

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**

**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE RUBUS  
ROBUSTUS (ZARZAMORA) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
PERFORMANCE CON 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL, AREQUIPA –  
2013.”**

TESIS PRESENTADA POR LA  
BACHILLER:  
**CAMACHO VALENCIA DONGO,  
DANIELA**

PARA OPTAR EL TÍTULO  
**PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

ASESOR DE TESIS:  
**JOSÉ VILLANUEVA SALAS, PHD**

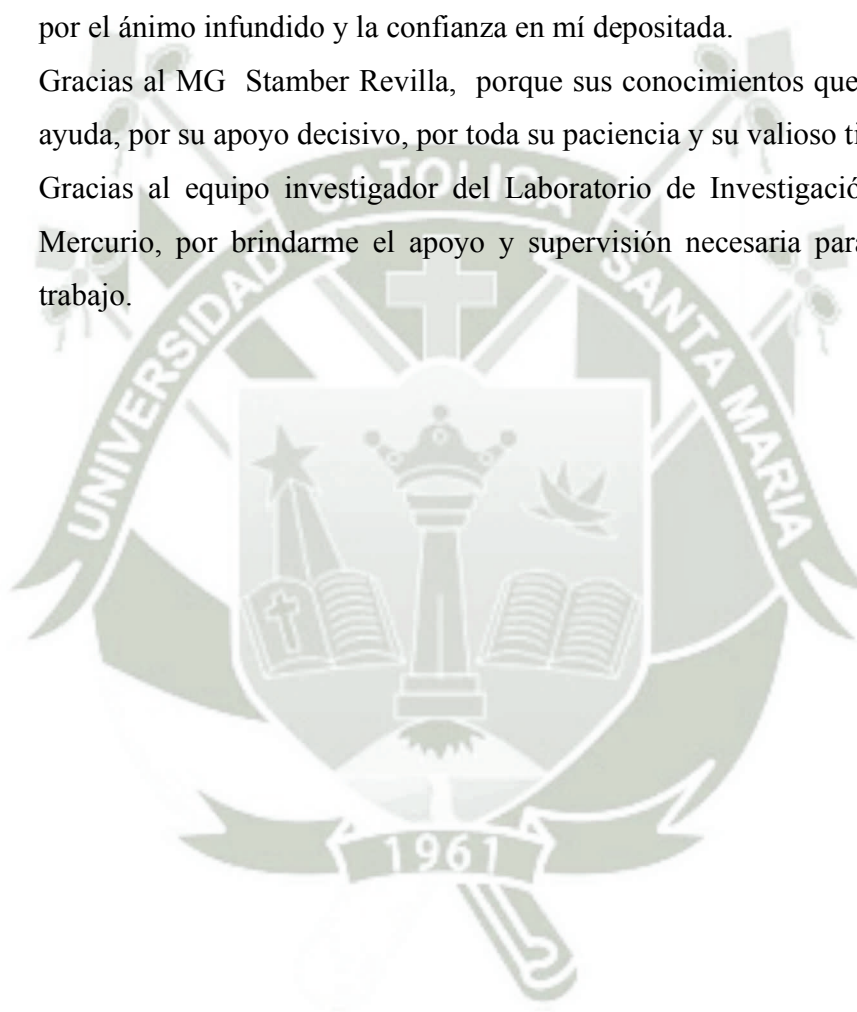
AREQUIPA – PERÚ  
2013

## AGRADECIMIENTOS

Gracias, de corazón, a mi asesor José Villanueva Salas PhD por su paciencia, dedicación, criterio y aliento. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda durante la elaboración de este trabajo de investigación. Me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

Gracias al MG Stamber Revilla, porque sus conocimientos que fueron de gran ayuda, por su apoyo decisivo, por toda su paciencia y su valioso tiempo.

Gracias al equipo investigador del Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio, por brindarme el apoyo y supervisión necesaria para culminar este trabajo.

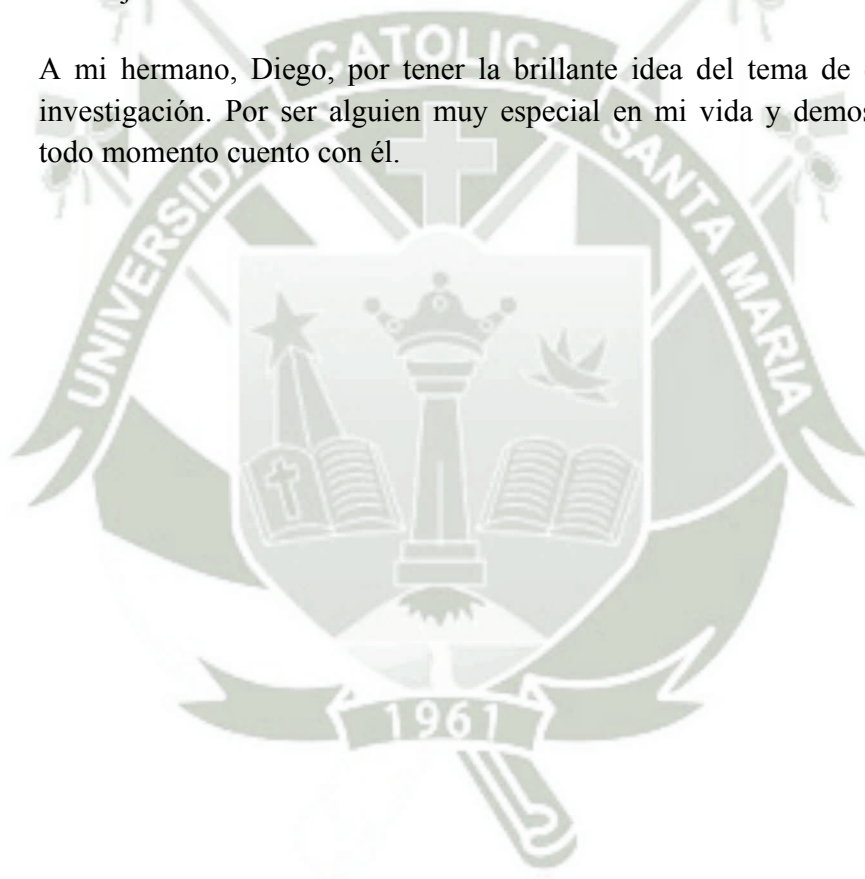


## DEDICATORIA

A Dios, por su amor, bondad y gracia, de haberme permitido llegar a éste punto dándome salud, fortaleza y sabiduría.

A mis padres, Juan Carlos y Celina. Por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi hermano, Diego, por tener la brillante idea del tema de este trabajo de investigación. Por ser alguien muy especial en mi vida y demostrarme que en todo momento cuento con él.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....  | <b>8</b>  |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>MARCO TEÓRICO</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1.1 ZARZAMORA</b> .....  | <b>9</b>  |
| 1.1.1 CLASIFICACIÓN Y NOMBRES COMUNES .....                         | 9         |
| 1.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA ZARZAMORA .....            | 10        |
| 1.1.3 CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS DE LA ZARZAMORA.....               | 11        |
| 1.1.4 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN .....                                   | 12        |
| 1.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA ZARZAMORA .....               | 13        |
| 1.1.6 USOS .....  | 14        |
| <b>1.2 ESPECIES OXIDANTES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES</b> ... | <b>16</b> |
| 1.2.1 ESPECIES OXIDANTES: RADICALES LIBRES (RL) .....               | 16        |
| 1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO .....  | 21        |
| 1.2.3 ANTIOXIDANTES .....   | 23        |
| 1.2.3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES- ALIMENTOS FUNCIONALES ...          | 24        |
| 1.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....              | 25        |
| <b>1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS</b> .....                               | <b>27</b> |
| 1.3.1 CLASIFICACIÓN GENERAL .....                                   | 28        |
| 1.3.2 FUNCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....                     | 29        |
| 1.3.3 ANTOCIANINAS .....  | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.3.3.1 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS .....                              | 32        |
| 1.3.3.2 POLIMERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS.....                            | 33        |
| 1.3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS...                | 33        |
| <b>1.4 CROMATOGRAFÍA .....</b>   | <b>35</b> |
| 1.4.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA .....   | 36        |
| 1.4.2 HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY).....                    | 36        |
| 1.4.2.1 TIPOS DE HPLC .....  | 37        |
| 1.4.2.2 INSTRUMENTACIÓN .....  | 38        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>   | <b>46</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....</b>                                    | <b>46</b> |
| <b>2.2 MATERIALES .....</b>  | <b>46</b> |
| 2.2.1 MATERIAL VEGETAL .....   | 46        |
| 2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....   | 46        |
| <b>2.3 MÉTODOS.....</b>  | <b>48</b> |
| 2.3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....                     | 48        |
| 2.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS .....                     | 48        |
| <b>2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT) .....</b>       | <b>49</b> |
| 2.4.1 MÉTODO DE FOLLIN- CIOCALTEU.....                                     | 49        |
| 2.4.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR<br>ESPECTROFOTOMETRÍA..... | 49        |
| 2.4.3 CÁLCULOS .....   | 51        |
| <b>2.5 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS .....</b>                             | <b>52</b> |
| 2.5.1 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS POR PH DIFERENCIAL.....               | 52        |
| 2.5.2 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS .....                                     | 52        |
| 2.5.3 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR<br>ESPECTROFOTOMETRÍA.....         | 53        |
| 2.5.4 CÁLCULOS .....   | 54        |

|  |    |
|--|----|
| <b>2.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ZARZAMORA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)</b> ..... | 55 |
| 2.6.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK.....  | 56 |
| 2.6.2 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DEL DPPH .....  | 56 |
| 2.6.3 PROCEDIMIENTO.....   | 56 |
| 2.6.4 CARACTERÍSTICAS DEL HPLC .....   | 57 |
| 2.6.5 CÁLCULOS .....   | 58 |
| <b>2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....  | 59 |
| 2.7.1 LINEALIDAD .....   | 59 |
| 2.7.2 SENSIBILIDAD.....  | 62 |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....  | 63 |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | 63 |
| 3.1 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT) ..   | 64 |
| 3.2 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS .....  | 67 |
| 3.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ZARZAMORA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC).....         | 69 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 81 |
| <b>RECOMENDACIONES</b> .....   | 82 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 83 |
| <b>ANEXOS</b> .....  | 91 |

## LISTA DE TABLAS

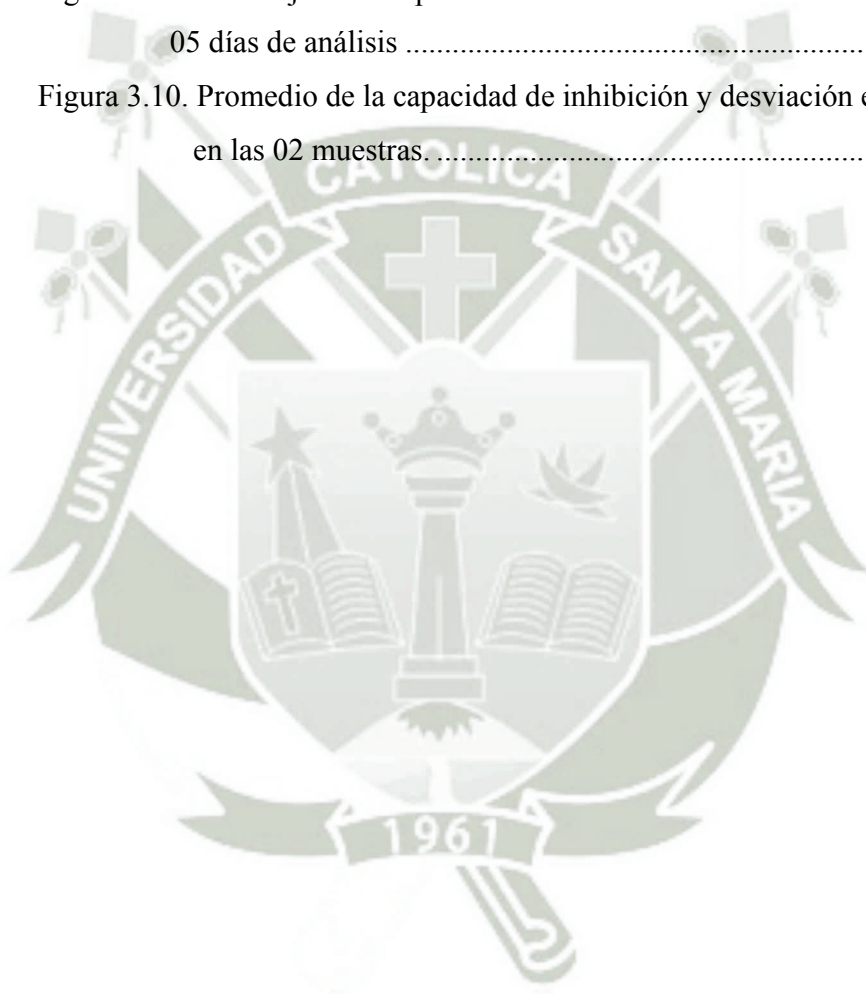
|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.1. Composición nutrimental en 100 g de <i>Rubus robustus</i><br>congelado .....   | 14 |
| Tabla 1.2. Especies reactivas y Radicales libres .....  | 17 |
| Tabla 1.3. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos .....   | 24 |
| Tabla 1.4. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de su<br>estructura básica .....                                      | 29 |
| Tabla 1.5. Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas<br>(mg/ 100 g peso fresco).....                                  | 32 |
| Tabla 2.1. Preparación de la curva de calibración con ác. gálico .....  | 51 |
| Tabla 2.2. Curva de calibración con DPPH .....  | 58 |
| Tabla 2.3. Preparación de la muestra por el método de DPPH .....  | 58 |
| Tabla 3.1. Determinación de la concentración de CFT.....  | 65 |
| Tabla 3.2. Contenido de CFT en <i>Rubus robustus</i> .....  | 67 |
| Tabla 3.3. Determinación de la concentración de antocianinas<br>monoméricas en el liofilizado de <i>Rubus robustus</i> (mg/100g)..... | 69 |
| Tabla 3.4. Áreas obtenidas en HPLC para la determinación de la<br>capacidad de inhibición del radical DPPH.....                       | 71 |
| Tabla 3.5. Porcentajes de la capacidad de inhibición del radical DDPH.....  | 73 |
| Tabla 3.6. Promedio de los porcentajes de la capacidad de inhibición del<br>radical DPPH.....   | 73 |
| Tabla 3.7. Estadística de la regresión de la linealidad .....   | 75 |
| Tabla 3.8. Análisis estadístico para la determinación de la linealidad.....   | 76 |
| Tabla 3.9. Análisis de varianza para la determinación de la linealidad .....  | 77 |
| Tabla 3.10. Cálculos para la determinación del límite de detección<br>y límite de cuantificación .....                                | 77 |
| Tabla 3.11. Áreas de las muestras obtenidas en HPLC para la   |    |

|   |    |
|---|----|
| determinación de la capacidad de inhibición en el<br>liofilizado de <i>Rubus robustus</i> ..... | 80 |
| Tabla 3.12. Porcentaje de la capacidad de inhibición en las muestras<br>analizadas .....        | 80 |

### LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1. Fruto de <i>Rubus robustus</i> .....   | 11 |
| Figura 1.2. Distribución mundial de <i>Rubus spp</i> .....   | 13 |
| Figura 1.3. Estructura química de algunos compuestos fenólicos .....   | 28 |
| Figura 1.4. Esquema de una posible configuración de un cromatógrafo<br>líquido isocrático.....   | 38 |
| Figura 1.5. Inyección mediante válvula de 6 vías.....  | 43 |
| Figura 2.1. Liofilizado de la muestra y su almacenamiento .....  | 50 |
| Figura 2.2. Espectrofotómetro CARY60 UV –VIS, Agilent<br>Technologies .....  | 52 |
| Figura 2.3. Estructuras de las antocianinas a diferentes pH's.....   | 54 |
| Figura 2.4. Estructura química de la Cianidina 3-glucósido .....   | 56 |
| Figura 2.5. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....   | 57 |
| Figura 2.6. HPLC, LaChrom-Hitachi.....   | 59 |
| Figura 3.1. Liofilizado de Zarcamora .....   | 64 |
| Figura 3.2. Curva de la calibración de ácido gálico .....  | 66 |
| Figura 3.3. Contenido promedio de CFT en el liofilizado de<br><i>Rubus robustus</i> .....  | 67 |
| Figura 3.4. Concentración promedio de antocianinas monoméricas<br>en el liofilizado de <i>Rubus robustus</i> .....   | 70 |
| Figura 3.5. Cromatogramas: A) DPPH + Metanol, B) DPPH + Metanol +<br>Trolox (0.06 mM/mL) y C) DPPH + Metanol + Muestra<br>(100 uL de extracto de Zarcamora)..... | 72 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.6. Curva de los porcentajes de inhibición del radical DPPH.....  | 74 |
| Figura 3.7. Representación gráfica de la curva de calibración empleada<br>para la determinación del límite de cuantificación<br>y límite de detección ..... | 78 |
| Figura 3.8. Representación gráfica de la concentración vs la<br>desviación estándar .....   | 78 |
| Figura 3.9. Porcentaje de la capacidad de inhibición durante los<br>05 días de análisis .....   | 81 |
| Figura 3.10. Promedio de la capacidad de inhibición y desviación estándar<br>en las 02 muestras. ....   | 81 |



## ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| ABTS   | 2,2-azobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato         |
| AM     | Antocianinas monoméricas                            |
| ANOVA  | Análisis de varianza                                |
| CFT    | Compuestos fenólicos totales                        |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                           |
| DPPH   | 2,2-difenil-1-picrilhidracilo                       |
| ET     | Transferencia de electrones individuales            |
| FRAP   | Poder antioxidante reductor del Hierro              |
| GAE    | Equivalente de ác. Gálico                           |
| HAT    | Transferencia de átomos de hidrógeno                |
| HPLC   | Cromatografía Líquida de Alta Performance           |
| LDL    | Lipoproteína de baja densidad                       |
| OMS    | Organización Mundial de la Salud                    |
| ORAC   | Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno     |
| PUFA   | Ácidos grasos poliinsaturados                       |
| RCS    | Especies reactivas de cloro                         |
| RL     | Radicales libres                                    |
| RNS    | Especies reactivas de nitrógeno                     |
| ROS    | Especies reactivas de oxígeno                       |
| TRAP   | Potencial de atrapamiento de radicales peróxido     |
| TROLOX | 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2 carboxílico |
| UV     | Ultravioleta  |

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la capacidad antioxidante de *Rubus robustus* (zarzamora) con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), así mismo se evaluó el contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Follin-Ciocalteau y antocianinas por el método del pH diferencial.

Se utilizaron frutos de *Rubus robustus* recolectados en el Valle de Chilina, distrito de Cayma, provincia y departamento de Arequipa, los cuales fueron llevados al laboratorio de la Universidad Católica de Santa María y posteriormente liofilizados en el laboratorio de Ingeniería de la Universidad Nacional de San Agustín. Asimismo, para determinar la especie exacta recolectada, se practicó un análisis morfológico en el Herbario de la misma universidad, el cual determinó que pertenecía a la especie de *Rubus robustus*.

Se encontró que el contenido de compuestos fenólicos fue de 219.11 mg GAE/100 g de *Rubus robustus* liofilizado y el promedio de antocianinas de 52 mg/100g *Rubus robustus* liofilizado.

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el uso de DPPH frente a una solución de Trolox (0.02 – 0.10 mmol/L) presenta una respuesta lineal la cual fue evaluada y validada. Para determinar el porcentaje de inhibición de la capacidad antioxidante de la muestra de zarzamora liofilizada, se trabajó dicha muestra en 02 concentraciones distintas de 1000 y 2000 mg/L obteniéndose un porcentaje de  $35.89 \pm 4.43$  y  $67.23 \pm 3.30$ , respectivamente. También se determinó que el límite mínimo de detección fue de 0.006 mmol/L y el límite de cuantificación fue de 0.020 mmol/L.

Los resultados indican que *Rubus robustus* presenta una buena capacidad antioxidante, por lo tanto, una dieta rica en esta especie podría ayudar a mejorar la calidad de vida de las personas, prevenir el desarrollo y la degeneración de enfermedades causadas por una sobreexposición a radicales libres; así como también podría ser de gran interés para la industria especializada con el fin de promover su uso, tanto natural cuanto procesado, como sustituto de los antioxidantes sintéticos.



## ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the antioxidant capacity of *Rubus robustus* (Blackberry) with DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The contents of total phenolic compounds by the method of Follin-Ciocalteu and anthocyanins by the pH differential method were also evaluated.

*Rubus robustus* was collected in the valley of Chilina, district of Cayma, province and department of Arequipa, Peru. The fruits were taken to Catholic University's laboratory and then lyophilized at the Laboratory of Food Engineering in the National University of San Agustín. Also to determine the exact species of *Rubus* collected, they underwent a morphological analysis on the Herbarium at the University which determined that they belonged to the species of *Rubus robustus*.

It was found that the content of phenolic compounds was 219.11 mg GAE/100 g of lyophilized *Rubus robustus* and the average of anthocyanins was 52 mg / 100g of lyophilized *Rubus robustus*.

The determination of the antioxidant capacity by DPPH using a Trolox solution (0.02 - 0.10 mmol/L) shows a linear response which was evaluated and validated. 02 samples of lyophilized *Rubus robustus* were used in different concentrations of 1000 and 2000 mg/L in order to determine the percentage of inhibition of its antioxidant capacity, obtaining a percentage of  $35.89 \pm 4.43\%$  and  $67.23 \pm 3.30\%$ , respectively. It was also found that the minimum limit of detection was 0.006 mmol/L and the limit of quantification was 0.020 mmol/L.

The results indicate that *Rubus robustus* has a good antioxidant capacity, therefore, a diet rich in this kind of fruit could help improve the quality of people's lives, preventing the development of diseases and degeneration caused by exposure to free radicals. It could also be of great interest to the specialized industry in order to promote their use, both natural and processed, as a substitute for synthetic antioxidants.



## INTRODUCCIÓN

*Rubus robustus* (zarzamora) es un fruto que se asemeja a una baya carnosa de tamaño pequeño, formado por múltiples ovarios provenientes de una sola flor que contienen una pequeña semilla en su interior. Dichos ovarios se encuentran dispuestos alrededor de un núcleo fibroso, agrupados en un receptáculo en forma de racimo.<sup>(51, 53)</sup>

Su cultivo es importante en México, Ecuador, así como en los Estados Unidos; sin embargo, en el Perú éste es un fruto poco comercializado y de un costo elevado.<sup>(46)</sup> La mayor parte de la cosecha de este fruto se pierde ya que es un producto muy sensible y perecedero. Por ello, después de recolectarlas se deben transportar y comercializar en un período de doce horas. Con el fin de evitar el deterioro, se realiza la liofilización, una tecnología de preservación que reduce las pérdidas post-cosecha y proporciona una alternativa viable para la transformación.

Los frutos de *Rubus robustus* son una fuente significativa de fenoles en la dieta humana los cuales tienen un gran potencial antioxidante. Además, poseen antocianinas, carotenoides y un alto contenido de vitamina C.<sup>(54)</sup>

Se produce una oxidación, siempre que una especie cede electrones a otra; la especie que gana electrones se reduce y la que pierde se oxida. En estas reacciones de oxidación se pueden producir radicales libres, especies muy oxidativas. Su incremento en el organismo conduce a un estado de estrés oxidativo en el que se producen lesiones bioquímicas y fisiológicas que pueden perjudicar el metabolismo del individuo, causando daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y llevando eventualmente a la muerte celular.<sup>(50)</sup> El daño oxidativo ha sido implicado en los procesos de envejecimiento<sup>(34)</sup> y en la patogénesis de numerosas enfermedades degenerativas, tales como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o las cataratas.<sup>(30)</sup>

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa las tasas de mortalidad por enfermedades degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo. Este efecto protector se ha atribuido al hecho de que estos alimentos proporcionan al organismo una mezcla óptima de componentes bioactivos, como los compuestos fenólicos y otros antioxidantes naturales. Existe preferencia por los antioxidantes naturales y no de fuentes sintéticas, por lo que la zarzamora es una opción factible.<sup>(4)</sup>

Es importante el estudio de metabolitos secundarios con actividad anti radicales libres de frutos silvestres para su posible aplicación como nutracéutico en la industria alimenticia, para la formulación de medicamentos así como para la caracterización de fuentes asequibles y con alto contenido de antioxidantes naturales.<sup>(59)</sup>

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el contenido de fenoles totales y antocianinas mediante espectrofotometría; así como, el porcentaje de inhibición por el método de DPPH del liofilizado de fruto de *Rubus robustus* recolectado en Arequipa, Perú. De este modo se busca fomentar su consumo en la ciudad de Arequipa y así prevenir enfermedades causadas por procesos oxidativos.

## OBJETIVOS

1. Obtener el liofilizado del jugo del fruto de *Rubus robustus*.
2. Determinar la cantidad de compuestos fenólicos y antocianinas del liofilizado del jugo *Rubus robustus*.
3. Determinar la capacidad antioxidante del liofilizado del jugo *Rubus robustus* (zarzamora) mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance utilizando el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
4. Relacionar la capacidad antioxidante del liofilizado del jugo *Rubus robustus* (zarzamora) con el contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas.

## HIPÓTESIS

Dado a que existen referencias de que la especie *Rubus robustus* (zarzamora) tiene un contenido de compuestos fenólicos, es probable que dicha especie posea una capacidad antioxidante que pueda ser determinada por Cromatografía Líquida de Alta Performance utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1 ZARZAMORA

##### 1.1.1 CLASIFICACIÓN Y NOMBRES COMUNES

###### Posición taxonómica de *Rubus robustus*<sup>(16)</sup>

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| Reino:      | <i>Plantae</i>       |
| División:   | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase:      | <i>Magnoliopsida</i> |
| Orden:      | <i>Rosales</i>       |
| Familia:    | <i>Rosaceae</i>      |
| Subfamilia: | <i>Rosoideae</i>     |
| Género:     | <i>Rubus</i>         |
| Especie:    | <i>Robustus</i>      |

**Nombres comunes:** Zarza, zarzamora, murra o mora

*Rubus robustus* es un arbusto de aspecto sarmentoso, cuyas ramas espinosas y de sección pentagonal, pueden crecer hasta 3 metros. Pertenece a la familia de las rosáceas y es popularmente conocido por sus frutos: las zarzamoras.

Es una planta muy invasiva y de crecimiento rápido que también puede multiplicarse vegetativamente generando raíces desde sus ramas. Puede colonizar extensas zonas de bosque, monte bajo, laderas o formar grandes setos en un tiempo relativamente corto.<sup>(5)</sup>

Existen más de 300 especies de zarzamora, aunque sólo nueve tienen valor comercial. A nivel mundial, las variedades de cultivo proceden de las especies *Rubus occidentalis* o de hibridaciones con *Rubus ideaus*. En Colombia, la especie cultivada comercialmente es la *Rubus glaucus* o mora de Castilla.<sup>(14, 16)</sup>

Dentro de las moras cultivadas existen variedades e híbridos con espinas y variedades sin espinas. Asimismo, dentro de esta clasificación se diferencian comercialmente en dulces y no dulces.<sup>(51)</sup>

### 1.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA ZARZAMORA

Es una planta de vegetación perenne, cuyo hábito de crecimiento es trepador, con tallos semirrectos de longitud variable (con varios tallos espinosos de hasta 3 metros de largo, redondeados, espinosos y ramificados).<sup>(32)</sup>

Las hojas son imparipinnadas, compuestas por 3 ó 5 folíolos peciolulados, de forma elíptica ovada u obovada de 5-12 cm de largo, con borde dentado o aserrado, de color verde oscuro por el haz y blanco-tomentoso por el envés.<sup>(32)</sup>

Las flores son hermafroditas, ubicadas en racimos de unos 30 cm de largo dando lugar a inflorescencias de forma oblonga o piramidal. Son blancas o rosadas, de 5 pétalos y 5 sépalos., dando lugar a inflorescencias de forma oblonga o piramidal.<sup>(13)</sup>

Los sépalos son grises o tomentoso-blanquecinos. El color de los pétalos varía desde el blanco al rosa, tienen de 10 a 15 mm y son de forma ovada. Los pistilos son filiformes simples, cada pistilo tiene un ovario que da origen a un pequeño fruto carnoso llamado drupa.<sup>(13)</sup>

El fruto se presenta como un agregado de drupas adheridas al receptáculo floral común, que se desarrollan independientes cada una, en conjunto parecen un cono de 1 a 2.5 cm de longitud, de color rojo oscuro en la madurez y púrpura cuando están sobremaduras (Ver Figura 1.1). La parte carnosa y jugosa son el epicarpio y mesocarpio, el endocarpio es una porción lignificada, dura y envuelve a la semilla (en cada drupa madura existe una semilla). La maduración de los frutos no es uniforme por cuanto la floración no es homogénea.<sup>(54)</sup>



**Figura 1.1: Fruto de *Rubus robustus***<sup>(44)</sup>

### 1.1.3 CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS DE LA ZARZAMORA

La planta de la zarzamora se desarrolla mejor en suelos arcillosos, de modo que permitan una adecuada reserva de agua y el exceso sea evacuado fácilmente, con alto contenido de materia orgánica rica en fósforo y potasio. Se debe mantener una relación de calcio, magnesio, potasio (Ca: Mg: K 2:1:1) ya que junto con el boro son responsables de una mayor o menor resistencia a las enfermedades.<sup>(53)</sup>

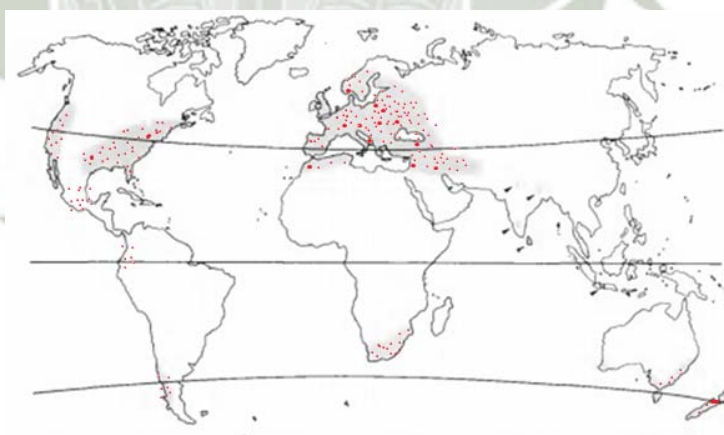
Debe presentar un buen drenaje, tanto interno como externo, ya que es una planta altamente susceptible al encharcamiento, se adapta bien al pH ácido entre 5.2 y 6.7 siendo el pH óptimo 5.7.<sup>(53)</sup>

En cuanto a las condiciones climáticas, este cultivo se desarrolla en alturas comprendidas entre 1500 y los 2400 m.s.n.m. con temperaturas entre los 11 y 18°C, y precipitación de 1500 y 2000 mm anuales.<sup>(54)</sup>

#### 1.1.4 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El origen del género *Rubus* es muy antiguo, se dice que fue conocida en el mundo clásico de hace 2000 años atrás, como alimento, medicamento y como cercas de protección para las viviendas. Procedentes de Asia y América, crecen en setos y ribazos, bordes de caminos, paredes y matorrales en muchas regiones templadas de América, Asia y Europa.<sup>(49)</sup>

Abunda en Norteamérica y es particularmente frecuente en el oeste de Europa, especialmente en los países mediterráneos, donde se considera una planta invasiva de los terrenos cultivados y requiere grandes esfuerzos para erradicarla. Existen especies adaptadas al Ártico, donde son especialmente útiles como alimento para la fauna salvaje. (Ver Figura 1.2)



**Figura 1.2: Distribución mundial de *Rubus spp*<sup>(41)</sup>**

La zarzamora de Castilla *Rubus glaucus* fue descubierta por Hartw y descrita por Benth. Es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador.

### 1.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA ZARZAMORA

Los frutos de zarzamora contienen un elevado porcentaje de agua, alrededor del 80% de su peso total, por eso tiende a ser más jugosa que carnosas. Dentro del jugo se encuentran disueltas una gran cantidad de sustancias, siendo las principales los azúcares y los ácidos orgánicos. Los azúcares constituyen uno de los componentes solubles de mayor predominancia y para la zarzamora se han mencionado relaciones azúcar/ácido desde 2.8 hasta 7.1<sup>(61)</sup>

El segundo componente de mayor predominancia lo constituyen los ácidos orgánicos, entre de los cuales los principales son el ácido málico y el ácido isocítrico pero también existen el ácido láctico, succínico, oxálico y salicílico y una serie de ácidos naturales con propiedades anticancerosas (ácidos clorogénico, ferúlico, ursólico)<sup>(43)</sup>

Asimismo, posee vitaminas, especialmente las vitaminas C, E y A, sales de calcio, potasio, hierro, manganeso y tienen un alto contenido en fibra; sin embargo, lo que más caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales, antocianinas y otros compuestos fenólicos, que además de conferirle su color y sabor característico, tienen acción antioxidante.<sup>(8)</sup> Éste fruto cuenta con bajo nivel calórico por su escaso aporte de carbohidratos y sólo el 1% es proteína.<sup>(42)</sup>

En la Tabla 1.1 se puede observar la composición nutrimental de *Rubus robustus* congelado.

**Tabla 1.1: Composición nutrimental en 100g de *Rubus robustus* congelado<sup>(16)</sup>**

| Componente          | Contenido | Componente                     | Contenido |
|---------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| Energía(Kcal)       | 59.00     | Vitamina A Equiv. Totales (µg) | 39.000    |
| Agua (g)            | 85.6      | Vitamina B6 (mg)               | 0.061     |
| Proteína (g)        | 0.700     | Ácido pantoténico(mg)          | 0.150     |
| Nitrógeno(g)        | 0.189     | Vitamina C (mg)                | 21.00     |
| Lípidos (g)         | 0.600     | Sodio, Na (mg)                 | 1.000     |
| Carbohidratos (g)   | 12.600    | Potasio, K (mg)                | 196.00    |
| Fibra dietética (g) | 2.700     | Calcio, Ca(mg)                 | 32.000    |
| Cenizas(g)          | 0.500     | Magnesio, Mg(mg)               | 22.000    |
| Humedad (g)         | 82.200    | Fósforo, P(mg)                 | 21.000    |
| Tiamina (mg)        | 0.029     | Hierro, Fe(mg)                 | 0.500     |
| Riboflavina (mg)    | 0.046     | Cobre, Cu (mg)                 | 0.120     |
| Niacina(g)          | 1.200     | Manganeso, Mn (mg)             | 1.220     |

Según la Comisión de Oregon Caneberry y Blackberry (2002) la semilla de la zarzamora presenta altos contenidos de los aceites oleico, linoleico, linolénico y palmítico que tienen efecto en la prevención de enfermedades del corazón y cáncer.

El periódico La Nación (5 de julio de 2000), cita un reportaje de EFE Y AP en donde se indica que el transresveratrol, o sólo resveratrol (se le conoce abreviadamente como res), controla el funcionamiento de la proteína NF-Kappa B, que a su vez está relacionada con la destrucción de las células cancerígenas y problemas cardíacos. Entre los productos que lo contienen están el maní, las zarzamoras y las uvas. También evita la inflamación celular, que está asociada a la artritis y otras enfermedades.

La Fundación Grupo Eroski menciona que el consumo de la zarzamora es importante porque tiene un alto contenido de antocianinos y carotenoides, que son antioxidantes, que neutralizan la acción de los radicales libres (nocivos para

el organismo) con lo cual se producen efectos antiinflamatorios y acción antibacteriana. Además mencionan que la zarzamora posee un alto contenido de vitamina C y altas cantidades de fibra. Agregan que la ingesta de estas sustancias potencia nuestro sistema inmunológico y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer. Además es un buen diurético.

### 1.1.6 USOS

Poseen propiedades vulnerarias, es decir que son capaces de curar las heridas. Las hojas y los tallos jóvenes de las zarzamos constituyen uno de los mejores vulnerarios porque sirven para remediar llagas y las heridas de la piel, debido a que son ricos en ácido ascórbico, ácido clorogénico y neoclorogénico.<sup>(40)</sup>

Además posee un alto contenido de antimicrobianos (ascórbico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido málico, arbutina, hidroquinonas y los taninos) que ayudan a eliminar los microorganismos de las heridas. Tienen la capacidad de eliminar el exceso de líquidos de las heridas y ayudar a secarlas debido a la propiedad astringente de los taninos.<sup>(20)</sup>

Finalmente, posee propiedades antiinflamatorias que ayudan a disminuir la hinchazón de las heridas gracias al ácido ascórbico, ácido clorogénico y ácido ferúlico.<sup>(20)</sup>

#### Uso interno:

- Diarrea: Las hojas de la zarzamora poseen propiedades astringentes ideales para curar la diarrea, gracias a las hidroquinonas que contienen.
- Diabetes: Gracias al ácido ascórbico y ácido ursólico.
- Inflamaciones intestinales.
- Úlceras
- Angina

- Forúnculos
- Inflamaciones de la lengua
- Inflamaciones de la laringe
- Encías
- Hemorroides

El *Rubus robustus* (zarzamora) es una planta muy interesante, que aparte de sus usos medicinales, ofrece los siguientes<sup>(40)</sup>:

- Su fruto puede ser comido como golosina, o preparado en forma de mermelada o postres.
- También puede ser transformado en licor de moras.
- Con sus hojas se puede hacer un excelente té casero.
- Con las cortezas de las ramas largas, despejadas de espinas y hojas, y abiertas longitudinalmente y separadas en 4 partes, pueden ser trenzadas para elaborar cuerdas.
- El jugo de los frutos, es una bebida refrescante y tonificante, que ayuda en caso de debilidad o fiebre.

## **1.2 ESPECIES OXIDANTES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES**

### **1.2.1 ESPECIES OXIDANTES: RADICALES LIBRES (RL)**

El oxígeno, elemento imprescindible en la vida de los organismos aerobios, es también la causa del envejecimiento y del deterioro de los mismos. Es requerido para la generación de todas las especies reactivas (Tabla 1.2), es decir las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), y especies reactivas de cloro (RCS).

**Tabla 1.2: Especies reactivas y Radicales libres<sup>(30)</sup>**

|                         | ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)   | ESPECIES REACTIVAS DEL CLORO (RCS)  | ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO (RNS)  |
|-------------------------|---|---|---|
| <b>Radicales libres</b> | Superóxido ( $O_2^-$ ), Hidroxilo(OH), Hidroperoxilo( $HO_2$ ), Peroxilo( $R_2$ ), Alcoxilo(RO), Carbonato( $CO_3$ ), Dióxido de carbono( $CO_2$ )                                  | Cloro atómico( Cl)  | Óxido nitroso (NO)<br>Dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ )   |
| <b>No radicales</b>     | Peróxido de hidrógeno( $H_2O_2$ ), Ác.hipobromoso(HOBr), Ác.hipocloroso(HOCl), Ozono( $O_3$ ), Singlete de oxígeno(O), Peróxidos orgánicos(ROOH), Peroxinitrito(ONOO <sup>-</sup> ) | Ác. Hipocloroso(HOCl), Cloruro de nitrilo( $NO_2Cl$ ), Cloraminas, Gas de cloro( $Cl_2$ ) | Catión de nitroso( $HNO_2$ ), Aniones de nitrosilo( $NO^+$ ), Aniones de nitroxilo( $NO^-$ ), Tetraóxido de dinitrógeno( $N_2O_4$ ), Peroxinitrito(ONOO), Ác. Peroxinitroso(ONOOH), Catión nitrilo(NO), Peroxinitrito de alquilo(ROONO), Cloruro de nitrilo( $NO_2Cl$ ) |

Un radical libre se define como un átomo o molécula que tiene uno o más electrones no apareados girando en sus órbitas externas. Es por esto que los radicales libres oxidan a las moléculas vecinas para así adquirir un equilibrio químico.<sup>(7)</sup>

Pero esas moléculas vecinas, al momento de ser oxidadas por los radicales libres, se convierten en especies radicalarias inestables (señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo) que van en busca de electrones de otras moléculas vecinas y es así como se genera una reacción en cadena capaz de destruir estructuras biológicas importantes.<sup>(7)</sup>

Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar.<sup>(64)</sup>

Desde el punto de vista molecular, son pequeñas moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.<sup>(7)</sup>

Los radicales libres son producidos por un gran número de mecanismos tanto endógenos como exógenos.<sup>(31)</sup>

Existen cuatro fuentes principales que explican la producción de radicales libres endógenamente:

- a) La mitocondria, que funciona como el sistema energético de la célula, interactúa con el oxígeno para producir la síntesis del ATP, produciendo radicales libres, que bajo condiciones especiales del organismo se convierten en sustancias tóxicas, responsables de daños celulares. En estas condiciones fisiológicas, la formación de radicales está vinculada a la actividad física e incluso a la intensidad de oxigenación. Esta producción puede también intensificarse cuando se producen desórdenes mitocondriales genéticos, inflamatorios o nutricionales.
- b) La inflamación es otra fuente de radicales libres producidos directamente por el complejo enzimático NADPH oxidasa de las células fagocitarias activadas. Este mecanismo, cuando se controla, es capital en la lucha infecciosa ya que permite la fagocitosis de las bacterias y cuerpos extraños. Además las células inflamatorias e inmunes pueden producir citoquinas como el TNF- $\alpha$  que es capaz de hacer producir radicales libres para las mitocondrias de las células destino.

- c) En los animales, las enzimas del Citocromo P450, constituyen uno de los sistemas de defensa primario contra los componentes químicos naturales de las plantas (que tienen la mayor fuente de toxinas de la dieta). La inducción de estas enzimas previenen efectos tóxicos de los químicos.
- d) Peroxisomas, los cuales son los organelos responsables de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas. Estos producen peróxido de hidrógeno como subproducto que luego es degradado por la catalasa.

Como fuentes exógenas de producción de radicales libres encontramos:

- a) Los metales tóxicos (cromo, vanadio, cobre) y también el hierro libre generan en presencia de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos muy reactivos.
- b) Los rayos ionizantes, rayos X, rayos gamma o ultravioletas son capaces de producir aniones superóxidos.
- c) Las dietas normales contienen comidas con vegetales con grandes cantidades de compuestos fenólicos naturales (ác. caféico, ác. clorogénico) los cuales pueden generar oxidantes por el ciclo de redox<sup>(4)</sup>

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

**1. Lípidos:** Donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo, ya que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos polinsaturados (PUFA). Los PUFA son parte esencial de los fosfolípidos que forman la capa bilipídica de las membranas dándole fluidez,

al ser oxidados por los radicales libres dan lugar a la lipoperoxidación, una reacción en donde los PUFA ceden sus electrones a los radicales libres.

Este efecto provoca el mayor daño a la célula al producir cambios en la estructura molecular de la membrana, lo anterior aunado a la formación de puentes disulfuro de las proteínas de membrana, dan como resultado la pérdida de permeabilidad y estabilidad de la membrana, provocando la muerte celular.<sup>(33)</sup>

**2. Proteínas:** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Los radicales libres oxidan a los aminoácidos, que constituyen a las proteínas produciendo diversas modificaciones tales como: la formación de grupos carbonilo, asociación de fragmentos proteicos por entrecruzamientos de enlaces disulfuro, rompimiento de enlaces peptídicos, pérdida de la afinidad por los metales, incremento en la hidrofobicidad, ocasionando que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad. Los radicales provocan que las proteínas que sufren un daño oxidativo presenten un deterioro en la actividad hormonal y enzimática, así como el transporte de iones, además de una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica.<sup>(65)</sup>

**3. Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Se sabe que el daño oxidativo sobre el DNA, producido específicamente por el OH, conduce a diversas modificaciones, principalmente en la desoxirribosa, provocando una liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar. Lo anterior produce el rompimiento de una o ambas cadenas ocasionando deleciones que dan como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, que afectan incluso la biosíntesis de cadenas de DNA. Además el estrés oxidativo produce errores durante la transcripción y traducción del RNA. Así, el daño oxidativo sobre las diversas biomoléculas puede conducir a un deterioro del metabolismo y estructura celular que provoca la muerte de las células.<sup>(65)</sup>

### 1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión.<sup>(38)</sup>

El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos.

El estrés oxidativo puede originarse por 2 situaciones:<sup>(31)</sup>

- Disminución de antioxidantes debido a la malnutrición. Por ejemplo, por ingesta dietética insuficiente de alfa-tocoferol, ácido ascórbico o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutatión.
- Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno a causa de la exposición de células a elevados niveles de oxígeno u otras toxinas que en sí mismas son especies reactivas. Por ejemplo, elevada concentración de contaminantes o excesiva activación de los sistemas naturales productores de radicales (en enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide o situaciones agudas en las que se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica como en la enfermedad grave.

Las células pueden tolerar casos de estrés oxidativo leve; sin embargo, situaciones severas pueden afectar el metabolismo celular, a través de la rotura de moléculas de DNA, del aumento de concentración del calcio intracelular, del daño a proteínas o peroxidación de lípidos.<sup>(38)</sup>

En la actualidad se han reportado casi 100 enfermedades en las que existen certezas experimentales sobre la incidencia del desbalance del estado oxidativo en su surgimiento y desarrollo entre ellas: cardiovasculares, neurológicas, endocrinas, respiratorias, de origen inmune y autoinmune, isquemia, trastornos gástricos, carcinogénesis y progresión de tumores. Quizás las enfermedades más estudiadas en relación con su progresión y el incremento de marcadores del estrés oxidativo son las neurodegenerativas. El papel de los radicales libres en enfermedades cardiovasculares es crucial; en aquellos pacientes que presentan estos padecimientos, la capacidad del organismo se ve disminuida en la formación de vasos sanguíneos (neovascularización), desarrollando enfermedades de riesgo como hipertensión y arterioesclerosis vascular.<sup>(29)</sup>

Es importante tener en cuenta otros factores que desencadenan el estrés oxidativo, como el tipo de vida y de dieta que actúan como prooxidantes. Un ejemplo conocido es el tabaco inhalado, el cual es considerado un poderoso prooxidante exógeno. El incremento indirecto del proceso oxidativo del tabaco inhalado puede incrementar un estrés oxidativo secundario debido a la inflamación pulmonar. En cuanto a los factores alimenticios, se conoce que las dietas ricas en grasas pueden contribuir a un estrés oxidativo debido al incremento de peroxidación lipídica; las carnes rojas ricas en grasas se cree que intensifican el estrés oxidativo a través de la ingesta del hierro heme, molécula que contiene metales como el hierro que son capaces de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal; esta acción cataliza reacciones que producen radicales hidroxilo y especies reactivas del oxígeno.

### 1.2.3 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en concentraciones bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasan o inhiben la oxidación de dicho sustrato.<sup>(30)</sup> Son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres.

Existen muchos tipos de clasificación de antioxidantes, pero para simplificarla, se tomó una clasificación específica según su naturaleza: (Ver Tabla 1.3)

- **Antioxidantes enzimáticos o endógenos:** Incluyen a enzimas como superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX), tiorredoxinareductasa y glutatión reductasa.
- **Antioxidantes no enzimáticos o exógenos:** Están determinados por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen logrando retrasar la producción y acción de los radicales libres. Algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son el glutatión, ácido lipóico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los bioflavonoides, la vitamina E (alfa tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetyl-L-carnitina, coenzima Q10, curcumina, N-acetil-cisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes.

**Tabla 1.3: Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos<sup>(31)</sup>**

| Antioxidantes enzimáticos    | Ubicación celular  | Propiedades antioxidantes  |
|------------------------------|--|--|
| Mn superóxidodismutasa.      | Mitocondria.   | Eliminación del radical superóxido.  |
| Catalasa.                    | Citosol y mitocondria.   | Remueve hidroperóxidos (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                          |
| Glutación peroxidasa         | Citosol y mitocondria.   | Remueve hidroperóxidos   |
| Glutación reductasa          | Citosol y mitocondria.   | Reducción del glutatiión oxidado   |
| Metionina sulfóxidoreductasa | Citosol y mitocondria.   | Reparación de residuos oxidados de metionina                                     |
| Antioxidantes no enzimáticos |  |  |
| Vitamina E                   | Compuestos fenólicos solubles en lípidos, localizados en membranas.        | Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica.          |
| Vitamina C (ác. ascórbico)   | Soluble en agua, localizado en citosol.                                    | Neutraliza una amplia variedad de ROS en la fase acuosa, regenera la Vitamina E. |
| Ác. Lipóico                  | Tiol endógeno, localizado tanto en la fase acuosa como en la fase lipídica | Interviene en el reciclado de Vitamina C por ser buen sustituto de la GSH.       |
| Ubiquinonas                  | Derivados de quinonas, solubles en lípidos; localizadas en membranas.      | Las formas reducidas son antioxidantes eficientes.                               |
| Carotenoides                 | Soluble en lípidos, localizados principalmente en membranas.               | Antioxidantes, reducen la peroxidación lipídica.                                 |

### 1.2.3.1 ANTIOXIDANTES NATURALES- ALIMENTOS FUNCIONALES

Las frutas y vegetales ayudan a reducir de manera considerable las enfermedades crónicas, como cáncer o enfermedades cardiovasculares. Este efecto de protección ha sido asociado con una variedad de constituyentes nutrientes y no nutrientes, siendo muchos de ellos caracterizados por sus propiedades antioxidantes.<sup>(32)</sup> Se trata además de productos que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos tradicionales habituales.

El alimento funcional (*Functional food*) se define: Cualquier alimento en forma natural o procesada que, además de sus componentes nutritivos, contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. El calificativo de funcional se relaciona con el concepto

bromatológico de "propiedad funcional", o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo.<sup>(60)</sup>

Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra dieta y existen evidencias de su rol en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.<sup>(3)</sup> Miles de moléculas que contienen la estructura de los polifenoles (grupos hidroxilos en anillos aromáticos) han sido encontradas en plantas comestibles como en la zarzamora. Estas moléculas son metabolitos secundarios de plantas y generalmente están envueltos en defensas en contra de la radiación ultravioleta y de la agresión de patógenos.<sup>(28)</sup>

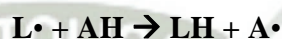
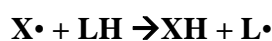
#### **1.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.<sup>(6)</sup>

Existen diversos métodos para medir o determinar la capacidad antioxidante de un compuesto; éstos difieren en el agente oxidante o sustrato que utilicen, en la medida del punto final, en la técnica de instrumentación utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción.

Las reacciones químicas implicadas en los principales ensayos de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos categorías:<sup>(12)</sup>

• **Transferencia de átomos de hidrógeno (HAT):** Mide la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. Como se muestra, un sustrato oxidable (LH) es atacado por un radical libre ( $X\bullet$ ) generando una especie no radicalaria (XH) y un nuevo radical libre ( $L\bullet$ ). Por su parte, en la segunda reacción se muestra como el antioxidante (AH) transfiere un átomo de hidrógeno para estabilizar el radical libre  $L\bullet$  y generar la especie  $A\bullet$



Generalmente está compuesta de un generador sintético de radicales libres, una molécula oxidable y un antioxidante.

• **Transferencia de electrones individuales (ET):** Estos métodos determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Describen reacciones más lentas que las HAT y por esto los cálculos de actividad antioxidante se basan en porcentajes de disminución en los productos más que en cinéticas de reacción. Implican una reacción redox con el oxidante, como un indicador del punto final de la reacción.

Ensayos que utilizan el mecanismo HAT:<sup>(22)</sup>

• **ORAC** (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno), basado en la inhibición del radical peroxil inducido por el [2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride] (AAPH) que es un compuesto "azo". Esta inhibición se mide por la permanencia de la fluoresceína.

- **TRAP** (Potencial de atrapamiento de radicales peróxido), al igual que el ORAC determina la captación del radical peroxil inducido por el AAPH y se mide el oxígeno consumido, mediante un electrodo de oxígeno.

Ensayos que utilizan el mecanismo ET:

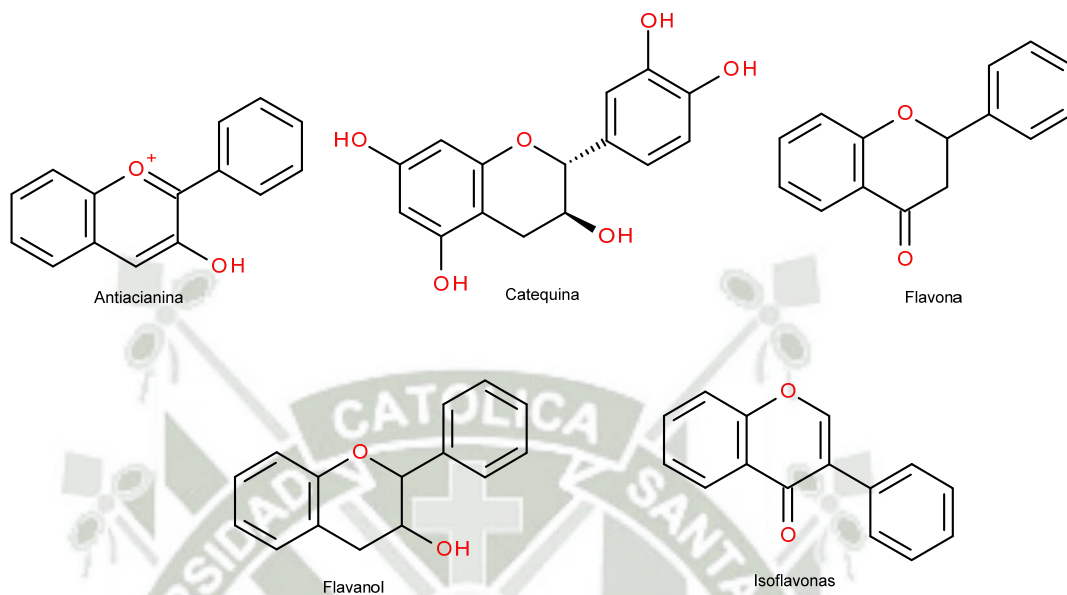
- **DPPH** (2,2'- difenil-1-picrilhidrazilo), es un método colorimétrico basado en la disminución de la absorbancia que se mide a 515 nm.
- **ABTS** [ácido-2,2'azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], se basa en la capacidad del antioxidante para captar el radical catiónico ABTS, lo que se evidencia mediante la decoloración y la disminución de la absorbancia a 734 nm.
- **FRAP** (Potencial antioxidante para reducir al hierro), se basa en la reducción del complejo tripiridiltriazina férrica a su estado ferroso por un antioxidante en medio ácido a 595 nm.

### 1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol (nombre popular del hidroxibenceno), unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Estos se encuentran generalmente en las plantas en forma de ésteres o glucósidos.<sup>(3)</sup>

Por lo general, se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol. Sin embargo, en ocasiones esta nomenclatura se reduce a los hidroxicompuestos y los metilfenoles reciben el nombre especial de cresoles. Esta definición incluye los fenoles di y trihídricos, los ácidos hidrobencóicos, nitrofenoles, clorofenoles, aminofenoles, metoxifenoles, fenoxifenoles, alquilfenoles y derivados de

núcleos aromáticos condensados (naftoles) (Figura 1.3). Las propiedades de cada uno de ellos dependen de la naturaleza de los grupos sustituidos en el anillo bencénico.<sup>(35)</sup>



**Figura 1.3: Estructura química de algunos compuestos fenólicos<sup>(39)</sup>**

### 1.3.1 CLASIFICACIÓN GENERAL

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos como se muestra en la Tabla 1.4.<sup>(39)</sup>

#### No flavonoides

- Fenoles no carboxílicos: C<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Por ejemplo: Derivados de arbutina y floroglucinol.
- Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> y derivados del ácido cinámico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Por ejemplo: Ác. gálico y ác. salicílico.

**Flavonoides (C6-C3-C6) Son los más comunes.**

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado (Difenilpropano C6-C3-C3). Subgrupos:

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos.

**Tabla 1.4: Clasificación de los compuestos fenólicos en función de su estructura básica<sup>(40)</sup>**

| NUMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO | DE ESQUELETO   | CLASE   |
|-----------------------------|--|---|
| 6                           | C <sub>6</sub>   | Fenoles Simples, Benzoquinonas  |
| 7                           | C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>                                  | Acidos Fenolicos  |
| 8                           | C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>                                  | Acetofenona, Acido Fenilacético   |
| 9                           | C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>                                  | Acidohidroxicinamico, Cromonas, Coumarinas, Isocoumarinas, Polipropenos |
| 10                          | C <sub>6</sub> - C <sub>4</sub>                                  | Naftoquinonas   |
| 13                          | C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub>                 | Xantonas  |
| 14                          | C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>                 | Estilbenos, Antraquinonas   |
| 15                          | C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>                 | Flavonoides, Isoflavonoides   |
| 18                          | (C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | Lignanos, Neolignanos   |
| 30                          | (C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> | Biflavonoides   |
| n                           | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>                   | Ligninas  |
|                             | (C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>                                   | Catecolmelanina   |
|                             | (C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> | (Taninos Condensados)   |

**1.3.2 FUNCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

La posible funcionalidad de los compuestos fenólicos en las plantas ha sido a lo largo de los años un tema complejo. En 1917, M. Wheldale escribió un libro sobre el papel de los antocianos en las plantas. Esta investigadora había observado que los antocianos de las plantas tenían numerosos efectos protectores, tales como favorecer el camuflaje e incluso atraer insectos contribuyendo de esta manera a la polinización. Actualmente una de las explicaciones más aceptadas a la síntesis de fenoles en las plantas es como respuesta al estrés. Las plantas están casi de forma continua sometidas a un estrés ambiental debido a radiaciones UV, altas temperaturas, baja disponibilidad de agua, plagas, etc. Existen estudios que

demuestran que las plantas sintetizan compuestos fenólicos para protegerse de los herbívoros o de las radiaciones UV u otras situaciones de estrés físico.<sup>(29)</sup>

Otro papel es el de ser atrayentes de animales polinizadores, el actuar como señales químicas entre plantas y microorganismos simbióticos y el ejercer una función estructural, por defecto de las ligninas en el soporte mecánico de las plantas.<sup>(36, 37)</sup>

Pero los compuestos fenólicos no sólo son importantes para la planta, también tienen consecuencias para los animales y humanos, ya que los incorporamos a nuestro organismo con el consumo de alimentos de origen vegetal.<sup>(36)</sup>

El estudio de los compuestos fenólicos en alimentación se ha centrado en varios aspectos; por una parte, en la contribución a las propiedades organolépticas como el color y el amargor. Por otra parte, en la participación en los procesos de oxidación durante la producción y conservación.

Sin embargo, la principal razón que ha hecho que el estudio de los compuestos fenólicos haya sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos 15 años es su contribución a la mejora de la salud. En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos en la dieta habitual pueden reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. De hecho varias organizaciones internacionales del ámbito de la nutrición como la OMS, recomiendan un consumo diario de antioxidantes, como los compuestos fenólicos, principalmente a través de frutas y verduras, con el fin de prevenir o acentuar patologías asociadas al estrés oxidativo.<sup>(40)</sup>

### 1.3.3 ANTOCIANINAS

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la

mayoría de las frutas y flores. Es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano<sup>(40)</sup>

Las antocianinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilo y debido a su poca solubilidad en agua, no se encuentra de manera libre en la naturaleza sino en su forma glucosilada.<sup>(40)</sup> Los azúcares que normalmente forman parte de las estructuras de los antocianos en las bayas son la glucosa, arabinosa, xilosa y la ramnosa. Los glucósidos pueden además estar acilados con ácidos como el acético, succínico, malónico, láctico y oxálico.<sup>(21)</sup>

Los antocianos son el segundo compuesto polifenólico que caracteriza a la especie *Rubus* después de los elagitaninos. En la zarzamora se han detectado predominantemente antocianos derivados de la cianidina unidos a varios azúcares (glucosa, arabinosa, rutinosa y xilosa). Los antocianos identificados se encuentran en un 94% de los casos sin acilar, en un 90% como monoglucósidos y en un 10% como diglucósidos.<sup>(5)</sup>

La función principal de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encargan de la filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés.<sup>(26)</sup>

Dentro de las vacuolas las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos está en operación.<sup>(5)</sup>

Las especies del género *Rubus* se han descrito como fuentes naturales de antocianinas, diversos estudios reportan que su contenido va de 10-600 mg/ 100 g de peso fresco como se observa en la Tabla 1.5

**Tabla 1.5: Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/ 100 g peso fresco) <sup>(40)</sup>**

| Bayas          | Género                                      | Antocianinas |
|----------------|---|--------------|
| Zarzamora      | <i>Rubus spp.</i>                           | 10-600       |
| Grosella negra | <i>Ribes nigrum L.</i>                      | 80-810       |
| Mora azul      | <i>Vaccinium</i><br>(diferentes subgéneros) | 60-480       |
| Frambuesa      | <i>Rubus ideaus L.</i>                      | 20-220       |
| Fresa          | <i>Fragaria ananassa</i>                    | 10-80        |

### 1.3.3.1 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y composición de la matriz en la que se encuentran. <sup>(28)</sup>

Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamientos, presencia de enzimas, luz, oxígeno y presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales.

Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH. Dependiendo del pH, las antocianinas pueden existir en cuatro especies diferentes: base quinoidal, catión flavilio, pseudobase carbinol y chalcona. En soluciones muy ácidas ( $\text{pH} < 0.5$ ), el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH, la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazará a las formas incoloras. <sup>(36)</sup>

### 1.3.3.2 POLIMERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son pigmentos lábiles que experimentan reacciones de degradación. Su estabilidad, como ya se mencionó es altamente variable y depende de su estructura y de la composición de la matriz en la cual existe.<sup>(28)</sup>

Al incrementar las sustituciones glucosídicas y en particular, acilaciones de azúcares residuales con ác. cinámico, incrementará la estabilidad del pigmento.

La polifenoloxidasa, peroxidasa y enzimas glicosiladas puede tener un efecto devastador sobre las antocianinas. Estas enzimas pueden ser nativas de los tejidos de las plantas, provenientes de la contaminación con mohos o ser parte de las actividades comerciales de las enzimas cuando son utilizadas como auxiliares del procesamiento. Las enzimas glicosiladas actúan directamente sobre las antocianinas, pero la acción de las polifenoloxidasas y peroxidasa son indirectas.<sup>(42)</sup>

Las antocianinas se condensarán con otros compuestos fenólicos para formar pigmentos de color polimérico. Esta reacción puede ser acelerada con la presencia de acetaldehído.<sup>(28)</sup>

### 1.3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales.<sup>(39)</sup>

- 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 éstos están implicados. Al ceder este átomo de hidrógeno se da lugar a la formación de un radical intermedio llamado radical fenoxilo. Éste es menos reactivo dado a que se estabiliza por resonancia con los electrones “p” del anillo aromático.
- b. Como quelantes de metales:** Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos al anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton.

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 determinarán sus propiedades tales como la solubilidad y la 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.<sup>(27)</sup>

En un estudio realizado en vinos elaborados con *Rubus spp* se encontró que la actividad antioxidante se ve influenciada por el porcentaje de antocianinas poliméricas que se forman durante el añejamiento<sup>(49)</sup>. Las frutas, especialmente las agrupadas en lengua inglesa bajo el nombre de berries como *Vaccinium myrtilus* (arándanos), *Ribes nigrum* (corintos negros), *Ribes grossularia* (uva espina o grosella), *Rubus idaeus* (frambuesa), *Ribes rubrum* (corintos rojos) y *Fragaria ananassa* (frutilla) son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxycinámicos e

hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras.

Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metillinoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas. También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente.<sup>(46)</sup>

Debido a la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación.<sup>(42)</sup>

#### **1.4 CROMATOGRAFÍA**

La cromatografía es un método físico-químico basado en la separación de componentes de una mezcla de acuerdo a sus diferencias estructurales. Dicha separación se lleva a cabo a través de un soporte estacionario, mediante diferentes interacciones. De acuerdo a estas diferentes interacciones (fuertes o débiles) con el soporte, la mezcla de componentes se moverá más o menos rápido. De esta forma, aún moléculas químicamente similares podrán ser separadas.<sup>(67)</sup>

Según la IUPAC “La cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o gel,

puede ser extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.<sup>(48)</sup>

#### 1.4.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Existen cuatro tipos de técnicas cromatográficas usadas principalmente:

**Cromatografía de papel (PC):** Donde el papel de celulosa es la fase estacionaria. Se usa la capilaridad para arrastrar los solventes a través del papel y así separar los solutos.

**Cromatografía de capa fina (TLC):** Técnica cromatográfica que utiliza una capa fina como absorbente en principalmente vidrio o placas de alúmina, las cuales son la fase estacionaria.

**Cromatografía de columna (CC):** La fase estacionaria es un adsorbente en polvo colocado en una columna de vidrio vertical. La fase móvil es un solvente vertido en la cima de la columna.

**Cromatografía de gases (GC):** La fase estacionaria es un líquido hirviendo (sustancia cerosa o aceitosa) la cual es introducida en una larga y estrecha columna de metal o vidrio. La fase móvil es un gas inerte que fluye continuamente a través de la columna donde los componentes de la muestra son distribuidos entre la fase estacionaria.

#### 1.4.2 HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY)

Es un tipo de cromatografía de columna utilizada en química analítica y bioquímica para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Es una cromatografía en fase líquida en columna a la cual se aplica una sobrepresión que permite acelerar el proceso de separación.

El HPLC utiliza una columna que contiene la fase estacionaria, una bomba que mueve la fase móvil a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas monitoreadas. El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que están siendo analizadas y los eluyentes elegidos.<sup>(23)</sup>

#### 1.4.2.1 Tipos de HPLC<sup>(24)</sup>

**Cromatografía de fase normal:** Método en el cual los analitos son separados basándose en su polaridad. Se utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar y es específica para analitos polares. El uso de solventes más polares en la fase móvil disminuirá el tiempo de retención de los analitos, mientras que solventes más hidrofóbicos hacen lo contrario.

**Cromatografía de fase reversa:** Utiliza una fase estacionaria apolar y una fase móvil acuosa moderadamente polar. La fase estacionaria más común es la sílica gel tratada con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , donde R es una cadena lineal de grupos alquilo como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  o  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . Con estas fases estacionarias, el tiempo de retención es mayor para moléculas menos polares, mientras que las moléculas polares eluyen más rápido. La unión del analito a la fase estacionaria es proporcional al área superficial de contacto alrededor del segmento no polar de la molécula del analito. La retención puede disminuirse añadiendo un solvente menos polar (metanol, acetonitrilo, etc) en la fase móvil para reducir la superficie de tensión del agua.

**Cromatografía de tamaño exclusiva:** También conocida como cromatografía de filtración de gel. Separa partículas basándose en su tamaño. Es una cromatografía de baja resolución y está reservada para la etapa final de purificación. También es usada para determinar el peso molecular de polisacáridos y es la técnica oficial sugerida por la Farmacopea Europea para la comparación del peso molecular de diferentes heparinas de bajo peso molecular.

**Cromografía de intercambio iónico:** La retención se basa en las diferentes atracciones entre iones y los sitios cargados unidos a la fase estacionaria. Los tipos de intercambiadores iónicos más comunes incluyen la celulosa y geles de dextrano, los cuales poseen mayor tamaño de poros y bajas cargas convirtiéndolos en adecuados para la separación proteica, resinas de poliestireno y poros de sílica. Es un tipo de cromatografía ampliamente utilizada para la purificación de agua, intercambio de proteínas y cromatografía de carbohidratos.

**Cromatografía de bio-afinidad:** Basada en la habilidad de sustancias activas biológicamente para formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos involucra la participación de fuerzas moleculares como las interacciones Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

**Cromatografía de flujo isocrático y de gradiente:** La cromatografía de flujo isocrático se basa en una separación en la que la fase móvil permanece constante durante todo el proceso. Una separación en la que la composición de la fase móvil cambia durante la separación se conoce como gradiente.

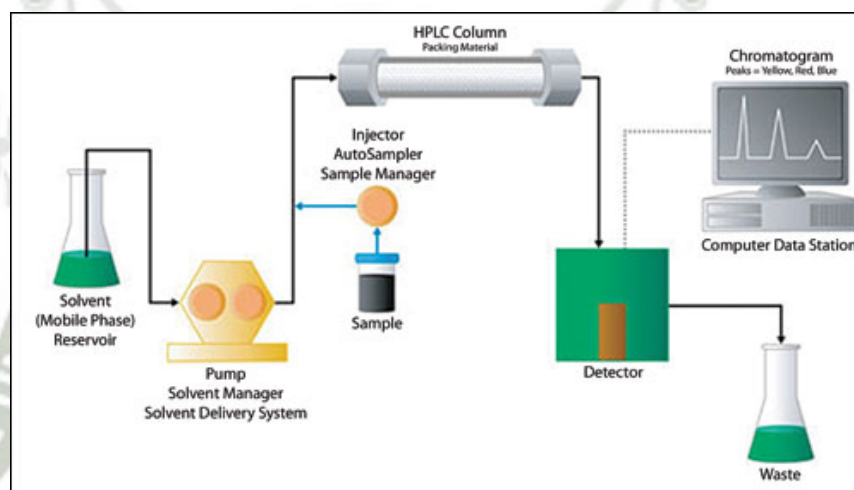
#### 1.4.2.2 INSTRUMENTACIÓN

En el caso más simple, el cromatógrafo líquido está constituido por: (Como se observa en la Figura 1.4)

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: Inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: Bomba

Como resultado del análisis cromatográfico se obtiene dos productos:

- Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración del soluto en función del tiempo( de elución)
- Un eluido o eluato, el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil, o idealmente, los componentes de la muestra separados.



**Figura 1.4: Esquema de una posible configuración de un cromatógrafo líquido isocrático**<sup>(23)</sup>

### Reservorio de la fase móvil

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse “dentro de la caja negra” de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente a ésta, manteniendo llenas las conexiones.<sup>(23)</sup>

### **Tuberías**

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, éste con uno o más detectores y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Deberán ser inertes y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico resistentes a altas presiones.<sup>(18)</sup>

### **Uniones**

Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas los distintos componentes del sistema cromatográfico. Una unión consiste en dos piezas de acople perfecto.

Las uniones deben ser inertes a fases móviles y a muestras, deben cerrar herméticamente y no deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.<sup>(48)</sup>

### **Bomba**

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio del solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

Un sistema de bombeo ideal deberá:<sup>(48)</sup>

- Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.
- Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas, ya que las pulsaciones, aunque no afectan a la separación en sí, pueden contribuir al ruido de fondo del detector y por tanto disminuir la sensibilidad.

- Suministrar flujos adecuados para los diferentes tipos de columnas. El caudal (varía desde los 10 uL/min hasta los 10 ml/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi) que suministran deber ser constante a lo largo del tiempo, ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención.

### **Tipos de bombas**

#### **Bombas reciprocantes (bombas de pistón)**

Existen varios tipos de bombas reciprocantes: de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba tándem, y bomba a pistón.

Las bombas reciprocantes permiten variar el caudal entregado variando el recorrido del pistón o variando la velocidad de movimiento del pistón. El volumen de la cámara del pistón es pequeño, normalmente entre 35-400  $\mu$ l, lo que permite cambiar fácilmente la fase móvil, y disminuye el tiempo de demora para hacer efectivo un cambio de la composición del solvente durante el gradiente de elución.<sup>(43)</sup>

#### **Bombas de desplazamiento continuo (bombas jeringa)**

La bomba jeringa es, a diferencia de las bombas reciprocantes, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el solvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón.<sup>(11)</sup>

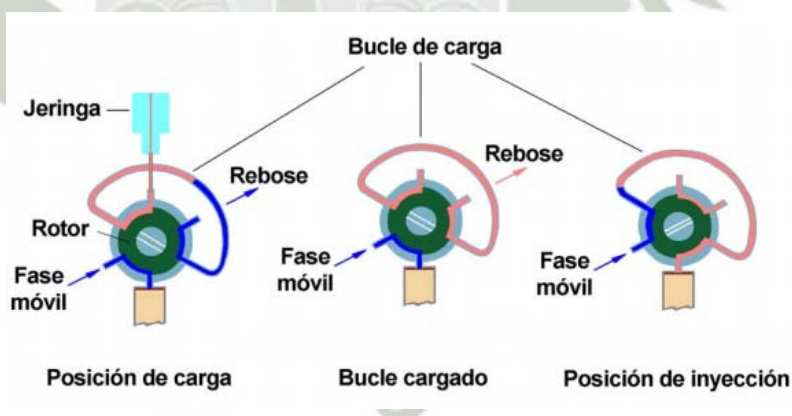
La principal ventaja de estas bombas es la total ausencia de pulsos ya que la cámara no necesita ser recargada, mientras que la principal desventaja está dada por el caudal o el tiempo necesario para recargar la cámara cuando se vacía.

## Inyectores<sup>(64)</sup>

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Facilidad de operación.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente, la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar. Éstas están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra (Figura 1.5)



**Figura 1.5: Inyección mediante válvula de 6 vías<sup>(23)</sup>**

El loop es intercambiable, de modo que la cantidad de muestra inyectada puede escogerse entre una serie de medidas estándar (5-200  $\mu$ l). Para llenarlo se gira el

rotor hacia la posición de carga obligando a la fase móvil a pasar directamente a la columna.

Se llena el loop en forma completa o parcial por medio de una jeringa y se vuelve a girar la válvula, obligando a la fase móvil a llegar a la columna a través del loop que contiene la solución muestra, a la que arrastra hacia la columna. Cuando se utiliza el método de llenado total del loop, deben emplearse al menos 5 volúmenes nominales del loop (por ejemplo: para un loop de 20 ul deben inyectarse 100 ul de la solución) para evitar los errores debidos al flujo laminar.

### **Detectores**

El detector es un dispositivo que permite “ver” y ubicar en el tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

### **Tipos de detectores**

#### **Detectores generales**

Miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Por ejemplo, el detector de índice de refracción y el de conductividad

#### **Detectores selectivos**

Aquellos que son sensibles a alguna propiedad propia del soluto.

**DETECTOR UV:** Detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de nanogramos. Poco

sensible a cambios de caudal y de temperatura y opera en el rango de 190-350 nm. En algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350-900 nm) llamándose detector UV-Visible.

Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija generalmente 254nm y utiliza una lámpara de Mercurio y los de longitud de onda variable, un espectrofotómetro que utiliza una lámpara de Deuterio o Xenón.

**DETECTOR DE FLUORESCENCIA:** Se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia “natural” o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico.

Es altamente sensible y selectivo para el análisis de trazas ya que existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula del analito, y además porque se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una dada longitud de onda varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirán además a la longitud de onda elegida.

**DETECTOR ELECTROQUÍMICO:** Muy sensible (1000 veces más sensible que el detector UV) y altamente selectivo. Su selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados o reducidos, sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado. Su principal limitación se debe al tipo de fase móvil que debe ser conductiva (sólo para cromatografía de fase reversa e intercambio iónico) y destruye al analito.

La detección de compuestos electrooxidables o electroreducibles ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso eluido de la columna. Este detector emplea 3 electrodos:

- Electrodo de trabajo: Induce la reacción redox.
- Electrodo de referencia: Produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo.
- Electrodo auxiliar: Provee la carga de neutralización complementaria cuando se da la reacción redox.

#### **Sistema de toma y procesamiento de datos**

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra y, por otro lado, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse interpretaciones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación, se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre ellos:

- Registrador gráfico: Convierte la señal en un gráfico X-Y
- Integrador: Permiten obtener un registro gráfico y su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.
- Computadora: Computadora de tipo personal que permite, con el software apropiado, el registro gráfico del cromatograma, los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, la generación de reportes y el manejo global de varios cromatógrafos.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio Pabellón H-202, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

#### 2.2 MATERIALES

##### 2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue recolectado en una zona del Valle de Chilina en Arequipa (Ver Anexo 2). En total se recolectó aproximadamente 1kg de *Rubus robustus* (zarzamora).

##### 2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

###### Reactivos químicos

- Estándar de Trolox P.A (CALBIOCHEM)
- Solución estándar de DPPH P.A (CALBIOCHEM)
- Alcohol metílico calidad HPLC P.A (Merck)
- Reactivo de Follin- Ciocateau P.A (Merck)
- Ácido gálico P.A (Sigma Aldrich)
- Carbonato de sodio P.A (Merck)

- Cloruro de potasio P.A (Merck)
- Acetato de sodio P.A (Merck)
- Agua Ultrapura (18.2 mΩ)

#### **Material de laboratorio**

- Fiolas ( 5, 10, 100 mL)
- Tubos de ensayo.
- Gradilla.
- Micropipetas de 20-200 uL, 100-1000 uL
- Tubos Ependorfs (1.5mL)
- Jeringa de HPLC.
- Filtros Anotop para HPLC (Merck)

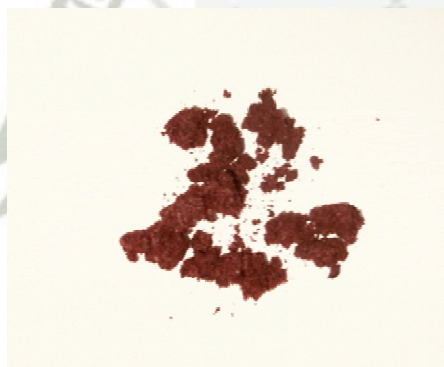
#### **Equipos**

- Balanza analítica Ohaus Pioneer PA 214.
- Baño Ultrasonido Branson 2510-E.
- Centrífuga Centra CL 2 Thermo IEC
- Easypure II de Barnstead.
- Agitador Vortex Analog mixer.
- Refrigerador
- Espectrofotómetro (CARY60 UV –VIS, Agilent Technologies)
- HPLC (LaChrom-Hitachi)

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se recolectó aproximadamente 1 kg de *Rubus robustus* en la zona de Chilina, Arequipa. Los frutos fueron lavados cuidadosamente y conservados en el congelador. Posteriormente se procedió al licuado y filtrado para la eliminación de materia sólida. Se guardó la muestra en el congelador y luego se realizó el proceso de liofilización de la muestra en el Liofilizador LABCONCO (de 2.5 L) de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. El liofilizado fue debidamente rotulado y colocado en bolsas de polipropileno debidamente selladas y fue almacenado en un ambiente libre de humedad y protegido de la luz como se muestra en la Figura 2.1.



**Figura 2.1: Liofilizado de la muestra y su almacenamiento**

### 2.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

En un tubo eppendorf se colocó aproximadamente 100 mg de muestra liofilizada y se mezcló con 1.0 mL de metanol calidad HPLC. Se procedió a su sonicación durante 10 minutos y posteriormente a su centrifugación a 4000 rpm por 15

minutos. Finalmente se separa el sobrenadante en otro tubo eppendorf. Se repite este proceso 3 veces y se juntan los 3 sobrenadantes. Se enrasa a 10 mL con metanol calidad HPLC.

## 2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT)

Para la determinación de compuestos fenoles totales (CFT), se utilizó el ensayo Follin-Ciocalteu.

### 2.4.1 Método de Follin- Ciocalteu

El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965). Consiste en que los compuestos fenólicos de la muestra se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul en la muestra que presenta un máximo de absorción a 750 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico o catequinas.<sup>(50)</sup>

### 2.4.2 Determinación de compuestos fenólicos por espectrofotometría

Se preparó una solución madre de ácido gálico de 1000 ppm. Pesar 0.005 g de ácido gálico, transferirlo a fiola de 5 mL, disolver y diluir con agua destilada. A partir de la solución madre, se preparó 05 diluciones de diferentes concentraciones en un rango entre 10 – 60 ppm siguiendo la ecuación de dilución, cómo se observa a continuación:

$$\begin{aligned}C \times V &= C' \times V' \\1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times V &= 10 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0.01\text{L} \\V &= 0.1 \text{ mL} = 100 \text{ uL}\end{aligned}$$

En la tabla 2.1 se muestra los volúmenes utilizados para la preparación de la curva de calibración, todos fueron llevados en fiola de 10 mL. Esta mezcla se homogenizó con la ayuda de un vortex y se dejó reaccionar por 2 horas en la oscuridad. Se preparó un blanco el cual sirvió para ajustar la absorbancia a cero.

**Tabla 2.1: Preparación de la curva de calibración de ác. gálico**

| Nº Patrón | Concentración de Ác. Gálico (mg/L) | Solución patrón de Ác. Gálico 1000 ppm (uL) | Agua destilada | Reactivo Follin-Ciocalteu | Carbonato de Sodio (al 20 %) |
|-----------|------------------------------------|---|----------------|---------------------------|------------------------------|
| Blanco    | 0                                  | 0   | 4 mL           | 0.25 mL                   | 2 mL                         |
| 1         | 10                                 | 100   |                |                           |                              |
| 2         | 20                                 | 200   |                |                           |                              |
| 3         | 30                                 | 300   |                |                           |                              |
| 4         | 40                                 | 400   |                |                           |                              |
| 5         | 60                                 | 600   |                |                           |                              |

Finalmente, se procedió a medir las absorbancias a 750 nm en el espectrofotómetro (Ver Figura 2.2). Se trazó la absorbancia contra concentración para obtener la curva estándar.

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos en la muestra, se procedió de la misma manera, utilizando 0.2 mL de un extracto preparado como se describe en el punto 2.3.2.



**Figura 2.2: Espectrofotómetro CARY 60 UV –VIS, Agilent Technologies.**

### 2.4.3 Cálculos

El contenido de los compuestos fenólicos totales, fueron expresados como mg GAE/100g de liofilizado de zarzamora, utilizando los datos de la curva estándar obtenida y la siguiente ecuación:

Donde:

a= intercepto

b= pendiente

Abs= Absorbancia de la muestra

V= volumen final de la muestra (10 mL)

Wma= peso de muestra de zarzamora (g)

GAE= Equivalente a ácido gálico (mg/100g)

## 2.5 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

Para la determinación de concentración de antocianinas se utilizó el método del pH diferencial. Las antocianinas experimentan una transformación reversible con cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia.<sup>(41)</sup>

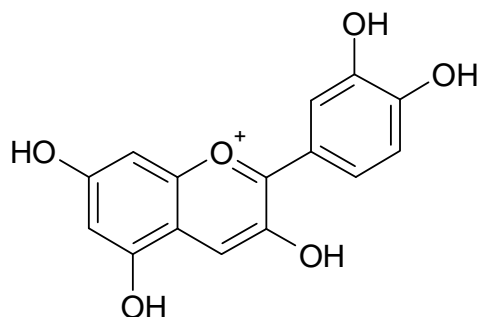
### 2.5.1 Cuantificación de antocianinas por pH diferencial

Método espectrofotométrico propuesto por Giustin y Wrolstad (2001) que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). La forma oxonium predomina a pH 1 y la hemiacetal a pH 4.5, como se observa en el Figura 2.3. Esta reacción permite una rápida y exacta medida de la antocianina total, incluso en presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos diferentes.<sup>(36)</sup>

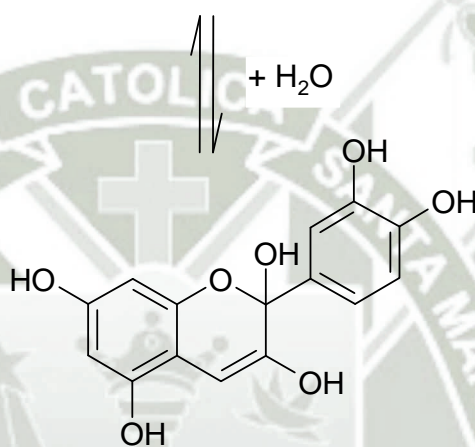
### 2.5.2 Extracción de antocianinas

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en solventes no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por lo tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos.<sup>(36)</sup>

En un tubo eppendorf se colocó aproximadamente 100 mg de muestra liofilizada y se mezcló con 1.0 mL de metanol calidad HPLC. Se procedió a su sonicación durante 10 minutos y posteriormente a su centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos. Finalmente se separa el sobrenadante en otro tubo eppendorf. Se repite este proceso 3 veces y se juntan los 3 sobrenadantes. Se enrasa a 10 mL con metanol calidad HPLC.



Catión flavilio (forma oxonium)  
(rojo) pH 1



Pseudobase carbinol (hemiacetal)  
(incolore) pH 4.5

**Figura 2.3: Estructuras de las antocianinas a diferentes pH's.** <sup>(40)</sup>

### 2.5.3 Determinación de antocianinas por espectrofotometría

Primero se preparó la solución buffer de cloruro de potasio 0.025 M (pH 1.0) y la solución buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH 4.5)

Se tomó una alícuota de 1.0 mL de la muestra del extracto metanólico de zarzamoras y se llevó a un volumen final de 10 mL con cada buffer respectivamente.

Se midió la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ ) y a 700 nm. Paralelamente, se midió cada buffer en el espectrofotómetro que sirvió para llevar a cero el espectrofotómetro.

#### 2.5.4 Cálculos

La concentración de antocianinas, fue expresada en mg de antocianinas monoméricas/100g de liofilizado de zarzamora, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$A = (A_{\max} - A_{700})pH_1 - (A_{\max} - A_{700})pH_{4.5}$$

$$A.M \text{ (mg / 100 g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1}$$

Donde:

A= Absorbancia

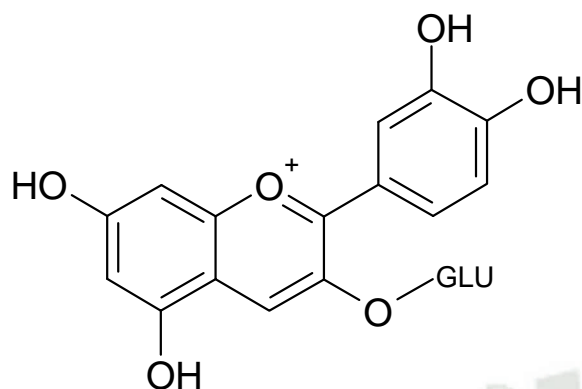
AM= Antocianinas monoméricas

PM= Peso molecular

FD= Factor de dilución

$\epsilon$  =Absortividad molar

La concentración final de antocianinas (mg/100g de fruto) se calcula en base al volumen del extracto y al peso de la muestra. Como la antocianina predominante en la *Rubus robustus* es la cianidina-3 glucósido (ver Figura 2. 4), se utilizó el peso molecular (PM) 449.20 y la Absortividad molar  $\epsilon$  de 26900 g/mol cm. Los valores de FD varían dependiendo de la cantidad de muestra diluida.



Cianidina 3-glucósido

Figura 2.4: Estructura de la Cianidina 3-glucósido<sup>(40)</sup>

## 2.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ZARZAMORA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

El fundamento del método desarrollado por Brand-Willams et al, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido (2,2-difenil-1-picril hidracina) por reacción con una sustancia antioxidante (Ver Figura 2.3); la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm.

Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH. La decoloración resultante es estequiométrica con respecto al número de electrones capturados. Este método no es específico a un antioxidante en particular por lo tanto aplica para evaluar una capacidad antioxidante total.<sup>(63)</sup>

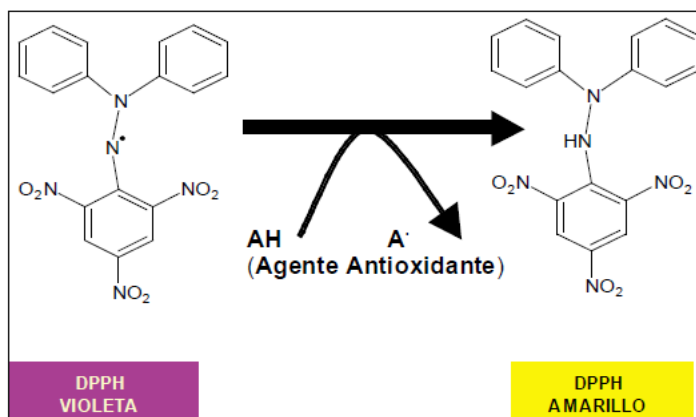


Figura 2.5: Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)<sup>(63)</sup>

### 2.6.1 Preparación de la solución stock

La solución patrón de ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) de concentración de 1 mmol/L fue preparada con metanol en 10 mL de metanol y almacenada en el congelador.

### 2.6.2 Preparación del estándar del DPPH

El DPPH es soluble en metanol. Se preparó una solución de DPPH de concentración de 2.5 mmol/L en 5 mL de metanol cada día del análisis y se protegió de la luz, debido a que este reactivo es altamente inestable.

### 2.6.3 Procedimiento

La curva de calibración se obtiene graficando distintas concentraciones de Trolox en función del área del DPPH residual usando como blanco la solución metanólica de DPPH.

Los ependorfs contienen 100 uL de DPPH 2.5 mmol/L en las cuales se agregan distintos volúmenes de la solución de Trolox 1 mmol/L ajustando con metanol a un volumen final de 1.0 mL de tal forma que la concentración final del Trolox se incrementa desde 0.02 hasta 0.10 mmol/L como se observa en la Tabla 2.1. Luego se sonica cada patrón y se inyecta cada 20 minutos exactamente.

**Tabla 2.2: Curva de calibración con DPPH**

|                                | BL  | ST <sub>1</sub> | ST <sub>2</sub> | ST <sub>3</sub> | ST <sub>4</sub> | ST <sub>5</sub> |
|--------------------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>DPPH 2.5<br/>mmol/L(uL)</b> | 100 | 100             | 100             | 100             | 100             | 100             |
| <b>MetOH (uL)</b>              | 900 | 880             | 860             | 840             | 820             | 800             |
| <b>Trolox 1mmol/L<br/>(uL)</b> | -   | 20              | 40              | 60              | 80              | 100             |
| <b>Cc (mmol/L)</b>             | -   | 0,02            | 0,04            | 0,06            | 0,08            | 0,1             |

Para la preparación de las muestras (Ver Tabla 2.2), se utiliza el método anteriormente mencionado en el punto 2.3 sólo que se filtra la muestra utilizando filtros anotop al momento de inyectarlas en el HPLC.

**Tabla 2.3: Preparación de la muestra por el método de DPPH**

|                                | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| <b>DPPH 2.5mmol/L<br/>(uL)</b> | 100            | 100            |
| <b>MetOH (uL)</b>              | 800            | 700            |
| <b>Muestra (uL)</b>            | 100            | 200            |

#### 2.6.4 Características del HPLC

El análisis de la capacidad antioxidante del *Rubus robustus* utilizando DPPH, se realizó en un equipo de HPLC de la marca LaChrom-Hitachi, compuesto de una bomba L-7100, un inyector manual de 20 µl (loop), un detector UV L-7400. Para el almacenamiento y evaluación de datos se usó como software una estación de datos EZ Chrom Elite y un ordenador personal (Figura 2.4). La columna analítica utilizada fue una Chromolith RP-18e de 100-4.6 mm, y diámetro interno de

partículas de 2  $\mu\text{m}$ . Una precolumna Chromolith RP-18e de 5-4.6 mm para proteger la columna analítica.

La separación cromatográfica se realizó usando como fase móvil metanol: agua (80:20) con una velocidad de flujo total a 1.0 ml/min. Se usó un detector de absorbancia a 517 nm. Se inyectó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de muestra de soluciones estándares, blanco y la muestra problema.



**Figura 2.6: HPLC, LaChrom-Hitachi**

### 2.6.5 Cálculos

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición o porcentaje de captación del radical libre lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(\%) = \frac{(A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}})}{A_{\text{Blanco}}} \times 100$$

Donde:

Ablanco= Área de DPPH sólo con metanol.

Amuestra = Área de DPPH con muestra.

## 2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el test de ANOVA, con un nivel de significancia de 95% ( $p=0.05$ )

### 2.7.1 LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Es necesario su determinación si se va a trabajar con un sólo estándar en las determinaciones de rutina.

Se determina la curva de regresión lineal

#### Cálculo de la recta de regresión:

Ecuación de la recta:

$$y = b x + a$$

Donde:

x : Concentración del analito

y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Fórmulas para hallar b:

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Fórmulas para hallar a:

$$a = y - bx = \frac{\sum yi - b \sum xi}{n}$$

Siendo **a** y **b** los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, **n** el número de mediciones, **Xi** el valor de la concentración e **Yi** el valor medido en el ensayo **i**.

### Interpretación estadística de la Regresión Lineal:

- Coeficiente de Correlación ``r``: Indica el grado de relación entre las variables “x” (concentración), e “y” (respuesta).
- Test de hipótesis para el Coeficiente de Correlación ``r``:

H<sub>0</sub>: r es diferente de 1

H<sub>1</sub>: r es igual a 1

Criterio de aceptación: r no debe ser significativamente diferente de 1

Formulas para hallar ``r``:

$$r = \frac{\sum xi yi - \frac{\sum xi \sum yi}{n}}{\sqrt{\left[ \sum x^2 i - \frac{(\sum xi)^2}{n} \right] \left[ \sum y^2 i - \frac{(\sum yi)^2}{n} \right]}}$$

### Coeficiente de Determinación:

Está dado por el cuadrado del coeficiente de correlación  $r^2$ ; indica la proporción de la varianza total de  $y$ . Este debe ser mayor o igual a 0.99 para ingredientes activos en una fórmula.

El valor  $r^2 = 1$  indica una recta perfectamente lineal,  $r^2 = -1$  una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y  $r^2 = 0$  la no correlación entre X e Y. En la práctica,  $r^2$  es generalmente mayor de 0.99 y los valores de 0.90 son raros.

Sin embargo, el indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico.

#### **Test de Hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación $r^2$ :**

$H_0$  = No existe correlación entre “x” e “y”

$H_1$  = Existe correlación entre “x” e “y”

Criterios de aceptación: Si el valor de  $t$  experimental obtenido es mayor que el  $t$  teórico de la tabla, calculado para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 95.0% (probabilidad de 0.05; t tabla: 2.306), entonces se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

Fórmula para hallar  $t_{exp}$ :

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

### 2.7.2 SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

- **Límite de detección:** Corresponde, según la USP XXII, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

- **Límite de cuantificación:** Corresponde, según la USP XXII, a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración.

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio de investigación se evaluó la capacidad antioxidante de la *Rubus robustus* (zarzamora) con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

Los frutos de *Rubus robustus* fueron recolectados en el Valle de Chilina, durante el mes agosto del 2012 y fueron llevados al laboratorio donde fueron lavados cuidadosamente y almacenados en congelador. Éstos frutos contienen un elevado porcentaje de agua, alrededor del 80 %, es por esta razón que fueron licuados, filtrados y posteriormente liofilizados (este proceso fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Alimentaria de la Universidad Nacional de San Agustín). Para la identificación de la especie *Rubus*, se envió una muestra al laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, donde se identificó que dicha especie pertenece al género *Rubus Robustus* (Anexo 1)

Una vez obtenida la muestra liofilizada, se la almacenó en bolsas de polipropileno con cierre hermético en un ambiente libre de humedad y protegidas del calor excesivo. (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Liofilizado de Zarzamora.**

### 3.1 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT).

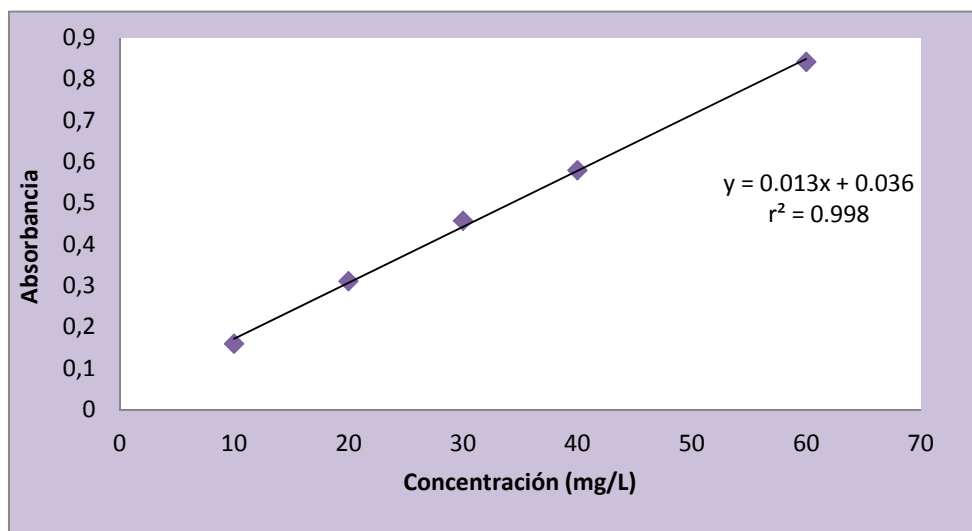
Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), en las muestras de zarzamora, se utilizó el ensayo de Follin-Ciocalteu. Este método es uno de los más usados actualmente para la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el uso de una técnica espectrofotométrica; y fue previamente calibrado empleando ácido gálico como patrón.

En la tabla 3.1 se presentan los valores obtenidos de absorbancia en la curva de calibración de ác. gálico a 750 nm, las mediciones se realizaron por triplicado.

**TABLA 3.1. DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN**

| N° | Concentración(mg/L) | Absorbancia a 750 nm |        |        | Absorbancia Promedio | Desviación estándar |
|----|---------------------|----------------------|--------|--------|----------------------|---------------------|
|    |                     | Rep 1                | Rep 2  | Rep 3  |                      |                     |
| 1  | 10                  | 0.1594               | 0.1591 | 0.1593 | 0.1593               | 0.0002              |
| 2  | 20                  | 0.3106               | 0.3108 | 0.3108 | 0.3107               | 0.0001              |
| 3  | 30                  | 0.4571               | 0.457  | 0.4569 | 0.457                | 0.0001              |
| 4  | 40                  | 0.5797               | 0.5787 | 0.5794 | 0.5793               | 0.0005              |
| 5  | 60                  | 0.8401               | 0.8414 | 0.8426 | 0.8414               | 0.0013              |

Los datos de la tabla 3.1 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 ácido gálico mg/L). El coeficiente de determinación simple  $r^2$  indica cuál es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.



**Figura 3.2. Curva de calibración de ácido gálico.**

En la Figura 3.2, se representa la recta promedio de regresión obtenida de concentraciones de ácido gálico y el valor promedio de las absorbancias medidas. Se obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) igual a 0.9984, una pendiente ( $b$ ) de 0.0135 y un intercepto ( $\alpha$ ) de 0.0361.

$$y = 0.0135 x + 0.0361$$

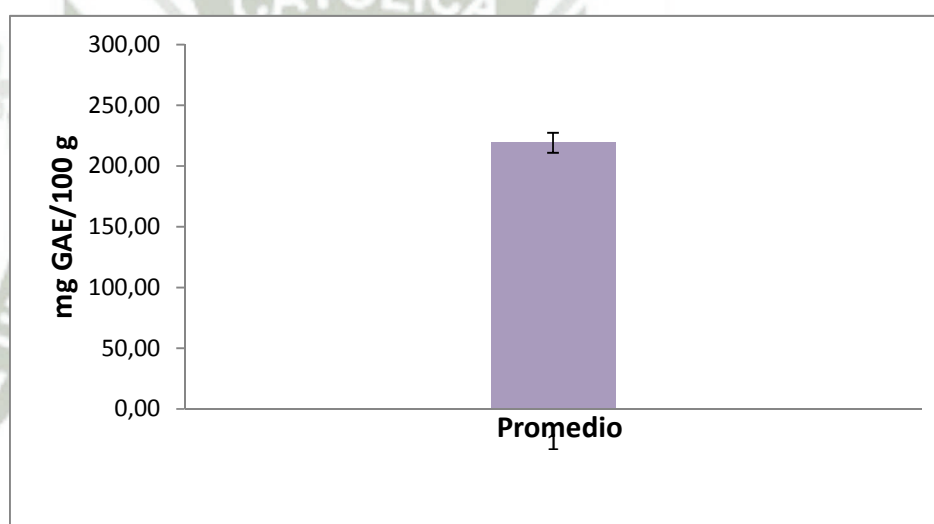
Se puede observar que la respuesta es lineal ya que se obtiene un coeficiente de determinación cercano a la unidad, indicando que hay una relación directa entre la concentración de compuestos fenólicos en *Rubus robustus* y la absorbancia.

El contenido de los compuestos fenólicos totales encontrados en la muestra fueron expresados como mg GAE/100g de liofilizado de *Rubus robustus*. En la Tabla 3.2, se muestran los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en *Rubus robustus*, encontrándose valores que oscilan desde 209.95 a 225.89 mg GAE/100 g.

**TABLA 3.2. CONTENIDO DE CFT EN EL LIOFILIZADO DE *Rubus robustus***

| Muestras        | Peso (g) | Absorbancias | mg GAE/100 g         |
|-----------------|----------|--------------|----------------------|
| 1               | 0.1009   | 0.3438       | 225.89               |
| 2               | 0.1008   | 0.3218       | 209.95               |
| 3               | 0.1012   | 0.3387       | 221.49               |
| <b>Promedio</b> |          |              | <b>219.11 ± 8.23</b> |

La Figura 3.3, muestra el valor promedio del contenido de compuestos fenólicos totales en zarzamora el cual es  $219.11 \pm 8.23$  mgGAE/100g.



**Figura 3.3. Contenido promedio de CFT en el liofilizado de *Rubus robustus***

Aunque el contenido de sustancias fenólicas es un indicativo de la actividad antioxidante de una muestra es muy importante analizar el contenido de algunos tipos de fenoles con actividad antioxidante elevada como es el caso de los flavonoides y específicamente de las antocianinas.

### 3.2 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

Para la determinación de concentración de antocianinas se utilizó el método del pH diferencial, basadas en un método espectrofotométrico. La forma oxonium predomina a pH 1 y la hemiacetal a pH 4.5. Se mide la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ ) y a 700 nm.

La concentración de antocianinas, fue expresada en mg de antocianinas monoméricas/100g de liofilizado de zarzamora, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$A = (A_{\max} - A_{700})pH_1 - (A_{\max} - A_{700})pH_{4.5}$$
$$A.M (mg / 100 g) = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l}$$

Donde:

A= Absorbancia

A.M= Antocianinas monoméricas

PM= Peso molecular

FD= Factor de dilución

$\epsilon$  =Absortividad molar

La concentración final de antocianinas (mg/100g de fruta) se calcula en base al volumen del extracto y al peso de la muestra. Como la antocianina predominante en la zarzamora es la cianidina-3 glucósido, se utilizó el peso molecular (PM) 449.20 y la Absortividad molar  $\epsilon$  de 26900. Los valores de FD varían dependiendo de la cantidad de muestra diluida.

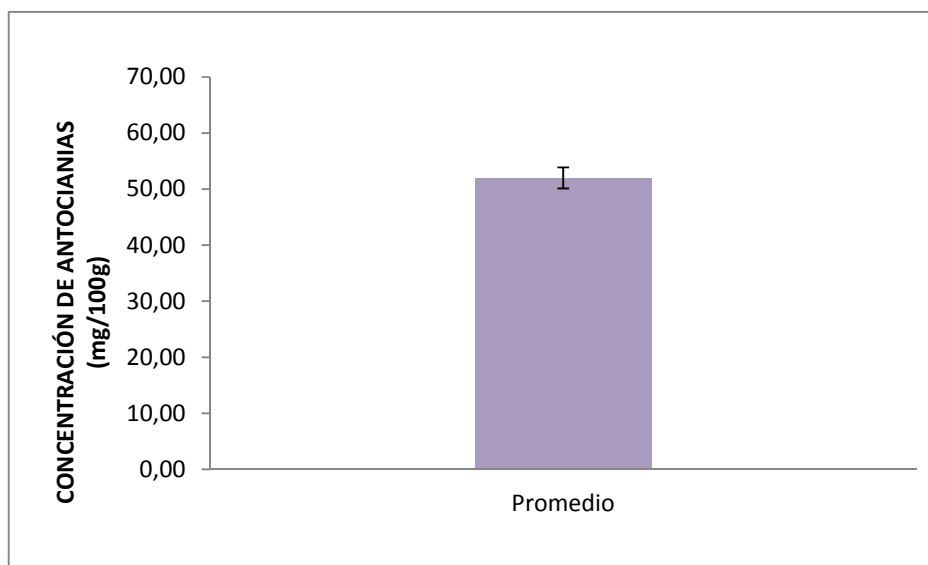
El contenido de antocianinas monoméricas encontrado en la muestra fueron expresados como mg/100g de liofilizado de *Rubus robustus*. En la Tabla 3.3, se muestran los resultados de las absorbancias y las concentraciones finales encontradas en dicho fruto, encontrándose valores que oscilan desde 50.35 a 54.02 mg/100 g.

**TABLA 3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE  
ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS EN EL LIOFILIZADO DE *Rubus  
robustus*(mg/100g)**

| Muestras        | Absorbancias a<br>pH 1,0 |        | Absorbancias a<br>pH 4,5 |        | Absorbancia<br>Corregida | Antocianinas<br>Monoméricas<br>mg/100g |
|-----------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|--|
|                 | 510 nm                   | 700 nm | 510 nm                   | 700 nm |                          |  |
| 1               | 0.3950                   | 0.0207 | 0.0981                   | 0.0253 | 0.3015                   | 50.35                                  |
| 2               | 0.4092                   | 0.0244 | 0.1064                   | 0.0308 | 0.3092                   | 51.63                                  |
| 3               | 0.4235                   | 0.022  | 0.1106                   | 0.0326 | 0.3235                   | 54.02                                  |
| <b>Promedio</b> |                          |        |                          |        |                          | <b>52.00± 1.86</b>                     |

Según Howard *et al.* (2007) se han detectado concentraciones de antocianinas en *Rubus spp* en un rango de 31 a 256 mg/ 100g de fruta fresca. En la muestra de liofilizado de *Rubus robustus* se obtuvo un valor promedio de  $52.00 \pm 1.86$  mg/100g, indicando que la muestra presenta un adecuado contenido de antocianinas monoméricas.

La Figura 3.4, muestra el valor promedio del contenido de antocianinas monoméricas en zarzamora el cual es de  $52.00 \pm 1.86$  mg/100g.



**Figura 3.4. Concentración promedio de antocianinas monoméricas en el liofilizado de *Rubus robustus***

### **3.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ZARZAMORA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)**

Para la determinación de la capacidad antioxidante por HPLC el método utilizado fue el desarrollado por Brand-Willams, en el que se usa el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido (2,2-difenil-1-picril hidracina) por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH.

Se prepararon soluciones patrón de Trolox de 1 mmol/L en metanol, almacenadas en congelador y solución de DPPH de concentración de 2.5 mmol/L en metanol, cada día del análisis y protegido de la luz, debido a que este reactivo es altamente inestable.

La curva de calibración se obtiene graficando distintas concentraciones de Trolox en función del área del DPPH residual, usando como blanco una solución metanólica de DPPH.

La actividad antioxidante es expresada como el porcentaje de inhibición o porcentaje de captación del radical libre lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(\%) = \frac{(A_{Blanco} - A_{Muestra})}{A_{Blanco}} \times 100$$

Donde:

$A_{blanco}$  = Área de DPPH sólo con metanol.

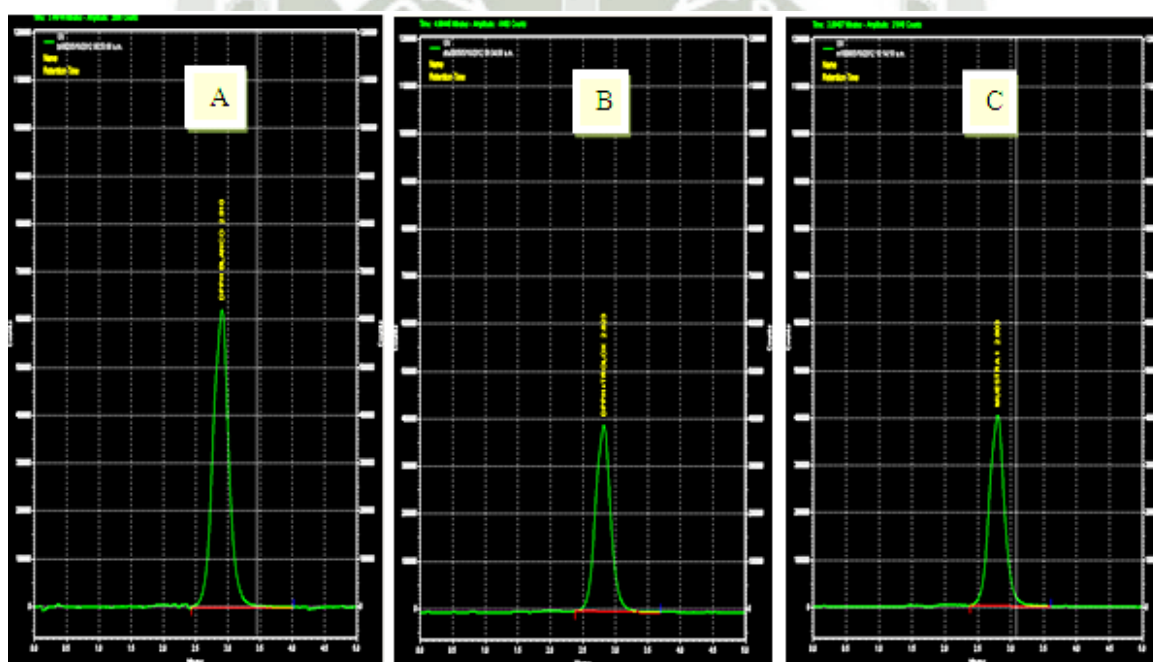
$A_{muestra}$  = Área de DPPH con muestra.

En la tabla 3.4, se observan las áreas obtenidas de DPPH después de la inyección de los estándares de Trolox preparados a distintas concentraciones en distintos días en el HPLC.

**TABLA 3.4. ÁREAS OBTENIDAS EN HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH**

| Concentración de Trolox(mmol/L) | Rep <sub>1</sub> | Rep <sub>2</sub> | Rep <sub>3</sub> | Rep <sub>4</sub> | Rep <sub>5</sub> |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                 | 21/09/2012       | 02/10/2012       | 03/10/2012       | 05/10/2012       | 17/10/2012       |
| <b>0</b>                        | 10077528         | 9608360          | 9812208          | 9830956          | 9374844          |
| <b>0.02</b>                     | 9036399          | 8167985          | 8167985          | 8140783          | 8522824          |
| <b>0.04</b>                     | 7501622          | 6329211          | 6385176          | 7225299          | 7439869          |
| <b>0.06</b>                     | 6345989          | 4869751          | 4615249          | 5928135          | 6091153          |
| <b>0.08</b>                     | 4765783          | 3414653          | 3685507          | 4547583          | 4814224          |
| <b>0.10</b>                     | 2695875          | 1916526          | 1963379          | 3379761          | 3666847          |

En la Figura 3.5, se muestra los cromatogramas: A) DPPH + Metanol (blanco), B) DPPH + Metanol + Trolox (0.06 mM/mL) y C) DPPH + Metanol + Muestra (100 uL extracto de Zarzamora). Como se observa en dichos cromatogramas el tiempo de retención es de 2.91 min aproximadamente y el tiempo que demoró la corrida fue de 5 minutos. En el cromatograma A y B se muestra que la concentración de Trolox disminuye el área del pico de DPPH, esto debido a que la solución de Trolox es utilizada como antioxidante. En el cromatograma C, se observa que la muestra si contiene capacidad antioxidante debido a que el área del pico disminuye comparado frente al cromatograma A, observándose un efecto similar al de la solución de Trolox utilizada.



**Figura. 3.5. Cromatogramas: A) DPPH + Metanol, B) DPPH + Metanol + Trolox (0.06 mmol/L) y C) DPPH + Metanol + Muestra (1000 mg/L de liofilizado de zarzamora)**

Una vez obtenidas las áreas en el HPLC, se procedió a transformarlas en porcentaje de inhibición de DPPH la tabla 3.5, muestra los porcentajes de inhibición encontrados

luego de aplicar la ecuación correspondiente. Como se observa los porcentajes de inhibición obtenidos utilizando Trolox van aumentando de acuerdo a la concentración.

**TABLA 3.5. PORCENTAJES DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH**

| Concentración de Trolox (mmol/L) | Rep <sub>1</sub> | Rep <sub>2</sub> | Rep <sub>3</sub> | Rep <sub>4</sub> | Rep <sub>5</sub> |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | 21/09/2012       | 02/10/2012       | 03/10/2012       | 05/10/2012       | 17/10/2012       |
| <b>0.02</b>                      | 10.33            | 14.99            | 16.76            | 17.19            | 9.09             |
| <b>0.04</b>                      | 25.56            | 34.13            | 34.93            | 26.50            | 20.64            |
| <b>0.06</b>                      | 37.03            | 49.32            | 52.96            | 39.70            | 35.03            |
| <b>0.08</b>                      | 52.71            | 64.46            | 62.44            | 53.74            | 48.65            |
| <b>0.10</b>                      | 73.25            | 80.05            | 79.99            | 65.62            | 60.89            |

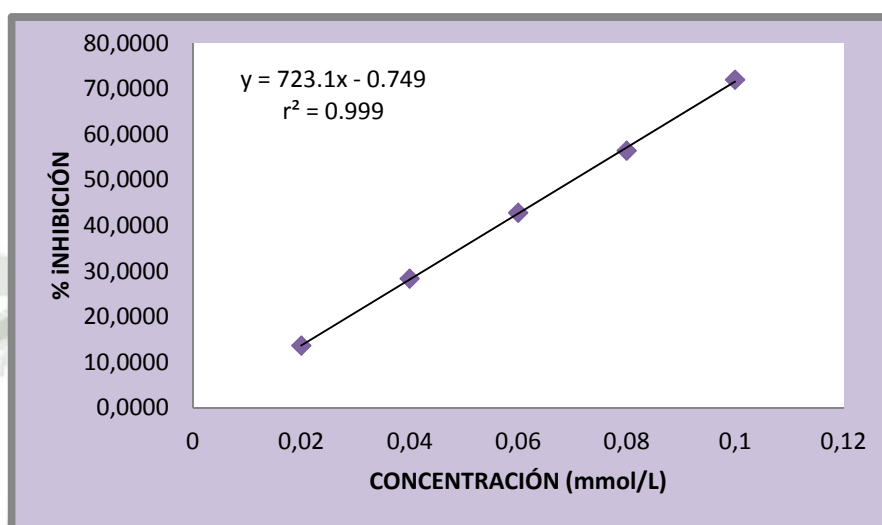
En la tabla 3.6, se muestra el promedio del porcentaje de inhibición de las 05 repeticiones realizadas para cada nivel de concentración, para poder realizar una curva de calibración.

**TABLA 3.6. PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH**

| Concentración de Trolox (mmol/L) | Rep <sub>1</sub> | Rep <sub>2</sub> | Rep <sub>3</sub> | Rep <sub>4</sub> | Rep <sub>5</sub> | Promedio     | D.S. |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|------|
|                                  | 21/09/2012       | 02/10/2012       | 03/10/2012       | 05/10/2012       | 17/10/2012       |              |      |
| <b>0.02</b>                      | 10.33            | 14.99            | 16.76            | 17.19            | 9.09             | <b>13.67</b> | 3.34 |
| <b>0.04</b>                      | 25.56            | 34.13            | 34.93            | 26.50            | 20.64            | <b>28.35</b> | 5.43 |
| <b>0.06</b>                      | 37.03            | 49.32            | 52.96            | 39.70            | 35.03            | <b>42.81</b> | 7.06 |
| <b>0.08</b>                      | 52.71            | 64.46            | 62.44            | 53.74            | 48.65            | <b>56.40</b> | 6.04 |
| <b>0.10</b>                      | 73.25            | 80.05            | 79.99            | 65.62            | 60.89            | <b>71.96</b> | 7.67 |

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales es el primer indicativo que evaluamos para determinar la linealidad.

La Figura 3.6, muestra la curva de los porcentajes de inhibición obtenidos. Como se observa existe una relación lineal entre la concentración y el porcentaje de inhibición, ya que a medida que se aumentaron las concentraciones de Trolox, aumentó su porcentaje de inhibición, por lo que se procedió a evaluar los resultados mediante estudios estadísticos.



**Figura 3.6. Curva de los porcentajes de inhibición del radical DPPH**

#### **Linealidad:**

Para determinar la linealidad del método usado en el presente estudio se evaluaron las concentraciones de Trolox vs los porcentajes de inhibición encontrados, en la Figura 3.6, se observa la ecuación de la recta, obteniéndose:

$$y = 723.12x - 0.749$$

La relación entre la variable dependiente (porcentaje de inhibición) y la variable independiente (concentración) se expresa matemáticamente haciendo una estadística de regresión, tal como se expresa en la Tabla 3.7.

TABLA 3.7. ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN DE LA LINEALIDAD

| Estadísticas de la regresión                          |        |
|---|--------|
| <b>Coefficiente de correlación múltiple</b>           | 0.9998 |
| <b>Coefficiente de determinación <math>r^2</math></b> | 0.9997 |
| <b><math>r^2</math> ajustado</b>                      | 0.9995 |
| <b>Error típico</b>                                   | 0.4864 |
| <b>Observaciones</b>                                  | 5      |

Se obtuvo unos coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0.9998; siendo el valor mínimo permitido de 0,995 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9997, siendo el valor mínimo permitido de 0,99.

El coeficiente de determinación nos indica que existe una buena predictibilidad de la respuesta a distintas concentraciones del analito.

Sin embargo, la información que da el coeficiente de correlación simple ( $r$ ) es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo  $r^2$  el coeficiente de determinación el que aporta mayor significación estadística y que expresa la proporción de la variación total y explicada por el modelo.

No obstante a ello y como se ha mencionado el indicador del modelo lineal no es  $r$  sino un test estadístico.

Se halló el estadístico “ $t$ ” junto con un test de varianza, como se observa en la Tabla 3.8 y 3.9.

**TABLA 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE LA LINEALIDAD**

|                     | Coeficientes | Error<br>típico | Estadístico<br>t | Probabilidad | Inferior<br>95% | Superior<br>95% |
|---------------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>Intercepción</b> | -0.7490      | 0.5101          | -1.4681          | 0.2384       | -2.3726         | 0.8746          |
| <b>Variable X 1</b> | 723.1208     | 7.6914          | 94.0165          | 2.65265E-06  | 698.6433        | 747.5983        |

Para poder interpretar los resultados obtenidos recordamos:

- Test de Hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación  $r$ :

$H_0$  = No existe correlación entre “x” e “y”

$H_1$  = Existe correlación entre “x” e “y”

Criterios de aceptación: Si el valor de  $t$  experimental obtenido es mayor que el  $t$  teórico de la tabla, calculado para  $(n-2)$  grados de libertad y un nivel de significación del 95.0% (probabilidad de 0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

El valor de  $t_{regresión} = 94.017$  es mayor a  $t_{tabla} = 2.069$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 2$  grados de libertad. Por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, demostrando que la correlación es lineal y significativa.

Adicionalmente se realizó el análisis de varianza como test estadístico complementario para establecer la linealidad del sistema como se muestra en la Tabla 3.9

**TABLA 3.9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DETERMINACIÓN  
DE LA LINEALIDAD**

|                  | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F         | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------|
| <b>Regresión</b> | 1                  | 2091.6150         | 2091.6150                 | 8839.1153 | 2.65265E-06        |
| <b>Residuos</b>  | 3                  | 0.7099            | 0.2366                    |           |                    |
| <b>Total</b>     | 4                  | 2092.3249         |                           |           |                    |

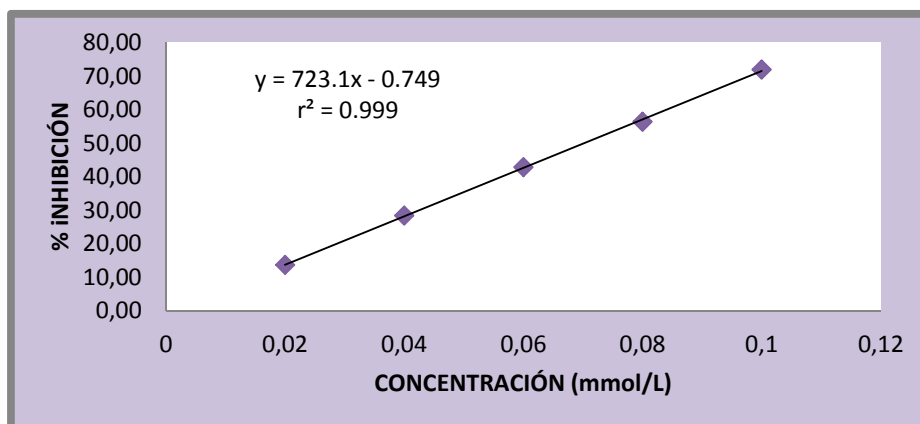
El análisis de varianza nos muestra que existe alta correlación, debido a que el valor de  $p < 0,05$  entre los datos de concentración y respuesta por lo que se concluye que el método es lineal.

#### **Sensibilidad**

Este parámetro se encuentra relacionado con la mínima cantidad de analito que pueda producir un resultado significativo. En la tabla 3.10 se muestran los valores de concentración de Trolox (1 mmol/L) y el porcentaje promedio, utilizados para la determinación de los límites de cuantificación y detección mediante la curva de calibración.

**TABLA 3.10. CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL LÍMITE  
DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

| Concentración de Trolox (mmol/L) | Promedio (%) | Desviación estándar |
|----------------------------------|--------------|---------------------|
| 0.02                             | 13.67        | 3.34                |
| 0.04                             | 28.35        | 5.43                |
| 0.06                             | 42.81        | 7.06                |
| 0.08                             | 56.40        | 6.04                |
| 0.1                              | 71.96        | 7.67                |

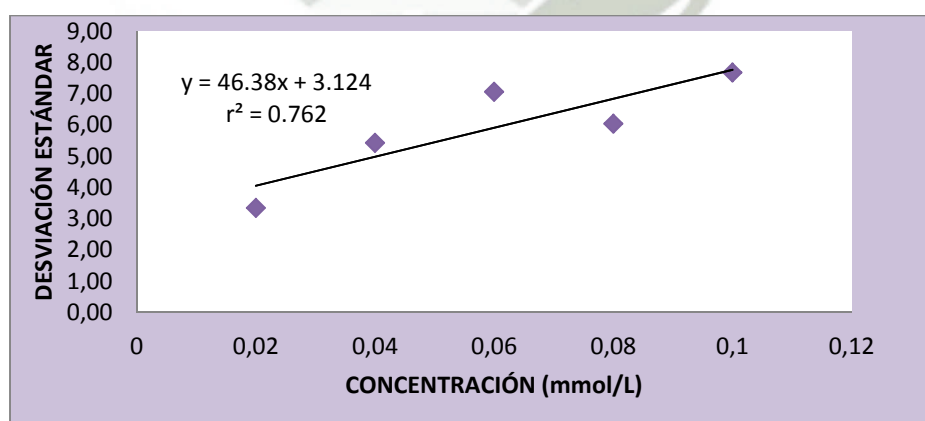


**Figura 3.7. Representación gráfica de la curva de calibración empleada para la determinación del límite de cuantificación y límite de detección.**

La Figura 3.7 muestra la curva de calibración así como la ecuación de la curva, se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco:  $Y_{bl}$

- $a = 0.749 = Y_{bl}$
- $b = 723.1$

Con la desviación estándar obtenida para cada nivel de concentración trabajado se calculó la recta correspondiente a la concentración vs la desviación estándar como se observa en la Figura 3.8.



**Figura 3.8. Representación gráfica de la concentración vs la desviación estándar**

Como en el caso anterior se extrapoló la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado  $S_{bl}$ , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

- **$a = 3.124 = S_{bl}$**
- **$b = 46.38$**

Se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación para “**n**” medidas individuales como:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de detección} = \mathbf{0.006 \text{ mmol/L}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \mathbf{0.020 \text{ mmol/L}}$$

El límite de detección obtenido fue de 0.006 mmol/L lo que nos indica que a esta concentración el analito puede ser detectado por el HPLC.

El límite de cuantificación obtenido fue de 0.020 mmol/L, lo que nos indica que a esta concentración el analito puede ser cuantificado con un grado de confianza previamente establecido (exactitud y precisión) bajo las condiciones experimentales establecidas.

Una vez determinados los parámetros de linealidad y sensibilidad del método, se procedió a determinar la actividad antioxidante en la muestra de zarzamora liofilizada, para ello se utilizó la muestra en 02 concentraciones distintas (1000 y 2000 mg/L) las cuales fueron analizadas durante 05 días distintos. La Tabla 3.11 muestra las áreas obtenidas luego de la inyección de la muestra en HPLC.

**TABLA 3.11. ÁREAS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL LIOFILIZADO DE *Rubus robustus***

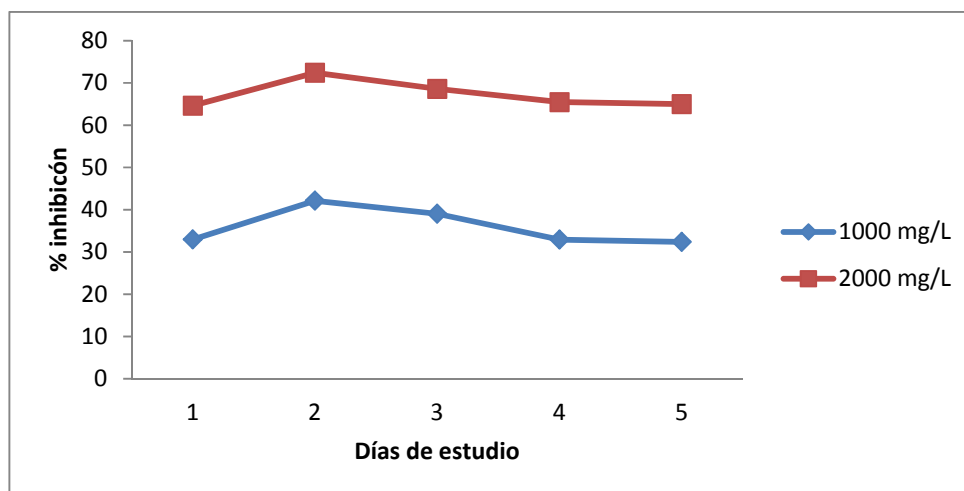
| Muestra(mg/L) | ÁREA                             |                                  |                                  |                                  |                                  |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|               | Rep <sub>1</sub><br>(21/09/2012) | Rep <sub>2</sub><br>(02/10/2012) | Rep <sub>3</sub><br>(03/10/2012) | Rep <sub>4</sub><br>(05/10/2012) | Rep <sub>5</sub><br>(17/11/2012) |
| 1000          | 6755266                          | 5559090                          | 5981545                          | 6594158                          | 6339305                          |
| 2000          | 3564447                          | 2650018                          | 3079734                          | 3393420                          | 3281908                          |

En la tabla 3.12 se muestra el porcentaje de la capacidad de inhibición obtenido en las muestras analizadas, así como el promedio de las mismas.

**TABLA 3.12. PORCENTAJE DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.**

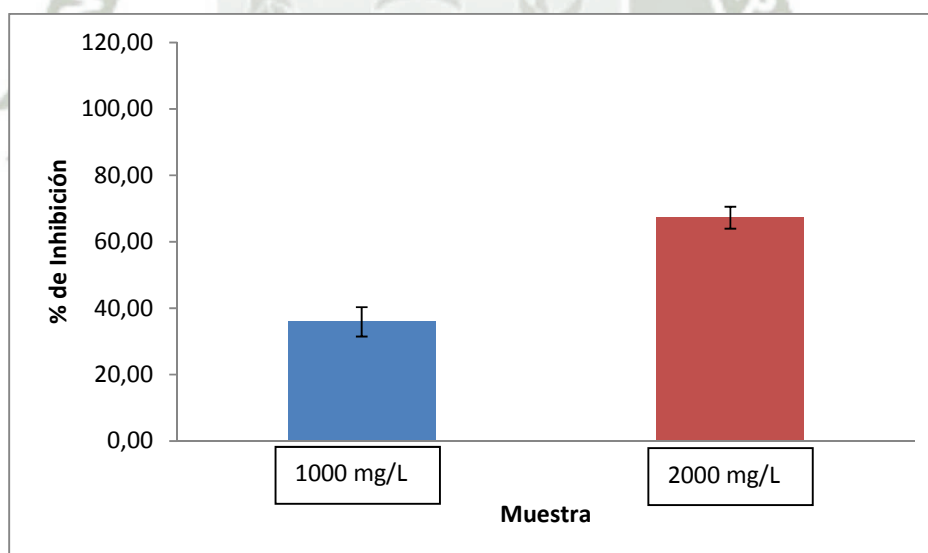
| Muestra(mg/L) | %Inhibición                      |                                  |                                  |                                  |                                  | PROMEDIO (%) | DS   |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|------|
|               | Rep <sub>1</sub><br>(21/09/2012) | Rep <sub>2</sub><br>(02/10/2012) | Rep <sub>3</sub><br>(03/10/2012) | Rep <sub>4</sub><br>(05/10/2012) | Rep <sub>5</sub><br>(17/11/2012) |              |      |
| 1000          | 32.98                            | 42.14                            | 39.04                            | 32.92                            | 32.38                            | <b>35.89</b> | 4.43 |
| 2000          | 64.63                            | 72.42                            | 68.61                            | 65.48                            | 64.99                            | <b>67.23</b> | 3.3  |

La Figura 3.9, muestra los porcentajes de la capacidad de inhibición obtenidos en la muestra en estudio durante 05 días diferentes de ser analizadas.



**Figura 3.9.** Porcentaje de la capacidad de inhibición durante los 05 días de análisis.

La Figura 3.10, muestra el promedio y la desviación estándar obtenidos en las muestras de *Rubus robustus* en estudio, el promedio obtenido es de  $35.89 \pm 4.43\%$  y  $67.23 \pm 3.30\%$  para una concentración de 1000 y 2000 mg/L.



**Figura 3.10.** Promedio de la capacidad de inhibición y desviación estándar en las 02 muestras.

## CONCLUSIONES

1. Se logró obtener el liofilizado del fruto de *Rubus robustus*, el cual fue un polvo fino de color carmín y de sabor y olor característico.
2. La cantidad de CFT encontrados y antocianinas fue de  $219.11 \pm 8.23$  mg GAE/100g y  $52.00 \pm 1.86$  mg/100g, respectivamente, en el liofilizado de *Rubus robustus*.
3. De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que el liofilizado de *Rubus robustus* (zarzamora) si posee una actividad antioxidante importante ya que se observa que en el ensayo de DPPH, la muestra presenta un porcentaje de inhibición del radical del 35.89 y 67.23 % para una concentración de 1000 y 2000 mg/L de extracto de *Rubus robustus*, respectivamente.
4. La capacidad antioxidante encontrada en *Rubus robustus* está relacionada directamente con la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas determinados en la muestra, esto de acuerdo a los resultados obtenidos.

## RECOMENDACIONES

- Extraer las antocianinas y compuestos fenólicos de diferentes presentaciones de la zarzamora como el fruto fresco, mermeladas y vinos para compararlos con los resultados obtenidos del producto liofilizado y ver cómo éstos se afectan.
- Se sugiere realizar estudios de la capacidad antioxidante de otro cultivo silvestre de zarzamora ubicado en una zona diferente de Arequipa para así poder comparar los resultados y ver si las condiciones climáticas afectan la capacidad antioxidante de dicho fruto.
- Realizar un estudio in vivo en animales de experimentación para observar el efecto antioxidante de *Rubus robustus*.
- Fomentar el cultivo *Rubus robustus* en la ciudad de Arequipa e incluir este fruto en la dieta diaria para así prevenir la aparición de enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AGUDO A.**, CABRERA L., AMIANO P., ARDANAZ E., BARRICARTE A., BERENGUER T., ET AL. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:1634-42.
2. **ALONSO A.M.**, DOMÍNGUEZ C., GUILLÉN D.A., BARROSO C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J AgricFoodChem.* 2002; 50: 3112-3115.
3. **ÁLVAREZ-CASTRO E.** y ORALLO-CAMBEIRO F., 2003. Actividad biológica de los flavonoides. Acción frente al cáncer. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago.
4. **AMES B. N.**, SHIGENAGA M.K., AND HAGEN T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Berkeley 94720.
5. **ANDRADE ESQUIVEL E.**, MORALES GUZMÁN J., ORTIZ CALDERÓN A.L., RODRÍGUEZ GARCÍA M.V., RONQUILLO VÁZQUEZ A., SÁNCHEZ SERRANO A., RODRÍGUEZ DAMIÁN A. R., GUZMÁN MALDONADO S. H., MENDOZA LÓPEZ M., HERNÁNDEZ LÓPEZ D. Análisis de las Propiedades Fisicoquímicas de la Zarcamora en las Variedades Brazos, Cherokee y Tupy de la Zona Alta de Michoacán. Instituto Tecnológico de Celaya. Depto. Ingeniería Bioquímica.
6. **ANTOLOVICH M.**, PRENZLER P.D., PATSALIDES E., MCDONALD S., ROBARDS K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127: 183-198.
7. **ARUOMA O.I.**, Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia and Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 53-63.

8. **BADUI- DERGALS.,** 1981. Química de los alimentos, Alhambra, México. pp. 43 a 122, 388 a 392, 553 a 502.
9. **BANDONIEN D.** y M. MURKOVICUB. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis L.*) by using an on-line HPLC-DPPH method, J. Biochem. Biophys: Methods: 53 (1-3), 65-70 (2002).
10. **BENZIE I.F.F,** STRAIN J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Anal Biochem. 1996; 239: 70-76.
11. **BHANDARI P.,** KUMAR N., SINGH B. Online HPLC-DPPH method for antioxidant of PocrorhizaRoyle ex Benth. And characterization of kutkoside by Ultra-PerfomanceLC-electrospray ionization quadrupole time-of- flight spectrometry. Indian Journay of Experimental Biology. Vol. 48, March 2010, pp 323-328.
12. **BRAND-WILLIAMS W.,** CUVELIER M., AND BERSET C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LebensmWiss Technology. 28. 25-30.
13. **CAJUSTE, B.J.,** LÓPEZ L., RODRÍGUEZ A.J., REYES M.I. 2000. Caracterización fisicoquímica de tres cultivares introducidos de zarzamora erecta (*Rubussp*)Fruticultura, Colegio de Post-graduados. U. A. Chapingo. México
14. **CANO A.,** HERNÁNDEZ-RUÍZ J., GARCÍA-CÁNOVAS F., ACOSTA M., ARNAO M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. Phytochem Anal. 1998; 9: 196-202.
15. **CAO G.,** PRIOR RL. Measurent of Oxygen Radical Absorbance Capacity in biological samples. MethEnzymol. 1999; 299 (5): 50-62.
16. **CARRILLO CABEZAS M.** “Evaluación nutritiva y nutracéutica de *Rubus robustus* deshidratada a tres temperaturas por el método de secado en bandejas.” Tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico, Escuela Superior Politécnica Chimborazo, 2008.

17. **CASTAÑEDA C.**, RAMOS E., IBÁÑEZ V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. Volumen 8, N° 1, Julio 2008.
18. **CHANDRASEKARD.**, MADHUSUDHANAK., RAMAKRISHNA S. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 40, Issue 2, 13 February 2006, Pages 460–464
19. **CHÁVEZ J.**, CHIRE T., LOAYSA L. Curso Principios bioactivos de plantas andinas y amazónicas del Perú. Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. UNALM 2002.
20. **COTTELE N.**, BERNIER J.L., CATTEAJ.P., POMMERY P., WALLET J.C., GAYDOU E.M (1996) Antioxidants properties of hydroxyl-flavones. Free Radical Biol. Med. 20:35-43.
21. **DAI J.**, GUPTA A., GATES L. y MUMPER R. J. 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties. Food and Chemical Toxicology 47:837-847.
22. **DAVALOS A.**, BARTOLOME B., SUBERVIOLA J., GOMEZ-CORDOVES C. Orac-fluorescein as a model for evaluating antioxidant activity of wines. Pol J Food Nutr Sci. 2003; 12 (SI 1): 133-136.
23. **ETTRE, L.S.** Evolution of liquid chromatography: A historical overview, in High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, Vol. 1 ed. Horvath, Academic Press, New York, 1980.
24. **FERNANDEZ J.A.**, Fundamentos del análisis cromatográfico. Cromatografía líquida de Alta Resolución. Grupo de investigación QUIMYTEC UPCT
25. **FERNÁNDEZ-PACHÓN M.S.**, VILLAÑO D., TRONCOSO A.M., GARCÍA-PARRILLA M.C. Antioxidant Capacity of Plasma after red wine intake in human volunteers. J Agric Food Chem. 2005; 53 (12): 5024-5029 .

26. **GARCÍA ALONSO J.**, PERIAGO M. J., VIDAL GUEVARA L.Y CANTOS E. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. *An. Vet. (murcia)* 18: 103-114 (2002).
27. **GARCÍA A.M.**, DE PALCUAL S., SANTOS C., RIVAS J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry*. 2004, 84: 13 – 18.
28. **GIUSTI M.M.**, WROLSTAD R.E. Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons; 2001. p. 1-13.
29. **GHISELLI A.**, SERAFINI M., NATELLA F., SCACCINI C. Total antioxidant capacity is a tool to asses redox status: critical view and experimental data. *Free RadicBiol Med*. 2000; 29 (11): 1106-1114.
30. **HALLIWELL B.** Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*. Volumen 91, Issue 3, Supplement 3. September 1991.
31. **HALLIWELL B.**, AND GUTTERIDGE J.M.C, 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*, Oxford, U.K: Oxford University Press.
32. **HASSIMOTTO, N.M.A.**, DA MOTA, R.V., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. 2008. Physicochemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubusspp.*) grown in Brazil. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 28(3): 702-708.
33. **HUANQUI C.** Oxidantes- Antioxidantes en Reumatología. *Revista Peruana de Reumatología*. Volumen 3 (1): 35-40. LIMA-PERÚ, 1997
34. **JURANEK I.**, BEZEK S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *Gen PhysiolBiophys*. 2005;24:263-78.
35. **KAHKOREN M.P.**, HOPIA A.I., VUCRELA H.J., RAUHA J.P., KUJALA T.S., HEINONEN M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 1999; 47: 3954-3962.

36. **KUSKOSKI E.**, ET AL COL. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. Rev. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, vol 24, n 4, 691-693, 2004
37. **KUSKOSKI E.**, ET AL COL. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4):726-732, out.-dez.2005.
38. **LEE J.W.**, KOO N., MIN D.B, 2004. Reactive oxygen especies, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3:21-33
39. **LEIGHTON, F. Y URQUIAGA I.**, (2001) Polifenoles del vino y Salud Humana, Antioxidantes y Calidad de Vida, Revista antioxidantes y calidad de vida online, Pontificia Universidad Católica de Chile, Febrero, 2011.
40. **LEYVA D.**, 2007. "Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora". Tesis para optar el título de Ing. En Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca, México.
41. **MARTÍNEZ-CRUZ N.**, ARÉVALO K., VERDE-STAR M, MORALES C., CÁRDENAS M., NÚÑEZ A., MORALES E. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* schldtl (zarzamora). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 42, núm. 4, octubre-diciembre, 2011, pp. 66-71. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México.
42. **MARTINEZ- VELARDE I.**, PERIAGO J AND ROS G, 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Alan Vol. 50 n.1, Caracas.
43. **MERTZ C.**, CHEYNIER V., GÜNATA Z., BRAT P. Analysis of phenolic compounds of two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High- Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8616-8624.
44. **MORALES GUZMÁN J.**, MEDINA TORRES M.G., ANDRADE ESQUIVEL E., GUZMÁN MALDONADO S., HERNÁNDEZ LÓPEZ D. Evaluación de los efectos del secado por aspersión sobre los compuestos fitoquímicos-funcionales

- y características fisicoquímicas en encapsulados de zarzamora (*Rubus spp*). XII Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología de Alimentos. Jueves 27 y viernes 28 de mayo de 2010. Guanajuato, Gto.
45. **ORTIZ CALDERÓN A.L.**, HERRERA HERNÁNDEZ M.G., GUZMÁN MALDONADO S.H., HERNÁNDEZ LÓPEZ J. Efecto de localidad sobre contenido fitoquímico y capacidad antioxidante de zarzamora variedad tupy (*Rubus eubates*). XII Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología de Alimentos. Jueves 27 y viernes 28 de mayo de 2010. Guanajuato, Gto
  46. **PALADINO S.C.** “Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera*)”. Tesis presentada para acceder al grado académico de Magister en Alimentos (Mención en Ciencias) del Posgrado Regional Cooperativo en Alimentos. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
  47. **PRIOR, R.L.**, Standarized Method for the Determination of Antioxidant Capacity and phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 1841-1856.
  48. **QUATTROCCHI O.**, ABELARIA DE ANDRIZZI S., LABA R. Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica, 1992.
  49. **REYES-CARMONA J.**, YOUSEF G., MARTÍNEZ-PENICHE R., LILA M. 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus spp.*) produced in different climatic regions. Journal of Food Science 7:497-453.
  50. **RICE-EVANS C.A.**, MILLER N.J., PAPAGANDA G. Structure and antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol. Med., 20, 933-956, 1996.
  51. **RIEGER, M.** 2006. Blackberries and Raspberries (*Rubus spp.*). Introduction to FruitCrop. University of Georgia (UGA). Pp. 89-103.
  52. **ROBARDS K.**, ET AL COL. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry 1999; 66.401-436.
  53. **RODRÍGUEZ GARCÍA M.V.**, GUZMÁN MALDONADO S. H., ANDRADE ESQUIVEL E., HERNÁNDEZ LÓPEZ. Evaluación de las propiedades

fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp*) del estado de Michoacán. XII Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología de Alimentos. Jueves 27 y viernes 28 de mayo de 2010. Guanajuato, Gto.

54. **RUBILAR M.**, PINELO M., SCHEUERMANN E., SINEIRO J., NUÑEZ M.J. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *MolNutr Food Res.* 2007; 51(6): 652-664.
55. **SALAZAR-PRECIADO, C.**, ARREDONDO-GÓMEZ, O., BERNAL-ASTORGA, A., VÁZQUEZ-MONTES, G. 2006. Secretaría de Desarrollo Rural de Colima (SDRC). Dirección de Comercialización y Planeación. Zarzamora: Perfil Comercial. Pp. 2-28.
56. **SÁNCHEZ-MORENO C.**, LARRAURI J.A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998; 76: 270-276.
57. **SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ G.** 2008. La red de Valor de la Zarzamora: El Cluster de Los Reyes Michoacán, un Ejemplo de Reconversión Competitiva. “Sistema de Inteligencia de Mercados”. Fundación Produce Michoacán, A.C. 1ra ed. Morelia, Michoacán, México. Pp. 1-106.
58. **SELLAPPAN S.**, AKOH, C C., KREWER G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food chem.*, 50, 2432-2438, 2002.
59. **SCHREKINGER M.E.**, LOTTON J, LILA M.A, DE MEJIA E.G. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J Med Food* 2010; 13(2):233-246
60. **SHETTY K.**, PALIYATH G., POMETTO A. Y LEVIN R., (2007). Functional Foods and Biotechnology. Advisory Board, Massachusetts, EUA. Leighton, F, Urquiaga, I. y Diez, M., (1997)
61. **SHIOW Y.** WANG AND HSIN-SHAN LIN. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and

- Developmental Stage. *J. Agric. FoodChem.*, 2000, 48 (2), pp 140–146. January 14, 2000.
62. **SINGLETON V.L.**, ROSSI J.R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J EnolVitic.* 1965; 16(3): 144-158.
63. **SOTERO V.**, MACO M., VELA J., MERINO C., DÁVILA E., GARCÍA D. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Rev. Soc. Quím. Perú*, ene. /mar. 2011, vol.77, no.1, p.66-74. ISSN 1810-634X.
64. **SOTO L.**, GUTIÉRREZ V. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Médica. Milit* 2002; 31(2):126-33. Instituto Superior de Medicina Militar.
65. **VICEO TOMEI A.**, VICEDO ORTEGA Y. Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas (La Habana)*, 2000, vol. 19.
66. **VINSON J.**, HAO Y., SU X. AND ZUBI L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46. 3630-3634.
67. **WAKSMUDZKA-HAJNOS M.**, SHERMA J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, 2000.
68. **WANG WEI-DONG** y XU SHI-YING, 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering.* 82:271.
69. **WAYNER D.M.**, BURTON G.W., INGOLD K.U., LOCKE S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 1985; 187 (1): 33-37.
70. **WINSTON G.W.**, REGOLI F., DUGAS A.J., FONG J.H., BLANCHARD K.A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free RadicBiol Med.* 1998; 24: 480-493.

# ANEXOS



## ANEXO 1



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



“AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”

### CONSTANCIA N° 004-2013-HUSA

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


HACE CONSTAR:

Que la muestra presentada por la Srta. Bachiller **Daniela Camacho Valencia Dongo**, egresada del Programa de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, para la Ejecución de su Tesis Profesional Titulada: “**Determinación de la capacidad antioxidante de la “zorzamora” mediante HPLC CON DPPH.** Las muestras fueron obtenidas de la zona de Chilina, distrito de Alto Selva Alegre, y ha sido determinada en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie:

***Rubus robustus Presl.***

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

Arequipa 14 de Marzo del 2013.

  
Blgo. Leoncio Mariño Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)

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

## ANEXO 2

