

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL FRUTO *Quararibea cordata* ZAPOTE.

Tesis presentada por el Bachiller:

Coa Sarmiento, Miguel Angel

para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Mg. Paredes Fuentes, Julitza

Arequipa - Perú

2022

DICTAMEN APROBATORIO

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000018397
N° Trámite en Fac. 1706-2017
Fecha 17-04-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL.

DE: COA SARMIENTO, Miguel Angel

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE in vitro DEL FRUTO Quercubus cordata "Zapote"

DICTAMINADORES 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 2) Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminador del Plan de Tesis presentado por los recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, registrando en cambio el título a: **"DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE in vitro DEL FRUTO Quercubus cordata "Zapote"**, y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con sus trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firmas  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 28/04/2017

ASESOR: Mgtr. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesor del presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, y verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma  Fecha 27 Enero del 2021

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dra. Gaby Josefina Velasco Lozano
- 2) Q.F. Fernando Antero Torres Vela
- 3) Q.F. Juan Andrés Ramirez Orellana

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por el recurrente, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente Trabajo de Investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Firmas  Fecha 23/09/21

JURADOS: Presidente
Vocal
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: Hora: Local: C- 402 (SUN)

DECANO

DEDICATORIAS

Dedicado a nuestro Creador de quien me maravillo en sus obras y virtudes a lo largo de su obra terrenal y celestial. A lo largo de todo este periodo de estudio puedo dar fe de su mano poderosa y darle las gracias por la vida otorgada.

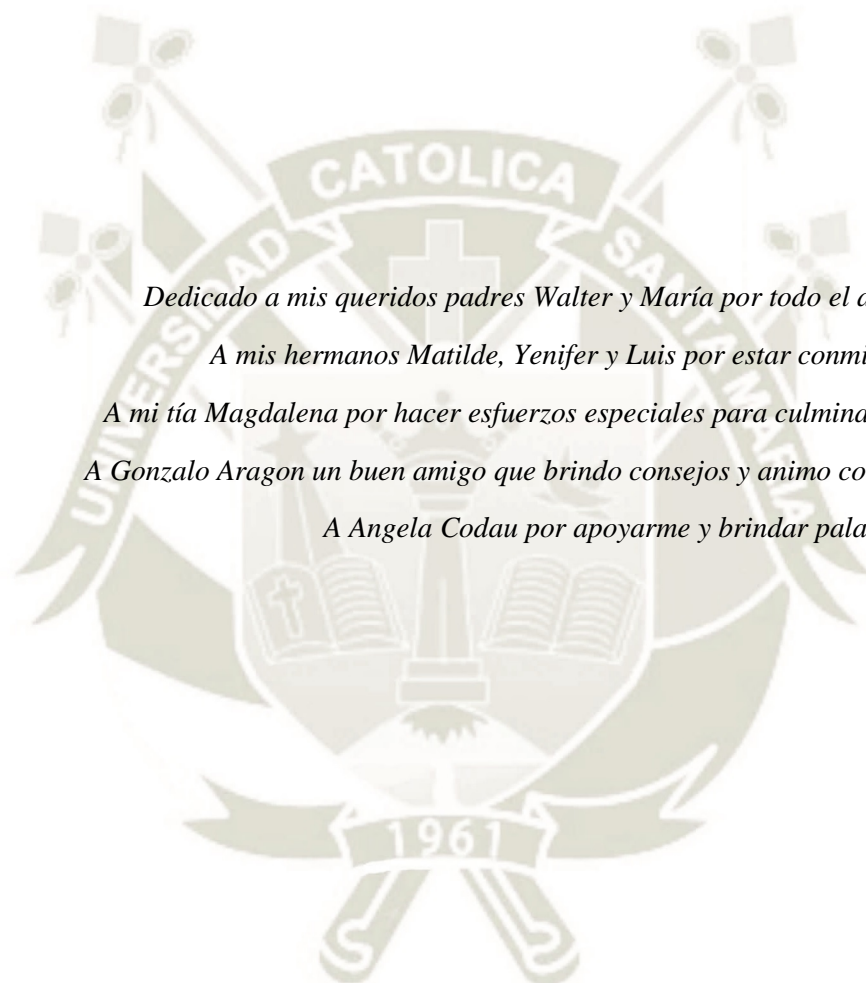
Dedicado a mis queridos padres Walter y María por todo el apoyo brindado.

A mis hermanos Matilde, Yenifer y Luis por estar conmigo y ayudarme.

A mi tía Magdalena por hacer esfuerzos especiales para culminar este proyecto.

A Gonzalo Aragon un buen amigo que brindo consejos y animo con este proyecto.

A Angela Codau por apoyarme y brindar palabras de aliento.



AGRADECIMIENTO

A Mg. Julitza Paredes Fuentes por todo el apoyo científico, dedicación y aliento brindado durante la realización de este proyecto.

A mi familia por estar siempre conmigo.

A mis amigos que dieron de su tiempo para reír y conversar así como ayudar en esta investigación.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica por brindar el apoyo a esta investigación.

Al personal científico de la Universidad Católica de Santa María por ayuda brindada a fin de culminar esta investigación.



RESUMEN

El objetivo de la presente investigación cuantitativa fue evaluar la capacidad antioxidante de la parte comestible de *Quararibea cordata*. (Zapote), así también su correspondiente cantidad de polifenoles totales y la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el mesocarpio mediante los métodos de DPPH, Folin-Ciocalteu y cromatografía en capa fina (TLC) respectivamente.

Se realizó por triplicado extracciones en solución alcohólica, clorofórmica y pentánica de la parte comestible de *Quararibea cordata*, mediante extracción asistida por ultrasonido.

Los resultados obtenidos por el método Folin-Ciocalteu evidenciaron la presencia de 63.51mg GAE/100g en el extracto alcohólico, 46.49mg GAE/100g en el extracto clorofórmico y 28.07mg GAE/100g el extracto pentánico, siendo significativamente mayor (valor- $p < 0.05$) el contenido de fenoles totales en el extracto alcohólico. Para la evaluación del efecto antioxidante se usó el método del radical libre DPPH utilizando como estándar al Trolox alcanzando un valor de 5.4 $\mu\text{mol TE/g}$ de fruta para el extracto alcohólico, 5.3 $\mu\text{mol TE/g}$ de fruta en el extracto clorofórmico y un valor no detectable para el extracto pentánico en ambos casos obtuvieron un valor de 9.6% de inhibición del radical DPPH; no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad antioxidante encontrada en los extractos alcohólico y clorofórmico. *Adicionalmente, las pruebas en cromatografía en capa fina mostraron la presencia de flavonoides, taninos y cumarinas como los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en el mesocarpio de Quararibea cordata. (Zapote).*

Se concluye que el fruto de *Quararibea cordata* (Zapote) presenta capacidad antioxidante, tiene presencia de polifenoles, lo cual confirma las propiedades atribuidas por pobladores de la zona y la sitúa como una fruta que puede llegar a tener un impacto positivo en la salud de la población mediante su inclusión en una dieta y estilo de vida saludable.

Palabras clave: *Quararibea cordata*, fruto amazónico, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante

ABSTRACT

The *Quararibea cordata* (Zapote) is an exotic fruit typical of the Peruvian Amazon that is consumed regularly by the local population due to its seasonal availability and its own characteristics of flavor and presentation. Therefore, the present investigation sought to quantitatively evaluate the presence of total polyphenols in the mesocarp of *Quararibea cordata*. (Zapote), as well as its corresponding antioxidant capacity and the identification of the main groups of secondary metabolites.

Extractions in alcoholic, chloroformic and pentanic solution of the mesocarp of *Quararibea cordata* were carried out in triplicate, likewise the content of total phenols was determined by the Folin-ciocalteu method and the antioxidant capacity by the DPPH method and thin layer chromatography (TLC).

The result with the method of Folin-Ciocalteu in the alcoholic extract was 60.51mg GAE / 100g of fruit, the chloroform extract was 46.49mg GAE / 100g of fruit and the pentane extract obtained the value of 28.07mg GAE / 100g of fruit. The antioxidant effect observed in *Quararibea cordata* (Zapote) was 5.4 $\mu\text{mg TE / g}$ of fruit for the alcoholic extract, in the chloroform extract 5.3 $\mu\text{mg TE / g}$ of fruit was obtained and for the pentane extract the result was not detectable in both cases the inhibition of DPPH radical was 9.6%. The highest value of them being the alcoholic extract. Secondary metabolites were identified as flavonoids, tannins, and coumarins by the thin-layer chromatography test. Therefore it can be said that *Quararibea cordata*. (Zapote) has total phenol content, quantifiable antioxidant capacity and presence of flavonoids, tannins and coumarins.

It is concluded that the fruit of *Quararibea cordata* (Zapote) has the presence of polyphenols and has antioxidant capacity, which confirms the properties attributed by residents of the area and places it as a fruit that can have a positive impact on the health of the population by including them in a healthy diet and lifestyle.

Key words: *Quararibea cordata*, Zapote, amazonic fruit, phenolic compounds, antioxidants, flavonoids, tannins, cumarines.

INDICE GENERAL

DICTAMEN APROBATORIO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCION.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I:.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. <i>Quararibea cordata</i> . (Zapote).....	55
1.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL.....	5
1.1.2. SINONIMIA.....	5
1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
1.1.3.1. ARBOL.....	5
1.1.3.2. TALLOS.....	6
1.1.3.3. HOJAS.....	6
1.1.3.4. INFLORESCENCIA.....	6
1.1.3.5. FRUTO.....	7
1.1.3.6. SEMILLAS.....	7
1.1.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	7
1.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	7
1.1.6. USOS Y PROPIEDADES.....	9
1.2. POLIFENOLES.....	9
1.2.1. BENEFICIOS DE LOS POLIFENOLES.....	12
1.2.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (FOLIN-CIOCALTEU).....	13
1.3. ANTIOXIDANTES.....	14
1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	15
1.3.1.1. ANTIOXIDANTES ENDOGENOS.....	15
1.3.1.2. ANTIOXIDANTES EXOGENOS.....	15
1.3.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS.....	16

1.3.3.DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	17
1.3.3.1. METODO DPPH.....	17
1.3.3.1.1. FUNDAMENTO	17
1.4. ESTRÉS OXIDATIVO	18
1.5. RADICALES LIBRES	19
1.6. LIOFILIZACION.....	21
1.6.1.PRINCIPIOS FISICOS DE LA LIOFILIZACION	22
1.6.2.VENTAJAS DE LA LIOFILIZACION.....	23
1.6.3.DESVENTAJAS DE LA LIOFILIZACION	24
CAPITULO II.....	25
2.1 MATERIALES Y METODOS.....	25
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
2.1.2. <i>Quararibea cordata</i>	25
2.2 MATERIALES	25
2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO	26
2.4 REACTIVOS.....	316
2.5 OTROS	26
2.6 METODOS.....	26
2.6.1 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	26
2.6.1.1 LIOFILIZACION DEL MATERIAL VEGETAL	26
2.6.1.2 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS	27
2.6.1.3 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS ALCOHOLICO, CLOROFORMICO Y PENTANICO	27
2.6.2 DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS	27
2.6.2.1 PREPARACION DE SOLUCION STOCK ACIDO GALICO	29
2.6.2.2. CURVA DE CALIBRACION.....	29
2.6.3. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DPPH	30
2.6.3.1 PREPARACION DEL RADICAL DPPH.....	310
2.6.3.2. PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE TROLOX.....	310
2.6.3.3 CURVA DE CALIBRACION.....	31
2.6.4 ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	31
2.6.4.1.FUNDAMENTO	32
2.6.4.2 PROCEDIMIENTO.....	32
2.6.4.3 FACTOR DE RETENCION	313

2.6.4.4 IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS	34
CAPITULO III.	36
3.1 OBTENCION DE LIOFILIZADO DE <i>Quararibea cordata</i> (zapote).....	36
3.2 EXTRACCION EN DIFERENTES SOLVENTES	37
3.2.1 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	38
3.3 DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES.....	38
3.4 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	43
3.5 ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	47
3.5.1 IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA GENERAL	48
3.5.2 IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE FLAVONOIDES.....	49
3.5.3 IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE CUMARINAS	50
3.5.4 IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE TANINOS.....	51
CONCLUSIONES.....	6753
RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.54
REFERENCIA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS.....	¡Error! Marcador no definido.2

INDICE DE ANEXOS

Fotografía 1 Mesocarpio de zapote fresco

Fotografía 2 Mesocarpio de zapote liofilizado

Fotografía 3 Aplicación de ultrasonido o sonicación

Fotografía 4 Pesada de muestra liofilizada

Fotografía 5 Primera extracción con solvente

Fotografía 6 Extracción con solvente hasta agotamiento

Fotografía 7 Recolección de muestra alcohólica

Fotografía 8 Recolección de muestra clorofórmica

Fotografía 9 Recolección de muestra pentánica

Fotografía 10 Extracto obtenido

LISTADO DE ABREVIATURAS

DPPH: *2,2-difenil-1-picril-hidrazilo*

CFT: Compuestos fenólicos totales

TROLOX: *6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo-2-acido carboxílico*

TE: Equivalente trolox

GAE: Equivalente de ácido gálico

SOD: Superóxido dismutasa

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a trolox

ROS: Especies reactiva de oxígeno

RNS: Especies reactiva de nitrógeno

EtOH: Etanol

INTRODUCCION

La Amazonia del Perú es una región con múltiples recursos naturales que necesitan ser conocidos para obtener de ellos soluciones a los desafíos de la alimentación y nutrición de la población en el presente siglo XXI. Es por ello que actualmente existe una gran tendencia hacia la búsqueda de alimentos con potencial nutritivo así también el interés de las personas por el cuidado de su salud debido a la situación mundial de pandemia.

Los compuestos fenólicos tienen demostrada capacidad antioxidante que ha despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional debido a su actuación frente a diversas enfermedades degenerativas como la diabetes mellitus, enfermedades coronarias, inflamación, infarto, reumatismo, Alzheimer, cáncer, enfermedades digestivas todas ellas relacionadas con un aumento de los radicales libres ^[1].

Cabe mencionar que los frutos de la región Amazónica del Perú aunque exóticos están en constante estudio científico siendo esta la razón que la presente investigación aborda al fruto zapote (*Quararibea cordata*), curiosamente conocida también como zapote del Perú, debido a que existe un desconocimiento de sus principales características como alimento para la población. La revalorización de esta fruta, poco conocida fuera de sus regiones de origen, llegaría a ser de gran apoyo para el poblador rural del interior del Perú. Esta fruta se consume mayormente en forma natural sin mayor grado de procesamiento y en menor proporción como saborizante de yogures.

La fruta presenta formas ovoides a elípticas que se presenta de forma solitaria o en grupos sostenidas por las ramas antiguas, sostenido por un pedúnculo muy fuerte, es de color marrón verdoso, pulverulento, con el cáliz persistente en forma de pezón ^[2].

Dentro de todo el conjunto de frutas nativas amazónicas, el zapote podría proporcionar materias antioxidantes, ácidos, colores, aromas y sabores que son indicadores de calidad y factores determinantes en su aceptación los cuales están en espera de su identificación y posterior explotación por la industria para elaborar productos novedosos y competitivos en el mercado. Es importante señalar que el Perú cuenta con diversos motivos que lo ubican como líder global en proveer superalimentos al mundo: posee una gran biodiversidad, cuenta con capacidad exportadora y tiene trazabilidad e innovación con cadenas de procesos transparentes y sostenibles ^[3].

Por ello el motivo y finalidad de esta investigación es encontrar grupos metabólicos secundarios en el mesocarpio del zapote, determinar el contenido de compuestos

fenólicos presentes en el mesocarpio del zapote y demostrar su capacidad antioxidante en extractos de diferente polaridad. Así continuando la tendencia de las últimas décadas es de imperiosa necesidad desarrollar trabajos analíticos que gran parte de investigadores de todo el país han logrado realizar, enfocando su trabajo científico para aumentar el conocimiento de los recursos del Perú.



HIPÓTESIS

Las frutas y verduras han demostrado en su composición química agregados con actividad fisiológica antioxidante beneficiosa como son los compuestos fenólicos es probable que usando técnicas modernas como el método Folin-ciocalteu y el método DPPH se cuantifique el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de la pulpa de *Quararibea cordata* de la selva amazónica peruana.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del fruto *Quararibea cordata* (zapote).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar cuantitativamente el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) en extracto alcohólico, clorofórmico y pentánico.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) en extracto alcohólico, clorofórmico y pentánico.
- Determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en el mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) por cromatografía en capa fina.
- Determinar el rendimiento de las extracciones alcohólicas, clorofórmicas y pentánicas del mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) liofilizado.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. *Quararibea cordata* (Zapote).

1.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

El zapote describe tanto al árbol como al fruto es una especie tropical a subtropical que florece en bosques lluviosos de tierras bajas, húmedas y calientes. En Ecuador se lo puede encontrar desde el nivel del mar hasta los 1200 – 2000 metros. El árbol se desarrolla bien en iluminación adecuada y abundante humedad. La parte comestible son sus frutos pero también se usa su madera para el sector de la construcción [2].



Figura 1.1 Fruta *Quararibea cordata*. (Zapote) recolectada. Fuente propia

1.1.2. SINONIMIA

- *Matisia cordata* Bonpl.
- Sapota-do-Solimoës

1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.3.1. ARBOL

El árbol de zapote presenta un rápido crecimiento, bien derecho y erguido puede alcanzar de 39-44 m que representarían un máximo de 45 m de alto en medio de la naturaleza, más no sobrepasa de 12 m en las áreas de cultivo ; siendo algunas veces corpulento con sus ramas rígidas y rico en látex amarillo con consistencia pegajosa [2].

1.1.3.2. TALLOS

Son herbáceos, cilíndricos; el tallo principal es relativamente grueso (3 a 6 cm diámetro), de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos [2].

1.1.3.3. HOJAS

Las hojas son alternadas, largas pecioladas agrupados en espirales cerca del final de las ramas, cordobrado a suborbicular, 15 – 30 cm de largo y casi tan anchos, membranosos, glabros, con siete nervaduras que surgen de la base [4].

1.1.3.4. INFLORESCENCIA

Se caracteriza por presentar 2 carpelos a diferencia del resto de los géneros de Bombacaceae que regularmente presentan 5 carpelos. Además posee columna estaminal dentada o lavada en la región distal y no claramente digitada. *Quararibea* presenta gran uniformidad con un solo tipo polínico. Flores solitarias opuestas a las hojas o menos frecuentemente en ramas cortas axilares. Botones florales ovoides, lisos, densamente lepidotos. Pedicelos de 1 -1.3cm, finalmente lepidotos, con 3 bracteolas anchamente triangulares-lanceoladas de 2-3mm de longitud, en posición distal a modo de cálculo en el botón y más separadas en la floración. Cáliz de campanulado a infundibuliforme, en vivo verde-amarillento, áspero al tacto, irregularmente lobado, de 2.1-2.3cm de longitud y 1cm de ancho, lóbulos de 0.4-0.6cm de longitud. Corola blanca, con pétalos anchamente espatulados de 3-3.2cm de longitud y 1.6-1.8cm de anchura, en la cara interna con indumento corto, estrellado, densamente dispuesto y en la cara externa con indumento lepidoto mezclado con pelos sedosos. Androceo con columna estaminal blanca, de 2.9 – 3.1 cm, densamente serícea, o lepidoto-serícea, ramas estaminales (lóbulos) de 5-7 mm de longitud y 2-3 mm de anchura, subglabras, erecto-patentes. Tecas de 35 a 40 en forma de “u” invertida, densamente dispuestas en dos series longitudinales en cada rama. Ovario de 3-4 lóculos. Estilo con indumento corto, adpreso-sericeo, estigma disciforme, ligeramente lobulado [4].

1.1.3.5. FRUTO

La fruta presenta un tamaño de 7 a 15 cm de largo por 5 a 15 cm de diámetro, exocarpio o cascara gruesa, coriáceo, pulpa anaranjada, abundante, jugosa, algo fibrosa, con frecuencia se encuentran frutos cuyo peso es apenas 200g (producto de una alta fructificación por árbol) [2].

1.1.3.6. SEMILLAS

Los frutos contienen dos a cinco semillas por cada uno de ellos, con un tamaño de 4 cm x 2.5cm cada una, tienen cotiledones plegados y retorcidos que miden de 25 a 35 mm de largo, 10 a 15 mm de ancho y 7 a 9mm de altura [2].

1.1.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Tabla N° 1.1: Clasificación taxonómica del zapote³.

REINO:	Plantae
DIVISION:	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE:	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN:	<i>Malvales</i>
FAMILIA:	<i>Malvaceae</i>
SUBFAMILIA:	<i>Bombacoideae</i>
GENERO:	<i>Quararibea</i>
ESPECIE :	<i>Quararibea cordata</i> (Bonpland) Vischer

1.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA

En *Quararibea cordata* (zapote) se tienen detectados 22 tipos de carotenoides incluyendo β -caroteno, α -criptoxantina y β -caroteno-5.6-epoxido; además se determinó la presencia de 10 diferentes di-esteres de zeaxantina incluyendo esterres con ácidos grasos insaturados [5].

La *Quararibea cordata* (zapote) es una fruta con fuentes concentradas de minerales, fibra y sustancias fitoquímicas nutritivas^[4]. Se encontró también la presencia de ácidos grasos, poliinsaturados, monoinsaturados y Omega 3. Se puede mencionar los siguiente metabolitos oxidados encontrados en *Quararibea cordata* (zapote), retinaldehído y ácido retinoico, que también son compuestos con actividad biológica. El retinaldehído es la forma esencial de la vitamina A que se necesita para una vista normal, en tanto que el ácido retinoico es necesario para una morfogenia normal, el crecimiento y la diferenciación celular. Entre otros compuestos encontrados también figuran el ácido cafeico, poliaminas, ácido ferúlico, dímeros de proantocianidina y catequinas^[6].

La fruta *Quararibea cordata* (zapote) presento valores pH entre 6.76 y 6.86, también una baja acidez y presencia de ácido ascórbico, azucares, solidos totales^[6]. En la siguiente Tabla N°1.2 se describen los componentes químicos presentes en el zapote.

Tabla N°1.2 Componentes químicos presentes en 100g de la porción comestible

Componentes	Cantidad
Calcio	22 mg
Fosforo	17 mg
Hierro	1.8 mg
Retinol	130 µg
Tiamina	0.02 mg
Riboflavina	0.09mg
Niacina	0.62 mg
Ácido ascórbico	8.9 mg

Fuente: Tablas peruanas de composición de alimentos, centro nacional de alimentación y nutrición

Instituto nacional de Salud, 2009^[8].

Tabla N°1.3 Composición aproximada expresada en % (g/100g de fruta) y valor energético total (Kcal/100g de fruta)

	Cascara	Pulpa	Semillas
Humedad	86.59±0.23	86.97±0.37	36.45±0.6
Cenizas totales	0.73±0.01	0.49±0.01	1.56±0.03
Lípidos totales	1.03±0.02	1.56±0.02	3.1±0.01
Proteínas crudas	0.56±0.01	0.64±0.01	7.05±0.08
Carbohidratos totales	11.09±0.18	10.34±0.18	51.84±0.54
Valor energético total	55.87	57.96	263.46

Fuente: Alessandra Berto et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. Brazil. 2015 ^[9].

1.1.6. USOS Y PROPIEDADES

Quararibea cordata (zapote) es un alimento natural consumido de forma fresca o procesada en bebida, jugos y néctares. La fruta también es servida en postres.

La corteza de *Odontocarya tripetala* es hervida con *Quararibea cordata* y ajíes para eliminar gusanos según la medicina folclórica de la Amazonia ^[10].

La madera de *Quararibea cordata* es usada para la construcción (elaboración de tableros contrachapados), artesanía y como leña ^[11].

1.2. POLIFENOLES

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Ellos son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas. El término “compuestos fenólicos” engloba a todas las sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Los fenoles se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal pues están presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales. Son alimentos ricos en fenoles la cebolla, el te, el vino tinto, el cacao, el

aceite de oliva virgen y alimentos procesados como el galletón con granos integrales [12,13,62,64].

En estos días los polifenoles son usados como ingrediente funcional en la preparación de comidas y suplementos dietéticos. Debido a su importancia por sus propiedades organolépticas y la salud humana, una mejor comprensión de sus estructuras relacionadas a su absorción, metabolismo y biodisponibilidad en el hombre sería de gran ayuda para indicar el potencial terapéutico como agentes terapéuticos y también de gran utilidad para predecir y controlar la calidad del producto. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* confirmaron que los compuestos fenólicos tienen un rol crucial con efectos antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, antitumorales y antiinflamatorios [15,16,17,63].

Los polifenoles se pueden clasificar en dos grandes grupos: los productos naturales son importantes fuentes de compuestos bioactivos.

- No flavonoides
 - a los fenoles no carboxílicos: C6, C6 – C1, C6 – C3.
 - Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C6 – C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.
- Flavonoides (C6 – C3 – C6) formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Tiene los siguientes subgrupos:
 - Antocianos.
 - Flavonas, flavononas y flavanonoles.
 - Flavanoles, taninos condensados y lignanos [16].

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto del resto de alcoholes. La célula ha desarrollado mecanismos para protegerse de la influencia de los radicales libres, así algunos mecanismos antioxidantes son enzimas como la superóxido dismutasa (cataliza la conversión de dos aniones superóxidos a una molécula de peróxido de hidrógeno y oxígeno), enzima catalasa peroxisomica (convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y por esta ruta completa el retiro de ROS iniciado por el SOD) [17]. Como se indicó previamente, los polifenoles son conocidos por ser agentes que pueden atrapar una

gran variedad de ROS (especies reactivas de oxígeno) por mecanismos ya analizados que incluyen atrapamiento directo de ROS, supresión de ROS, formación por inhibición de las enzimas envueltas en su producción, y protección de los sistemas de defensa celular antioxidante. Las frutas, vegetales, granos y hierbas son fuentes comunes de polifenoles. La mayoría de los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas son antioxidantes hidrosolubles. Los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana. Son metabolitos secundarios de plantas con aproximadamente 8,000 variantes en su estructura presentan anillo(s) aromático(s) con uno o más grupos OH. Los compuestos fenólicos están subdivididos en grupos por el número de anillos aromáticos y por los elementos estructurales que ligan esos anillos [18].

Ácidos fenólicos: se distinguen dos clases dependiendo de la estructura: derivado de ácido benzoico (ácido gálico) y derivados de ácido cinámico (ácido cafeico, ferúlico y cumárico). Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzóicos y consisten en uniones *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y ácidos sinápicos. Estos ácidos son raramente encontrados en una forma libre, excepto en los alimentos procesados que pasan por procesos de congelamiento, esterilización o fermentación [19].

Los flavonoides: Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas con una estructura que contiene difenilpropano. Incluyendo las flavonas, flavones, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavoles. Están subdivididos en función a su estructura química. Los flavonoides están presentes naturalmente en la dieta, así como muy presentes en muchas frutas y vegetales y bebidas como por ejemplo las flavanonas se encuentran en grandes cantidades en frutas cítricas como la mandarina, las isoflavonas se encuentra en la soya siendo un recurso consumido en la dieta humana y en la cerveza pueden encontrar las proantocianidinas que le dan su característica astringente [18].

Estilbenos: se caracterizan por tener en su estructura como núcleo 1.2-difeniletileno con sustituyentes hidroxilo y anillos aromáticos, el más representativo del grupo es el trans- resveratrol [18].

Taninos: polifenoles solubles en agua, se dividen en dos grupos hidrosolubles y condensados. Presentan por lo general dos grupos galotaninos y elagitaninos [18].

Diferuloilmetanos: Son un pequeño grupo de compuestos fenólicos estructuralmente tienen dos anillos aromáticos sustituidos por grupos OH, algunos contienen cadenas alifáticas, la curcumina es ejemplo de este grupo ^[18].

Lignan: están formados por 2 unidades fenilpropánicas. Los lignanos son metabolizados a enterodioles y enterolactonas por la microflora intestinal. La linaza es la fuente más alta de lignanos mientras que las frutas contienen poca cantidad de ella ^[18].

En cuanto a la ingesta total de compuestos fenólicos en la dieta, los ácidos fenólicos forman aproximadamente una tercera parte y los flavonoides son los dos tercios restantes. Los flavonoides más abundantes en la dieta son flavanoles (catequina), antocianidinas y sus productos de oxidación. Las principales fuentes de polifenoles son zumo de frutas cítricas, vino, te, café, chocolate y cerveza ^[16].

Las frutas son fuentes adecuadas de polifenoles, quienes son fuentes naturales de antioxidantes con múltiples efectos biológicos. Ellos están presentes en las frutas, semillas, hojas y su cantidad presente depende del cultivo, condiciones del cultivo, maduración de la fruta, tipo, variedad y partes de planta. Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta y la falta de estos tiene impacto en la salud. Los compuestos fenólicos son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua ^[21,22].

Las uvas son fuentes de compuestos fenólicos, así también otros frutos exóticos de la Amazonia tales como jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), tucuma (*Astrocaryum aculeatum*) y jatoba (*Hymenaea stigonocarpa*), aguaje (*Mauritiella aculeata*), açai (*Euterpe oleracea*) mostraron también presencia de compuestos fenólicos lo que le brinda relevancia a sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias ^[20,21, 65, 66].

1.2.1. BENEFICIOS DE LOS POLIFENOLES

Se tiene evidencia que los polifenoles a partir de frutas tropicales pueden tener propiedades fisiológicas beneficiosas, en las que se incluyen un amplio rango de actividades biológicas incluyendo propiedades antioxidantes y antiinflamatorias²³. Los frutos frescos son nutricionalmente equivalentes a porciones pequeñas de frutos secos. Los frutos secos tienen contenido de fibra, compuestos fenólicos y taninos. Se tiene evidencia científica que el consumo regular de los frutos secos aporta calidad de vida ^[26,27, 28].

Debido a que los compuestos fenólicos se encuentran de forma abundante en alimentos vegetales. Este beneficio está relacionado con su capacidad antioxidante, pues gracias a ello tienen la propiedad de eliminar radicales libres [29].

El consumo tanto de verduras y frutas pueden mantener un balance adecuado. Adicionalmente, los polifenoles presentes en las frutas tienen excelentes propiedades como preservantes. Además, su capacidad antioxidante y su habilidad de protección ha sido demostrada frente a las siguientes patologías a continuación descritas y/o actúan contra estas [29,30] :

- Obesidad [18]
- Estrés oxidativo [18]
- Inflamación crónica [18]
- Inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [26]
- Parasitosis [26]
- Disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares [26,31]
- Ciertos tipos de cáncer [24,31]
- Diabetes tipo II [21]
- Osteoporosis [21]
- Disfunción hepática y mitocondrial [27]
- Desordenes visuales [27]
- Diarrea [27]
- Enfermedad de Alzheimer [27]

1.2.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (FOLIN-CIOCALTEU)

El ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu es un método usado para determinar el contenido total de fenoles en frutas secadas [27].

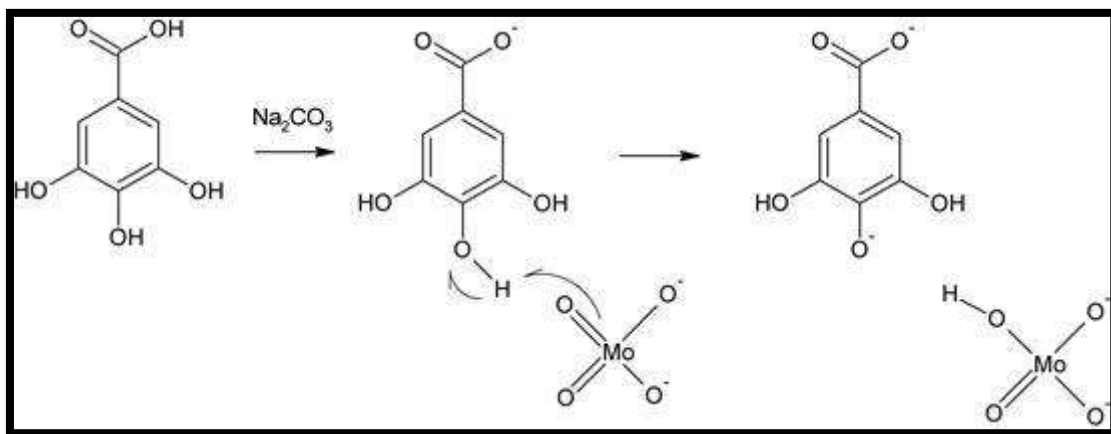


Figura 1.2 Reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con ácido gálico. Fuente: Muñoz B et al ,2017

Este método es también conocido como el método del ácido gálico equivalente (GAE) es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato usado en ensayos colorimétricos de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Tiene la capacidad de medir la cantidad de sustancias que son examinadas para inhibir la oxidación del agente. La naturaleza exacta del FCR es desconocida pero se acepta que contienen complejos de ácido fosfomolibdico y fosfotungstico. El sistema de examen es la mezcla del tungstato y molibdato en un medio altamente básico. Los fenoles son energicamente oxidados en un medio básico resultando en la formación de oxígeno, el cual reacciona con el molibdato con formación de óxido de molibdeno (MoO) obteniendo una absorbancia intensa cerca de 750nm. Este método es preciso, sensitivo y simple, puede ser útil para estandarizar muestras botánicas probando así que las limitaciones y variaciones están apropiadamente controladas. Generalmente se utiliza ácido gálico como un compuesto de referencia así los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico ^[32].

1.3. ANTIOXIDANTES

En las frutas y vegetales hay una mezcla compleja de antioxidantes y otros macro y micronutrientes potencialmente beneficiosos, los cuales pueden funcionar con diferentes cinéticas y dinámicas. La dieta es de importancia para mantener las defensas antioxidantes ya que es la vía de entrada de los compuestos antioxidantes al organismo ^[29,33].

Los antioxidantes son sustancias que ayudan a neutralizar el efecto nocivo que los subproductos llamados radicales libres ejercen en las células y los tejidos.

Su efecto protector ha sido atribuido a la presencia de compuestos con actividad antioxidante en los alimentos consumidos por el hombre. Algunas de sus funciones están el ser captadores de radicales libres, formadores de complejos de metales pro-oxidantes, agentes reductores y desactivadores de la formación de oxígeno singlete. Estos son compuestos químicos que nos ayudan a reducir la oxidación que enfrentamos diariamente, se denominan comúnmente como cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato oxidable, retrasa o impide significativamente la oxidación de ese sustrato ^[17, 30].

1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se clasifican según su origen

1.3.1.1. ANTIOXIDANTES ENDOGENOS

Mecanismos enzimáticos del organismo (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y Coenzima Q). Algunas enzimas necesitan de factores metálicos como selenio cobre o zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular ^[23].

1.3.1.2. ANTIOXIDANTES EXOGENOS

Son introducidos por la dieta y deben ser capaces de neutralizar la acción oxidante de la molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad química. Entre los más importantes presentes en los zumos de frutas se encuentran la vitamina C vitamina E y diversos carotenoides y diversos compuestos fenólicos entre otros ^[34].

Algunas fuentes importantes de estos compuestos son las bayas, frutos secos, frutos cítricos, vinos y bebidas como té y mates (landete) sin embargo, es importante la consulta médica y la correcta prescripción de una dieta balanceada ya que en dosis altas estos antioxidantes podrían actuar como pro oxidantes ^[32].

1.3.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus derivados dependen en el número y la posición de grupos hidroxilo enlazados al anillo aromático, el sitio de unión y la mutua posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático y el tipo de sustituyentes. Así la glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad de secuestros de radicales por los compuestos fenólicos. Las diferencias que existen entre la actividad de secuestro de radicales están distribuidas a las diferencias estructurales de hidroxilación, glicosilación y metoxilación ^[32].

Las disposiciones estructurales que imparten mayor actividad antioxidante son a sustitución 3' y 4' orto-dihidroxi en el anillo "B", las disposiciones en posiciones meta en los carbonos 5' y 7' del anillo "A" y en combinación con los grupos ceto en posición 4' e hidroxilo en posición 3' de la cadena cíclica de tres átomos de carbono. Los grupos orto-dihidroxi estructuralmente son los más importantes por presentar una alta actividad ^[32]. Pueden actuar mediante dos mecanismos:

- a) **COMO CAPTADORES DE RADICALES LIBRES:** los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres; deteniendo las reacciones en cadena en la que estos están implicados. Al ceder ese átomo de hidrógeno se da lugar a la formación de un radical intermedio llamado radical fenoxilo. Este es menos reactivo dado a que se estabiliza por resonancia con los electrones "p" del anillo aromático ^[32].
- b) **COMO QUELANTES DE METALES:** esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos al anillo aromático. De este modo, los orto dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton ^[32].



Sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, la presencia de azúcares y el grado de polimerización determinan sus propiedades tales como la solubilidad y tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno.

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros ^[16].

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. De esta manera los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes ^[31].

1.3.3. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos ha sido extensivamente estudiada a partir de los mecanismos antioxidantes tales como la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): ORAC (del inglés: *oxygen radical absorbance capacity*); transferencia de un electrón (SET): FRAP (del inglés: *ferric reducing hability pf plasma*), CUPRAC (del inglés: *cupric reducing antioxidant capacity*); mixto (HAT y SET): DPPH (donde se emplea el 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (o también conocido como TEAC del inglés: *trolox equivalent antioxidant capacity*) y evaluación de la oxidación lipídica: índice de peróxido, dienos conjugados, valor de p-anisidina, sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS del inglés: *thiobarbituric acid reactive substances*) y compuestos orgánicos volátiles ^[35].

1.3.3.1. METODO DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante de la pulpa de zapote (*Quararibea cordata*) se utilizó el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

1.3.3.1.1. FUNDAMENTO

El ensayo con DPPH es un método indirecto para determinar la actividad antioxidante. El radical DPPH es uno de los pocos radicales estables de nitrógeno orgánico, el cual tiene una coloración púrpura. Es un producto de fácil adquisición y no necesita ser activado como en el caso de otros métodos. En la prueba de DPPH, los antioxidantes fueron capaces de reducir al radical estable DPPH a una coloración amarilla de difenil-picrilhidrazina. El DPPH es utilizado bastante como un agente evaluador de la eliminación de radicales libres por los antioxidantes. Es un radical libre estable que muestra una máxima absorbancia a 517nm. Cuando el

radical DPPH encuentra a un donador de protones como por ejemplo un antioxidante, los radicales pueden eliminarse y la absorbancia se reduce. El test es simple, rápido y solo necesita de un espectrofotómetro UV-VIS para realizarlo, lo cual explicaría su uso generalizado en la detección de antioxidantes. La estabilidad del radical DPPH lo hace muy útil para investigar su capacidad de atrapar radicales libres de los fenoles, catecoles y anilinas ^[31].

El método está basado en la reducción de las absorbancias de la solución en metanol o etanol de DPPH en la presencia de un antioxidante donador de hidrógeno en donde sufre un reordenamiento estructural. Los compuestos fenólicos pueden actuar como donadores de hidrógeno o de electrones en reacciones de este tipo, ya que el radical fenoxilo generado es menos reactivo y se estabiliza por resonancia con los electrones pi del anillo aromático de los compuestos fenólicos, la donación del hidrógeno permite la generación de la forma no radicalaria DPPH-H, que explica el cambio de coloración que ocurre en el mecanismo de reacción del radical y la reacción que ocurre con el antioxidante ^[32].

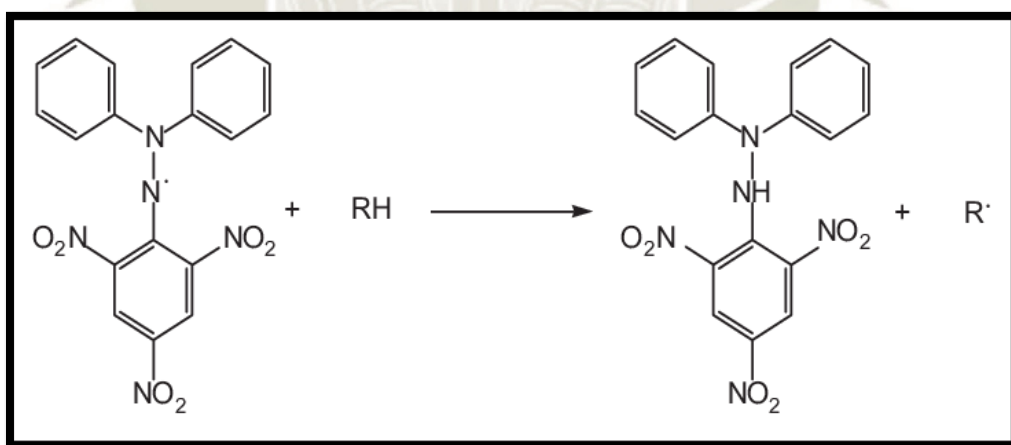


Figura 1.3 Estructura del DPPH y su reducción por un antioxidante

Fuente: La Rosa Toro, Vigo López & Muedas Taipe, 2011.

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo en la etiología de las enfermedades crónicas y degenerativas sugieren que los antioxidantes tanto endógenos y exógenos, son necesarios para proteger los componentes celulares del daño oxidativo. Es un estado de la célula en

la cual se encuentra alterada la homeostasis oxido-reducción intracelular, es decir el balance entre pro-oxidante y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular. Un gran número de enfermedades por ejemplo diabetes tipo II, cáncer, Alzheimer, obesidad e hipertensión están asociadas con la excesiva producción de especies reactivas (especies de oxígeno y nitrógeno) dando como resultado en stress oxidativo. ²⁹ el estrés oxidativo puede llegar a provocar daño celular por una disfunción endotelial y un progresivo deterioro de la salud vascular [36,34,37,16].

1.5. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son moléculas que contienen en su última órbita uno o más electrones desapareados esta característica los hace reaccionar rápidamente con otras moléculas. Los radicales libres son átomos altamente reactivos con capacidad de robar un átomo de las moléculas vecinas. Dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical inevitablemente esta última pasa a ser un radical libre [38,28,39].

Alteraciones fisiológicas y bioquímicas en el cuerpo humano pueden resultar en la sobreproducción de radicales libres provocando daño oxidativo en las biomoléculas. Los radicales libres incluyen superóxido, radical hidroxilo y radical peróxido, generalmente resulta en la degradación de la proteína, peroxidación lipídica y oxidación del ADN, quien ha sido considerada estar ligada a muchas enfermedades crónicas como diabetes, cáncer, y aterosclerosis. Muchos estudios han demostrado que el consumo de frutas y verduras promueve el estado de salud correcto y previene las enfermedades [40,41,42,43].

Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno como los iones superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH), radical óxido nítrico (NO), oxígeno molecular singlete (O_2), radicales peroxinitrito y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) los que son generados por las células durante su metabolismo de varios procesos bioquímicos y fisiológicos [44].

Los radicales más perjudiciales en organismos vivos son los radicales de oxígeno a veces denominado especies de oxígeno reactivas (sobre todo las superóxido,

hidroxilo y perhidroxilo). Las ROS son pequeñas moléculas de oxígeno que participan en las reacciones redox porque tienen una alta reactividad. Las reacciones redox están divididas en dos procesos químicos: oxidación y reducción. Las ROS están compuestas por radicales libres y no-radicales, ambos orgánicos e inorgánicos. Los radicales libres son una de las causas de un gran número de enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis ^[41]. La tabla N°1.3 describe los tipos de radicales libres según las especies reactivas.

Tabla N°1.4 Tipos de radicales libres

TIPO	RADICAL LIBRE
Especies reactivas del oxígeno (ROS)	Anión superóxido (O_2^-)
	Radical hidroxil (HO)
	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
	Acido hipocloroso (HClO)
	Oxígeno singlete ($1O_2$)
	Ozono (O_3)
Especies reactivas del nitrógeno (RNS)	Nitroxido (NO)
	Dióxido de nitrógeno (NO_2)
	Peroxinitrilo ($ONOO^-$)
	Radical alcoxil (RO)
	Radical peroxil (ROO)

FUENTE: Avello M et al, 2006

Tenemos ejemplos resaltantes:

Anión superóxido (O_2^-): es el radical más abundante y común a nivel celular. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis para ser usado como defensa bactericida. Es generado en reacciones de auto oxidación y enzimáticas en diferentes organelos celulares ^[44].

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): No es un radical libre, pero es una forma reactiva de gran importancia, ya que posee la capacidad de generar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. Esta ROS, es formada principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque también se genera en otros organelos celulares como el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol ^[44].

Es de conocimiento que los excesos de radicales libres pueden dar lugar a la inducción de importantes cambios fisiológicos, que por lo general desembocan en el desarrollo de ciertas enfermedades. Así cuando los niveles de ROS exceden la capacidad de defensa de los sistemas antioxidantes, el resultado es el progreso del envejecimiento y funciones fisiológicas anormales. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales aparece un estrés oxidativo, iniciador de ciertas situaciones patológicas con mayor o menor trascendencia en la salud ^[29].

Se puede llevar al organismo a las siguientes posibilidades:

- Adaptación: ya que hay aumento de la actividad de los sistemas de defensa antioxidante, que protege a la célula frente a daños futuros.
- Daño en tejidos: por daño en lípidos, proteínas y carbohidratos.
- Muerte celular: por necrosis o apoptosis ^[16].

1.6. LIOFILIZACION

El procedimiento llamado criodeshidratación, criodesecación o liofilización, consiste en congelar el producto para luego deshidratarlo al vacío, aprovechando la propiedad de sublimación que posee el hielo, es decir, la propiedad que le permite pasar de una fase sólida a la fase gaseosa sin fundirse. Mediante este proceso se elimina a muy baja temperatura, el agua de un producto que se mantiene congelado y rígido mientras esta húmedo. En esas condiciones el producto así obtenido no pierde sabor, pesa menos y se conserva durante más tiempo ^[45, 46].

1.6.1. PRINCIPIOS FISICOS DE LA LIOFILIZACION

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada ^[45].

En el diagrama de fases, la frontera entre el gas y líquido va desde el punto triple hasta el punto crítico. La liofilización (flecha azul) lleva el sistema alrededor del punto triple, evitando así la transición directa de líquido a gas de un secado tradicional (flecha verde).

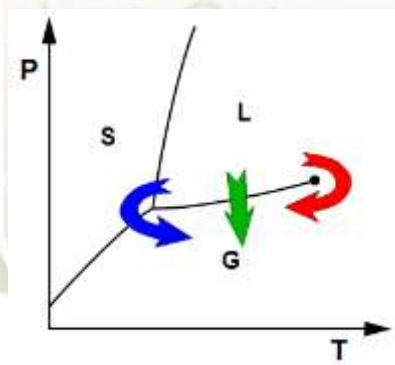


Figura 1.4 Diagrama de fases del proceso de liofilización. Fuente Amersham Biosciences, 1999.

Para llevar a cabo el proceso de liofilización se necesita determinar los siguientes parámetros.

- a) Punto eutéctico del producto.
- b) Presión.
- c) Temperatura.

La reducción de la presión existente en la cámara, con temperatura y presión por debajo de la correspondiente al punto triple, hace que inmediatamente se inicie la evaporación de la humedad. La fase de sublimación concluye cuando ya no hay hielo para retirar del producto.

El producto seco liofilizado tiene una estructura porosa, debido a que las moléculas de agua han abandonado sus sitios dejándolos así, por tanto estos poros tienden a llenarse con aire atmosférico, el cual es muy dañino por contener oxígeno que da lugar a la oxidación y ranciamiento, es por esto que se busca un gas inerte o aire seco para evitar estos fenómenos, una vez secado el producto, va a un tambor de producto terminado ^[45].

1.6.2. VENTAJAS DE LA LIOFILIZACION

La liofilización ofrece múltiples ventajas:

- a) Calidad superior del producto final.
- b) Longevidad del producto procesado, manteniendo sus propiedades.
- c) En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación.
- d) Se reduce considerablemente la desnaturalización proteica, de modo que los tejidos se conservan en estado viable. Debido en parte a las bajas temperaturas empleadas y también a la ausencia de migración de sales y otros solutos, el producto final tiene exactamente el mismo grado de uniformidad que el material primitivo.
- e) La pérdida de constituyentes volátiles, tales como aceites esenciales, es generalmente menor que otros métodos de desecación.
- f) La desecación es uniforme y rara vez observa un endurecimiento superficial.
- g) En las condiciones de baja temperatura en que se realiza la desecación no se produce ningún crecimiento bacteriológico, ni cambio enzimático.
- h) En virtud del elevado vacío empleado, en comparación en el empleado en la evaporación ordinaria, la cantidad de oxígeno presente es tan pequeña que resultan protegidos, incluso, los componentes fácilmente oxidables.
- i) Los productos liofilizados pueden almacenarse por largo tiempo completamente secos, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad^[45].

1.6.3. DESVENTAJAS DE LA LIOFILIZACION

- a) Elevado costo debido a que el proceso es relativamente largo y complejo.
- b) El producto debe conservarse en condiciones adecuadas de temperatura y humedad ya que es fácilmente reconstituible.
- c) En el caso de polvo liofilizado, este es muy higroscópico si está expuesto al ambiente sin ningún tipo de cuidado ^[45].



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios H-203 y el Laboratorio de investigación Proyecto Mercurio de la Universidad Católica de Santa María.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. *Quararibea cordata* (ZAPOTE)

El material utilizado fue el mesocarpio de la fruta teniendo en cuenta su aspecto, color y tamaño para finalmente liofilizarlas. La cantidad de *Quararibea cordata* obtenida en el Mercado de Abastos Andrés Avelino Cáceres de la ciudad de Arequipa fue de 3 Kg.

Los parámetros para que las frutas formen parte del grupo de estudio fueron tamaño, consistencia firme y peso de aproximadamente 150g. El material biológico fue refrigerado a una temperatura de 4°C hasta que fuera liofilizado (Ver Anexo 1).

2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo de 15 x 100 mm, Pirex.
- Micropipetas automáticas de 10-50 μL y 10-100 μL .
- Beaker de 10 y 500 mL.
- Fiola de 5, 10 y 25 mL.
- Matraz de 100 ml
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Probeta Eurolab de 50 mL.
- Placa de silicagel, Merck
- Cuba cromatográfica
- Pesa-filtro
- Pizeta

2.3. EQUIPOS

- Balanza Analítica Sartorius TE2145.

- Centrifuga de 12 tubos Zec Centra CL₂.
- Espectrofotómetro Cary 60 de Agilent.
- Sonicador P Selecta Ultrasons H.W. Kassel S.A.
- Equipo de Liofilización modelo Triad “ LABCONCO”
- Agitador Vortex Analog mixer

2.4. REACTIVOS

- Etanol 96% (CH₂-CH₂OH) (DIPROQUIM)
- Cloroformo (DELTAQUIMICA)
- N-Pentano (Merck)
- Reactivo Trolox (Calbiochem)
- Reactivo DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*)P.A.
- Reactivo de Folin Ciocalteu P.A. (Merck)
- Ácido gálico P.A. (C₇H₆O₅)
- Carbonato de sodio P.A. (Na₂CO₃)
- Ácido sulfúrico 97% (H₂SO₄)
- Ácido acético glacial 100% (CH₃-COOH) (Merck)

2.5. OTROS

- Espátulas.
- Gradillas.
- Pinzas.
- Soportes Universales.
- Alcohol 96°.

2.6. MÉTODOS

2.6.1. DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

2.6.1.1. LIOFILIZACION DEL MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron las muestras refrigeradas mencionadas en el apartado 2.1.1. Se procedió a lavarlas con agua destilada y se extrajo el mesocarpio de cada fruta extrayendo sus semillas de en medio de ella. Posteriormente se coordinó el uso del equipo de liofilización modelo Triad “LABCONCO” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, el mesocarpio fue cortado en rodajas delgadas para después ser colocadas en la

bandeja del equipo. Los frutos liofilizados se colocaron en un envase de vidrio sellado y fueron almacenados hasta su uso.



Figura 2.1 Equipo de Liofilización Fuente propia

A continuación se describen las condiciones experimentales de liofilización en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Condiciones de liofilización de las muestras

Proceso	Temperatura	Tiempo
Pre freeze	-	6 horas
Seg. 1	-50 °C	20 horas
Seg. 2	-20 °C	24 horas
Seg. 3	10 °C	8 horas

Para obtener el rendimiento de la muestra liofilizada se procedió a pesar la muestra fresca y de igual forma luego del proceso de liofilización, se utilizó la siguiente ecuación 2.1

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{peso muestra seca} / \text{peso muestra fresca}) * 100$$

Ecuación 2.1 Cálculo de rendimiento del liofilizado

2.6.1.2. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Luego de obtener la muestra de zapote liofilizado, se procedió a pesar 10g de este y se colocó en 40 mL de alcohol etílico 96° en un matraz de 100 mL de capacidad, se procedió a sonicar durante 10 minutos, como se observa en la figura 2.2 y luego se centrifugo a 2000 RPM por 10 minutos, se separó el sobrenadante en un vaso de precipitado de 400ml cubierto de papel aluminio, dejándolo evaporar a temperatura ambiente. El proceso fue exactamente repetido con el cloroformo y el n-pentano, respectivamente, hasta presentar

decoloración. Obteniéndose así tres extractos etanólico, clorofórmico y pentánico.



Figura 2.2 Equipo de sonicación. Fuente propia

2.6.1.3. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS ALCOHOLICO, CLOROFORMICO Y PENTANICO

Los extractos etanólico, clorofórmico y pentánico fueron pesados para obtener el valor de rendimiento del método de sonicación. Para ello se procedió a pesar el vaso de precipitado vacío y fue comparado con el valor obtenido con el residuo. Luego se aplica la siguiente fórmula expresada en la Ecuación 2.2:

$$\%R = \frac{W_i}{W_f} \times 100$$

Ecuación 2.2 Porcentaje de rendimiento

Donde %R hace referencia al porcentaje de rendimiento, W_i es el peso del extracto y W_f es el peso seco de material vegetal.

El extracto se guardó en envases de vidrio, cubriéndolos en papel aluminio y almacenándolo a 4°C hasta su uso.

2.6.2. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS

Para el análisis de los compuestos fenólicos totales se usó el método de Folin-Ciocalteu.

2.6.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCION STOCK ACIDO GALICO

Se procedió a pesar el ácido gálico puro en un cantidad de 50 mg para luego colocarlo en una fiola de 50ml de volumen, agregándole agua ultrapura se agita vigorosamente para alcanzar una mezcla optima y se enraza. El envase

es protegido de la luz con papel aluminio. La concentración alcanzada fue de 1000ppm.

2.6.2.2. CURVA DE CALIBRACION

A partir de la solución patrón de ácido gálico de 1000 ppm, se procedió a realizar una serie de diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 ppm. Para ello se colocó en distintas fiolas protegidas de la luz 20, 40, 60, 80 y 100 uL de la solución patrón antes descrita. Como se describe en la tabla 2.2 a cada fiola de 10mL se le adiciono 250 uL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agito y luego se agregó 2ml de carbonato de sodio al 20%. La mezcla se agito, se enrazo utilizando agua destilada y se dejó reposar por 2 horas. Finalmente, se tomó la lectura en el espectrofotómetro (CARY60 UV-VIS, Agilent Technologies) a 760nm. El blanco tuvo los mismos componentes químicos excepto el ácido gálico.

Para comparar los análisis realizados con el método de Folin Ciocalteu con el mesocarpio del zapote (*Quararibea cordata*) todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados como promedio , requiriendo primero la determinación del estadístico F para comparar las varianzas iguales y diferentes del fruto de zapote ($p < 0.05$). Se utilizó el análisis de varianza y test de Tukey.

Tabla 2.2 Curva de calibración para método Folin Ciocalteu

Muestra	Concentración de ácido gálico ppm	Volumen de Ácido gálico μL	Reactivo Folin Ciocalteu	Agua destilada	Na_2CO_3
1	2	20			
2	4	40			
3	6	60	0.25mL	4mL	2mL
4	8	80			
5	10	100			

Elaboración: Fuente propia

2.6.3. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DPPH

2.6.3.1. PREPARACION DEL RADICAL DPPH

El envase del DPPH que estuvo almacenado a una temperatura de 4°C, se procedió a pesar una cantidad de DPPH en una balanza analítica. El peso total fue de 5.77 mg y fue disuelto con etanol en una fiola de 10ml con el objetivo de obtener una concentración de 0.00292mM. La solución obtenida se almaceno y protegió de la luz a una temperatura de 4°C.

2.6.3.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX

El reactivo Trolox conocido también como análogo de la vitamina E fue utilizado como estándar, así usando una balanza analítica se pesó la cantidad de 4 mg para obtener una concentración 1.598 mM en una fiola de 10ml. Se disolvió con etanol 96° al volumen anterior.

2.6.3.3. CURVA DE CALIBRACION

A partir de la solución madre de DPPH a 0.00292mM se procede a realizar la gráfica de calibración que resulta de la mezcla de la solución stock como se presenta en la siguiente tabla 2.2 Para finalmente enrasarla en una fiola de 5 mL se dejó reposar por 30 minutos. Fue leído en el espectrofotómetro (CARY60 UV-VIS, Agilent Technologies) a 517nm.



22

Figura 2.3 Grupo de fiolas para la curva de calibración en método DPPH

Tabla 2.3 Curva de calibración para método DPPH

Concentración	Trolox	DPPH	Etanol
Blanco	0	500 μ L	
4 μ M	125 μ L	500 μ L	
8 μ M	250 μ L	500 μ L	c.s.p.
16 μ M	500 μ L	500 μ L	
24 μ M	750 μ L	500 μ L	
32 μ M	1000 μ L	500 μ L	

Elaboración: Fuente propia

Para comparar los análisis realizados con el método de DPPH con el mesocarpio del zapote (*Quararibea cordata*) todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados como promedio, requiriendo primero la determinación del estadístico F para comparar las varianzas iguales y diferentes del fruto de zapote ($p < 0.05$). Se utilizó el análisis de varianza y test de Tukey.

2.6.4. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de componentes por distribución entre dos fases inmiscibles (la fase móvil y fase estacionaria) ^[47]. La CCF se realiza utilizando sistemas de disolventes y reactivos reveladores correspondientes para cuatro tipos de metabolitos secundarios importantes, tales como reacción general y sustancias flavonoides, taninos y terpenos.

La cromatografía en capa fina es un procedimiento rápido y específico para cierto tipo de sustancias. Se utiliza generalmente la sílica gel como adsorbente o alúmina mezclada con un agente que haga se pegue bien en forma de una capa fina porosa sobre una placa de vidrio o plástico ^[48].

La idea y los fundamentos de la utilización de un adsorbente cromatográfico dispuesto como una delgada capa sobre un soporte inerte rígido, son atribuidos a

Izmailov y a Shaiber (1938). La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte distribuido uniformemente [49].

La cromatografía en capa fina hace parte de una gran familia de técnicas cromatográficas entre las que se encuentran la cromatografía en columna (CC), la de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) como las más populares. Las técnicas cromatográficas constituyen una herramienta fundamental en los laboratorios analíticos y de investigación por lo que su conocimiento es de trascendental relevancia [50,51].

2.6.4.1. FUNDAMENTO

La cromatografía en capa fina se fundamenta en la afinidad de los compuestos con respecto a la fase estacionaria y la fase móvil, impulsados por la acción capilar se distribuyen sobre la superficie de la fase estacionaria, los compuestos con mayor afinidad a la fase estacionaria se distribuyen lentamente mientras que los otros componentes se distribuyen más rápidamente, una vez producida la separación se puede visualizar los componentes individuales [32].

2.6.4.2. PROCEDIMIENTO

La placa de silicagel que se usaron fueron cortadas en la siguientes dimensiones de 10 cm de largo y 3 cm de ancho, con un lápiz se marcó una línea a 1 cm del borde inferior y superior, estas marcas sirvieron como referencia del inicio y del final en la corrida cromatográfica, posteriormente se sembró la muestra etanólica diluida (1:1 en etanol) en las diferentes placas, la siembra se realizó en banda y repasando 10 veces la muestra, luego las placas se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser colocadas en sus respectivas fases móviles.

Las fases móviles fueron preparadas y dejadas en la cuba por un tiempo de media hora para lograr una saturación de medio, la cuba cromatográfica estuvo cerrada para evitar la pérdida de la saturación de medio. Las placas una vez secas fueron colocadas con cuidado en la cuba, evitando el contacto de las fases móviles con el punto de siembra de las muestras, evitando así

errores en las corridas cromatográficas, seguidamente la fase móvil comenzó su recorrido arrastrando la muestra hasta la segunda marca de la placa de sílica-gel, manifestando el final de la corrida cromatografía.

Terminada la corrida se procedió a retirar la placa y se la dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se observó la separación de los componentes reflejados como puntos coloreados en las placas con diferentes tamaños y distancias recorridas. Después se aplicaron los reveladores apropiados a cada metabolito a investigar. Todas las placas tuvieron reveladores aplicados en forma de rociado forma uniforme, dependiendo del tipo de componentes que se busca separar, identificar y visualizar se dejó secar a temperatura ambiente o se colocó en la estufa a una temperatura de 100°C por un máximo de 10 minutos. Finalmente las placas se observaron a una luz de UV/V a 254 nm y 366 nm.



Figura 2.4 Sembrado de la muestra alcohólica en placa de silicagel.

2.6.4.3. FACTOR DE RETENCION

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria.⁵² Esta capacidad está determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes y la naturaleza del disolvente, donde los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se absorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares serán arrastrados con mayor facilidad. Para realizar el cálculo utilizamos la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil (Y)}}$$

En un sistema particular de disolventes, el Rf es característico de cada sustancia y es así posible identificar los compuestos desconocidos en un determinado alimento. Frecuentemente comparando la migración de sustancias desconocidas con la migración de compuestos patrón en un sistema particular de disolventes es posible identificar tentativamente los compuestos que se encuentran presentes en un determinado alimento ^[53].

2.6.4.4. IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La identificación de los posibles metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes en la fruta zapote (*Quararibea cordata*), se llevó a cabo por cromatografía de capa fina. Para ello se realizó:

- Corrida general mezclando

Acetato de etilo: metanol: agua (80:10:10)

Fue la que mejor resultado demostró al aplicarle vainillina 5% y ácido sulfúrico 5% en etanol y colocando la placa en la estufa a 100° por 10 minutos. Esta mezcla permite identificar en la solución una variedad de metabolitos secundarios entre los cuales se encuentran los flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas.

En base a la corrida general, se realizaron las siguientes fases móviles para identificar los metabolitos secundarios:

- Flavonoides.- para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla :

Acetato de etilo: Metanol (90:10)

La que mejor separo los componentes bioactivos correspondientes a este grupo y se revelo con reactivo de cloruro de aluminio 1% en etanol esparciendo este reactivo por la placa cromatográfica, se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser observadas con ayuda de luz ultravioleta a 366nm.

- Taninos.- para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla de:

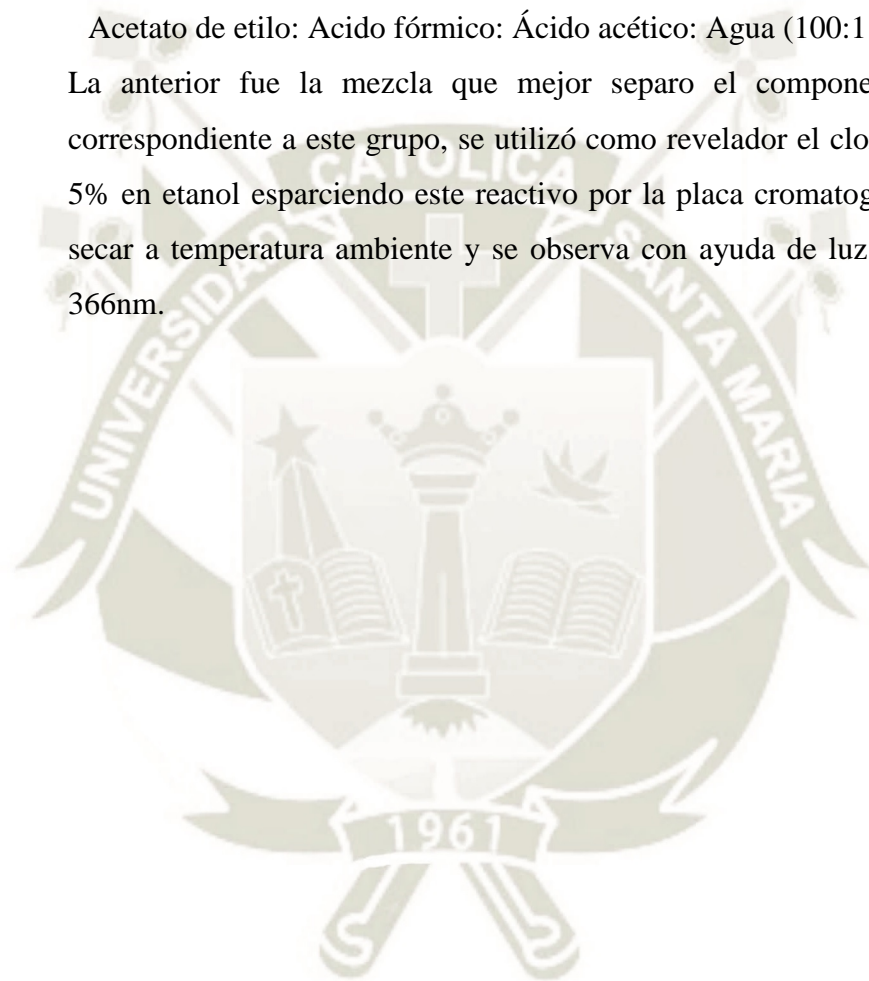
Acetato de etilo: metanol (80:20)

La que mejor separo el componente bioactivo correspondiente a este grupo, se utilizó cloruro férrico al 5% en etanol esparciendo este reactivo por la placa cromatografía, se dejó secar a temperatura ambiente y se observa la placa con luz natural.

- Cumarinas.- para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla de :

Acetato de etilo: Acido fórmico: Ácido acético: Agua (100:11:11:26)

La anterior fue la mezcla que mejor separo el componente bioactivo correspondiente a este grupo, se utilizó como revelador el cloruro férrico al 5% en etanol esparciendo este reactivo por la placa cromatografía. Se dejó secar a temperatura ambiente y se observa con ayuda de luz ultravioleta a 366nm.



CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios en la *Quararibea cordata* en nuestro país son escasos y más aún sobre las propiedades de esta fruta.

El presente trabajo de investigación buscó evaluar el efecto antioxidante *in vitro*, determinar el contenido de compuestos fenólicos en el mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) y conocer algunos de sus metabolitos secundarios, para ello se inició con la búsqueda, análisis y selección bibliográfica donde se encontró reportes de investigaciones realizadas en el extranjero sobre el efecto de *Quararibea cordata* (zapote) en la función antioxidante e identificación de sus compuestos. Para la identificación del género *Quararibea*, se envió una muestra al laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, donde se identificó que dicha especie es *Quararibea cordata* (Bonpland) Vischer

En el presente proyecto se utilizó mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) liofilizado para la determinación de su capacidad antioxidante y evaluar su contenido de compuestos fenólicos.

3. CAPITULO III

3.1. OBTENCIÓN DEL LIOFILIZADO DE *Quararibea cordata* (zapote)

Después de obtener aproximadamente 3 kg de frutos de *Quararibea cordata* (zapote) procedentes del centro de abastos Andrés Avelino Cáceres, ubicado en la ciudad de Arequipa. Se cortó y separo el mesocarpio de la cascara y semillas de la fruta luego se procedió a su liofilización en la Facultad de Farmacia de la Universidad Católica de Santa María; el resultado final se observa en la figura 3.1.



Figura 3.1 Muestra liofilizada de mesocarpio de zapote. Fuente propia

Con respecto al cálculo del porcentaje de rendimiento de liofilización, definida por la ecuación 2.1, se consideraron los valores de peso de muestra fresca y muestra seca como se presenta en la tabla 3.1:

Tabla 3.1 Valores considerados en la liofilización de Zapote

Muestra	Peso de muestra fresca	Peso de muestra seca	Rendimiento de liofilización %
Mesocarpio Zapote	175.5 g	85.3 g	45.44%
	188.3 g	77.4 g	
	179.7 g	83.8 g	


FUENTE: Elaboración propia

Las muestras obtenidas se colocaron en frascos estériles protegidos de la luz con papel aluminio y almacenados a 4°C hasta su posterior uso.

3.2. EXTRACCIÓN EN DIFERENTES SOLVENTES

La extracción se realizó con etanol, cloroformo y n-pentano ya que se debía determinar la presencia o ausencia de los compuestos solubles en un solvente polar, medianamente polar y apolar. Como se observa en la tabla 3.2

Tabla 3.2 Tabla de disolventes usados en orden de polaridad

Disolventes	Punto de Ebullición °C	Polaridad
Pentano	36.1	Menor
Cloroformo	61.2	
Etanol	78.3	
Agua	100	

Fuente: Carmen Flores et al.2017

Se procedió a pesar la cantidad de 10g de mesocarpio liofilizado y se realizó la extracción con los solventes hasta agotamiento. Los extractos presentaron una coloración anaranjada-amarilla como se observa en la fotografía del **Anexo 5 y 6**. Se evaporó a temperatura ambiente, los extractos fueron colocados en envases de vidrio, estos fueron protegidos de la luz solar con papel aluminio y almacenados bajo refrigeración hasta la experimentación.

3.2.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Pasado el tiempo de evaporación se obtuvo un residuo como se aprecia en las fotografías del **Anexo 7, 8 y 9** se procedió a pesar los recipientes, los datos recolectados de cada extracto son aplicados en la fórmula de la ecuación 2.2.

La tabla 3.3 muestra el rendimiento de la extracción según tipo de disolvente, observamos que el alcohol etílico utilizado como disolvente para la extracción brinda mayor rendimiento, con un 73.91%. En el caso del mayor rendimiento, los componentes del zapote tuvieron mayor afinidad por el etanol, por este motivo el rendimiento fue mayor, este rendimiento más alto podría deberse a la extracción de principios activos con capacidad antioxidante del zapote, como los flavonoides, compuestos fenólicos y ácido gálico, dando como resultado un mayor porcentaje de rendimiento. El menor porcentaje de rendimiento se obtuvo con el uso de un solvente de tipo apolar, como el pentano, de tal modo que los componentes del zapote tuvieron menor afinidad por este tipo de solvente.

A continuación se expresan los resultados por cada extracto polar, medianamente polar y apolar:

Tabla 3.3 Rendimiento de la extracción según tipo de disolvente

Tipo de disolvente	Cantidad media de Zapote (g)	Cantidad media de extracto final (g)	Rendimiento medio de la extracción (%)
Alcohol etílico	10	7.391	73.91
Cloroformo	10	0.399	3.99
n-Pentano	10	0.051	0.51

FUENTE: Elaboración propia

3.3. DETERMINACIÓN LOS COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), en las muestras de zapote, se utilizó el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este método es uno de los más usados actualmente para la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el uso de una técnica de análisis espectrofotométrico; y fue previamente calibrado empleando

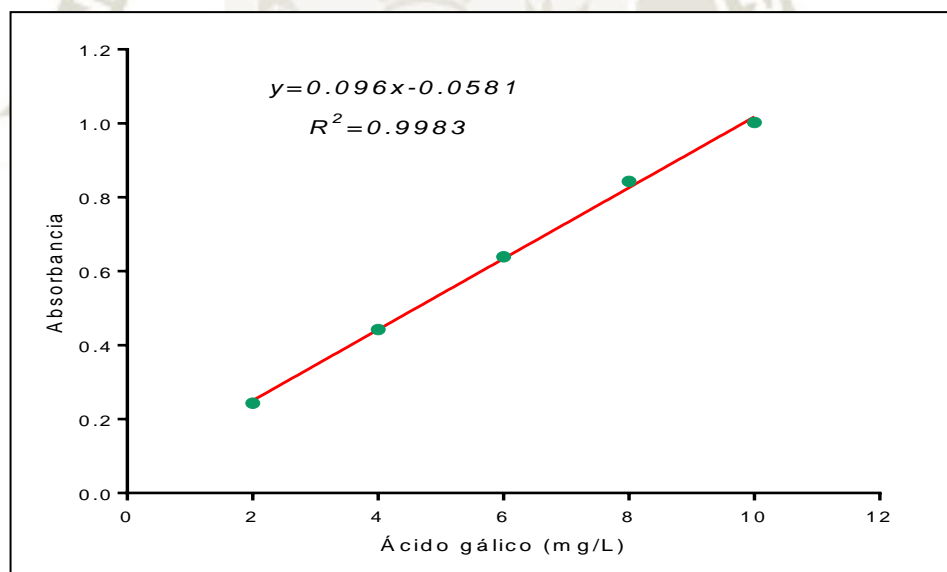
ácido gálico como patrón. Se realizaron las curvas de calibración a partir de una solución madre cuya concentración fue de 1000 mg/L de estándar ácido gálico.

En la Tabla 3.4 se presentan los valores obtenidos de absorbancia en la curva de calibración de ácido gálico a 760nm, las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla N° 3.4: Datos de la curva de calibración

Concentración ppm	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Absorbancia promedio	DE	CV%
2	0.256	0.249	0.225	0.243	0.016	4.584
4	0.448	0.446	0.432	0.442	0.009	2.036
6	0.649	0.647	0.621	0.639	0.016	2.503
8	0.855	0.845	0.829	0.843	0.013	1.542
10	1.014	1.011	0.982	1.002	0.018	1.796
Blanco	0.087					

DE: Desviación estándar CV%: Coeficiente de variación porcentual



FUENTE: Elaboración propia

Figura N° 3.2: Curva de Calibración correspondiente a fenoles

En la Figura N° 3.2, se muestra el gráfico de calibración correspondiente a la Tabla N° 3.4, obteniendo como resultado un coeficiente de correlación r^2 de 0.9983, siendo este superior a lo establecido por la USP ($r^2 > 0.995$) por lo tanto se afirma que existe una correlación lineal entre la concentración y el área.

De la Figura N°3.2 también se puede se obtener el valor de **A**: 0.0581 y **B**: 0.0096.como se observa en la ecuación 3.2

$$Y = 0.0096x + 0.0581 \quad \text{[Ecuación 3.2]}$$

Se puede observar que la respuesta es lineal ya que se obtiene un coeficiente de correlación cercano a la unidad, indicando que hay una relación directa entre la concentración de ácido gálico y la absorbancia.

El contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en la muestra fueron expresados como mg GAE/100g de mesocarpio liofilizado de *Quararibea cordata*. En la Tabla 3.5, se muestran los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en *Quararibea cordata*, encontrándose valores que oscilan desde 28.07 a 63.51 mg GAE/100g. La muestra siguió la metodología que aparece en el apartado 2.3.1

TABLA 3.5 Contenido de FT en el liofilizado de *Quararibea cordata*

Muestras	Promedio Abs	Desviación estándar	mg GAE/100 g
Etanol	0.707	0.117	63.51
Cloroformo	0.535	0.003	46.49
n-Pentano	0.344	0.054	28.07

FUENTE: Elaboración propia

La figura N°3.3, muestra gráficamente el valor promedio del contenido de compuestos fenólicos totales en la fruta expresados en miligramos de GAE/100g de liofilizado de *Quararibea cordata*.

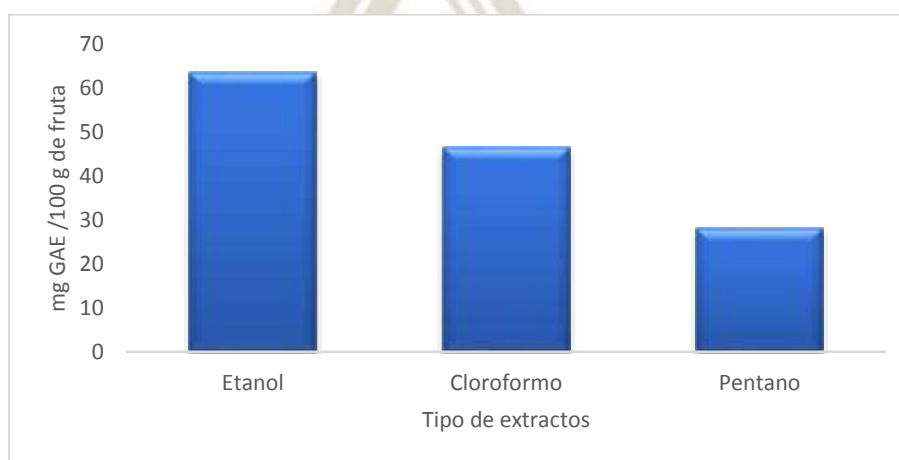


Figura N°3.3 Compuestos fenólicos totales presentes en extractos de *Quararibea cordata*.

3.3.1.1. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS ENTRE LOS TRES EXTRACTOS

La tabla de resultados 3.6 del ANOVA es como sigue:

Tabla 3.6 ANOVA para la comparación de las concentraciones de compuestos fenólicos

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre Tratamientos	2	1884.22	942.11	18.26
Entre bloques o columnas	6	309.576	51.60	
Total	8	2193.802		

Tabla 3.7 Comparaciones específicas (Tukey) de las concentraciones de compuestos fenólicos

PRUEBA DE TUKEY			
Diferencia honestamente significativa	HSD=		0.3047
Valor Alfa	Multiplicador=		4.3390
Cuadrado del error medio	Mse=		0.0148
Tamaño de los grupos	n=		3
Calculo Media Aritmética de los Grupos			
	E. etanólico	E. clorofórmico	E. pentánico
E. etanólico		0.001	0.36008
E. clorofórmico			0.3596
E. pentánico			

FUENTE: Elaboración propia

En la tabla 3.6 del ANOVA presenta una significancia menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que se interpreta que la cantidad de compuestos fenólicos equivalentes a ácido gálico de los diferentes tipos de solventes, son diferentes. La prueba de especificidad con sus resultados expresados en la tabla 3.7, indican que al menos uno de los resultados obtenidos presentan diferencia significativa entre los grupos investigados.

Carvalho et al. Encontraron que el contenido de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos de pulpa de *Quararibea cordata* liofilizado fue de 6.31 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de extracto, el presente estudio encontró que el contenido de fenoles totales se encuentra en 63.51 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de mesocarpio en el extracto alcohólico. Puede estar involucrado en la diferencia de los resultados obtenidos la procedencia de la muestra, o la exposición de la muestra a fuentes de calor durante la experimentación ^[54].

Monteiro, Sabrina et al en el año 2017. Realizo un estudio en Brasil sobre la fruta *Quararibea cordata* encontraron un contenido de fenoles de 8.42 a 9.52 mg de ácido gálico en 100 g de mesocarpio en extracto alcohólico, siendo este valor menor que el encontrado en el presente estudio. El estadio de maduración pudo llegar a influir en la diferencia de resultados ^[7].

Cerón et al. En un estudio realizado en la UNAL, Bogotá, Colombia determino el contenido de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *Quararibea cordata* liofilizado tenían un valor de 265.90 mg equivalentes a ácido gálico por 100 g de mesocarpio siendo el valor detectado en el presente estudio de 63.51 mg equivalentes a ácido gálico por 100g de *Quararibea cordata* mesocarpio liofilizado por lo tanto es mayor el valor encontrado por Cerón y sus colaboradores. La etapa de maduración al momento del estudio puede influir en el desarrollo del fruto y su contenido de algunos tipos de fenoles manifestando esta diferencia ^[29].

Cisneros Dionisio, Ana Lucia en el año 2013, realizo un estudio para evaluar el contenido de compuestos fenólicos en fruto seco de *Quararibea cordata* (zapote), el estudio fue realizado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú encontrando un valor de 667.20 mg AG/100g de fruta siendo este último valor mayor al

encontrado en el presente estudio. La diferencia entre estos valores podría originarse debido al tipo de preparación de la muestra así como factores ambientales en el desarrollo de la fruta ^[55].

Aqeel Ashraj, Muhhamad et al. En un estudio realizado en Malasia sobre la fruta *Durio zibethinus murray* encontraron un contenido de fenoles de 690.62 a 998.29 mg/L equivalentes de ácido gálico siendo este valor mayor que el encontrado en el presente estudio. Aun cuando *Quararibea cordata* y *Durio zibethinus murray* forman parte de la misma familia vegetal el lugar de origen de la fruta puede haber influido en su cantidad de polifenoles así como la manipulación de esta ^[56].

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la preparación de la curva de calibración se utilizó el reactivo antioxidante estándar Trolox mediante el método DPPH, el cual fue preparado en distintas concentraciones crecientes que fueron en total seis, finalmente estas concentraciones resultan de la adición de reactivos necesarios para esta determinación y la metodología fue señalada en el capítulo II de la presente investigación, incluyendo el desarrollo del blanco, como se observa en la Figura 2.3. Todas las soluciones fueron mezcladas y se dejó reposar 30 minutos, luego se realizaron las lecturas según el orden de concentración de menor a mayor, este ensayo se realizó por triplicado y los resultados se muestran a continuación en la tabla 3.8.

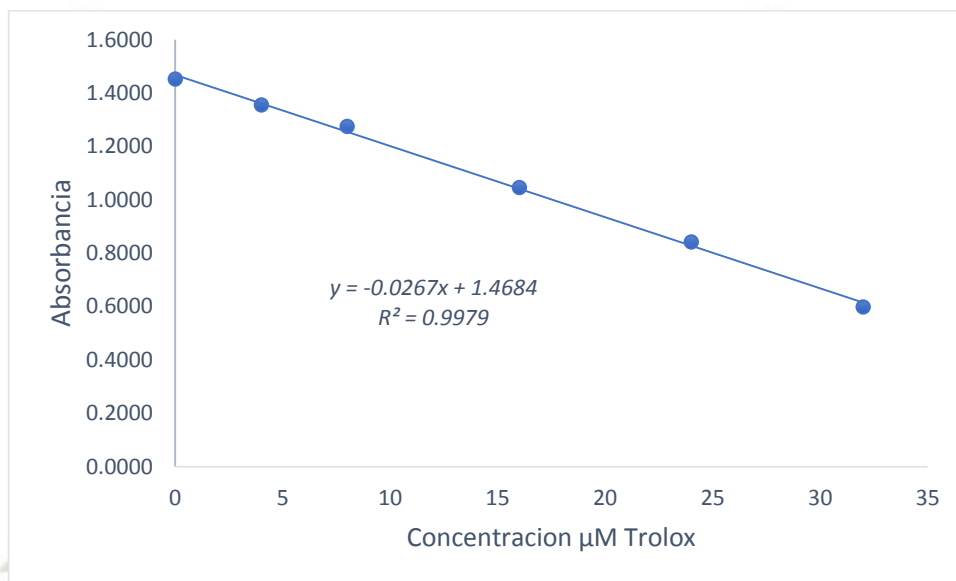
Tabla 3.8 Gráfico de Trolox y DPPH

Conc (µM)	Absorbancia N.1	Absorbancia N.2	Absorbancia N.3	Absorbancia promedio	DE	CV%
0	1.4906	1.4528	1.4172	1.454	0.036	2.525
4	1.3594	1.3529	1.3532	1.355	0.003	0.270
8	1.2708	1.2666	1.2876	1.275	0.011	0.871
16	1.0132	1.0051	1.1203	1.046	0.064	6.146
24	0.7933	0.822	0.9093	0.842	0.060	7.179
32	0.5597	0.5844	0.6507	0.598	0.047	7.865
Blanco						1.4900

DE: Desviación estándar CV%: Coeficiente de variación porcentual

FUENTE: Elaboración propia

Los datos de la tabla 3.8 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincule las dos variables. El análisis de regresión permite obtener un modelo que relacione una variable dependiente “y” (Absorbancia) con una variable independiente “x” (concentración de Trolox). El coeficiente de determinación simple r^2 indica cual es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.



FUENTE

Figura N°3.4 Gráfico de calibración correspondiente a capacidad antioxidante

En la figura N°3.4, se representa la recta promedio de regresión obtenida de concentraciones de Trolox y el valor promedio de las absorbancias medidas. Se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) igual a 0.9979, una pendiente (b) de -0.0027 y un intercepto (a) de 1.4684. Como se observa en la ecuación 3.3

$$Y = -0.0027x + 1.4684 \quad \text{[Ecuación 3.3]}$$

Con estos resultados demostramos que la respuesta es lineal ya que se obtiene un coeficiente de correlación cercano a la unidad, indicando que hay una relación directa entre la concentración de Trolox y la absorbancia. La muestra siguió la metodología descrita en el apartado 2.3.1. Además se realizó un análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de los estándares respecto a la concentración de estos tomando en cuenta la absorbancia del blanco (1.4900) como el 100%. La actividad antioxidante es expresada como el porcentaje de inhibición o de captación del radical, con ese fin se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Abs Blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs Blanco}} \right) * 100$$

Ecuación 3.4 Porcentaje de inhibición

A partir de la concentración de Trolox vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH se interpolaron los datos en un gráfico de calibración como muestra la figura 3.5

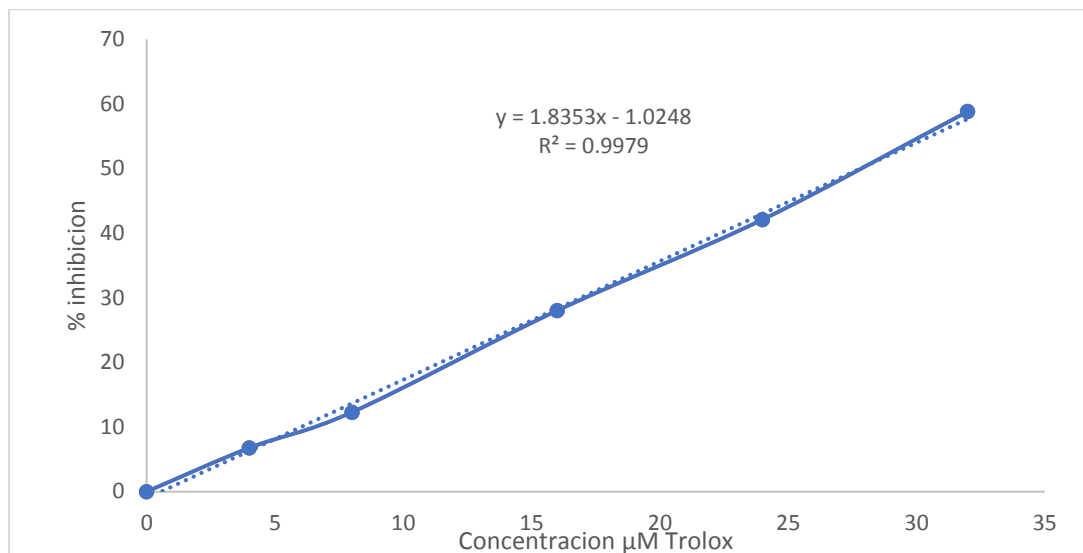


Figura N°3.5 Gráfico de calibración correspondiente a porcentaje de inhibición

En la figura N°3.5, se representa los 6 puntos de porcentaje de inhibición, la línea corresponde al ajuste matemático representado por la ecuación de la recta y con una linealidad (r^2) igual a 0.9979, una pendiente (b) de 1.8353 y un intercepto (a) de - 1.0248. Como se observa en la ecuación 3.4

$$Y = 1.8353x - 1.0248 \quad \text{[Ecuación 3.5]}$$

Se interpoló los valores del mesocarpio liofilizado a porcentaje de inhibición del radical DPPH utilizando la ecuación 3.4. Obteniendo el valor promedio para la capacidad antioxidante del extracto etanólico de 9.6% y para el extracto cloroformico de 9.6%.

El contenido de antioxidantes encontrados en la muestra fueron expresados como µmol Trolox/g de mesocarpio liofilizado de *Quararibea cordata*. En la tabla 3.9, se muestran los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en *Quararibea cordata*, encontrándose el valor de 5.452µmol ET/g de fruta para el extracto etanólico y 5.352 µmol ET/g de fruta para el extracto clorofórmico.

TABLA 3.9 Capacidad antioxidante en el liofilizado de *Quararibea cordata*

Muestras	Absorbancias	DE	$\mu\text{mol E.T.}$ /g fruta	% INH. DPPH
	Promedio			
Etanol	1.3133	1.878	5.452	9.6
Cloroformo	1.3128	1.811	5.352	9.6
n-Pentano	1.6729	-	INDETECTABLE	INDETECTABLE

DE: Desviación estándar

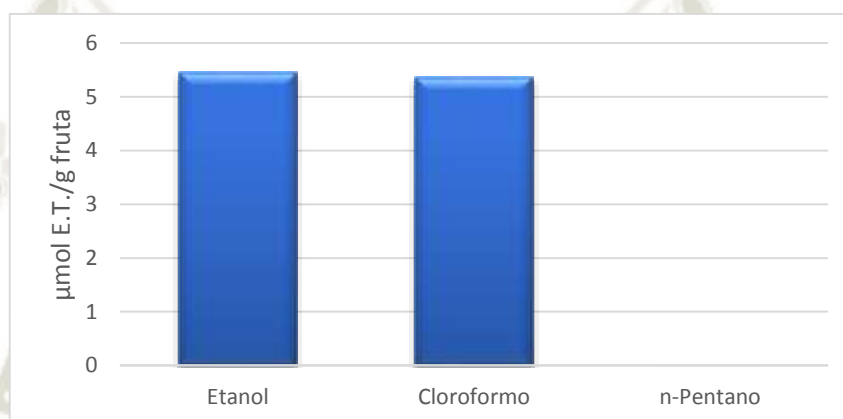


FIGURA 3.5 Comparación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Quararibea cordata*.

Tabla 3.10 Prueba F para varianzas de dos muestras en concentraciones de Trolox

	Etanol	Cloroformo
Media	5.4520	5.3517
Varianza	3.5281	3.2796
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1.0757	
P(F<=f) una cola	0.4817	
Valor critico para F (una cola)	19	

FUENTE: Elaboración propia

Tabla 3.11 Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en concentraciones de Trolox

	Etanol	Cloroformo
Media	5.4520	5.3517
Varianza	3.5281	3.2796
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	3.4038	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.0666	
P(T<=t) dos colas	0.950080959	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

FUENTE: Elaboración propia

Debido a que el extracto pentánico es el grupo con diferencia significativa por su inexistente capacidad antioxidante se procedió a trabajar con los otros dos grupos. Como se observa en la tabla 3.10 la Prueba F presenta una significancia, que es mayor al nivel aceptado de 0.05 por lo que se interpreta que la capacidad antioxidante equivalentes a Trolox de los diferentes tipos de solventes, son iguales. La prueba de especificidad con sus resultados expresados en la tabla 3.11, indican los resultados obtenidos no presentan diferencia significativa entre los grupos investigados. En el presente estudio se encontró evidencia estadística para aceptar que tanto la capacidad antioxidante del extracto etanólico y del extracto clorofórmico no difieren significativamente al 95 % de confianza.

Teniendo presente de forma particular el resultado del extracto etanólico es beneficioso saber que debido a su alto contenido de agua del zapote pudo existir la facilidad que agentes químicos solubles en un medio hidroalcohólico pudieran ser extraídos en un medio adecuado para ellos.

Ceron et al, en un estudio desarrollado en Colombia determinaron que el extracto etanólico de *Quararibea cordata* presentaba en su capacidad antioxidante total con DPPH un valor de 16.67 $\mu\text{mol ET/ml}$ al ser comparado con el resultado obtenido en el presente estudio la capacidad antioxidante es menor con 5.45 $\mu\text{mol ET/g}$ de

Quararibea cordata liofilizado. Debido a estos hallazgos en *Quararibea cordata* liofilizado existe la presencia de actividad antioxidante la cual puede llegar a ser beneficiosa y efectiva. La diferencia en resultados pudo deberse al tipo de preparación del extracto obtenido [29].

3.5. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

En base al extracto alcohólico se realizaron las respectivas pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios buscando la presencia de específicamente taninos, cumarinas y flavonoides. A continuación se describe el procedimiento general de la cromatografía en capa fina, para ello se utilizó una placa de silicagel (Merck) de esta se cortaron trozos de las siguientes dimensiones de 3 cm de ancho y 10 cm de largo. Con un lápiz se marcó dentro de la placa cromatográfica a 1cm de los bordes la línea de inicio y final del recorrido de la muestra. La siembra de la muestra se realizó con capilares de vidrio, el proceso de la siembra fue uniforme y lineal.

En la cuba cromatografía se colocó los agentes químicos necesarios para la corrida cromatografía con el objetivo de saturar el ambiente de la cuba. Con ayuda de unas pinzas se colocaron con cuidado cada una de las placas. Una vez culminado el recorrido se retiró la placa para dejar secar a temperatura ambiente. Cada metabolito secundario presenta una preparación especialmente diseñada para su identificación.

3.5.1. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA GENERAL

La presencia de grupos de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos, taninos y cumarinas hace posible su identificación de forma preliminar con el objetivo de aislar de forma específica cada uno de ellos. Para la identificación general de estos metabolitos secundarios se procedió en dos etapas, primero se utilizó la siguiente mezcla como se describe:

Acetato de etilo (77) : metanol (15) : agua (8)

La segunda etapa consiste en aplicar una solución de vainillina ácido sulfúrico, la preparación es como sigue:

Solución A

Vainillina1g
Etanol100ml

Solución B

Ácido sulfúrico cc 5ml
Etanol
csp.....100ml

Se pulverizo la solución A y se dejó secar, luego con la solución B fue sometida la placa a 100°C por un tiempo de 10 minutos posteriormente se observó la placa a 365nm. La figura muestra el resultado obtenido con sus respectivos Rf (0.43, 0.66 y 0.75):

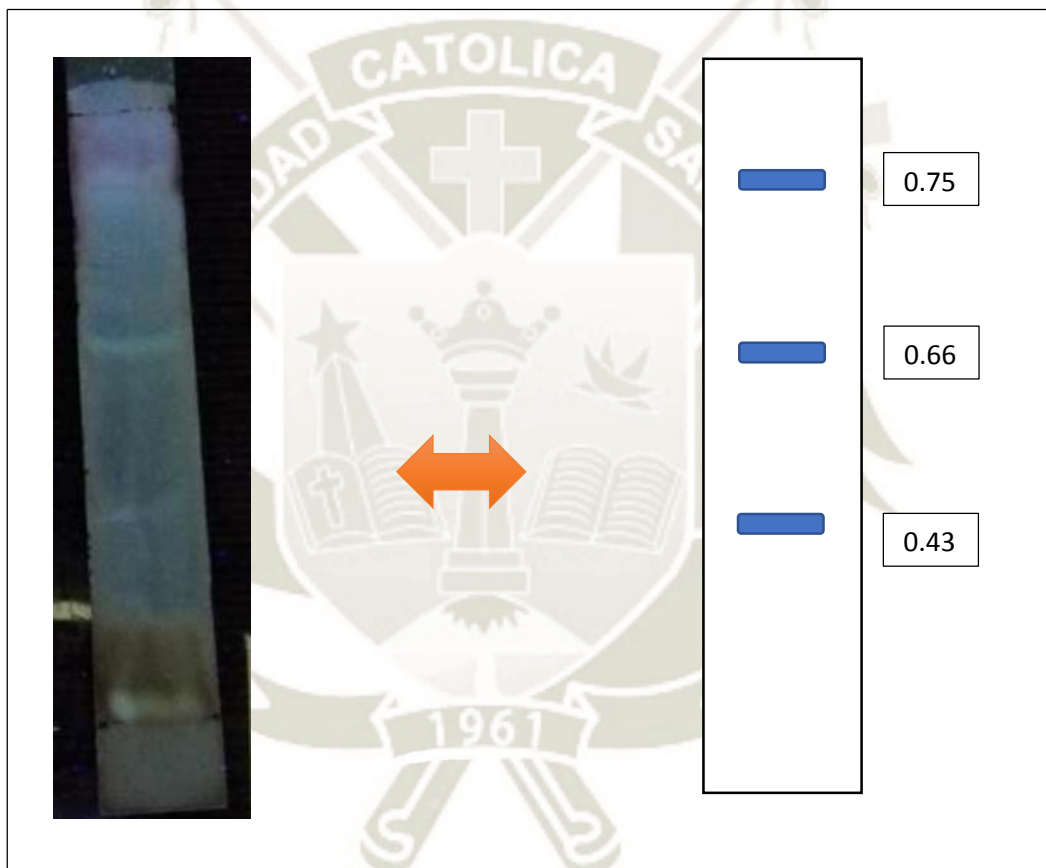


Figura 3.6 Placa de cromatografía general

La presencia de las bandas en los Rf determinados posiblemente se pueda asociar a grupos de metabolitos secundarios como flavonoides, cumarinas y taninos.

3.5.2. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA FLAVONOIDES

Para la identificación de este metabolito secundario se utilizó la siguiente fase móvil:

Acetato de etilo (100) : ácido acético (11) : ácido fórmico (11) : Agua (26)

Se reveló con reactivo a base de cloruro de aluminio, se muestra en detalle las bandas observadas en la placa a 365nm de longitud de onda. La figura 3.7 muestra el cromatograma obtenido:

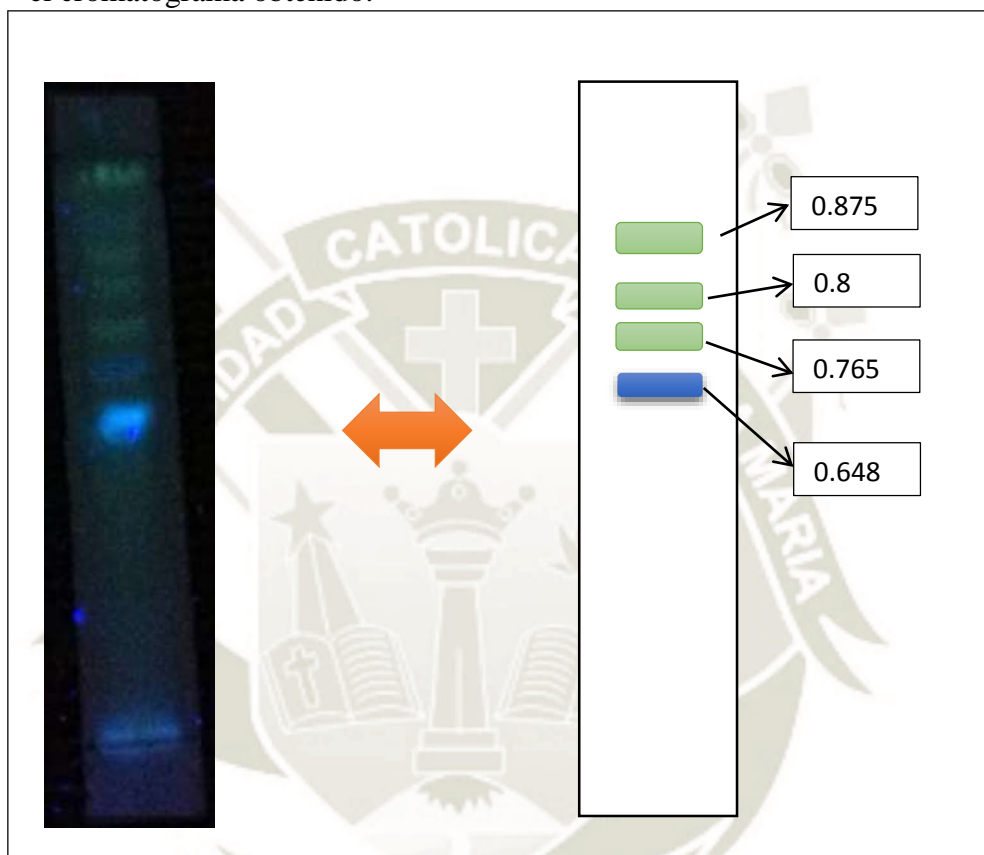


Figura 3.7 Placa cromatográfica para determinación de Flavonoides

En la placa cromatográfica se puede observar bandas de coloraciones azul-verdosas que podrían corresponder a metabolitos del grupo flavonoide, en base a los Rf encontrados en los siguientes puntos (0.648, 0.765, 0.8 y 0.875) teóricamente se puede mencionar la presencia de flavonoides en frutas del genero *Bombacoideae* como la quercetina, rutina, luteolina y hesperetina. Así existen investigadores como Fernández y Flor Ordoñez que encontraron flavonoides con un Rf de 0.81 – 0.97, Parisaca, A y Quispe G. encontraron flavonoides con un Rf de 0.79. Una investigación desarrollada en la UNSA por Chávez Chávez, J. determino flavonoides, con un Rf de 0.777 [32,57,58, 59].

3.5.3. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA CUMARINAS

Se utilizó una fase móvil compuesta de:

Acetato de etilo (60) : Tolueno (40)

Las placas fueron reveladas con hidróxido de potasio al 5% en etanol. Luego se observa a 365nm visualizando manchas en los Rf (0.02). La figura muestra el cromatograma obtenido:



Figura 3.8 Placa cromatografía para determinación de cumarinas

En la muestra se evidenció una banda azul, según bibliografía encontrada y teóricamente mencionada por el atlas titulado “Plant drug análisis” es probable que se trate de la presencia de hidroxycumarina ya que tienen la particularidad de dar resultados cromogénicos negativos pero dan intensa fluorescencia celeste al irradiarse con la luz UV a 365nm ^[60].

3.5.4. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA TANINOS

Para la fase móvil se utilizó:

Cloroformo (2) : Acetato de etilo (2) : Acido fórmico (1)

Como revelador se utilizó cloruro férrico 5% en etanol, la presencia de bandas marrón oscura se ubicó en un Rf de 0.30. La marrón podría corresponder a la presencia de taninos y teóricamente se puede mencionar la presencia de taninos condensados en *Quararibea cordata* (zapote) como dímeros de proantocianidina, En el trabajo de Nina Flores y Chara Chise desarrollado en la UCSM, Arequipa, Perú encontraron la presencia de metabolitos secundarios en *Grindelia glutinosa* (Chiri-chiri), utilizando una fase móvil de acetato de etilo-metanol (8:2) y como revelador: cloruro férrico al 5% se observó un color marrón que es parecido a lo encontrado en el presente estudio ^[6,61]. La figura muestra el resultado obtenido:

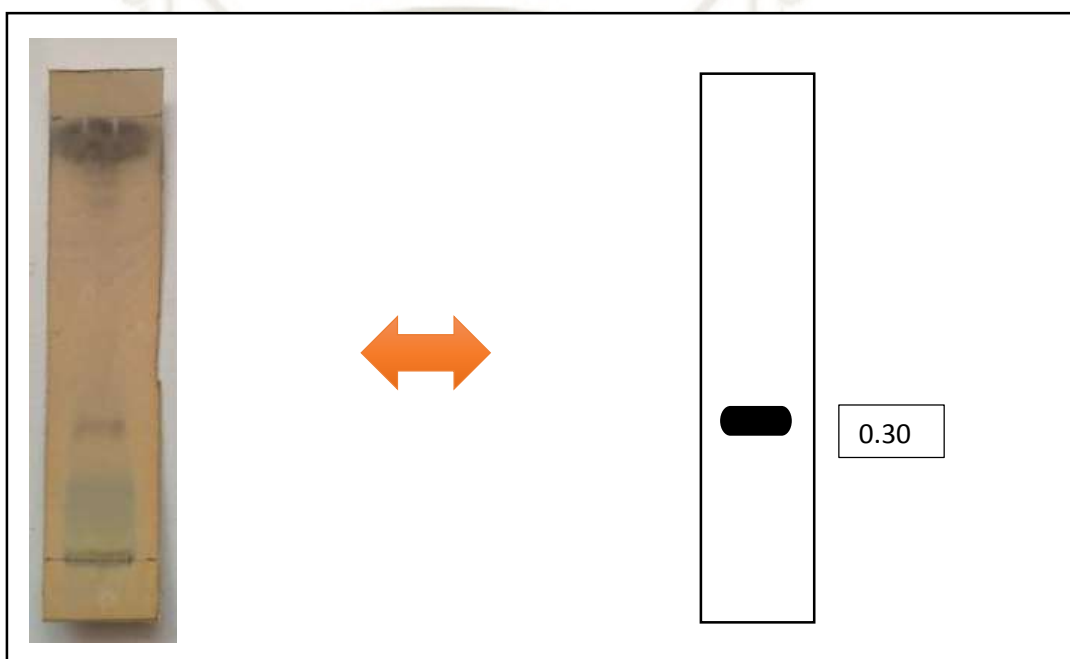


Figura 3.9 Placa cromatográfica para la determinación de taninos

Grupos fenólicos	Intensidad
Flavonoides	+++
Cumarinas	+
Taninos	++

Tabla 3.12 Intensidad de manchas cromatográficas presentes en zapote *Quararibea cordata*.

CONCLUSIONES

- Primera:** Evaluando la capacidad antioxidante *in vitro* del mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote) se determinó en base a los resultados obtenidos que existe diferencia significativa entre los extractos estudiados.
- Segunda:** Se encontró una máxima cantidad de 63.51 mg GAE/100g de muestra de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico, seguido en menor proporción de los extractos clorofórmico con 46.49mg GAE/100g de muestra y 28.07mg GAE/100g de muestra en extractos pentánico.
- Tercera:** Se determinó que el extracto etanólico y clorofórmico presentan una mayor capacidad antioxidante que el extracto pentánico por método DPPH. Se encontró la cantidad de 5.4 $\mu\text{mol TE/g}$ de fruta presentes en el extracto etanólico y 5.3 $\mu\text{mol TE/g}$ de fruta presentes en el extracto clorofórmico.
- Cuarta:** Se identificó con el ensayo cualitativo de cromatografía en capa fina a grupos metabólicos flavonoides, cumarinas y taninos presentes en el mesocarpio de *Quararibea cordata* (zapote).
- Quinta:** Se encontró que el extracto etanólico presento un mayor rendimiento de extracción, un 73% frente a los otros dos extractos clorofórmico y pentánico.

RECOMENDACIONES

- Primera:** Desarrollar determinaciones de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en sus distintos estadios de maduración del zapote.
- Segunda:** Diseñar una metodología para determinar la presencia y concentración de carotenoides en zapote por distintos métodos a diferentes pH por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- Tercera:** Desarrollar determinaciones sobre la cantidad de vitamina A, C y E para incrementar el conocimiento del perfil nutricional del zapote.
- Cuarta:** Difundir los datos de *Quararibea cordata* (zapote) encontrados para incrementar su conocimiento, consumo y apreciación por parte de la población.

REFERENCIAS

1. Wu S, Ng L, Huang Y, Lin D, Wang S, Huang S. Antioxidant Activities of *Physalis Peruviana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005; 28(6): 963-966.
2. Salazar B, Alegría G. Caracterización morfológica insitu del árbol y órgano sensorial del fruto de varias accesiones de zapote(*Matisia cordata*) en tres zonas del Guayas. [Tesis de Grado]. Universidad de Guayaquil.
3. PROMPERÚ lanza marca sectorial "superfoods Perú" en feria de alimentos más importante del mundo. *Revista Agroenfoque*. 2017; 207: 42.
4. Villalobos R, Neyra D. Evaluación del efecto antiinflamatorio de un gel formulado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Quararibea cordata* (Bonpl). Vischer "Zapote" en ratones y evaluación analgésica del extracto hidroalcohólico. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Norbert Wiener.
5. Murillo E, Menchaca D, Giuffrida D, Dugo P, Torre G, Meléndez A, et al. Native carotenoids composition of some tropical fruit. *Food Chemistry*. 2013; 140(4): 825-836.
6. Berto A, Braga A, Campos R, Freitas M, Visentainer J, Fernandes E. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. *Pharm Biol*. 2015; 236-243.
7. Sauthier S, Karnopp G, Michelon N, Ramos A, Monego M, Kipper D. Influencia de la preservación termina sobre las características físico-química, microbiológica y compuestos bioactivos de la pulpa de *Sapota-do-Solimoes Quararibea cordata*. *Revista de Alimentos*. 2017; 16(1): 85-95.
8. Reyes M. Tablas peruanas de composición de alimentos Lima: Centro Nacional de Alimentación y Nutrición; 2017.
9. Berto A, da Silva A, Visentainer J, Matsushita M. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. *Food Research International*. 2015; 77.

10. Fernández J. Nueva especie y notas al género Quararibea (bombacaceae). Revista Académica Colombiana de la Ciencia (Suplemento Especia)l. 2000; 23: 49-52.
11. Barreto L, Roy A. Efectos del preservante CCB en el método de formulación del adhesivo para tableros contrachapados de sapote (Matisia cordata). [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Ingeniería.
12. Kuklinsky K. Farmacognosia: Omega; 1999.
13. Andlauer F. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. 1998; 43(5): 356-360.
14. Fu L, Xu BT, Xu XR, Qin XS, Gan RY, Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. Molecules. 2010; 15(12): 8602-8617.
15. Gutierrez E, Ambriz D, López N, Castillo R, Heiedia J. Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. Archivo Latinoamericano de Nutrición. 2016; 66(2): 87-100.
16. Alvarado N. Estudio fitoquímico preliminar y actividad antioxidante de las hojas de Achyrocline alata DC (huira huira) y su relación con su contenido de compuestos fenólicos totales. [Tesis de grado]. Arequipa. Perú: Universidad Católica Santa María.
17. Creus E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Offam. 2004; 23(6): 80-84.
18. Beserra A, De Sousa P, Arriaga A, Prado G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northe astern Brazil. Food Research International. 2011; 44(7): 2155-2159.
19. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sorces and bioavailability. American society for Clinical Nutrition. 2004; 79(5): 727-747.

20. Lezama K. Determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de uva (*Vitis vinífera*) obtenido con y sin tratamiento enzimático. [Tesis de grado]. Perú. Universidad Nacional Agraria de la Molina.
21. Diaz R. Evaluación de compuestos bioactivos en pulpa atomizada y pulpa congelada de *Mauritiella aculeata* (Kunth) Burret "aguaje". [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
22. Bravo Y, Huaman Y. Efecto hipoglucemiente del arandano (*Vaccinium myrtillus*) en ratas con diabetes mellitus tipo II, inducidas experimentalmente. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
23. Axelle M, Stanislas G, Douraguia E, Gonthier MP. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Reunion French Island. *Food Chemistry*. 2016; 212: 225-233.
24. Tassoni A, Zappi A, Melucci D, Reisch B, Davies P. Seasonal changes in amino acids and phenolic compounds in fruits from hybrid cross populations of American grapes differing in disease resistance. *Plant Physiology et Biochemistry*. 2019; 135: 182-193.
25. Samúdio V, Vieira T, Lousada J, Galdi A, Alves G, Brentan D, et al. Nutraceutical potencial of *Byrsonima cydoniifolia* fruits base don chemical composition, anti-inflammatory and antihyperalgesic activities. *Journal of Food Chemistry*. 2017; 15(237): 240-246.
26. Suarez L. Caracterización de compuestos fenólicos y actividad actioxidantes de extracto hidroalcohólico, infuso y decocto de *Prosopis pallida*. [Tesis de Grado Doctorado]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
27. Sui Kiat C, Alasalvar C, Shahidi F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of functional food*. 2016; 21(C): 113-132.
28. Gil Á, Serra L. Libro blanco del pan España: Médica Panamericana; 2010.

29. Cerón I, RTL N, El-Halwagic , Cardona C. Process synthesis for antioxidant polyphenolic compounds production fro Matisia cordata bonpl (zapote) pulp. Journal of food engineering. 2014; 134: 5-15.
30. Candido T, Silva M, Agostini-Costa TdS. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (Mauritia flexuosa I.F) from the Cerrado and Amazon biomes. Food Chemistry. 2015; 177.
31. Arias M. Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (Brassica rapa L). [Tesis de grado]. España: USC.
32. Parisaca A, Quispe G. Estudio comparativo de la capacidad antioxidante de tres especies de la familia Passiflora in vitro, mediante método cuprac y DPPH, según su estado de madurez. [Tesis de grado] Perú: Universidad Católica de Santa María.
33. Pu F, Ren XL, Zhang XP. Phenolic Compunds and antioxidant activity in fruits of six diospy kaki genotypes. European Food Research and technology. 2013; 237(6).
34. Enciclopedia de la medicina natural. Océano; 2013.
35. Craft B, Kerrihard A, Amarowicz R, Pegg R. Phenol-Based antioxidants and the In Vitro methods used for their assement. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety. 2012; 11(2): 148-173.
36. García B, Saldaña A, Saldaña L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2013; 12(2).
37. Padhi E, Ronghua L, Hernandez M, Tsao Rea. Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulse and their contribution to antioxidant activity. Journal of Functional Food. 2017; 38(3).
38. Encyclopedia of Cancer. M I, editor. Springer: Free Radicals; 2016.
39. Benito P, Clavo S, Gómez C, Iglesias C. Alimentación y nutrición en la vida activa: Ejercicio físico y deporte: UNED; 2014.

40. Nicácio A, Rotta E, Schuelter J, Oliveira É, Kimura E, Visentainer J, et al. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from e.i dc fruits by UHPLC-MS/MS. Food analytical methods. 2017; 10(8): 2718-2728.
41. Jayathilake C, Rizliya V, Liyanage R. Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plant in Sri Lanka C. jayathilake, V. Procedia Food Science. 2016; 6: 123-126.
42. Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archive Toxicology. 2012; 86(3): 341-391.
43. Zenteno B. Extracción de principios activos de estructura fenolica y evaluación de la capacidad antioxidante a partir de Azonella compacta. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
44. Wali A, Gupta M, Mallick S, Gupta S. Antioxidant potencial and phenolic contents of leaf, bark, and fruit of Aegle marmelo. Journal of Tropical Forest science. 2016; 28(3): 268-274.
45. Amersham Biociences Reversed Phase Chromatography. United Kingdom; 1999.
46. Ballester Jea. Química España: NAU libres; 2011.
47. Preethi J, Harita B, Rajesh I. Review on thin layer chromatography. Journal of Formulation. 2017; 1(1): 1-4.
48. Vejar E. Prácticas de bioquímica descriptiva. México; 2005.
49. Sharapin N, Pinzon R. Fundamentos de tecnología de productos fisioterapeuticos Colombia: Andrés Bello; 2000.
50. Quattrocchi O, de Andrizzi A. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. 211-218.
51. Guarnizo a, Martínez P. Experimentos en química orgánica, con enfoque en ciencias de la vida. separación de pigmentos por cromatografía de capa fina Colombia: Ediciones Elizcom; 2012.

52. Cromatografía en capa fina. [Online]. Acceso 16 de octubre de 2020. Disponible en: <http://www.qfa.uam.es/qb/practicass/P6-guion.pdf>.
53. Bolaños N, Lutz G, Herrera C. Química de alimentos. Manual de laboratorio; 2000.
54. Cerón I, Rex N, El Halwagi M, Cardona C. Development and antioxidant capacity of sapota pulp jelly (*Quararibea cordata*). *Journal of Food Engineering*. 2014.
55. Cisnero A. Estudio de la composición químico proximal, compuestos volátiles, actividad antioxidante y antielastasa de dos frutos amazónicos: *Solanun sessiliflorum* Dunal (cocona) y *Matisia cordata* (sapote). [Tesis de grado] Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
56. Aqeel Ashraf M, Jamil Maah M, Yusoff I. Estimation of antioxidant phytochemicals in four different varieties of Durian (*Durio zibethinus murray*) fruit. *Middle-east Journal os Scientific Research*. 2010; 6(5): 465-471.
57. Chavez J. determinación y cuantificaión de flavonoides mediante cromatografía líquida de alta presión HPLC a partir del extracto polar ácido de *Euphorbia laurifolia juss ex* y su actividad toxica. [Tesis de grado]. Perú: Univerisdad Nacional de San Agustín de Arequipa.
58. Fernández K, Flor B. Determinación del efecto antihipertensivo y la actividad antioxidante del extracto del fruto de *Capsicum Pubescens R&P* (Rocoto) en animales de experimentación con hipertensión inducida por L-Name. [Tesis de Grado]. Perú: Universidad Católica Santa María.
59. A Aziz NA, Mhd Jalil AM. Bioactive compounds, nutritional value, and potential health benefits of indigenous durian (*Durio Zibethinus Murr*). *A Review Food*. 2019; 8(3).
60. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis*. 2nd ed. Germany: Springer; 1996.
61. Nina M, Chara G. Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico del extrato y gel de las hojas de *Grindelia glutinosa* (chiri-chiri) en animales de experimentación. [Tesis de Grado]. Perú: Universidad Católica Santa María.

62. Lutz M, Barraza R, Henríquez C. Phenolic compounds content and antioxydant capacity of meals provided to elementary public schools in Chile during 2011. *Arch Latinoam Nutr.* 2015; 65(2): 71-78.
63. Raymond C. *Química*. 9th ed.: McGrawHill; 2012..
64. Cereceres-Aragón A., Rodrigo-García J., Álvarez-Parrilla E., Rodríguez-Tadeo A.. Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2019 Abr [citado 2021 Ago 20];36(2): 470-478. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112019000200470&lng=es. Epub 20- Ago - 2020. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.2171>.
65. de Lima Yamaguchi KK, Ravazi L, Lamarão C, Silva E, da Veiga-Junior V. Amazon acai:Chemistry and biological activities: A rewiew. *Food Chemistry.* 2015;(179): 137-151.
66. Seraoui R, Benkiniouar R, Akkal S, Ros G, Nieto G. Phytochemical investigation, antioxidant and antimicrobial assays of algerian plant *Calamintha baborensis* batt. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2018; 52(4): 347-356.

ANEXOS

Anexo 1 Mesocarpio de zapote fresco



Anexo 2 Mesocarpio de zapote liofilizado



Anexo 3 Pesada de muestra liofilizada



Anexo 4 Aplicación de ultrasonido o sonicación



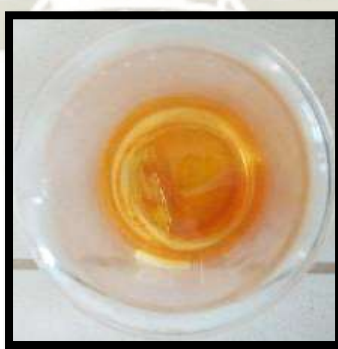
Anexo 5 Primera extracción con solvente



Anexo 6 Extracción con solvente hasta decoloración



Anexo 7 Recolección de muestra alcohólica



Anexo 8 Recolección de muestra clorofórmica



Anexo 9 Recolección de muestra pentánica



Anexo 10 Extracto blando



Anexo11 Contenido de CFT en el liofilizado de *Quararibea cordata*: extracto etanólico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg GAE/100 g
1	0.1095	0.6215	53.6
2	0.1100	0.8419	74.22
3	0.100	0.6602	62.72
Promedio			63.51

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 12 Contenido de CFT en el liofilizado de *Quararibea cordata*: extracto clorofórmico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg GAE/100 g
1	0.1002	0.5372	49.81
2	0.1005	0.5306	48.97
3	0.1224	0.5365	40.71
Promedio			46.49

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 13 Contenido de CFT en el liofilizado de *Quararibea cordata*: extracto pentánico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg GAE/100 g
1	0.1055	0.3488	28.70
2	0.1035	0.2870	23.04
3	0.1084	0.3963	32.50
Promedio			28.07

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 14 Capacidad antioxidante en el liofilizado de *Quararibea cordata* extracto etanólico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg TROLOX
1	0.1095	1.3085	5.408
2	0.1100	1.3616	3.596
3	0.100	1.2699	7.352
Promedio			5.452

FUENTE: Elaboración propia

Anexo15 Capacidad antioxidante en el liofilizado de *Quararibea cordata* extracto clorofórmico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg TROLOX
1	0.1002	1.2748	7.156
2	0.1005	1.3725	3.534
3	0.1224	1.2911	5.365
Promedio			5.352

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 16 Capacidad antioxidante en el liofilizado de *Quararibea cordata* extracto pentánico

Muestras	Peso (g)	Absorbancias	mg TROLOX
1	0.1055	1.4487	0.692
2	0.1035	1.8278	NO SE DETECTA
3	0.1084	1.7422	NO SE DETECTA
Promedio			NO SE DETECTA

FUENTE: Elaboración propia

Anexo 17 Reporte del Laboratorio de Biología UNSA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 05- 2017-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de frutos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Quararibea cordata* (Bonpland) Vischer conocido comúnmente como "zapote" de la familia Malvaceae. Dicha muestra fue obtenida del mercado de productores de la provincia de Arequipa, departamento Arequipa para el estudio de la Tesis "Determinación de la capacidad antioxidante in vitro del extracto etanólico del fruto de "zapote" y evaluación del contenido de polifenoles totales, ejecutado por MIGUEL ANGEL COA SARMIENTO de la Escuela Profesional y Académica de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
 CLASE: MAGNOLIOPSIDA
 SUBCLASE: Dilleniidae
 ORDEN: Malvales
 FAMILIA: Malvaceae
 GENERO: Quararibea
 ESPECIE: *Quararibea cordata* (Bonpland) Vischer

Se expide la presente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 29 de Marzo del 2017



Blgo. Leoncio Marino Herrera
 DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cerrado
 Teléfono: (054) 237755 / 984248674
 Apartado Postal: 0028
 AREQUIPA - PERÚ