59 mg/100g de ácido vanílico presente en toda la planta de *A. sessilis* verde. Estos valores son superiores a los obtenidos en este estudio donde solo se obtuvo 6.78 mg/100g de ácido vanílico utilizando un sistema HPLC-ESI-MS.

Por otro lado, Khan et al. (94) lograron identificar y cuantificar compuestos fenólicos del extracto etanólico de *Alternanthera bicolor* mediante el sistema HPLC-DAD, obteniendo 101.27 mg/100 g de ácido cafeico.

Ambos resultados son superiores a los obtenidos en este estudio, reflejando el uso y tipo de sistemas, la fase móvil y los tipos de solventes utilizados para el tratamiento de las muestras.

La mayor cantidad de ácido vanílico en las plantas conocida hasta ahora se encuentra en la raíz de *Angelica sinensis*, (83) una hierba autóctona de China, que se utiliza en la medicina tradicional china. El ácido vanílico se produce por la degradación de la lignina por los hongos que comen madera y la oxidación de la vainillina. tiene propiedades antimicrobianas. El ácido vanílico inhibe la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el crecimiento de *Zymomonas mobilis*. Los metabolitos secundarios del ácido vanílico se utilizan a menudo como aromatizantes.

El ácido cafeico es un compuesto orgánico que es clasificado como un ácido hidroxicinámico. Este sólido amarillo contiene grupos funcionales fenólico y acrílico. Se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales formas de biomasa.

Los compuestos fenólicos de las plantas tienen dentro de sus propiedades las de ser antioxidante, ejercer efectos quelantes y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, actuando en su mayoría en la dieta, como elemento que promueven la salud ante factores químicos y físicos estresantes para el organismo.

Los ácidos: clorogénico, ferúlico y cafeico tienen propiedades antioxidantes *in vitro*, que pudieran contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Investigaciones *in vitro* han revelado que el ácido cafeico y otros compuestos fenólicos como los ácidos sináptico o ferúlico, incubados en presencia de LDL, incrementan la protección de estas lipoproteínas contra la oxidación con la relación cafeico > sináptico > ferúlico. Como se sabe, los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

Así, de cinco especies diferentes de una misma familia, sólo una tiene valores de contenido total bastante elevados, las demás tienen valores muy similares a la planta en estudio. *Alternanthera brasiliana* es valorada por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antimicrobianas. Por estas propiedades, *Alternanthera brasiliana* es conocida en Brasil como "penicilina" o "terramicina". Y como se describe, su contenido fenólico total no es tan alto como cabría esperar de nuestra planta, pero aun así demuestra ser una planta poderosa. Los compuestos fenólicos que se encuentran en las plantas medicinales tienen diversos efectos biológicos, como propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y desempeñan un papel clave en la prevención de determinadas enfermedades. La presencia comprobada de fenólicos en *Alternanthera porrigens* respalda un análisis preliminar del uso tradicional de esta planta en la región andina para aliviar la inflamación.

CONCLUSIONES

1. Se consiguió establecer *in vitro* segmentos nodales de *Alternanthera porrigens* (Moradilla), y se logró determinar compuestos fenólicos de sus extractos mediante la técnica de Folin-Ciocalteu y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de fase reversa (RP-HPLC).
2. Se localizó a la especie *Alternanthera porrigens* en el distrito de Mollebaya región Arequipa y se identificó taxonómicamente.
3. El tratamiento más adecuado para la desinfección superficial de los explantes de *Alternanthera porrigens* fue utilizando etanol al 70% (v/v) e hipoclorito de sodio 2.0% (v/v) durante 2 y 7 minutos de enjuague respectivamente, logrando un promedio del 95% de explantes viables.
4. Se evaluó el efecto de fitohormonas cuyas concentraciones de 0.5mg/L AIA con 1 mg/L BAP fue la combinación que presentó resultados óptimos para la propagación *in vitro* de *A. porrigens*.
5. El contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu en Moradilla en el extracto metanólico obtenidos por el método de extracción continua utilizando Soxhlet fue de 6,81 mg EAG/g de extracto.
6. Se identificaron compuestos fenólicos (ácido cafeico y ácido vanílico) derivados del extracto de Moradilla mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).

RECOMENDACIONES

- Se puede emplear la metodología de propagación propuesta para otras especies medicinales por su factibilidad y fácil aplicación.
- Se recomienda utilizar otros reguladores de crecimiento como las giberelinas (GA1, GA2, GA3) para evaluar el desarrollo de tejidos de manera constante, elongación de raíces, hojas jóvenes, floración, alargamiento de segmentos nodales e inducción en la germinación de semillas.
- Para extraer metabolitos secundarios, es esencial tener en cuenta los disolventes por lo que se recomienda primero utilizar solventes no polares para extraer clorofilas y metabolitos secundarios que no pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos. Luego, se debe utilizar un disolvente polar para extraer los polifenoles de la planta.
- Se recomienda la separación de los extractos mediante LC-MS, que es otra técnica comúnmente utilizada para el análisis de extractos naturales ya que facilita la confirmación rápida y precisa de compuestos químicos.
- Se sugiere realizar ensayos para determinar la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de los fitoconstituyentes de *Alternanthera porrigens*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biológica SdCsl. Informe sobre la Conservación de las Especies Vegetales: Un resumen de los progresos realizados en la implementación de la Estrategia Mundial para la Conservación de las Especies Vegetales (GSPC). Montreal, Quebec, Canadá; 2009.
2. Huie CW. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2002;373(1):23-30.
3. Irshad M, Zafaryab M, Singh M, Rizvi M. Comparative analysis of the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts. *International journal of medicinal chemistry*. 2012;2012.
4. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. *Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden*. 1993;45:1-1286.
5. Franquemont C, Plowman T, Franquemont E, King S, Niezgodá C, Davis W, et al. The ethnobotany of Chinchero, an Andean community in southern Peru. *Fieldiana, botany*. 1990(24).
6. Hundiwale JC, Patil A, Kulkarni M, Patil D, Mali R. A current update on phytopharmacology of the genus *Alternanthera*. *Journal of Pharmacy Research*. 2012;5(4):1924-9.
7. Llellish M, Odar J, Trinidad H. *Guía de Flora de las Lomas de Lima*. 2015.
8. Boro P, Shirma Deka A, Kalita M. Clonal propagation of *Alternanthera sessilis*: A biopharmaceutically potent herbal medicinal plant. *J Phytol Res*. 1998;11:103-6.
9. Perea Dallos M, González T, Campos Mosos HA, Guillot Monroy G, Cogua Suárez JE. *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio*.
10. Gnanaraj WE, ALIAS AJM, Subramanian KM, Nallyan S. *Micropropagation of Alternanthera sessilis (L.) using shoot tip and nodal segments*. 2011.
11. Quipuscoa Silvestre V, Tejada Pérez C, Fernández Ardiles C, Pauca Tanco A, Durand Vera K, Dillon MO. *Diversidad de plantas vasculares de las Lomas de Yuta, provincia de Islay, Arequipa Perú*, 2016. *Arnaldoa*. 2016;23(2):517-46.
12. Bussmann RW, Glenn A, Sharon D. *Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru—can traditional applications provide leads for modern science?* 2010.

13. González Falconí DE. Qualitative phytochemical study, determination of total phenolic content, UV-VIS analysis, and determination of antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Alternanthera porrigens*: Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay; 2020.
14. Mears JA. The nomenclature and type collections of the widespread taxa of *Alternanthera* (Amaranthaceae). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 1977:1-21.
15. PEDERSEN TM. Studies in South American Amaranthaceae V. *Bonplandia*. 2000:83-112.
16. Macbride J. Flora of Peru, Field Mus. Nat Hist Bot Ser. 1937;13.
17. Sánchez I, Sánchez A, Azabache L, Vásquez T, Juárez C, Callirgos L, et al. La Diversidad Biológica en Cajamarca: Visión étnico-cultural y potencialidades. Cajamarca: Gobierno Regional de Cajamarca. 2012.
18. Department P. Diversidad florística de la Loma Mongón, Provincia Casma, Departamento Ancash, Perú.
19. Tene V, Malagon O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(1):63-81.
20. Martínez CEC. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. C Martinez, *Plantas Medicinales de los Andes Ecuatorianos*. 2006:285-96.
21. Salvador MJ, Dias DA. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil.(Amaranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004;1(32):107-10.
22. Cai Y, Sun M, Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(8):2288-94.
23. Gorinstein S, Arnao de Nue I, Arruda P. Alcohol-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1991;39(5):848-50.
24. Ferreira EO, Salvador MJ, Pral EM, Alfieri SC, Ito IY, Dias DA. A new heptasubstituted (E)-aurone glucoside and other aromatic compounds of *Gomphrena agrestis* with biological activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2004;59(7-8):499-505.
25. Brochado CdO, Almeida APd, Barreto BP, Costa LP, Ribeiro LS, Pereira RLdC, et al. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2003;14(3):449-51.

26. Zhou B-N, Blaskò G, Cordell GA. Alternanthin, a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. *Phytochemistry*. 1988;27(11):3633-6.
27. Robertson KR. The genera of Amaranthaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*. 1981;62(3):267-313.
28. Guerra R, Pereira H-A, Silveira L, Olea R. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:1215-9.
29. Tapia-Pérez ME, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R, Osuna L, Meckes M. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity—Part II. *Pharmaceutical biology*. 2003;41(3):180-3.
30. Tanveer A, Khaliq A, Siddiqui MH. A review on genus *Alternanthera* weeds implications. *Pakistan Journal of Weed Science Research*. 2013;19(1).
31. Mroginski LA, Roca WM. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. 1991:19-40.
32. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 2010;258.
33. Pérez Ponce JN, Alvarado Capó Y. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas; 1998. Report No.: 9597122022.
34. Roca W, Mroginski L. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). *Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* CIAT, Cali, Colombia. 1991.
35. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473-97.
36. Chu C-C, WANG C-C, Sun C-S, HSU C, YIN K-C, BI F-Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia sinica*. 1975;18(5):659-68.
37. Gamborg OLC, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*. 1968;50(1):151-8.
38. Tiwari R, Rana C. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*. 2015;3(5):661-70.
39. Kroymann J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current opinion in plant biology*. 2011;14(3):246-51.

40. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*. 2011;6(11):1720-31.
41. Berini JL, Brockman SA, Hegeman AD, Reich PB, Muthukrishnan R, Montgomery RA, et al. Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in plant science*. 2018;9:1257.
42. Tyagi A, Singh B, Thammegowda NKB, Singh NK. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. *Archives of microbiology*. 2019;201(3):295-303.
43. García AÁ, Carril EP-U. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. 2011;2(3).
44. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons; 2002.
45. Taiz L. Eduardo zeiger. *Plant Physiol*. 2009:522-50.
46. Rispaill N, Morris P, Webb KJ. Phenolic compounds: extraction and analysis. *Lotus japonicus handbook*: Springer; 2005. p. 349-54.
47. Matsuura HN, Fett-Neto AG. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*. 2015;2(7):1-15.
48. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, Suarez D. *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia-UNIAGRARIA, Colombia. 2018.
49. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
50. Vattem D, Randhir R, Shetty K. Cranberry phenolics-mediated elicitation of antioxidant enzyme response in fava bean (*Vicia faba*) sprouts. *Journal of food biochemistry*. 2005;29(1):41-70.
51. Jobling M. M. Fingerman & R. Nagabhushanam (eds): *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms*. Springer; 2007.
52. Beart JE, Lilley TH, Haslam E. Plant polyphenols—secondary metabolism and chemical defence: Some observations. *Phytochemistry*. 1985;24(1):33-8.
53. Randhir R, Lin Y-T, Shetty K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*. 2004;39(5):637-46.

54. Lin D, Hu L, You H, Sarkar D, Xing B, Shetty K. Initial screening studies on potential of high phenolic-linked plant clonal systems for nitrate removal in cold latitudes. *Journal of Soils and Sediments*. 2010;10(5):923-32.
55. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*. 2013;72:1-20.
56. Martins N, Barros L, Ferreira IC. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:1-12.
57. Sumczynski D, Kotásková E, Družbíková H, Mlček J. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and *in vitro* digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food chemistry*. 2016;211:339-46.
58. Surco-Laos F, Valle Campos M, Loyola E, Dueñas M, Santos C. Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2016;82(1):29-37.
59. Rani CS, Sudhakar C. Effect of plant growth retardants on growth, yield and economics of kharif pigeonpea (*Cajanus cajan*. L). *International Journal of Chemical Studies*. 2018;6:1495-8.
60. Weidner S, Chrzanowski S, Karamać M, Król A, Badowiec A, Mostek A, et al. Analysis of phenolic compounds and antioxidant abilities of extracts from germinating *Vitis californica* seeds submitted to cold stress conditions and recovery after the stress. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(9):16211-25.
61. Verdaguer D, Jansen MA, Llorens L, Morales LO, Neugart S. UV-A radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown. *Plant science*. 2017;255:72-81.
62. Valenta K, Burke RJ, Styler SA, Jackson DA, Melin AD, Lehman SM. Colour and odour drive fruit selection and seed dispersal by mouse lemurs. *Scientific reports*. 2013;3(1):1-5.
63. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*. 2011;126(4):1821-35.
64. Tsao R, Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2003;1018(1):29-40.

65. Liu Q, Cai W, Shao X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*. 2008;77(2):679-83.
66. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*. 2004;1054(1-2):95-111.
67. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*. 2005;71(2):214-22.
68. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;41(5):1523-42.
69. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*. 2007;30(18):3268-95.
70. Box J. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water research*. 1983;17(5):511-25.
71. Huang W, Xue A, Niu H, Jia Z, Wang J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. *Food chemistry*. 2009;114(3):1147-54.
72. Fernandes AJD, Ferreira MRA, Randau KP, de Souza TP, Soares LAL. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *The Scientific World Journal*. 2012;2012.
73. Martin M, Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005;1090(1-2):16-38.
74. Fallon A, Booth R, Bell L. *Applications of HPLC in Biochemistry*: Elsevier; 1987.
75. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to modern liquid chromatography*: John Wiley & Sons; 2011.
76. Dong MW. The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. *LC-GC North America*. 2013;31(6):472-8.
77. Ozores M. *Cromatografía de líquidos HPLC. Análisis químicos*. 2011.
78. Giri D. *High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications*. Biochemistry. 2015.
79. Brown PR, Weston A. *HPLC and CE: Principles and Practice*: Academic Press; 1997.

80. Pikulthong V, Phakpaknam S, Dechkla M, Teerakathiti T. Optimal medium for watercress (*Alternanthera* sp.) micropropagation. *Suan Sunandha Science and Technology Journal*. 2018;5(2).
81. Preece J, Compton M. Problems with explant exudation in micropropagation. *High-Tech and Micropropagation I: Springer*; 1991. p. 168-89.
82. Chalala M, Alfaro T, Rodríguez L, Carballo C, Rodríguez Ferradá CA, Ramos R, et al. Lavado y desinfección de *Ocimum basilicum* L. var. *lactucaeifolium*. I. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2002;7(2):0-.
82. Kumari, Khushbu, and Suniti Yadav. "Linear regression analysis study." *Journal of the practice of Cardiovascular Sciences* 4.1. 2018. (33).
83. Duke, JA. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, 999 edition. ISBN 978-0-8493-3865-6. Archivado desde el original el 23 de septiembre de 2015.. 1992
84. Riaz U, Kharal MA, Murtaza G, Zaman Q uz, Javaid S, Malik HA, et al. Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress: A mini review. *Pak J Agric Res [Internet]*. 2018;32(1).
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>
85. Damasceno SS, Dantas BB, Ribeiro-Filho J, Antônio M Araújo D, Galberto M da Costa J. Chemical properties of caffeic and ferulic acids in biological system: Implications in cancer therapy. A review. *Curr Pharm Des [Internet]*. 2017;23(20):3015–23.
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>
86. Touaibia M, Jean-François J, Doiron J. Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview. *Mini Rev Med Chem [Internet]*. 2011;11(8):695–713.
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/138955711796268750>
87. Li AS, Bandy B, Tsang SS, Davison AJ. DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds *in vitro*. *Free Radic Res [Internet]*. 2000;33(5):551-66.
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760000301091>
88. Zhang Z-C, Xu M, Sun S-F, Qiao X, Wang B-R, Han J, et al. Metabolic analysis of four phenolic acids in rat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]*. 2008;871(1):7–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.019>

89. Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault J-F, Ceccaldi BC, Brunerie P, et al. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* [Internet]. 1996;50(2–3):107–13. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01552-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(96)01552-0)
90. Neha Sharma, Nishtha Tiwari, Manish Vyas, Navneet Khurana, Arunachalam Muthuraman, Puneet Utreja. An overview of therapeutic effects of vanillic acid [Internet]. Disponible en: <https://www.plantarchives.org>
91. Othman A, Ismail A, Hassan FA, Yusof BNM, Khatib A. Comparative evaluation of nutritional compositions, antioxidant capacities, and phenolic compounds of red and green sessile joyweed (*Alternanthera sessilis*). *J Funct Foods* [Internet]. 2016;21:263–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.014>
92. Gutierrez M, Jara A, Rodriguez Y, Cornejo J, Cazar M, Astudillo L. Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador. En: Proceedings of The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. Basel, Switzerland: MDPI; 2013.
93. Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, De Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z Naturforsch C* [Internet]. 2006;61(1–2):19–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2006-1-204>
94. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. En: *Oxidants and Antioxidants Part A*. Elsevier; 1999. p. 152–78.

ANEXOS

Anexo N°1. Constancia del Análisis Taxonómico de *Alternanthera Porrigens*.



INSTITUTO CIENTÍFICO MICHAEL OWEN DILLON (IMOD)

Investigación, Conservación, Educación, y Transformación de Recursos
Reconocido por Resolución de Dirección General Nro. 140-2016-SERFOR/DGGSPFFS



"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN DE MUESTRAS N° 005-2019

El Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD).

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por la Universidad Católica de Santa María con RUC 20141637941, para la ejecución del proyecto: "Estudio Comparativo del Perfil Antioxidante de extractos vegetales de diferentes especies de *Alternanthera*. Protección de compuestos activos por micropencapsulación y obtención de colorantes naturales", recolectada en el distrito de Mollebaya, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa con coordenadas 16°29'54,6"S 71°28'08,5"O, fue determinada taxonómicamente en las Instalaciones del Herbario del Instituto Científico Michael Owen Dillon, "Herbario Sur Peruano" (HSP), y corresponden a:

Clase: Equitopsida
SubClase: Magnoliidae
Orden: Caryophyllales
Familia: Caryophyllaceae
Género: *Alternanthera*
Especie: *Alternanthera porrigens* (Jacq.) Kuntze

La clasificación se ha realizado según la propuesta por el grupo Angiosperm Phylogeny Group en "An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG IV" (2016).

Se expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Arequipa, 24 de abril del 2019.



Ms. Cs. Bigo. Víctor Quipuscoa Silvestre
C. B. P. N° 2484
Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD)
Herbario Sur Peruano (HSP)
vquipuscoas@hotmail.com
vquipuscoa@imod.org.pe

Dirección: Av. Jorge Chávez No. 610 Cercado, Arequipa - Perú
Correo: imod.per@gmail.com

Anexo N°2. Componentes de soluciones stock del Medio de Cultivo MS utilizado

El Medio de Cultivo MS se realizó con las siguientes sustancias:

Tabla N°1. Compuestos para la elaboración de solución stock de macronutrientes.

Macronutrientes	
	mg/L
(NH ₄)NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440

Se utilizó 100 mL de la solución stock de macronutrientes para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Tabla N°2. Compuestos para la elaboración de solución stock de micronutrientes.

Micronutrientes	
	mg/L
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KI	0,83

Se utilizó 10 mL de la solución stock de micronutrientes para preparar 1 L de medio de cultivo MS

Tabla N°3. Compuestos para la elaboración de solución stock de micronutrientes (Hierro y EDTA).

Micronutrientes	
	mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3

Se utilizó 10 mL de la solución stock de Hierro quelado para preparar 1 L de medio de cultivo MS

Tabla N°4. Compuestos para la elaboración de solución stock de vitaminas.

Vitaminas	
	mg/L
mioinositol	100
Tiamina HCl	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0
Piridoxina HC	0,5

Se utilizó 10 mL de la solución stock de vitaminas para preparar 1 L de medio de cultivo MS

Tabla N°5. Compuestos utilizados como fuente de carbono y agente gelificante.

	g/L
Sacarosa	30
Agar	7,5

Todas las soluciones se prepararon sobre un 70% de agua del volumen final deseado, y sobre ella se van añadiendo uno por uno todos los componentes hasta su completa disolución. Posteriormente se ajusta el volumen final con agua y se almacenan.

Anexo N°3. Establecimiento *in vitro* de *Alternanthera porrigens*.



Figura N°1. Explantes de Moradilla para las pruebas de desinfección.

Anexo N°4. Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de los explantes según las pruebas de desinfección.

	Test	P-Value
Levene's	1.65988	0.1355

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	29489.2	12	2455.77	153.24	0.0000
Within groups	416.687	26	16.0256		
Total (Corr.)	29885.9	38			

Prueba	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum
P1	3	0	0	%	0
P2	3	3.33333	2.88675	86.6025%	0
P3	3	10.0	0	0%	10.0
P4	3	21.6667	2.88675	13.3235%	20.0
P5	3	20.0	5.0	25.0%	15.0
P6	3	30.0	5.0	16.6667%	25.0
P7	3	21.6667	2.88675	13.3235%	20.0
P8	3	40.0	5.0	12.5%	35.0
P9	3	51.6667	2.88675	5.58726%	50.0
P10	3	63.3333	5.7735	9.11606%	60.0
P11	3	50.0	5.0	10.0%	45.0
P12	3	78.3333	2.88675	3.68521%	75.0
P13	3	91.6667	5.7735	6.29837%	85.0
Total	39	37.0513	28.0441	75.6899%	0

Prueba	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
P1	0	0		
P2	5.0	5.0	-1.22474	
P3	10.0	0		
P4	25.0	5.0	1.22474	
P5	25.0	10.0	0	
P6	35.0	10.0	0	
P7	25.0	5.0	1.22474	
P8	45.0	10.0	0	
P9	55.0	5.0	1.22474	
P10	70.0	10.0	1.22474	
P11	55.0	10.0	0	
P12	80.0	5.0	-1.22474	
P13	95.0	10.0	-1.22474	
Total	95.0	95.0	1.34667	-0.922125

Anexo N°5. Análisis de varianza para la Altura de segmentos nodales en la fase de multiplicación *in vitro* de *Alternanthera porrigens* (Moradilla)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.26667	4	1.06667	16.84	0.0002
Within groups	0.633333	10	0.0633333		
Total (Corr.)	4.9	14			

Prueba 2	Count	Average	Standard deviation	Cerf. of variation
P1	3	1.13333	0.208167	18.3676%
P2	3	1.53333	0.251661	16.4127%
P3	3	1.93333	0.208167	10.7672%
P4	3	2.66667	0.152753	5.72822%
P5	3	2.23333	0.378594	16.952%
Total	15	1.9	0.591608	31.1373%

Prueba 2	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
P1	0.9	1.3	0.4	-0.914531	
P2	1.3	1.8	0.5	0.41407	
P3	1.7	2.1	0.4	-0.914531	
P4	2.5	2.8	0.3	-0.6613	
P5	1.8	2.5	0.7	-1.12932	
Total	0.9	2.8	1.9	-0.0264324	-0.911983

Anexo N°6. Análisis de varianza para la generación de numero de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de *Alternanthera porrigens* (Moradilla)

Test	P-Value
Levene's	0.5232

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21.7333	4	5.43333	2.04	0.1648
Within groups	26.6667	10	2.66667		
Total (Corr.)	48.4	14			

Prueba 2	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation
P1	3	2.33333	1.52753	65.4654%
P2	3	2.66667	0.57735	21.6506%
P3	3	4.0	2.0	50.0%
P4	3	5.66667	1.52753	26.9563%
P5	3	4.33333	2.08167	48.0384%
Total	15	3.8	1.85934	48.93%

Prueba 2	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
P1	1.0	4.0	3.0	0.6813	
P2	2.0	3.0	1.0	-1.22474	
P3	2.0	6.0	4.0	0	
P4	4.0	7.0	3.0	-0.6613	
P5	2.0	6.0	4.0	-0.914531	
Total	1.0	7.0	6.0	0.4087	-0.933753

Anexo N°7. Procedimiento de Extracción del material vegetal para determinación de compuestos fenólicos



Figura N°2. Obtención del material vegetal seco de Moradilla.

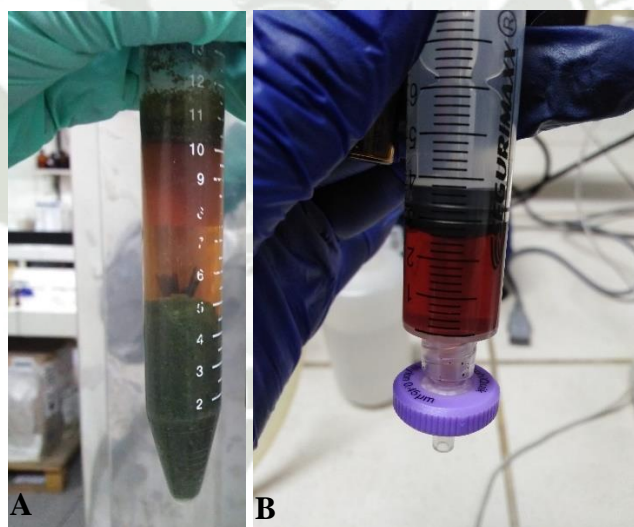


Figura N°3. A) Extracción con solventes mediante sonicación para la determinación cromatográfica. B) Sobrenadante del extracto vegetal.

Anexo N°8. Resultados de áreas y tiempos de retención de la curva de calibración del ácido vanílico mediante HPLC

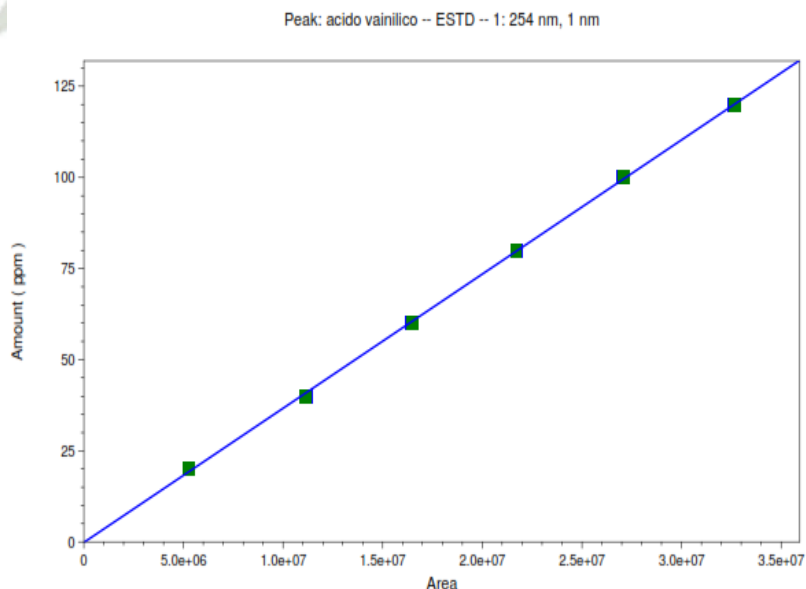
Universidad Católica de Santa María
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad
Area de Análisis Instrumental - HPLC

Seeueneie D:\PROYECTOS HPLC\CONTROL DE CALIDAD\Control de Calidad\Data\labbc xiomara\otros polifenoles\pruebas\CurvaAcido...
Analista analista

1: 254 nm, 1 nm					acido vainilico	acido vainilico	acido vainilico
Sample ID	Sampl...	Vial	Volu...	Total Factor	Retention Time	Area	ESTD Concent...
CurvaAcidoVan...	1	1	15	1.0000	10.23	5286687.00	20.0000
CurvaAcidoVan...	1	1	15	1.0000	10.23	5286687.00	20.0000
CurvaAcidoVan...	1	2	15	1.0000	10.60	11189319.00	40.0000
CurvaAcidoVan...	1	2	15	1.0000	10.72	11122642.00	40.0000
CurvaAcidoVan...	1	3	15	1.0000	10.73	16428464.00	60.0000
CurvaAcidoVan...	1	3	15	1.0000	10.74	16477754.00	60.0000
CurvaAcidoVan...	1	4	15	1.0000	10.75	21743675.00	80.0000
CurvaAcidoVan...	1	4	15	1.0000	10.79	21690767.00	80.0000
CurvaAcidoVan...	1	5	15	1.0000	10.74	27001584.00	100.0000
CurvaAcidoVan...	1	5	15	1.0000	10.84	27084210.00	100.0000
CurvaAcidoVan...	1	6	15	1.0000	10.78	32587708.00	120.0000
CurvaAcidoVan...	1	6	15	1.0000	10.74	32671889.00	120.0000

Min:	10.23	5286687.00	20.0000
Max:	10.84	32671889.00	120.0000
Mean:	10.66	19047615.50	70.0000
Std Dev:	0.21	9666299.77	35.6753
%RSD:	1.93	50.75	50.9647

Anexo N°9. Curva de calibración del estándar ácido vanílico mediante HPLC



acido vainilico (1: 254 nm, 1 nm)
Average RF: 3.67898e-006 RF StDev: 6.22868e-008 RF %RSD: 1.69304
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Replace
Fit Type: Linear
 $y = 3.68287e-006x - 0.179558$
Goodness of fit (r^2): 0.999762

Anexo N°10. Resultados de áreas y tiempos de retención de la curva del ácido vanílico presentes en hojas y tallo de *A. porrigens* mediante HPLC

Universidad Católica de Santa María
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad
Area de Análisis Instrumental - HPLC

Secuencia: D:\PROYECTOS HPLC\CONTROL DE CALIDAD\Control de Calidad\Data\abbc xiomara\otros polifenoles\
Analista: analista

1: 254 nm, 1 nm					acido vainilico	acido vainilico
Sample ID	Sampl...	Vial	Volu...	Total Factor	Retention Time	Area
CurvaAcidoVan...	1	1	15	1.0000	10.23	5286687.00
CurvaAcidoVan...	1	1	15	1.0000	10.23	5286687.00
CurvaAcidoVan...	1	2	15	1.0000	10.60	11189319.00
CurvaAcidoVan...	1	2	15	1.0000	10.72	11122642.00
CurvaAcidoVan...	1	3	15	1.0000	10.73	16428464.00
CurvaAcidoVan...	1	3	15	1.0000	10.74	16477754.00
CurvaAcidoVan...	1	4	15	1.0000	10.75	21743675.00
CurvaAcidoVan...	1	4	15	1.0000	10.79	21690767.00
CurvaAcidoVan...	1	5	15	1.0000	10.74	27001584.00
CurvaAcidoVan...	1	5	15	1.0000	10.84	27084210.00
CurvaAcidoVan...	1	6	15	1.0000	10.78	32587708.00
CurvaAcidoVan...	1	6	15	1.0000	10.74	32671889.00
prueba1 Porrig...	1	2	15	1.0000	10.35	18458677.00

Min:	10.23	5286687.00
Max:	10.84	32671889.00
Mean:	10.63	19002312.54
Std Dev:	0.21	9256218.77
%RSD:	2.02	48.71

Anexo N°11. Resultados de áreas y tiempos de retención de la curva de calibración del ácido cafeico mediante HPLC

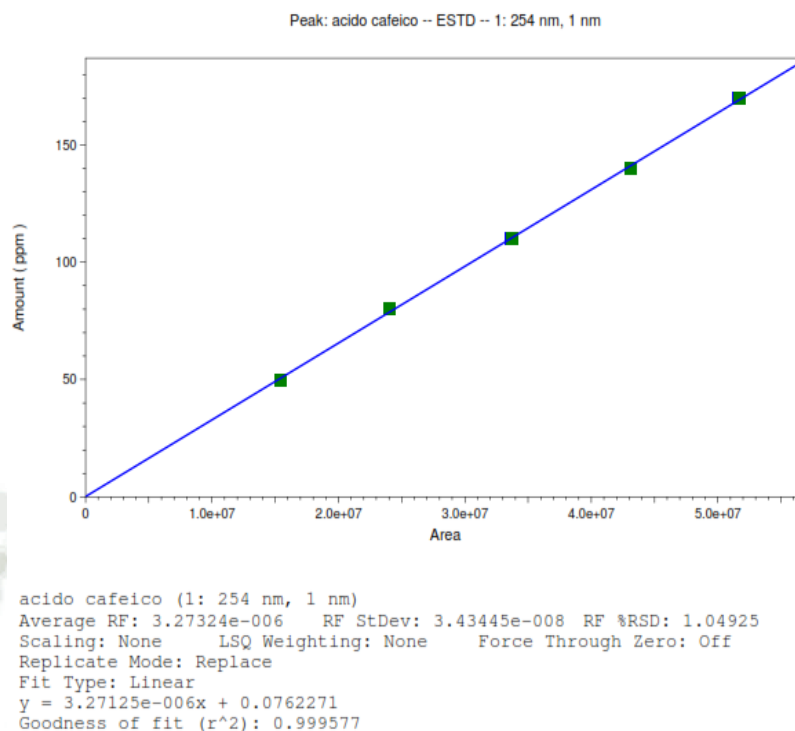
Universidad Católica de Santa María
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad
Area de Análisis Instrumental - HPLC

Secuencia: D:\PROYECTOS HPLC\CONTROL DE CALIDAD\Control de Calidad\Data\abbc xiomara\otros polifenoles\pruebas\CurvaCafei...
Analista: analista

1: 254 nm, 1 nm					acido cafeico	acido cafeico	acido cafei...
Sample ID	Sampl...	Vial	Volu...	Total Factor	Retention Time	Area	ESTD Concent...
CurvaCafeico 2...	1	1	15	1.0000	11.37	15419650.00	50.0000
CurvaCafeico 2...	1	1	15	1.0000	11.37	15419650.00	50.0000
CurvaCafeico 2...	1	2	15	1.0000	11.52	24032626.00	80.0000
CurvaCafeico 2...	1	2	15	1.0000	11.63	24053976.00	80.0000
CurvaCafeico 2...	1	3	15	1.0000	11.60	33662848.00	110.0000
CurvaCafeico 2...	1	3	15	1.0000	11.73	33694931.00	110.0000
CurvaCafeico 2...	1	5	15	1.0000	11.17	43130266.00	140.0000
CurvaCafeico 2...	1	5	15	1.0000	11.17	43130266.00	140.0000
CurvaCafeico 2...	1	4	15	1.0000	11.53	51642654.00	170.0000
CurvaCafeico 2...	1	4	15	1.0000	11.23	51716146.00	170.0000

Min:	11.17	15419650.00	50.0000
Max:	11.73	51716146.00	170.0000
Mean:	11.43	33590301.30	110.0000
Std Dev:	0.20	13658971.58	44.7214
%RSD:	1.73	40.66	40.6558

Anexo N°12. Curva de calibración del estándar ácido cafeico mediante HPLC



Anexo N°13. Resultados de áreas y tiempos de retención de la curva del ácido cafeico presentes en hojas y tallo de *A. porrigens* mediante HPLC

Universidad Católica de Santa María
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad
Area de Análisis Instrumental - HPLC

Seeueneia D:\PROYECTOS HPLC\CONTROL DE CALIDAD\Control de Calidad\Data\abbc xiomara\otros polifenoles\
Analista analista

1: 254 nm, 1 nm					acido cafeico	acido cafeico
Sample ID	Sampl...	Vial	Volu...	Total Factor	Retention Time	Area
CurvaCafeico 2...	1	1	15	1.0000	11.37	15419650.00
CurvaCafeico 2...	1	1	15	1.0000	11.37	15419650.00
CurvaCafeico 2...	1	2	15	1.0000	11.52	24032626.00
CurvaCafeico 2...	1	2	15	1.0000	11.63	24053976.00
CurvaCafeico 2...	1	3	15	1.0000	11.60	33662848.00
CurvaCafeico 2...	1	3	15	1.0000	11.73	33694931.00
CurvaCafeico 2...	1	5	15	1.0000	11.17	43130266.00
CurvaCafeico 2...	1	5	15	1.0000	11.17	43130266.00
CurvaCafeico 2...	1	4	15	1.0000	11.53	51642654.00
CurvaCafeico 2...	1	4	15	1.0000	11.23	51716146.00
prueba1 Porrig...	1	2	15	1.0000	11.80	8102328.00
					Min:	8102328.00
					Max:	51716146.00
					Mean:	31273212.82
					Std Dev:	15065478.54
					%RSD:	48.17