

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**Síntesis biológica y caracterización de nanopartículas de oro y la
cuantificación de Oleuropeína a partir de las hojas de olivo (*Olea europaea*
var. Sevillana) provenientes de la provincia de Ilo - Moquegua**

Tesis presentada por los Bachilleres:

Solorzano Villanueva, Sandro Adrian

ORCID: 0009-0002-0383-4740

Villanueva Lambruschini, José Efrain

ORCID: 0009-0002-2940-0318

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor (a):

Mg. Medina Pérez, Jeaneth Marisol

ORCID: 0000-0003-3856-6926

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 22 de Enero del 2026

Dictamen: 014406-C-EPFyB-2026

Visto el borrador del expediente 014406, presentado por:

2018247361 - SOLORZANO VILLANUEVA SANDRO ADRIAN

2019703121 - VILLANUEVA LAMBRUSCHINI JOSÉ EFRAIN

Titulado:

**SÍNTESIS BIOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LA
CUANTIFICACIÓN DE OLEUROPEÍNA A PARTIR DE LAS HOJAS DE OLIVO (OLEA EUROPAEA
VAR. SEVILLANA) PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE ILO - MOQUEGUA**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29262816 - LOPEZ VALENCIA YENNY CANDELARIA
DICTAMINADOR**



**29247630 - CORZO SALAS DE VALDIVIA ANGELICA MAGDALENA
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR**



SÍNTESIS BIOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LA CUANTIFICACIÓN DE OLEUROPEÍNA A PARTIR DE LAS HOJAS DE OLIVO (OLEA EUROPAEA VAR. SEVILLANA) PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE ILO - MOQ

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	3%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	docplayer.es Fuente de Internet	1%
5	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la guía y fuerza en realizar este proyecto.
A mis padres, José Luis y Silvia, por su amor, consejos y apoyo incondicional en todo lo que me propongo, gracias a ustedes me convertí en lo que soy.
A mi hermanito, Sebastián, por su cariño y dándome la motivación de enseñarle la virtud de la dedicación y el esfuerzo.
A mi mascota Canela, que me acompañó en cada etapa de este proceso.
A mis amigos Imanol, Víctor, Yomira, Margot, Diana, Paolo, Diego, Carlos y mis amistades cercanas que hice durante el transcurso de mi etapa universitaria, intercambio estudiantil y en el internado, apreciando su lealtad, risas y apoyo mutuo.

Sandro Adrián Solorzano Villanueva

A Dios por consolar mi alma.
A mi patria por ser lienzo de mi obra.
A mis padres, Efraín y Aurora, por su amor incondicional y su entrega a la familia, sus experiencias y virtudes forjaron la persona que soy.
A mis hermanos, Xiomara, Fabio y Valentina por el cariño, la fuerza y cambio que supusieron en mí; la dedicación y el esfuerzo de ser un camino para ustedes.
A mis mascotas Molly, Polly y Gaby por llenar de felicidad cada vacío durante este proyecto.
A mis amigos, Paolo, Imanol, Víctor, Jerdie, Rocío, Yomira, Diana, Cynthia y amistades cercanas que hice durante el transcurso de mi etapa universitaria e internado, me han llegado al corazón.
A Tota Sáenz Zenteno, gracias por toda su ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos la fortaleza y sabiduría en cumplir este proyecto de tesis.

A nuestros familiares por los valores inculcados y la motivación de seguir adelante.

A la señora Rossana La Motta y a la señora Gladys Vásquez por darnos el permiso de trabajar con sus cultivos y confiar en nuestra visión.

A la Universidad Católica de Santa María, por brindarnos las enseñanzas y herramientas para convertirnos en unos profesionales de éxito.

A los integrantes del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, Tiffany, Ricardo y Rodrigo, por orientar nuestro esfuerzo y desarrollo, así como al Dr. Jaime Cárdenas y la Dra. Lily en su confianza durante la producción del proyecto.

A nuestra asesora de tesis, la Mg. Jeaneth Medina, por todo su apoyo, orientación y la oportunidad de desarrollar el trabajo en el laboratorio de Investigación Proyecto Mercurio (LIPROM). Al igual que al Dr. José Villanueva, Dra. Celia Choquenaira, Dr. Elvis Gonzales y compañeros de laboratorio por su cooperación y consejos para la culminación de esta investigación.

RESUMEN

En la presente investigación se desarrolló una alternativa ecológica para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) empleando hojas de olivo (*Olea europaea*) de diferentes zonas geográficas y periodos de tiempo en la provincia de Ilo - Moquegua, sometidas a procesos de extracción utilizando solventes de distinta polaridad (etanol y metanol), con el fin de evaluar su influencia en el rendimiento extractivo y capacidad antioxidante. Los resultados mostraron que el extracto metanólico presentó un mayor rendimiento de extracción y un contenido total de compuestos fenólicos superior, alcanzando un valor promedio de 293.1776 mg GAE/g de muestra seca. La capacidad antioxidante, determinada mediante los métodos DPPH, ABTS y CUPRAC, evidenció una elevada capacidad antioxidante en ambos extractos, siendo mayor en el periodo de floración, destacando nuevamente el extracto metanólico con valores de 2468.1676 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH), 1619.8550 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS) y 2243.0345 $\mu\text{mol TE/g}$ (CUPRAC), lo que sugiere una fuerte correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante.

A partir del extracto con mayor capacidad antioxidante se logró la síntesis biológica de AuNPs, confirmada por un cambio de color característico y una absorbancia en UV-Vis alrededor de 550 nm. La caracterización mediante STEM, DLS y UV-Vis evidenció nanopartículas predominantemente esféricas, con un tamaño promedio entre 7 – 9 nm y una distribución homogénea, lo que confirma el potencial del extracto como agente reductor y estabilizante.

Asimismo, se estandarizó un método de HPLC para la cuantificación de Oleuropeína, obteniendo una idónea linealidad ($R^2 = 0.9999$), una buena recuperación y precisión con límites de detección y cuantificación aceptables en guías analíticas internacionales. La cuantificación reveló que el extracto metanólico presentó el mayor contenido de Oleuropeína, con un valor promedio de 13.85 $\mu\text{g/mL}$.

Por los resultados obtenidos, se pudo comprobar que los extractos de hojas de olivo constituyen una fuente rica en compuestos fenólicos con una elevada capacidad antioxidante, generando una excelente síntesis biológica de nanopartículas de oro, aportando un valor agregado a las hojas y una alternativa sostenible con posibles aplicaciones en el ámbito farmacéutico y biotecnológico.

Palabras clave: Nanopartículas, Oleuropeína, Olivo.

ABSTRACT

This research developed an environmentally friendly alternative for the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using olive leaves (*Olea europaea*) from different geographical areas and harvest times in the province of Ilo. The leaves were subjected to extraction processes using solvents of varying polarity (ethanol and methanol) to evaluate their influence on extraction yield and antioxidant capacity. The results showed that the methanolic extract exhibited a higher extraction yield and a greater total content of phenolic compounds, reaching an average value of 293.1776 mg GAE/g of dry sample. The antioxidant capacity, determined using the DPPH, ABTS, and CUPRAC methods, showed high antioxidant capacity in both extracts, with the highest activity occurring during the flowering period. The methanolic extract again stood out, with values of 2468.1676 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH), 1619.8550 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS), and 2243.0345 $\mu\text{mol TE/g}$ (CUPRAC), suggesting a strong correlation between phenolic content and antioxidant capacity.

From the extract with the highest antioxidant capacity, green synthesis of AuNPs was achieved, confirmed by a characteristic color change and UV-Vis absorbance around 550 nm. Characterization by STEM, DLS, and UV-Vis revealed predominantly spherical nanoparticles with an average size of 7–9 nm and a homogeneous distribution, confirming the extract's potential as a reducing and stabilizing agent.

Furthermore, an HPLC method for quantifying Oleuropein was standardized, achieving excellent linearity ($R^2 = 0.9999$), good recovery and precision with acceptable limits of detection and quantification. Quantification revealed that the methanolic extract had the highest oleuropein content, with an average value of 13.85 $\mu\text{g/mL}$.

The results obtained confirmed that olive leaf extracts are a rich source of phenolic compounds with high antioxidant capacity, generating excellent biological synthesis of gold nanoparticles. This adds value to the leaves and provides a sustainable alternative with potential applications in the pharmaceutical and biotechnological fields.

Keywords: Nanoparticles, Oleuropein, Olive.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
MARCO TEÓRICO.....	7
1. Nanotecnología	7
1.1 Historia.....	7
1.2 Definición de nanotecnología y nanopartículas	8
2. Clasificación de nanopartículas	9
2.1 Nanopartículas orgánicas	9
2.2 Nanopartículas inorgánicas.....	9
3. Síntesis de nanopartículas	11
3.1 Síntesis química	11
3.2 Síntesis biológica	12
4. Técnicas de caracterización de nanopartículas	13
4.1 Espectroscopia UV-Visible.....	13
4.2 Espectroscopía FT-IR	14
4.3 Dispersión de Luz Dinámica.....	14
4.4 Microscopía electrónica de transmisión de barrido	16
5. <i>Olea europaea L. variedad Sevillana</i>	18
5.1 Generalidades.....	18
5.2 Clasificación biológica.....	19
5.3 Clasificación taxonómica.....	20

5.4	Composición química	21
5.5	Usos Medicinales	27
6.	Radicales Libres	27
7.	Capacidad Antioxidante	30
7.1	Definición	30
8.	Métodos para determinar la capacidad antioxidante	32
8.1	Ensayo DPPH	32
8.2	Ensayo ABTS	33
8.3	Ensayo CUPRAC	34
9.	Método para determinar polifenoles totales	35
9.1	Ensayo Folin-Ciocalteu	35
10.	Método de extracción de la Oleuropeína	35
10.1	Fraccionamiento	35
11.	Técnicas de Cuantificación de la Oleuropeína	36
11.1	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	36
12.	Contexto y problemática de la producción agrícola en Moquegua	39
MATERIALES Y MÉTODOS		42
1.	Lugar de ejecución	42
2.	Materiales	42
2.1	Material vegetal	42
2.2	Reactivos químicos	42
2.3	Materiales de laboratorio	43
2.4	Aparatos y equipos	44
2.5	Software	44
3.	Metodología	45
3.1	Obtención de las muestras	45
3.2	Obtención del extracto vegetal	45
4.	Determinación del contenido de polifenoles totales	46

5.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH	48
6.	Determinación de la capacidad antioxidante por método ABTS	50
7.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método CUPRAC	51
8.	FT-IR.....	53
9.	Cuantificación del contenido de Oleuropeína en extracto vegetal por HPLC	54
9.1	Condiciones cromatográficas	54
9.2	Estandarización de parámetros para la cuantificación de Oleuropeína.....	55
9.3	Cuantificación de Oleuropeína en las muestras	60
10.	Síntesis biológica de nanopartículas de Oro	60
11.	Caracterización de nanopartículas UV-Vis.....	62
12.	Caracterización de nanopartículas DLS	62
13.	Caracterización de nanopartículas STEM.....	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		65
1.	Obtención del extracto de hojas de olivo	65
2.	Determinación del contenido de polifenoles totales	65
3.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH	70
4.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS	76
5.	Determinación de Capacidad antioxidante por método de CUPRAC.....	82
6.	FT-IR.....	88
7.	Estandarización de parámetros para la cuantificación de Oleuropeína en HPLC.....	90
7.1	Linealidad	90
7.2	Sensibilidad.....	92
7.3	Precisión.....	92
7.4	Exactitud	94
7.5	Cuantificación de Oleuropeína en las muestras	96
8.	Caracterización de nanopartículas por UV-Vis.....	97
9.	Caracterización de nanopartículas por DLS.....	98
10.	Caracterización de nanopartículas por STEM.....	100

CONCLUSIONES 102

RECOMENDACIONES..... 106

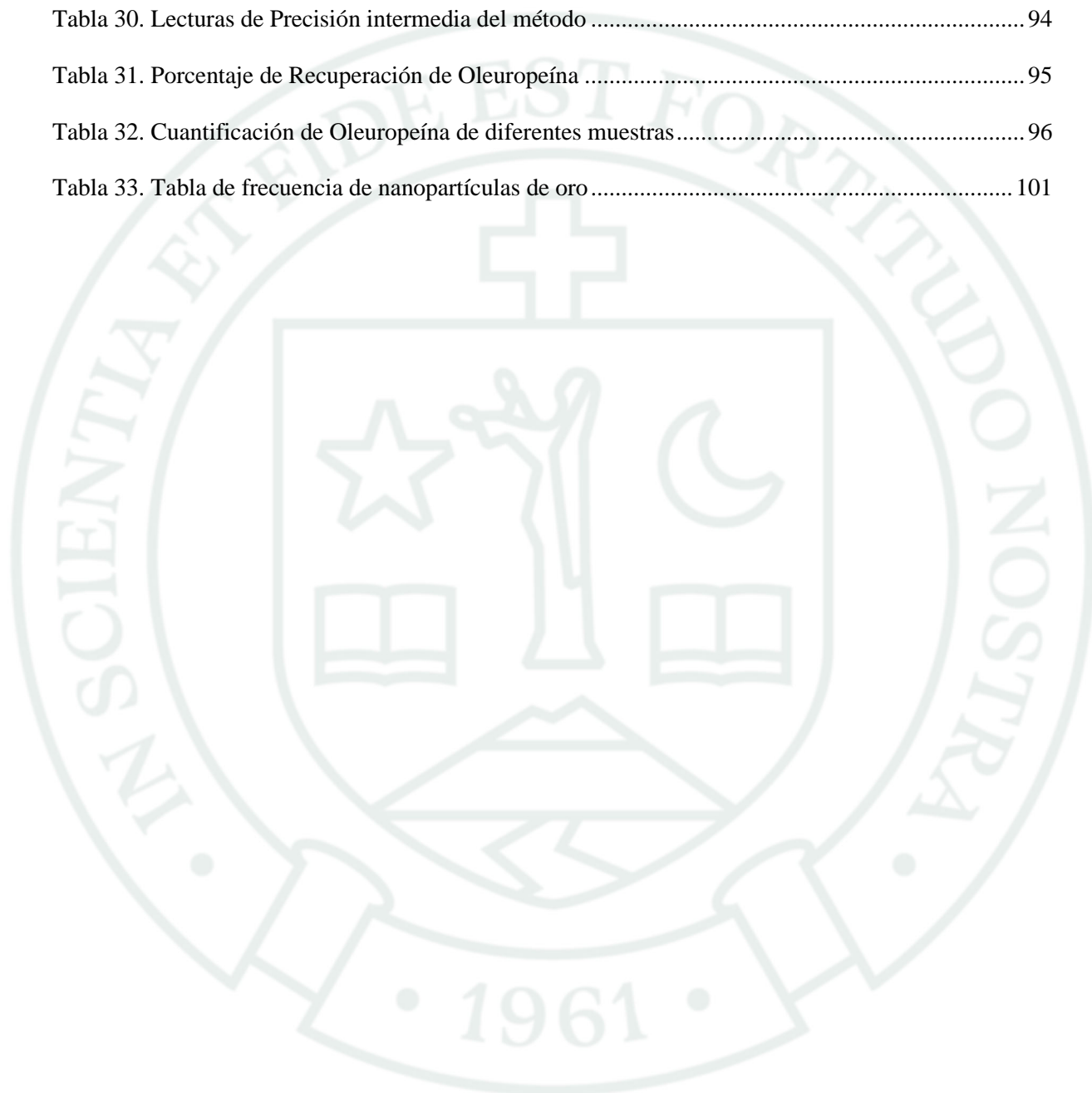
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 107



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Olea europaea</i> L. var. <i>Sevillana</i>	20
Tabla 2. Clasificación de las Especies reactivas de oxígeno.....	28
Tabla 3. Clasificación de las Especies reactivas de nitrógeno	29
Tabla 4. Preparación de la curva de calibración Polifenoles Totales.....	47
Tabla 5. Preparación de la curva de calibración de DPPH	49
Tabla 6. Preparación de la curva de calibración de CUPRAC.....	52
Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de Oleuropeína en HPLC	56
Tabla 8. Absorbancia de blancos para ensayo de Polifenoles Totales	66
Tabla 9. Lecturas de patrones de la curva de calibración de Polifenoles Totales	66
Tabla 10. Contenido de Polifenoles Totales en extractos vegetales metanólicos	68
Tabla 11. Contenido de Polifenoles Totales en extractos vegetales etanólicos	69
Tabla 12. Blancos para ensayos de DPPH	71
Tabla 13. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente etanólico.....	71
Tabla 14. Blancos para ensayos de DPPH en periodo de cosecha.....	73
Tabla 15. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente metanólico	73
Tabla 16. Capacidad Antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración.....	75
Tabla 17. Capacidad Antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de cosecha.....	76
Tabla 18. Blancos para ensayos de ABTS	77
Tabla 19. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente etanólico.....	77
Tabla 20. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente metanólico	79
Tabla 21. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración	81
Tabla 22. Lectura de blancos para ensayo CUPRAC	82
Tabla 23. Lectura de patrones para ensayo CUPRAC en etanol.....	82
Tabla 24. Lectura de patrones para ensayo CUPRAC en metanol	84
Tabla 25. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración	85

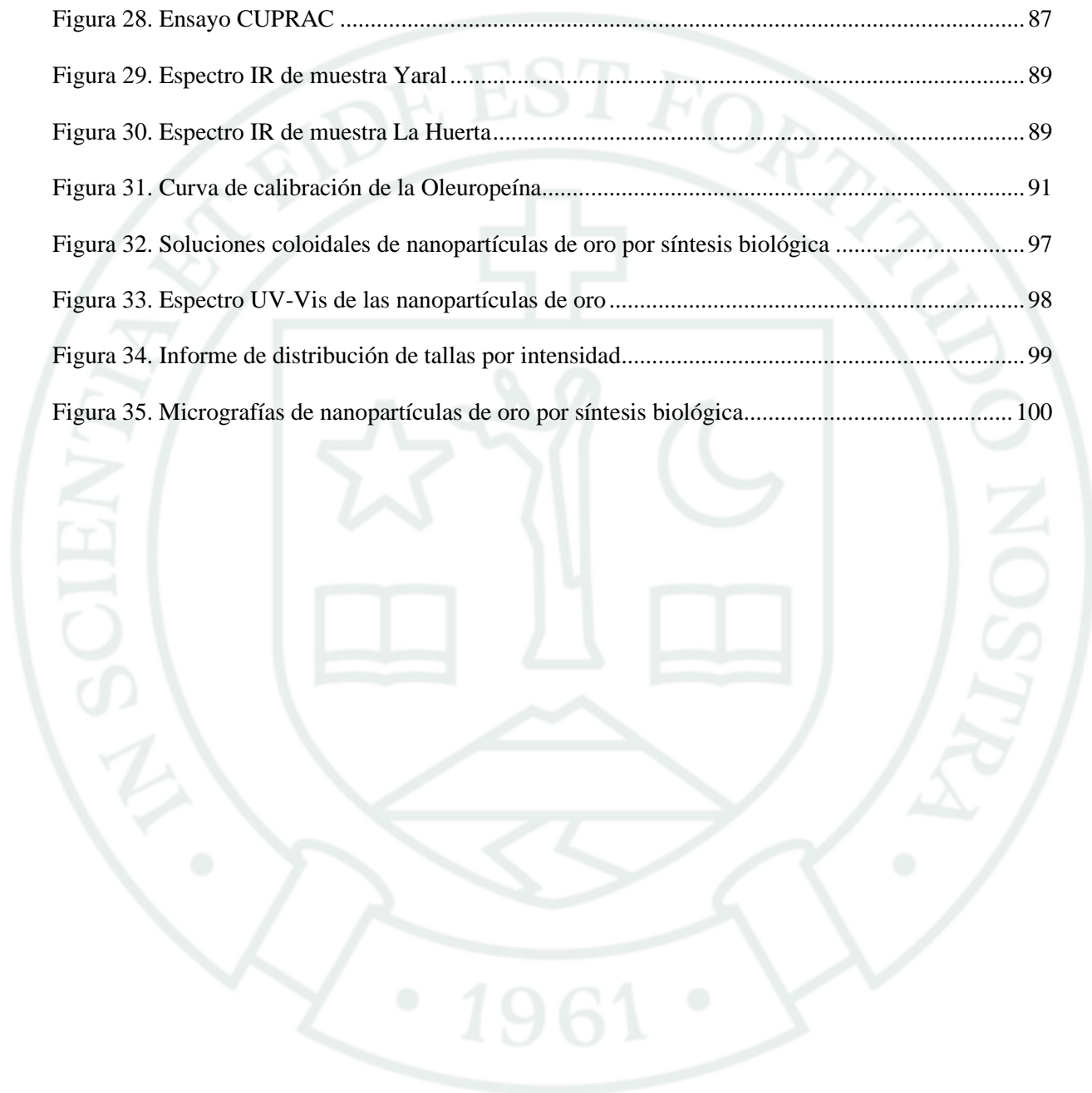
Tabla 26. Lectura de blancos para ensayo CUPRAC en muestras de cosecha	86
Tabla 27. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de cosecha	86
Tabla 28. Áreas de pico de los patrones de Oleuropeína	90
Tabla 29. Lecturas de Repetibilidad del método	93
Tabla 30. Lecturas de Precisión intermedia del método	94
Tabla 31. Porcentaje de Recuperación de Oleuropeína	95
Tabla 32. Cuantificación de Oleuropeína de diferentes muestras	96
Tabla 33. Tabla de frecuencia de nanopartículas de oro	101



ÍNDICE DE FIGURAS

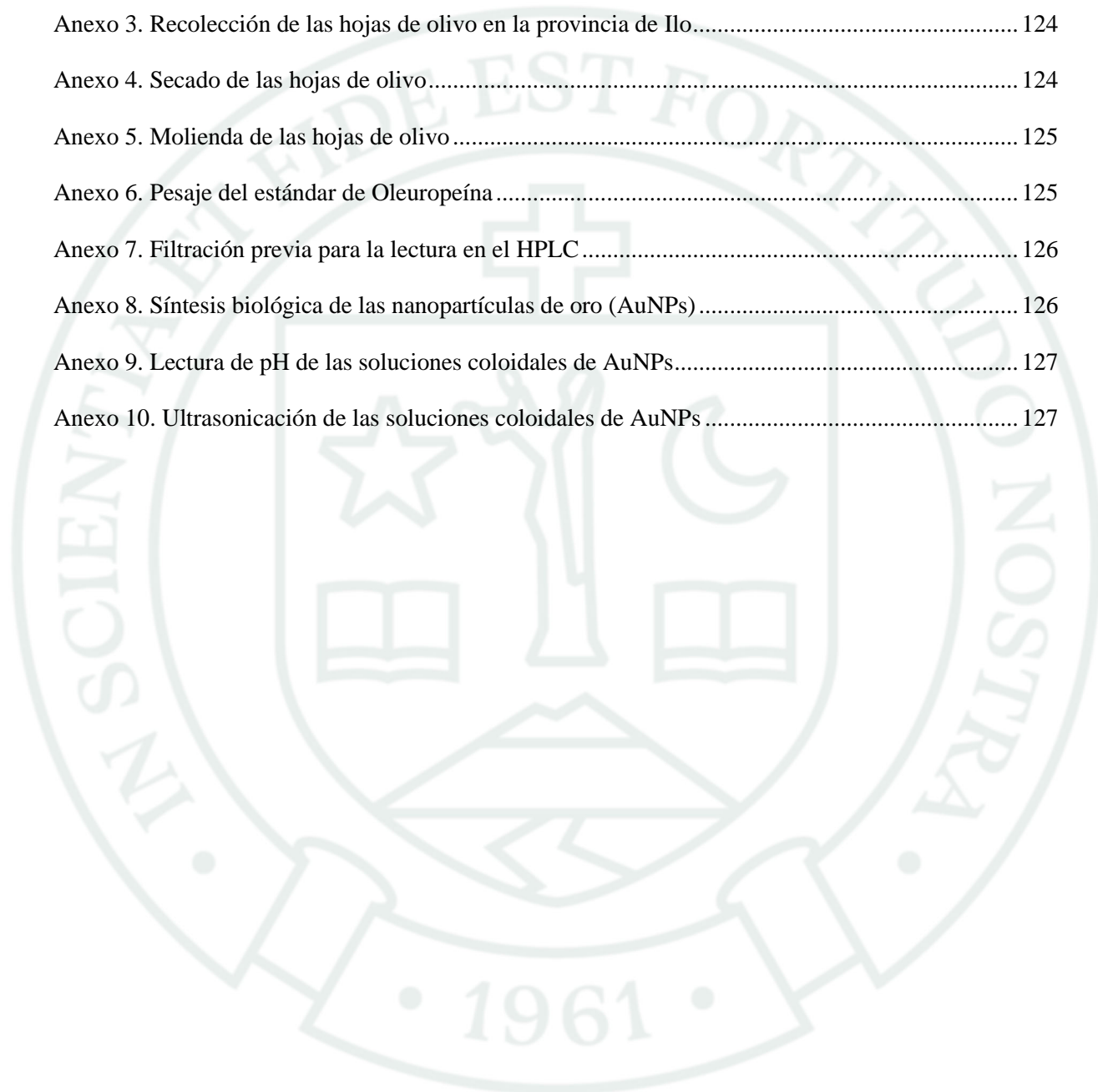
Figura 1. La copa de Licurgo. El vidrio aparece verde con luz reflejada (A) y rojo violeta con luz transmitida (B)	7
Figura 2. Síntesis de nanopartículas: <i>top-down</i> y <i>bottom-up</i>	11
Figura 3. Configuración STEM que incluye el detector de espectro de espectroscopía de dispersión de energía (EDS).....	17
Figura 4. Estructura química de un compuesto fenólico.....	22
Figura 5. Ejemplos de ácidos fenólicos	23
Figura 6. Ejemplos de polifenoles.....	24
Figura 7. Isopreno, estructura básica de los terpenos.....	25
Figura 8. Estructura química de los iridoides y secoiridoides	25
Figura 9. Estructura química de la Oleuropeína.....	26
Figura 10. Mecanismo de reacción del DPPH frente a un antioxidante	32
Figura 11. Mecanismo de síntesis y reacción del radical ABTS+ frente a un antioxidante.....	33
Figura 12. Mecanismo de reacción de CUPRAC frente a un antioxidante.....	34
Figura 13. Mecanismo de reacción del reactivo F-C frente a un antioxidante.....	35
Figura 14. Componentes principales del HPLC.....	37
Figura 15. Extractos vegetales alcohólicos de las hojas de olivo	65
Figura 16. Curva de calibración de Polifenoles Totales	67
Figura 17. Ensayo de Polifenoles Totales.....	70
Figura 18. Curva de calibración de DPPH en etanol	72
Figura 19. Porcentaje de Inhibición de DPPH en etanol.....	72
Figura 20. Curva de calibración de DPPH en metanol	74
Figura 21. Porcentaje de Inhibición de DPPH en metanol.....	74
Figura 22. Curva de calibración de ABTS en etanol	78
Figura 23. Porcentaje de Inhibición de ABTS en etanol.....	78

Figura 24. Curva de calibración de ABTS en metanol	80
Figura 25. Porcentaje de Inhibición de ABTS en metanol.....	80
Figura 26. Curva de calibración para ensayo CUPRAC en etanol	83
Figura 27. Curva de calibración para ensayo CUPRAC en etanol	84
Figura 28. Ensayo CUPRAC	87
Figura 29. Espectro IR de muestra Yaral.....	89
Figura 30. Espectro IR de muestra La Huerta.....	89
Figura 31. Curva de calibración de la Oleuropeína.....	91
Figura 32. Soluciones coloidales de nanopartículas de oro por síntesis biológica	97
Figura 33. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro	98
Figura 34. Informe de distribución de tallas por intensidad.....	99
Figura 35. Micrografías de nanopartículas de oro por síntesis biológica.....	100



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Constancia de Clasificación Taxonómica	122
Anexo 2. Certificado de Análisis del estándar de Oleuropeína	123
Anexo 3. Recolección de las hojas de olivo en la provincia de Ilo.....	124
Anexo 4. Secado de las hojas de olivo.....	124
Anexo 5. Molienda de las hojas de olivo	125
Anexo 6. Pesaje del estándar de Oleuropeína	125
Anexo 7. Filtración previa para la lectura en el HPLC	126
Anexo 8. Síntesis biológica de las nanopartículas de oro (AuNPs).....	126
Anexo 9. Lectura de pH de las soluciones coloidales de AuNPs.....	127
Anexo 10. Ultrasonicación de las soluciones coloidales de AuNPs	127



INTRODUCCIÓN

En la última década, las nanopartículas de oro (AuNPs) han generado un interés considerable en múltiples disciplinas científicas y tecnológicas, gracias a sus singulares propiedades fisicoquímicas, como su gran superficie específica, estabilidad y potencial actividad biológica. Estas características hacen de las AuNPs un material ideal para aplicaciones en biomedicina, farmacología y biotecnología. No obstante, los métodos tradicionales de su síntesis suelen involucrar químicos tóxicos y procesos que generan residuos contaminantes, limitando su uso en áreas que priorizan la sostenibilidad y seguridad.

En la región sur del Perú, en la provincia de Ilo, departamento de Moquegua, la producción de olivo y derivados ha sido una de las principales actividades económicas de la provincia por su buena calidad certificada gracias a las características únicas de la zona, sin embargo, el sistema productivo de olivo ha experimentado un decrecimiento significativo en los últimos años por diferentes factores como incendios, cambio climático y rentabilidad, reflejado en la disminución de su cosecha, por lo que se plantea un valor agregado a las hojas de olivo, considerado como un desecho agrícola. La valorización de la hoja de olivo podría ofrecer nuevas oportunidades económicas a través del aprovechamiento de su potencial antioxidante en la síntesis de nanopartículas, un campo poco investigado en la provincia.

Es aquí donde surge la síntesis biológica, una alternativa amigable con el ambiente para sintetizar nanopartículas, empleando compuestos naturales de origen vegetal como agentes reductores y estabilizantes, como la Oleuropeína, un compuesto fenólico del grupo de los polifenoles, presente de forma mayoritaria en el fruto y hojas de olivo, convirtiéndola en pieza clave para la síntesis de las AuNPs.

Esta investigación tiene como objetivo sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro mediante un enfoque de síntesis biológica haciendo uso de extractos alcohólicos de las hojas de olivo de

la *variedad Sevillana*. Se evaluaron las condiciones óptimas de síntesis y se caracterizaron propiedades como el tamaño y la forma de las AuNPs obtenidas; asimismo se evaluó la correlación de la Oleuropeína como posible principal responsable de la capacidad antioxidante en el extracto, por lo que se le cuantifica por HPLC.

Al existir una carencia de investigación enfocada en los productos de desecho del olivo, esta representará un recurso de alto potencial, ya que no solo contribuirá al conocimiento sobre el beneficio de las hojas de olivo y sus compuestos fenólicos como la Oleuropeína o derivados, sino que también abrirá nuevas oportunidades en el campo farmacéutico y biotecnológico. La síntesis de nanopartículas a partir de los extractos naturales puede tener un impacto significativo en el diseño de nuevos tratamientos médicos, por lo que este enfoque podría dar un nuevo uso en beneficio de la salud y generar una economía cíclica sin causar contaminación ambiental.



HIPÓTESIS

Es probable que el extracto alcohólico de los productos de desecho como son las hojas de olivo permita generar nanopartículas de oro eficazmente, donde la Oleuropeína sea el principal bioindicador de poder reductor y estabilizante, aprovechando así sus propiedades antioxidantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar mediante una alternativa ecológica nanopartículas de oro y la cuantificación de Oleuropeína a partir del extracto de las hojas de olivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto de las hojas de olivo a través de diferentes solventes.
2. Cuantificar los compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu de los extractos de hojas de olivo.
3. Determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH, ABTS y CUPRAC de los extractos de hojas de olivo.
4. Identificar los grupos funcionales presentes en las hojas de olivo por FT-IR y comparar sus valores entre las zonas de recolección.
5. Estandarizar el método de HPLC para cuantificar Oleuropeína.
6. Cuantificar el contenido de Oleuropeína en los extractos alcohólicos a través del HPLC.

7. Sintetizar las nanopartículas de oro a partir del extracto alcohólico con mayor capacidad antioxidante.

8. Determinar las características morfológicas de las nanopartículas de oro mediante la Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM), la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y Espectroscopía UV-Vis.





CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Nanotecnología

1.1 Historia

El empleo de la nanotecnología data del siglo IV d.C., siendo los romanos los pioneros en el uso de su arte, como lo demuestra la Copa de Licurgo, un artefacto de vidrio dicróico con la capacidad de cambiar de color dependiendo de la luz, verde bajo luz directa y rojo-púrpura al ser atravesado por ella. En 1990, estudios bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM) identificaron que este fenómeno se debe a nanopartículas de una aleación de plata (Ag) y oro (Au), medidas entre 50 a 100 nanómetros (nm), a una proporción de aproximadamente 7:3 de Ag:Au, junto con un 10% de cobre integrado en el vidrio; generando colores específicos al absorber la luz, las nanopartículas más grandes producen tonos rojo-púrpura, mientras que las de plata dispersa generan el color verde (Figura 1) (1).



Figura 1. La copa de Licurgo. El vidrio aparece verde con luz reflejada (A) y rojo violeta con luz transmitida

(B)

Siguiendo este principio, análisis en vitrales medievales y cerámicas islámicas (siglo IX-XVII) y en las espadas "Damasco" (siglo XIII-XVIII), se concluyó contenían nanohilos de cementita y nanotubos de carbono para aumentar su dureza y filo. En 1857, Michael Faraday estudió las propiedades ópticas de suspensiones coloidales de nanopartículas de oro, demostrando cómo estas estructuras producen colores únicos según las condiciones de luz. Estos ejemplos reflejan la evolución de las técnicas nanoestructuradas desde la antigüedad hasta los desarrollos contemporáneos en nanociencia, consolidando su relevancia histórica y científica (1).

1.2 Definición de nanotecnología y nanopartículas

Por sintaxis, el prefijo "nano" proviene del griego “νάνος” y significa "enano", siendo una milmillonésima parte de algo. La nanotecnología es una área de la ciencia e ingeniería que diseña y manipula las dimensiones de la materia a una escala nanométrica de 1 a 100 nm (nanomateriales), permitiendo aplicaciones innovadoras en áreas como la química, física, biología, medicina, ingeniería y electrónica (1).

Las nanopartículas son partículas de materia con un diámetro inferior a 100 nm, que actúan como unidades independientes en términos de propiedades. A diferencia de los materiales macroscópicos, las nanopartículas presentan propiedades físicas, químicas y biológicas que dependen directamente de su tamaño. Este rasgo incrementa la relevancia de los átomos en su superficie, facilitando reacciones químicas más rápidas y eficientes (2).

Entre las propiedades que pueden diferir respecto a los materiales en su forma convencional se incluyen el color, la reactividad química, la temperatura de fusión, la conductividad eléctrica, el magnetismo, la resistencia mecánica y la estructura cristalina (3).

2. Clasificación de nanopartículas

2.1 Nanopartículas orgánicas

Las nanopartículas orgánicas se generan utilizando nanomateriales sintetizados a partir de moléculas orgánicas con tamaños inferiores a 100 nm como los colorantes fluorescentes, medicamentos, polímeros semiconductores π -conjugados y biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos o péptidos (4).

2.2 Nanopartículas inorgánicas

Las nanopartículas inorgánicas se generan a partir de nanomateriales no biológicos como metales, óxidos o sales, cual gozan de una mayor estabilidad, hidrofiliidad, biocompatibilidad y menor toxicidad en comparación con las orgánicas. Entre las más destacadas se encuentran las nanopartículas metálicas (oro y plata) y las magnéticas (níquel, cobre, hierro) (5).

2.2.1 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas son un tipo de material nano-magnético que se caracteriza por su gran área superficial, capacidad de respuesta magnética y superparamagnetismo. Entre las nanopartículas magnéticas más comunes se encuentran las sintetizadas con óxido de hierro, como la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (5).

2.2.2 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas son nanomateriales de dimensión cero o coloides metálicos, que se obtienen mediante métodos como la reducción química, microemulsión o descomposición térmica de sales metálicas. Para estabilizarlas, se emplean ambientes inertes o agentes protectores de superficie como ligandos orgánicos o recubrimientos inorgánicos. Estas nanopartículas presentan propiedades fisicoquímicas distintas a las de los materiales masivos, debido a fenómenos como el confinamiento cuántico y su alta relación superficie-volumen (5). Las nanopartículas metálicas son estructuras nanométricas altamente versátiles gracias a su capacidad para ajustar su forma, composición, tamaño, estructura, ensamblaje y propiedades ópticas. Entre sus características distintivas se encuentran una fuerte absorción de plasmones, dispersión mejorada de Rayleigh, intensificación del efecto Raman en superficies (SERS), capacidad para obtener información química en sustratos metálicos a escala nanométrica y aplicaciones en imagenología de sistemas biológicos (6).

2.2.2.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) destacan por su baja toxicidad y permiten modificaciones en forma, tamaño y superficie, lo que las adapta para tratamientos oncológicos como una hipertermia localizada. En el ámbito terapéutico, las AuNPs se utilizan en tratamientos fototérmicos, radioterapias, quimioterapias y como vehículos para la liberación controlada de medicamentos. Estudios han demostrado su capacidad para penetrar el núcleo celular con partículas pequeñas (2-6 nm), mostrando mayor eficacia y menor toxicidad en comparación con las de mayor tamaño. Además, presentan propiedades antimicrobianas y biodegradables, lo que facilita su eliminación del organismo mediante filtración glomerular. (5)

3. Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se basa mediante dos enfoques principales: *top-down* y *bottom-up*. El método *top-down* se basa en la reducción de tamaño partiendo de materiales sólidos mediante procesos físicos y mecánicos como la homogenización a alta presión, molienda o trituración. Por otro lado, el enfoque *bottom-up* forma a las nanopartículas a partir de la unión de moléculas o átomos individuales mediante procesos físico-químicos, como se observa en la Figura 2 (5).

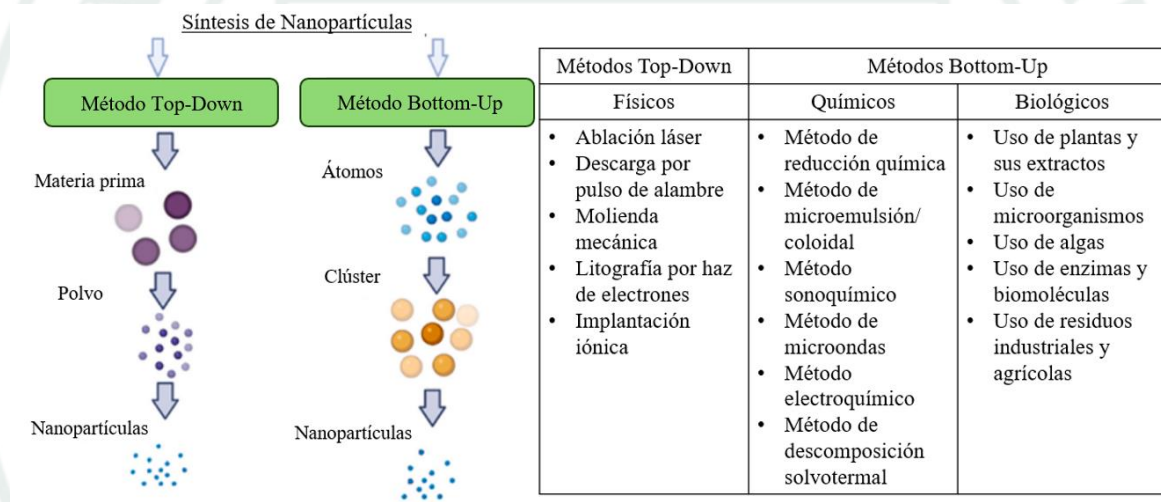


Figura 2. Síntesis de nanopartículas: *top-down* y *bottom-up*

3.1 Síntesis química

3.1.1 Método de Turkevich

El método de Turkevich (1951) emplea citrato trisódico como agente reductor para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs). Variables como la relación $\text{HAuCl}_4/\text{citrato}$, el pH y la

temperatura se ajustan para controlar el tamaño y la estabilidad de las partículas. Este proceso consta de tres etapas: la formación inicial de partículas diminutas (1-2 nm) mediante una reducción rápida; la coalescencia de partículas poco estabilizadas, disminuyendo su número; y un crecimiento continuo hasta estabilizarse en un tamaño promedio de 2.5 nm. Este método es ampliamente utilizado por su simplicidad y eficacia en la producción de AuNPs. La incorporación de borohidruro de sodio (NaBH_4) al método de Turkevich se introdujo como una modificación para simplificar la síntesis, eliminando la necesidad de calentamiento. Por otro lado, uno de los métodos más reconocidos para sintetizar nanopartículas de oro esféricas (AuNPs) solubles en solventes orgánicos es el método Brust-Schiffrin. Este enfoque se caracteriza por la formación de nanopartículas pequeñas (<10 nm de diámetro), gracias a la alta afinidad de los ligandos tioles por la superficie del oro, lo que evita el crecimiento de las nanopartículas (5).

3.1.2 Método de Brust-Schiffrin

El método de Brust-Schiffrin (1994) representó un avance fundamental siendo la primera técnica de síntesis "*in situ*" de nanopartículas metálicas estabilizadas con tioles. Entre sus principales ventajas destacan su implementación sencilla en condiciones ambientales, la alta estabilidad térmica de las nanopartículas resultantes, y la versatilidad para modificar y darle un carácter funcional a su superficie mediante ligandos. Este método permite obtener nanopartículas de oro con un tamaño controlado en el rango de 1.5 a 5.2 nm (7).

3.2 Síntesis biológica

Los extractos vegetales contienen diversos agentes reductores que facilitan la síntesis de

nanopartículas. Grupos funcionales como fenoles, carbonilos, aminas y ácidos carboxílicos, están presentes en compuestos fitoquímicos como polifenoles, flavonoides y terpenos, donando los electrones necesarios para reducir las sales metálicas. Las características finales de las nanopartículas dependen de factores como la concentración del extracto vegetal, la sal metálica utilizada, el pH de la mezcla de reacción, la temperatura y el tiempo de incubación (8).

La síntesis mediante el uso de plantas y sus órganos vegetativos como las hojas, corteza, tallo o raíces, son procesadas para obtener un extracto vegetal. En este método, no se requieren agentes externos de estabilización o recubrimiento, ya que los fitoquímicos actúan simultáneamente como agentes reductores y estabilizantes, eliminando la toxicidad de compuestos como el borohidruro de sodio (NaBH_4). Dado que los extractos vegetales contienen una amplia variedad de fitoquímicos, no existe un mecanismo único descrito para este proceso. La variabilidad en la composición y concentración de agentes reductores en los extractos vegetales influye en las dimensiones y morfologías de las nanopartículas obtenidas (9).

4. Técnicas de caracterización de nanopartículas

4.1 Espectroscopia UV-Visible

La espectroscopía UV-Vis se refiere a un tipo de espectroscopía de absorción de radiación electromagnética en la que la luz UV-visible es absorbida por moléculas, siendo los grupos cromóforos que contienen los electrones, responsables de la absorción de radiación ultravioleta y visible (10).

La espectroscopía UV-vis es una técnica esencial para detectar la resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas de metales como el oro. El espectrofotómetro emplea radiación electromagnética entre 190 y 800 nm, dividiéndose en ultravioleta, entre 190 a 400

nm, y visible, entre 400 a 800 nm (11), teniendo las AuNPs un pico de absorción entre los 528 y 544 nm (12).

4.2 Espectroscopía FT-IR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica con base en la tecnología espectroscópica infrarroja que radica en las vibraciones atómicas de los enlaces químicos de los grupos funcionales, los cuales absorben radiaciones infrarrojas a frecuencias y energías específicas, de esta manera, cada molécula presentará una lectura completamente distinta a otra.

El espectrómetro FT-IR utiliza esencialmente un interferómetro para medir la energía que se transmite a la muestra. La radiación infrarroja emitida por el cuerpo negro (fuente idealizada de radiación infrarroja de calibración y referencia) llega al interferómetro, donde ocurre la codificación espectral de las señales.

La señal resultante o interferograma se transmite a través de la muestra o rebota en su superficie, donde se absorben longitudes de onda de energía específicas. La región IR se divide comúnmente en tres áreas más pequeñas: IR cercano, de 10 a 400 cm^{-1} ; IR medio, de 400 a 4000 cm^{-1} e IR lejano, de 4000 a 14000 cm^{-1} . Finalmente, el haz pasa a través del detector y se envía a la computadora de procesamiento para la transformación de Fourier (13).

4.3 Dispersión de Luz Dinámica

El tamaño de las nanopartículas representa una de sus propiedades fundamentales; ya que determina aspectos fundamentales como su estabilidad, tendencia a la agregación y capacidad de interacción con el solvente y el entorno. La técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

determina el diámetro de nanopartículas en un medio fluido; basado en el movimiento browniano, que habla del resultado de las colisiones térmicas inducidas entre las partículas y las moléculas del disolvente. De esta manera, las partículas más grandes presentan movimientos más lentos, produciendo fluctuaciones suaves en la intensidad de luz dispersada, mientras que partículas más pequeñas generan cambios más rápidos y abruptos. Estas variaciones permiten calcular el coeficiente de difusión traslacional (D), que se convierte en radio hidrodinámico (R_h) mediante la ecuación de Stokes-Einstein (14):

$$D = \frac{kT}{(6\pi\eta R_h)}$$

Donde:

k = Constante de Boltzmann

T = Temperatura

η = Viscosidad del medio

El movimiento browniano que experimentan las partículas en suspensión genera cambios constantes en sus posiciones relativas, creando interferencias constructivas y destructivas en la intensidad de la luz dispersada que llega al detector. Estas fluctuaciones en la intensidad luminosa contienen información fundamental sobre la velocidad de desplazamiento de las partículas, específicamente sobre sus coeficientes de difusión traslacional. Partículas más pequeñas, al moverse más rápidamente, producen fluctuaciones más rápidas y de menor amplitud en la intensidad, mientras que partículas más grandes generan variaciones más lentas y prolongadas (14).

4.4 Microscopía electrónica de transmisión de barrido

La Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) es una técnica centrada en el escaneo secuencial de una sonda de electrones ultrafina sobre la materia. Mediante este proceso, los electrones interactúan con la muestra, dispersándose en distintas direcciones según la composición atómica de la zona analizada. Dichas señales, se registran de forma sincronizada con el barrido, permitiendo construir la imagen punto a punto. STEM emplea el detector de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF), este artefacto cuenta con la capacidad de capturar los electrones dispersados a ángulos elevados, generando una señal cuyo contraste es proporcional al cuadrado del número atómico (Z^2) de los elementos presentes. Este fenómeno, descrito como "contraste Z", permite distinguir diferentes elementos químicos en la muestra basándose únicamente en su peso atómico, sin requerir que el material tenga una estructura cristalina definida (15).

Los electrones dispersos en el STEM disponen de tres detectores diferentes para el registro de la imagen: el detector de campo brillante (BF) toma los electrones transmitidos en la trayectoria del haz cerca del eje óptico, además de contener la corriente total del haz; los detectores anulares de campo oscuro (ADF) con rango angular de aproximadamente 40 mrad (miliradianes) y HAADF, con rango angular más amplio, de 60 a 200 mrad, registran los electrones esparcidos fuera de la trayectoria del haz. (Figura 3) (15).

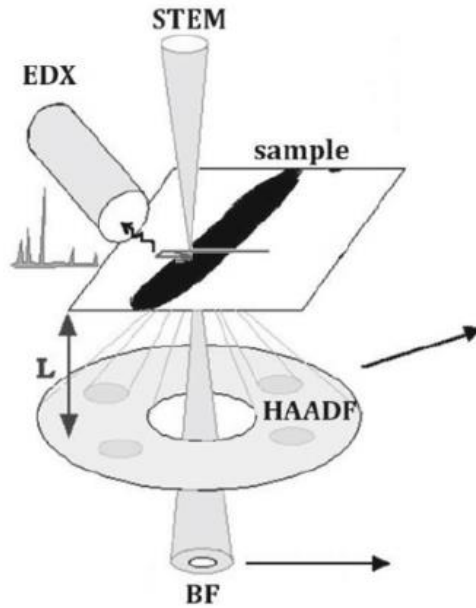


Figura 3. Configuración STEM que incluye el detector de espectro de espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

La optimización de la resolución de las imágenes se basa en el control de tres parámetros: el tamaño de la apertura del condensador, el tamaño del punto de enfoque y la longitud de cámara (L), que representa la distancia entre la muestra y el plano del detector. La densidad de corriente del haz en la muestra determina en gran medida la calidad de la imagen, puede incrementarse mediante una apertura mayor del condensador o reduciendo el tamaño del punto. Es importante destacar que existe una relación inversa entre el tamaño del punto y la corriente del haz: al aumentar el punto, se produce una desmagnificación de la fuente y una consecuente disminución en la corriente disponible. Los ajustes en las lentes del condensador CL1 y CL2 permiten modular adicionalmente estas características del haz. Un aspecto crucial para alcanzar la máxima resolución es el correcto alineamiento del sistema mediante el Ronchigrama, un patrón de sombra formado por una sonda de electrones estacionaria sobre un material amorfo, que se observa en el centro del patrón de difracción de haz convergente (CBED). Este patrón

sirve como referencia visual para centrar la apertura del condensador y verificar la calidad del haz. La efectividad de esta técnica de alineación varía según el tipo de fuente de electrones: mientras que en microscopios con cañón de emisión de campo (FEG) el Ronchigrama es fácilmente observable, en sistemas con filamentos de hexaboruro de lantano (LaB₆) resulta más difícil de obtener debido al mayor tamaño efectivo de la sonda, lo que limita tanto la resolución espacial como el brillo de la imagen incluso a voltajes superiores a 200 kV (15).

La integración de la espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) con el modo STEM permite realizar un análisis elemental directo y localizado en la muestra. Esta técnica detecta los rayos X propios de la interacción del haz de electrones con los átomos de la muestra durante el proceso de barrido, proporcionando información composicional en puntos específicos o a lo largo de líneas predefinidas. La verdadera potencia analítica emerge al correlacionar esta información elemental con las imágenes estructurales obtenidas mediante los detectores de campo brillante (BF) y el campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF). Esta combinación sinérgica permite generar mapas elementales con resolución atómica, donde la distribución espacial de los diferentes elementos químicos puede visualizarse directamente superpuesta sobre las características estructurales de la muestra, ofreciendo una caracterización completa de las nanopartículas en estudio (15).

5. *Olea europaea L. variedad Sevillana*

5.1 Generalidades

El olivo es un árbol perenne del Mediterráneo cultivado por su fruto drupáceo llamado también olivo o aceituna, fue introducida por los españoles desde el descubrimiento de América, donde su cosecha fue modificada a lo largo de los cinco siglos por las características propias de la

tierra y el clima peruano, haciendo que la aceituna tenga características y propiedades únicas (16), se siembra principalmente en el departamento de Tacna; y en menor medida, en Moquegua, Arequipa, Ica, Lima, Ancash y La Libertad (17). El periodo de floración tiene lugar durante la estación de invierno y primavera (agosto-octubre) con un clima frío moderado para inducir el reposo, seguido de la estación de verano y otoño con temperaturas suaves y días soleados para la maduración del olivo. Se divide en 2 etapas: la cosecha temprana, con las aceitunas verdes que se extrae el aceite de oliva, y la cosecha tardía, con las aceitunas más oscuras y maduras para el consumo diario (18).

5.2 Clasificación biológica

Los olivos son árboles de tamaño pequeño a mediano, según el método de propagación, si es a partir de semillas alcanzan una altura de 20 metros a más, mientras que los propagados vegetativamente son más bajos y arbustivos, alcanzando a una altura rondando los 5 metros. El olivo presenta un tronco acanalado con una corteza muy rugosa, de color gris a marrón oscuro. Las hojas son simples, opuestas, enteras, sin estípulas y pecioladas; la lámina es elíptica a lanceolada, coriácea (superficie dura y flexible) con nerviación pinnada, de color verde grisáceo oscuro. La inflorescencia es una panícula axilar de la hoja con un tamaño entre 3 a 8 cm de largo y numerosas flores, son polígamo-monoicas; pueden ser tanto bisexuales como solo masculinas, tienen dos estambres ubicados a ambos lados del ovario; los filamentos son cortos y las anteras grandes, mientras que el ovario está ubicado en una posición superior del cáliz; el estilo es corto y el estigma bilobulado. El olivo es polinizado por el viento permitiendo la fecundación y producción de los frutos. El fruto es una drupa globosa a elipsoide de color verde brillante tornando a púrpura oscuro al madurar, su tamaño oscila entre 1.5 – 3 cm, el mesocarpio del fruto es rico en aceite con un sabor amargo por la presencia de los antioxidantes

y el endocarpio tiene una consistencia pétreo o de piedra conteniendo a la semilla del olivo (19).

5.3 Clasificación taxonómica

La *variedad Sevillana* es una de las especies más relevantes del olivo (Tabla 1) debido a su cultivo y características propias del fruto, se encuentra generalmente en la región sur del Perú, siendo validada por el Herbarium Arequipense (HUSA) (Anexo 1), destacando por su alto contenido de compuestos fitoquímicos antioxidantes, además de su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, como lo es la zona costera de Ilo (20).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Olea europaea L. var. Sevillana*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Oleaceae
Género	Olea
Especie	Olea europaea
Subespecie	Olea europaea variedad Sevillana

Nota: Elaboración propia

5.4 Composición química

La composición química del olivo depende de varios factores, como la variedad, zona y estado de maduración. Los principales componentes de la pulpa del olivo son el agua (60-75 %) y los lípidos (10-25 %), en su mayoría triglicéridos como el ácido oleico y palmítico, también hay diglicéridos y ácidos grasos libres. Los siguientes compuestos nutricionales y bioactivos se presentan en menor porcentaje en el fruto, pero es en la hoja donde se presencia en mayor concentración:

- **Compuestos fitoquímicos:** Siendo los compuestos fenólicos los de mayor proporción en las hojas de olivo como la Oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol, seguido de los flavonoides como la apigenina, kaempferol, luteolina y crisoeriol; y ácidos fenólicos, entre ellos el ácido cafeico.
- **Carbohidratos:** Los carbohidratos solubles más abundantes en las hojas de olivo son el manitol, la fructosa y glucosa.
- **Aminoácidos:** Las hojas de olivo contienen todos los aminoácidos esenciales, a excepción de la metionina por su baja concentración y conversión inmediata en S-adenosilmetionina (SAM).
- **Minerales:** Presentan una fuente rica en minerales, siendo el calcio y el potasio los más destacados.
- **Fibra cruda:** Las hojas de olivo son una fuente de fibra dietética, incluyendo fibra insoluble (celulosa, lignina) y soluble (hemicelulosa) (21),(22).

5.4.1 Compuestos fitoquímicos antioxidantes

Los fitoquímicos son compuestos químicos o metabolitos secundarios sintetizados en diferentes tejidos y organelos celulares de las plantas, son directamente responsables de las características organolépticas y funciones de defensa como la actividad antioxidante. Son agrupadas según su estructura química y mecanismo de acción (23).

5.4.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y sensoriales de las plantas y frutos. Su estructura química está basada en un anillo aromático (bencénico) unido a uno o más grupos hidroxilo ($-OH$) como se observa en la Figura 4, cuyo propósito es secuestrar y neutralizar radicales libres, debido a la facilidad del átomo de hidrógeno para ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura química resultante que soporta un electrón desapareado (24).

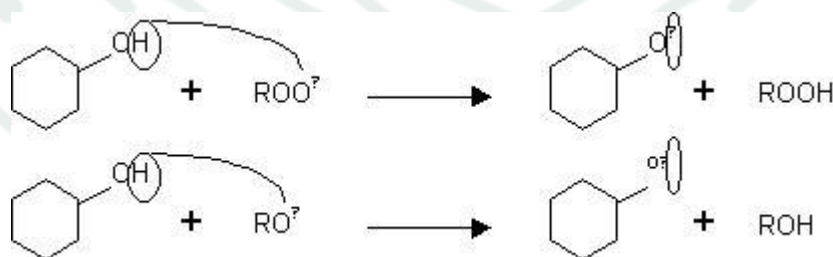


Figura 4. Estructura química de un compuesto fenólico

5.4.1.1.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan por contener un solo anillo aromático (bencénico) y ser derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico, ambos con un grupo carboxilo en el extremo de su estructura. Los ácidos hidroxibenzoicos se distinguen por compartir una estructura básica C_6-C_1 , como ocurre con el ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico y vanílico. En cambio, los ácidos hidroxicinámicos corresponden a compuestos aromáticos que presentan una cadena lateral de tres carbonos (C_6-C_3), entre los que se encuentran el ácido cafeico y el p-cumárico (Figura 5). Además, la presencia de un doble enlace carbono-carbono entre el anillo bencénico y el grupo carboxilo contribuye a potenciar las propiedades reductoras del grupo hidroxilo (OH) (25).

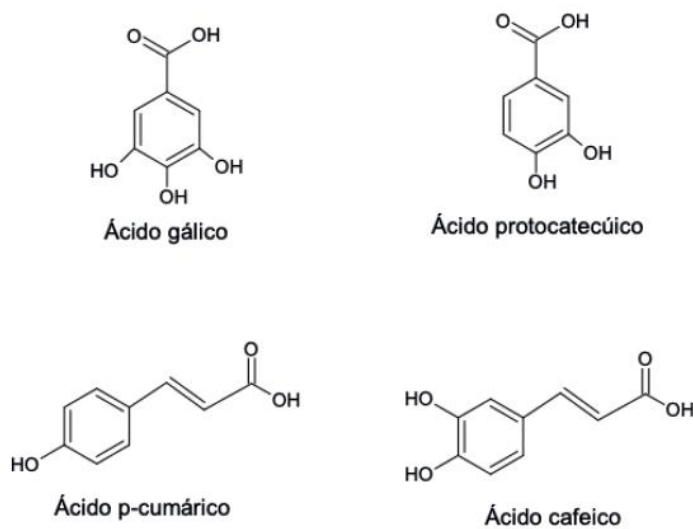


Figura 5. Ejemplos de ácidos fenólicos

5.4.1.1.2 Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se caracterizan por ser moléculas altamente reactivas, ya que en su estructura química poseen uno o más anillos bencénicos y varios grupos hidroxilo, además de ciertos grupos funcionales del tipo éster, los cuales influyen en su comportamiento químico y reactividad. Usualmente se encuentran ligadas con azúcares, también pueden unirse con ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos. Existen diferentes tipos de polifenoles, el cual depende de su complejidad química y puede agruparse en C_6 , $C_6 - C_n$, $C_6 - C_n - C_6$, donde $n = <3$. Existen diferentes tipos de polifenoles: flavonoides, cumarinas, taninos (hidrolizables y condensados), proantocianinas, entre otras (Figura 6); las cuales son las encargadas de brindar las propiedades sensoriales y antioxidantes a la planta (26).

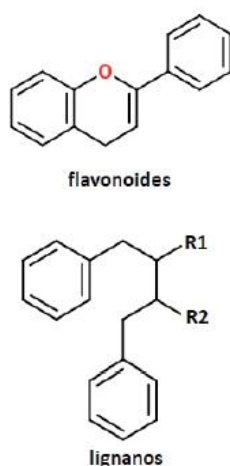


Figura 6. Ejemplos de polifenoles

5.4.1.2 Terpenos

Los terpenos son compuestos fitoquímicos derivados del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo que contiene cinco átomos de carbono, cuya clasificación se basa en la cantidad de unidades de isopreno en la estructura, siendo monoterpenos (2 unidades de isopreno), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno) y diterpenos (4 unidades de isopreno), entre las

principales. Los terpenos pueden constituir estructuras lineales, cíclicas o una combinación de ambas. Son compuestos heterocíclicos y pueden encontrarse en forma libre o como glicósidos. Los terpenos se encuentran en muchos aceites esenciales y en diferentes tejidos vegetales, su característica particular es la presencia de un sistema de dobles enlaces observada en la Figura 7, principal responsable de las propiedades pigmentarias y organolépticas (27).

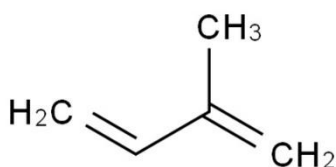


Figura 7. Isopreno, estructura básica de los terpenos

5.4.1.2.1 Iridoides

Los iridoides son compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los monoterpenos, presentando como base estructural al 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano, denominado como iridano. El iridano deriva del geranyl pirofosfato (GPP), precursor principal de los monoterpenos y sus ciclaciones, que, a través de reacciones de oxidación, reducción y glicosilación, se forman los iridoides. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides) o cerradas (iridoides), mostradas en la Figura 8 (28).

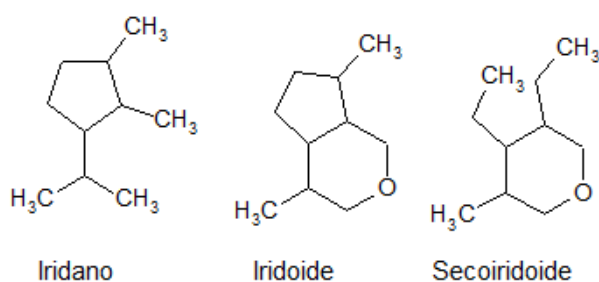


Figura 8. Estructura química de los iridoides y secoiridoides

5.4.2 Oleuropeína

La Oleuropeína es un glicósido secoiridoide llamado ácido elenólico y una molécula de glucosa, unido a un polifenol conocido como hidroxitirosol (4-(2-hidroxi-etil) benceno-1,2-diol) (Figura 9), estos grupos aumentan su polaridad y afinidad por los solventes polares, siendo un compuesto hidrofílico con un peso molecular total de 540.51 g/mol (Anexo 2) (29). Es uno de los componentes bioactivos más abundantes en la especie del olivo, cuya concentración de Oleuropeína varía en función de la variedad, producto oleícola, clima, estado de maduración del olivo y sistema de elaboración empleado.

Se le considera como el principal antioxidante presente tanto en el fruto como en las hojas del olivo, responsable de tener un amplio rango de actividades fisiológicas y farmacológicas como antiinflamatorio, antimicrobiano, neuroprotector y anticancerígeno (30).

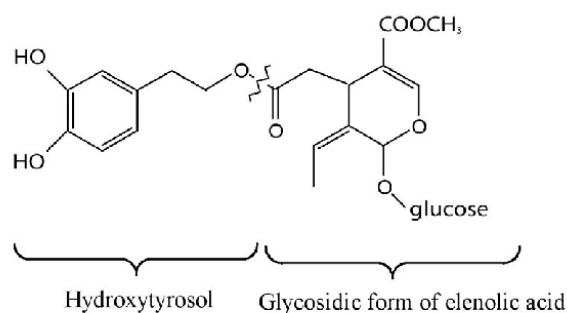


Figura 9. Estructura química de la Oleuropeína

5.4.2.1 Propiedades Físicoquímicas

La Oleuropeína es una molécula polar, Log P (logaritmo decimal del cociente de las concentraciones molares de la forma neutra en n-octanol y en agua) = 0.13; TPSA (Superficie polar topológica) = 201.67Å²; moderadamente soluble en agua (2.72 mg/mL) y un Log S

(ESOL, Solubilidad estimada) = -2.30, debido a sus múltiples grupos -OH (6 donadores y 13 aceptadores de H⁺). Su estructura flexible con 11 enlaces rotables y su anillo fenólico le confieren una alta capacidad reductora (31).

5.5 Usos Medicinales

El olivo y sus derivados contienen una elevada concentración de compuestos fenólicos, siendo los responsables de brindar efectos nutricionales, fisiológicos y farmacéuticos en la salud humana. Principalmente su actividad antioxidante, la cual protege a nuestro organismo contra el estrés oxidativo a través de la neutralización de los radicales libres, previniendo enfermedades crónicas como el cáncer y la diabetes. Otros usos medicinales es su actividad antiinflamatoria y antimicrobiana, que actúan contra un amplio espectro bacteriano

(principalmente GRAM+) y hongos. Además, mejoran la salud cardiovascular mediante la reducción de la presión arterial disminuyendo los niveles de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y ofrecen una protección contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, por su capacidad para reducir la inflamación y daño oxidativo en el cerebro (32).

6. Radicales Libres

Un radical libre se define como cualquier átomo o molécula que contenga al menos un electrón desapareado en sus orbitales, formados a partir de la adición o pérdida de un electrón, o por la ruptura homolítica de sus enlaces covalentes, causada generalmente por la energía de los rayos ultravioletas o radiación ionizante. Los radicales libres son generalmente inestables y altamente reactivos por el electrón desapareado, son electrófilos y atacan a los sitios de mayor densidad

electrónica como en los compuestos con átomos de nitrógeno (ácidos nucleicos, proteínas) y dobles enlaces carbono-carbono (fosfolípidos), con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y forman nuevos radicales en cadena.

Los radicales libres se dividen según su centro radicalario, es decir, el átomo donde se porta el electrón desapareado puede ser centrados en oxígeno, carbono, nitrógeno y azufre. Los más relacionados con la fisiología humana son los radicales centrados en oxígeno, denominados especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés), y los centrados en nitrógeno, denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS en inglés). Tanto las ROS y RNS se pueden clasificar en dos grupos de compuestos: radicales y no radicales (Tabla 2 y 3), cuya diferencia es que las especies no radicales no tienen electrones desapareados, pero son reactivas y pueden reaccionar o generar radicales de forma inmediata (33).

Tabla 2. Clasificación de las Especies reactivas de oxígeno

Especies reactivas de oxígeno (ROS)			
Especies Radicales		Especies No Radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Anión superóxido	O_2^-	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$OH\cdot$	Ozono	O_3
Radical peroxilo	$ROO\cdot$	Oxígeno singlete	1O_2
Radical peroxilo lipídico	$LOO\cdot$	Acido hipocloroso	$HOCl$

Nota: Elaboración propia

Tabla 3. Clasificación de las Especies reactivas de nitrógeno

Especies reactivas de nitrógeno (RNS)			
Especies Radicales		Especies No Radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Óxido nítrico	NO \cdot	Peroxinitrito	ONOO $^{-}$
Dióxido de nitrógeno	NO $_2$	Nitrosilo catión	NO $^{+}$
		Nitroxilo	HNO
		Cloruro de nitrilo	NO $_2$ Cl
		Dinitrógeno trióxido	N $_2$ O $_3$
		Ácido nitroso	HNO $_2$

Nota: Elaboración propia

Las ROS y RNS se generan principalmente en las mitocondrias, en menor proporción, en el retículo endoplásmico, núcleo, citoplasma, peroxisomas y lisosomas, a través del metabolismo celular normal. Se ha demostrado que las ROS tienen efectos tanto positivos como negativos según su concentración. En pequeñas cantidades, las ROS controlan y median procesos fisiológicos celulares críticos como la apoptosis y la defensa inmunológica. Sin embargo, existen factores endógenos como los trastornos metabólicos o factores exógenos tales como la contaminación atmosférica, radiación, el humo del cigarrillo, la dieta, metales pesados como el plomo y mercurio, xenobióticos, responsables de aumentar la producción de ROS y RNS, causando estrés oxidativo o nitrosativo respectivamente, es decir, una alteración en la señalización celular y desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes (REDOX) del organismo, provocando un daño celular y el desarrollo de enfermedades crónicas (34).

7. Capacidad Antioxidante

7.1 Definición

La capacidad antioxidante es la medida principal para evaluar el potencial de un agente reductor en inhibir los procesos de oxidación de una molécula a través de la donación de sus electrones o hidrógenos, así neutralizando los radicales libres (ROS y RNS) (35), causantes del estrés oxidativo y de diferentes enfermedades crónicas como la diabetes y Alzheimer, o enfermedades asociadas al envejecimiento de la piel, llegando a aparecer diferentes tipos de cáncer (36),(37),(38).

Los ensayos para determinar la capacidad antioxidante se clasifican según la interacción entre el antioxidante y radical libre (39).

7.1.1 Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón (SET)

Están basados en el potencial del antioxidante en reducir y neutralizar iones metálicos, grupos carbonilo y radicales libres, mediante la transferencia de un electrón, así convirtiendo al radical en su forma reducida, generando un cambio de absorbancia y color en la reacción final, que es directamente proporcional a la concentración del antioxidante, reflejando un proceso termodinámico o estequiométrico (40),(41).

- CUPRAC (*Capacidad de reducción antioxidante del cobre*)
- FRAP (*Poder de reducción antioxidante del hierro*)

7.1.2 Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Están basados en el movimiento concertado de un protón y un electrón en un solo paso cinético, donde el antioxidante transfiere un átomo de hidrogeno al radical libre, dejando de propagar la reacción en cadena de manera inmediata, mientras que el antioxidante se convierte en un radical, aunque la reacción conduzca a la formación de otro radical, dadas las características propias del antioxidante, este será menos reactivo que el radical libre inicial (42).

- HORAC (*Capacidad antioxidante del radical hidroxilo*)
- ORAC (*Capacidad de absorción del radical oxígeno*)
- TRAP (*Parámetro antioxidante de captura de radicales*)

7.1.3 Ensayos mixtos (HAT/SET)

Estos ensayos de modo mixto se basan generalmente en la eliminación de un cromóforo estable, donde ambos tipos de mecanismo se utilizan para obtener una visión más completa del comportamiento antioxidante, dependientes de las condiciones de reacción como el pH y solvente (42).

- ABTS (*Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)*)
- DPPH (*2,2-difenil-1-picril-hidrazilo*)

8. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

8.1 Ensayo DPPH

El DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazilo) es un radical libre aceptor de átomos de hidrógeno y electrones que presenta un color violeta intenso, es el método más utilizado para evaluar la capacidad antioxidante debido a su simpleza y rapidez, el mecanismo de reacción se basa en la reducción del radical libre DPPH en un solvente orgánico por su alta insolubilidad en agua, donde el antioxidante a través de una transferencia de un protón de hidrógeno neutraliza al DPPH, cambiando a un color amarillo tenue a una absorción entre 515 a 520 nm (Figura 10). Esta decoloración actúa como un indicador de la capacidad antioxidante. Para conseguir un resultado eficaz, se debe evitar la exposición del reactivo a la luz, debido a que la absorbancia del DPPH tiende a disminuir por ser altamente fotosensible (43).

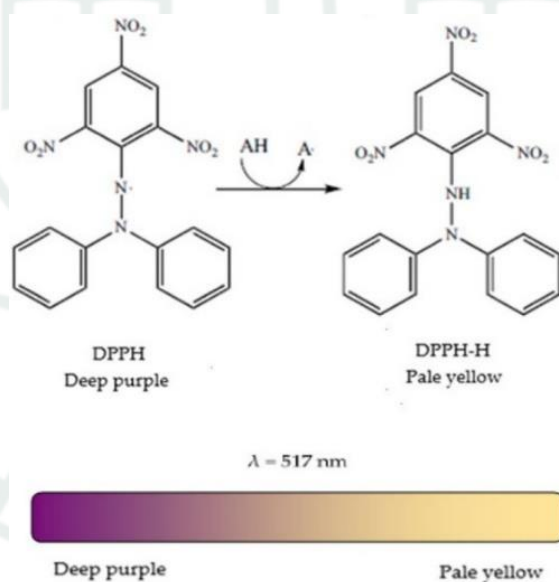


Figura 10. Mecanismo de reacción del DPPH frente a un antioxidante

8.2 Ensayo ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)) consiste en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS⁺, para sintetizar este radical catiónico de color verdeazulado, se produce una reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈), agente oxidante responsable de generar radicales sulfatos y extraer un electrón del ABTS para formar el radical. Para esta reacción, se necesita agitar entre 12 – 16 horas, siendo soluble tanto en solventes orgánicos como acuosos. En la presencia de un antioxidante, el ABTS⁺ se reduce y cambia de color a un azul pálido o incoloro. Este radical presenta tres picos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm después de 7 minutos de reacción con el antioxidante (Figura 11). Por lo que este ensayo permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrogeno y neutralizar al radical ABTS⁺ (44),(45).

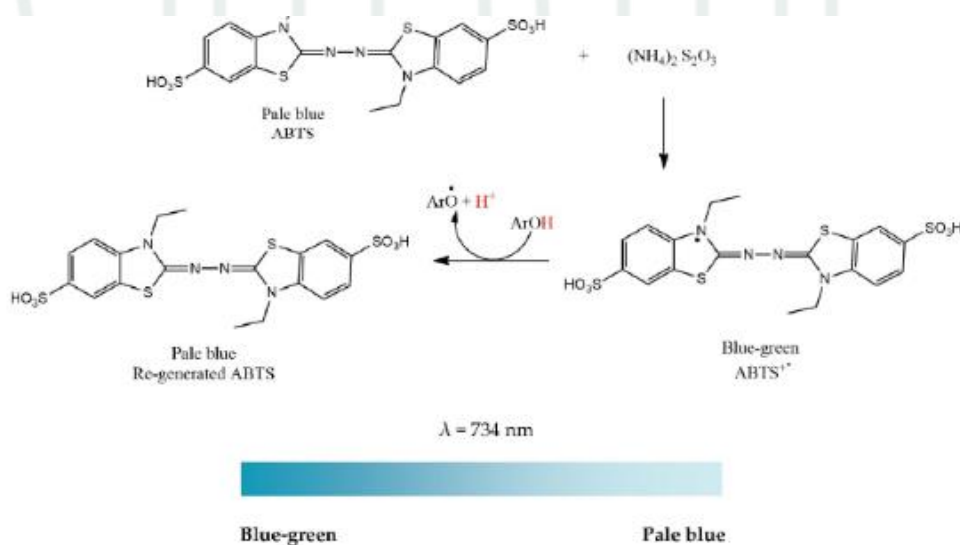


Figura 11. Mecanismo de síntesis y reacción del radical ABTS⁺ frente a un antioxidante

8.3 Ensayo CUPRAC

Este método es eficaz para analizar muestras tanto lipofílicas como hidrofílicas, debido a que utiliza una reacción entre el Cobre (Cu^{+2}) y la Neocuproína (Nc) formando el complejo Bis (Neocuproína)-Cobre (II), siendo un agente oxidante cromogénico de color azul claro. Al reaccionar con el antioxidante elegido, se forma un quelato coloreado de anaranjado-amarillo por la reducción del cobre, el cual es soluble en agua y solventes orgánicos. Esta relación se lleva a cabo en un pH 7, controlado por el buffer acetato de amonio, donde el quelato formado con el cobre reducido se puede medir a 450 nm después de 30 minutos de reacción (Figura 12), además es relativamente más estable frente a parámetros adversos como el aire, luz solar, tipo de solvente y pH extremos, en comparación a otros reactivos radicales cromogénicos (46).

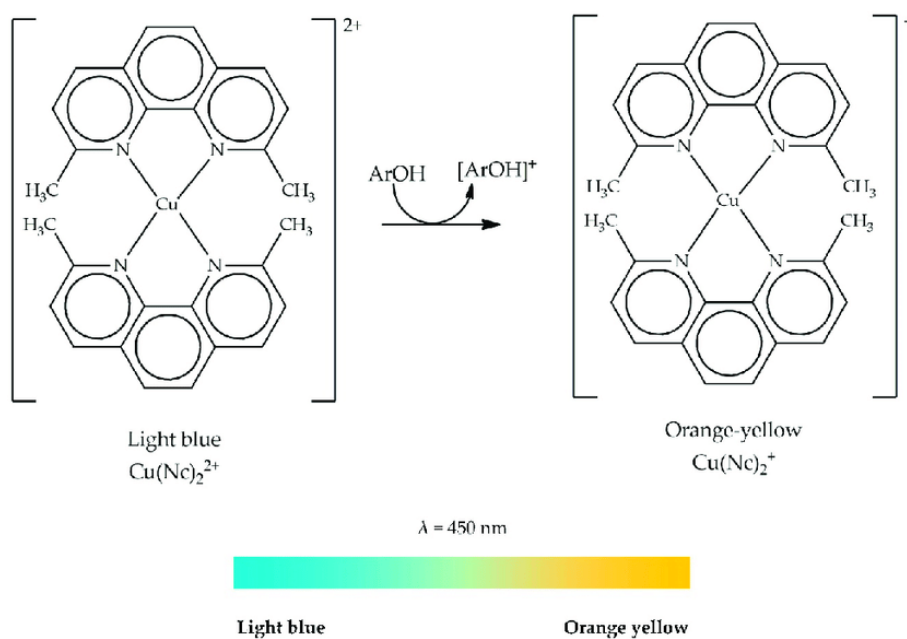


Figura 12. Mecanismo de reacción de CUPRAC frente a un antioxidante

9. Método para determinar polifenoles totales

9.1 Ensayo Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu (F-C) se utiliza para medir el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en muestras tales como alimentos y extractos vegetales. Su fundamento se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de F-C (una combinación de los ácidos fosfomolibdico (Mo^{+6}) y fosfotúngstico (W^{+6})), un potente agente oxidante de color amarillo, que, al ser reducido por los grupos fenólicos del antioxidante (ej. ácido gálico) a través de la transferencia de electrones y un pH básico, da lugar a un complejo de color azul intenso con una absorción máxima a 765 nm, cuya intensidad es el indicador idóneo para evaluar el contenido de polifenoles espectrofotométricamente. (Figura 13) (47),(48).

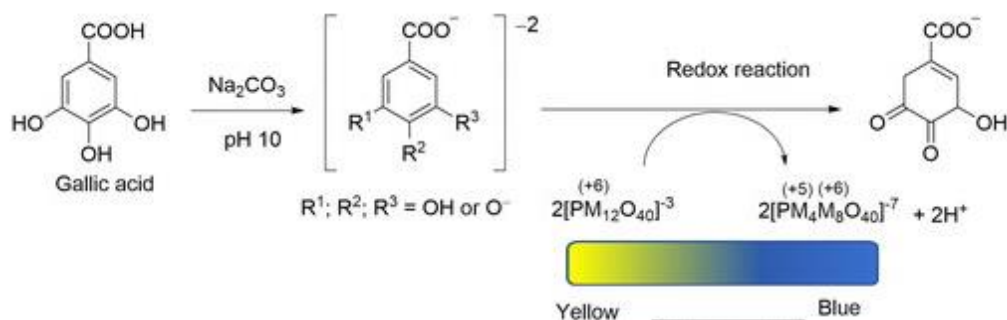


Figura 13. Mecanismo de reacción del reactivo F-C frente a un antioxidante

10. Método de extracción de la Oleuropeína

10.1 Fraccionamiento

Los métodos de extracción consisten en poner el material vegetal en contacto con un solvente adecuado, capaz de solubilizar, en la medida de lo posible, los compuestos o analitos de interés.

Una vez obtenido el extracto crudo (muestra vegetal previamente colectada, secada y molida)

es necesario separar los diferentes compuestos fitoquímicos presentes para el análisis del analito deseado, proceso conocido como fraccionamiento (49). Para ello pueden emplearse diversos procedimientos, como por partición sólido/líquido (S/L) con solventes de diferente polaridad, precipitación, variación de pH, cristalización, destilación, sublimación y las técnicas cromatográficas, permitiendo obtener distintas fracciones de la muestra para identificar los compuestos fitoquímicos presentes y evaluar sus propiedades (50).

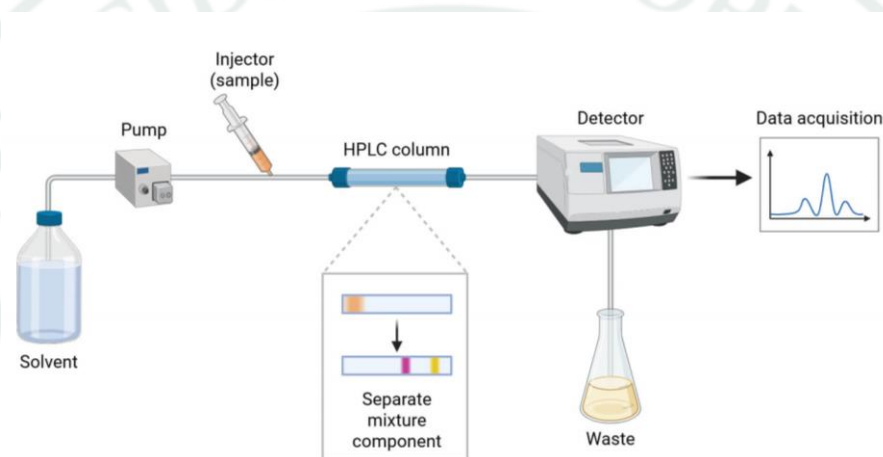
11. Técnicas de Cuantificación de la Oleuropéina

11.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “Chroma” (color) y “Graphein” (escribir), aludiendo a las bandas coloreadas obtenidas por la separación de los pigmentos vegetales, tal como fue publicado en 1906 por el científico ruso M. Tswett (51). La cromatografía es un método utilizado para la separación de los componentes de una muestra, existen diferentes técnicas cromatográficas según el criterio de los componentes, las cuales se encuentran la cromatografía en capa fina (CCF), la de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siendo el HPLC la técnica que puede utilizar diferentes principios de separación; como por partición (el más usado, basado en la polaridad relativa entre los componentes del equipo y analito), adsorción (por las interacciones físicas del analito), intercambio iónico (por la carga eléctrica) y tamaño molecular, según el tipo de columna cromatográfica (52). Para poder realizar una adecuada separación analítica y cuantificación de algún analito, el sistema del HPLC requiere de componentes clave: la columna cromatográfica, que contiene a la fase estacionaria específica para separar los compuestos individuales; la bomba, responsable de mantener la fase móvil en movimiento a través del sistema (de forma

isocrática o gradiente), donde un desgasificador elimina los gases disueltos de la fase móvil para no generar ruido en las lecturas, siendo identificado el analito y cuantificado a través del detector UV-Vis/DAD (arreglo de diodos) mediante su absorbancia generada y el área de pico (Figura 14) (53).

Figura 14. Componentes principales del HPLC



En el caso de la fase móvil, corresponde al líquido eluyente constituido por un solvente o una mezcla de solventes de alta pureza, que circula a través de la columna a velocidad constante y transporta la muestra hacia la fase estacionaria.

La fase estacionaria es el material fijo ubicado dentro de la columna, generalmente compuesta por un sólido poroso, con un tamaño de partícula menor a los 10 μm para optimizar el poder de separación, las fases estacionarias más usadas y versátiles son la de sílice y de microperlas de polímero. Los componentes que presentan mayor afinidad por la fase estacionaria quedan retenidos por más tiempo y, en consecuencia, eluyen lentamente de la columna, mientras que el componente con mayor afinidad a la fase móvil se retiene y eluye en menos tiempo. Además, la fase estacionaria necesita cumplir un requerimiento esencial, el cual es tener la estabilidad y resistencia a las altas presiones, debido a que las partículas más pequeñas tienen una mayor resistencia al flujo, por ende, se necesitan presiones más elevadas para crear el caudal de

eluyente deseado, Por esta razón, la carcasa de las columnas suele fabricarse en acero inoxidable, ya que es un material inerte y resistente a muy altas presiones. Para conseguir una mejor estabilidad química, reproducibilidad y selectividad en la separación, se utiliza la fase enlazada, que es la fase estacionaria unida de forma covalente a partículas de soporte o a las paredes internas de la columna para evitar su pérdida. La sílice es una fase estacionaria polar, que contiene en su superficie grupos silanoles (SiOH), sustancias reactivas frente a un organoclorosilano de la fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido enlazado covalentemente, entre los más usados es la cadena C8 (n-octilo) o C18 (n-octadecilo), convirtiendo a la sílice en una fase estacionaria apolar, lo cual es importante no utilizar eluyentes con pH básicos para evitar la hidrólisis de los grupos silanoles y degradar la columna cromatográfica (54).

En relación con la cromatografía por partición, se distinguen dos tipos de cromatografía: la cromatografía en fase normal y en fase inversa (o reversa), la diferencia recae en que la cromatografía en fase normal utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil relativamente apolar (hexano, tolueno o diclorometano), por lo que su fase inversa, utiliza una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar (agua, metanol o acetonitrilo). En la cromatografía en fase normal, los compuestos de menor polaridad eluyen en primer lugar, ya que presentan mayor solubilidad relativa en la fase móvil; además, el incremento de la polaridad de la fase móvil conlleva una reducción del tiempo de elución. En contraste, en la cromatografía en fase inversa, los analitos de mayor polaridad presentan menores tiempos de retención y eluyen primero. Por lo que la naturaleza y polaridad de los grupos funcionales de los analitos desempeñan un papel determinante en su interacción con la fase estacionaria y, en consecuencia, en el orden de elución de los compuestos.

Según el tipo de fase estacionaria empleada pueden presentar diferentes características como la longitud, diámetro interno y material del relleno, lo que una adecuada selección de la

columna y fase móvil resulta esencial para lograr una separación eficiente de los componentes de la muestra de interés, siendo detectado y cuantificado sin interferentes o sobreposiciones en las lecturas (55).

12. Contexto y problemática de la producción agrícola en Moquegua

El departamento de Moquegua presenta una estructura agrícola reducida, constituyéndose como la más pequeña de todo el Perú, tanto en valores absolutos como en su aporte al valor agregado regional. Esta limitación se basa en su escaso territorio agrícola efectivo, debido a que aproximadamente de las 27000 hectáreas con condiciones climatográficas óptimas, solo 15600 se encuentran bajo cultivo. De esta manera, el perfil productivo se orienta principalmente al autoconsumo, con excepción de los cultivos de uva y olivo que poseen valor comercial. Según datos del 2020, alrededor del 72% de la producción agrícola de la región se basó en el olivo (56), esto se refleja en la dinámica del Valor Bruto de la Producción (VBP) agropecuaria, un indicador económico que suma el valor de bienes y servicios producidos por un sector productivo. En el periodo enero-diciembre de 2023 a 2024, el VBP para Moquegua mostró un leve crecimiento del 1.9%, pasando de 153.18 a 156.06 millones de soles (57). Sin embargo, este incremento marginal no debe interpretarse como un signo positivo, debido a que muestra la vulnerabilidad de un sector que depende de las condiciones climáticas estables. La evidencia más reciente de esta fragilidad se observa en el desempeño del segundo trimestre del 2025, donde el sector agropecuario de Moquegua registró una contracción del 5.3% (IPE, 2025). El problema radica en la cadena productiva del olivo como la alternancia bienal, la variabilidad climática generando un ambiente poco favorable para el inicio de la floración del olivo, también los recientes incendios y desbordes del río Osmore en las chacras afectando su producción. A pesar de las dificultades, el olivo ileño y productos como el aceite de oliva

presentan efectos muy beneficiosos para la salud humana y características organolépticas únicas, con una buena calidad certificada internacionalmente, sin embargo, no se aprovecha los otros órganos vegetativos de la planta como lo son las hojas, un futuro agregado potencial para la investigación científica (18),(20),(58).





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

La ejecución de la tesis se realizó en el laboratorio de investigación Proyecto Mercurio (LIPROM) ubicado en el pabellón H-202 de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa.

2. Materiales

2.1 Material vegetal

- Hojas de olivo (*Olea europaea* variedad *Sevillana*)

2.2 Reactivos químicos

- Etanol al 96%
- Etanol absoluto
- Metanol
- Alcohol isopropílico
- Acetonitrilo (grado HPLC)
- Oleuropeína (grado HPLC)
- Ácido Acético P.A.
- Ácido Nítrico P.A.
- Ácido Clorhídrico P.A.
- Ácido Tetracloroáurico (III) trihidratado (Sigma Aldrich)
- Citrato de Sodio P.A.
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) P.A.
- ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) P.A.
- Persulfato de Potasio P.A.
- Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilo-3,4-dihidrocromeno-2-carboxílico) P.A.
- Acetato de Amonio P.A.

- Neocuproína P.A.
- Cloruro de Cobre (II) dihidratado P.A.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu P.A.
- Ácido Gálico P.A.
- Carbonato de Sodio P.A.
- Agua Destilada y Ultrapura

2.3 Materiales de laboratorio

- Fiolas de vidrio transparente y ámbar de 5, 10, 25, 50 y 100 mL
- Celda de cuarzo de 4 mL
- Celda de poliestireno de 4 mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 200 mL
- Pipetas de 1 y 5 mL
- Micropipeta de 10, 200 y 1000 μL
- Puntas para micropipeta (blancas, amarillas y azules)
- Tubos cónicos falcón de 15 y 50 mL
- Embudos de vidrio
- Frascos de vidrio
- Papel filtro Whatman N° 40, 150 mm
- Viales de muestreador automático de HPLC de 2 mL
- Jeringas estériles de 5 mL
- Filtros de Jeringa ANOTOP N° 10, 0.22 μm
- Papel Kraft
- Barras de agitación magnética
- Tiras reactivas de pH
- Gradillas

- Espátulas

2.4 Aparatos y equipos

- Balanza Analítica SARTORIUS
- Estufa MEMMERT UM 100
- Molino 500A
- Espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis
- HPLC Hitachi Primaide
- Espectrómetro Cary 630 FT-IR
- Sonicador MRC DC-200H
- Ultrasonicador Vibra-Cell
- Zetasizer Nano ZS90
- Agitador Vórtex VWR
- Centrifugadora Rotofix 3 A
- pHmetro (Medidor de pH) Metrohm 827
- Microscopio electrónico Talos F200i TEM

2.5 Software

- Essential FT-IR
- SpectraGryph
- Graphpad Prism
- Malvern-Zetasizer versión 2.2
- ImageJ
- Microsoft Excel 2019

3. Metodología

3.1 Obtención de las muestras

Las muestras de las hojas de olivo se clasificaron según su origen de extracción, las zonas fueron “La Huerta” (LH) (Latitud: 17°37'45”S, Longitud: 71°17'15”O) y “Yaral” (Y) ((Latitud: 17°37'22”S, Longitud: 71°16'06”O) ambas locaciones ubicadas en la provincia de Ilo, Moquegua. Fueron recolectadas en 2 distintos periodos: el primero fue en la primera semana de noviembre del 2024 para garantizar las mismas condiciones después de la última cosecha del año, y el segundo fue en la última semana de marzo del 2025 siendo la primera cosecha del año (Anexo 3). Las hojas elegidas se lavaron con agua ultrapura, se les retiró los peciolo y se almacenaron en pliegos de papel Kraft, para luego ser llevadas a una estufa y estabilizarse a una temperatura de 40°C durante 7 días. Al culminar el periodo de tiempo, las hojas secas fueron trituradas en una molienda hasta obtener un polvo, lo más fino posible (Anexo 4 y 5) (53).

3.2 Obtención del extracto vegetal

El extracto de las hojas del olivo se realizó a través de una maceración asistida por sonicación, a una concentración 1:10 m/v en 2 solventes diferentes (metanol y etanol absoluto), por lo que se pesó 1 g del polvo obtenido de la trituración de las hojas y se colocó en un tubo cónico Falcón de 15 mL para cada extracción. A cada tubo se le añadió 10 mL del solvente elegido, dividido en 3 rondas (4 mL, 3mL y 3 mL), cada ronda fue sometida a sonicación durante 15 minutos y posteriormente a centrifugación a 4000 rpm (revoluciones por minuto) por 15 minutos. Una vez terminado cada ronda del proceso de extracción, se recolectó el sobrenadante

de cada tubo y se vertió en una fiola de 10 mL, enrasándolo con los solventes respectivos (59).

4. Determinación del contenido de polifenoles totales

4.1 Preparación de solución Folin-Ciocalteu al 10 %

Para preparar la solución de Folin-Ciocalteu al 10 % y comparar cual solvente del extracto de hojas presentó mayor contenido de polifenoles, se tomó 10 mL de solución de Folin-Ciocalteu 2 M y enrasó con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.

4.2 Preparación de solución Carbonato de Sodio al 10 %

Para preparar la solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 10 %, se pesó 20 g de Na_2CO_3 para ser llevado a una estufa a 105 °C por 1 hora, después fue llevado a un desecador por 1 hora para que se establezca a temperatura ambiente. Finalmente, se pesó 10 g de Carbonato de sodio desecado y se mezcló con agua ultrapura en una fiola de 100 mL hasta enrasarlo.

4.3 Preparación de solución stock de Ácido Gálico

Para preparar la solución stock de Ácido Gálico, se pesó 0.10 g de Ácido Gálico y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 100 mL, obteniendo una solución stock de Ácido Gálico a 1000 mg/L (ppm).

4.4 Preparación de la curva de calibración

Para la curva de calibración, se utilizó la solución stock de Ácido Gálico y se preparó 5 patrones

de diferentes concentraciones en fioles de 10 mL (entre un rango de 100 a 500 μM) como se muestra en la Tabla 4 y siendo enrasados con agua ultrapura.

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración Polifenoles Totales

Estándar	Concentración (μM)	Volumen de solución madre de Ácido Gálico (mL)
1	100	0.5
2	200	1
3	300	1.5
4	400	2
5	500	2.5

Nota: Elaboración propia

De esta manera, se tomó 0.5 mL de cada estándar preparado y se adicionó 2 mL de la solución de Folin-Ciocalteu al 10% a una fiola de 5 mL y se agitó suavemente el contenido, dejándolo reposar 5 minutos; pasado ese tiempo, se agregaron 2 mL Carbonato de Sodio al 10% y se homogenizó, en el caso del blanco se realizó bajo las mismas condiciones reemplazando los estándares por cada solvente. Pasado los 60 minutos de reposar en oscuridad, se hizo las lecturas por triplicado en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (60).

4.5 Contenido de polifenoles totales de las muestras.

Los extractos vegetales obtenidos fueron diluidos a una concentración 1/1000 v/v, tomando 0.5 mL de cada uno y se adicionó 2 mL de la solución de Folin-Ciocalteu al 10% a una fiola de 5 mL y se agitó suavemente el contenido, dejándolo reposar 5 minutos; pasado ese tiempo, se

agregaron 2 mL Carbonato de Sodio al 10% y se homogenizó, por otro lado, en el caso del blanco se realizó las mismas condiciones reemplazando los estándares por cada solvente. Pasado los 60 minutos de reposar en oscuridad, se hizo las lecturas por triplicado en el espectrofotómetro a 765 nm (60).

5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

5.1 Preparación del radical DPPH

Para preparar la solución de DPPH 0.1 mM y comparar cual solvente del extracto de hojas presentó mayor capacidad antioxidante, se pesó 0.0039 g de DPPH disolviéndolo con los solventes en fioles de 100 mL hasta enrasar, luego se los llevó a sonicar por 5 minutos y se envolvió con papel aluminio para evitar la fotooxidación, la solución de DPPH se refrigeró a 4° C en la nevera hasta ser requerido.

5.2 Preparación de la solución stock de Trolox

Se pesó 0.0025 g de Trolox (un antioxidante análogo de la vitamina E) y se enrasó con los solventes en fioles de 10 mL, obteniendo la solución madre de Trolox a una concentración de 1 mM.

5.3 Preparación de la curva de calibración

Para la curva de calibración, se utilizó la solución stock de Trolox y se preparó 5 patrones de diferentes concentraciones en fioles de 5 mL (entre un rango de 100 a 500 μ M) como se muestra

en la Tabla 5 y siendo enrasados con los solventes de metanol y etanol absoluto.

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración de DPPH

Estándar	Concentración (μM)	Volumen de Solución de Trolox (mL)
1	100	0.5
2	200	1
3	300	1.5
4	400	2
5	500	2.5

Nota: Elaboración propia

Se tomó 0.2 mL de cada estándar Trolox preparado y se adicionó 3.8 mL de la solución de DPPH a una fiola de 5 mL, enrasándolo con el solvente para homogenizarlo, en el caso del blanco se realizó bajo las mismas condiciones, solo reemplazando el volumen ocupado de los estándares por cada solvente. Pasado los 30 minutos de reposar en oscuridad y los reactivos reaccionen hasta alcanzar un punto estable, se hizo las lecturas de sus absorbancias por triplicado en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

5.4 Capacidad antioxidante de las muestras por el método DPPH

Los extractos vegetales obtenidos fueron diluidos a una concentración 1:1500 v/v, tomando 0.2 mL de cada uno, más los 3.8 mL de la solución de DPPH, enrasándolo con el solvente para homogenizarlo. Luego de los 30 minutos, se hizo las lecturas de sus absorbancias por triplicado en el espectrofotómetro a 515 nm y se hicieron los respectivos cálculos para determinar su capacidad antioxidante (61).

6. Determinación de la capacidad antioxidante por método ABTS

6.1 Preparación de la solución de ABTS

Para preparar la solución de ABTS, se pesó 0.0360 g del reactivo ABTS, enrasándolo con agua ultrapura en una fiola de 10 mL obteniendo una concentración de 7 mM, luego se llevó a sonicar por 5 minutos. Si la fiola no es ámbar, se debe envolver con papel aluminio para evitar la fotooxidación.

6.2 Preparación de la solución de persulfato de potasio

Para preparar la solución de persulfato de potasio, encargado de convertir en radical catiónico al ABTS, se pesó 0.0066 g y mezcló con agua ultrapura en una fiola de 10 mL obteniendo una concentración de 2.45 mM. Por lo que al mezclarlo con la solución de ABTS durante 12 - 16 horas bajo oscuridad y a temperatura ambiente, se obtuvo la solución de ABTS⁺, de esta mezcla se tomó 1 mL y fue enrasada con el solvente en una fiola de 25 mL.

6.3 Preparación de la curva de calibración

Para la curva de calibración se utilizó la solución stock de Trolox 1 mM y se preparó 5 patrones de diferentes concentraciones (de 100 a 500 μ M) en fiolas de 5 mL y enrasados con los solventes a comparar.

De cada estándar de Trolox preparado se tomó 0.2 mL, agregando 3.8 mL de la solución ABTS⁺ a una fiola de 5 mL, enrasándolo con el solvente para homogenizarlo, en el caso del blanco se realizó bajo las mismas condiciones, solo reemplazando el volumen ocupado de los

estándares por cada solvente. Cada patrón se dejó reposando por 7 minutos y se realizó la lectura de su absorbancia por triplicado en el espectrofotómetro a una longitud de 732 nm.

6.4 Capacidad antioxidante de las muestras por el método ABTS

Los extractos vegetales obtenidos fueron diluidos a una concentración 1:1500 v/v, tomando 0.2 mL de cada uno, más los 3.8 mL de la solución de ABTS+, enrasándolo con el solvente para homogenizarlo en una fiola de 5 mL, en el caso del blanco se realizó con las mismas condiciones, solo reemplazando el volumen ocupado de los estándares por el solvente. Pasado los 7 minutos, se hizo las lecturas de sus absorbancias por triplicado en el espectrofotómetro a 732 nm y se hicieron los respectivos cálculos para determinar su capacidad antioxidante (62).

7. Determinación de la capacidad antioxidante por el método CUPRAC

7.1 Preparación de solución Cloruro de Cobre (II) 0.02 M

Para preparar la solución de Cloruro de Cobre (II) (CuCl_2) 0.02 M, se pesó 0.17 g y enrasó con agua ultrapura en una fiola de 50 mL.

7.2 Preparación de solución buffer de Acetato de Amonio (pH 7)

Para preparar la solución buffer de Acetato de Amonio (pH 7), se pesó 7.70 g de Acetato de Amonio y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.

7.3 Preparación de solución Neocuproína 7.5×10^{-3} M

Para preparar la solución de Neocuproína, se pesó 0.156 g de Neocuproína y se enrasó con etanol en una fiola de 100 mL.

7.4 Preparación de solución stock de Trolox 1 mM

Para preparar la solución stock de Trolox 1 mM, se pesó 0.0025 g de Trolox y se enrasó respectivamente con el solvente a elegir en una fiola de 10 mL cada una, obteniendo dos soluciones stock de Trolox.

7.5 Preparación de curva de calibración

Para la curva de calibración, se utilizó la solución stock de Trolox y se preparó 5 patrones de diferentes concentraciones en fiolas de 10 mL (entre un rango de 100 a 500 μ M) como muestra la Tabla 6, enrasados con los solventes a comparar.

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración de CUPRAC

Estándar	Concentración (μ M)	Volumen de solución madre de Trolox (mL)
1	100	0.5
2	200	1
3	300	1.5
4	400	2
5	500	2.5

Nota: Elaboración propia

Se tomó 0.5 mL de cada estándar preparado y se adicionó 1 mL de la solución CuCl_2 0.02 M, 1 mL de solución buffer de Acetato de Amonio (pH 7) y 1 mL de solución Neocuproína 7.5×10^{-3} M a una fiola de 5 mL, se enrasó y agitó suavemente el contenido, dejándolo reposar 30 minutos en oscuridad; por otro lado, en el caso del blanco se realizó bajo las mismas condiciones reemplazando los estándares por cada solvente. Pasado el tiempo de reacción, se hizo las lecturas por triplicado en el espectrofotómetro a 450 nm.

7.6 Capacidad antioxidante de las muestras por método CUPRAC

Los extractos vegetales obtenidos fueron diluidos a una concentración 1/3000 v/v, tomando 0.5 mL de cada uno en una fiola de 5 mL, adicionando 1 mL de la solución CuCl_2 0.02M, 1 mL de solución buffer de Acetato de Amonio y 1 mL de solución Neocuproína 7.5×10^{-3} M, se enrasó con el solvente y agitó suavemente el contenido, dejándolo reposar 30 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo, se hizo las lecturas por triplicado en el espectrofotómetro a 450 nm (63).

8. FT-IR

Para la identificación de los grupos funcionales en las hojas de olivo se empleó el espectrómetro Cary 630 FT-IR, operado por el software de análisis MicroLab. Las muestras secas trituradas que se usaron para realizar los extractos vegetales fueron usadas para las lecturas en este equipo. Los espectros fueron registrados en el rango de 4000 a 650 cm^{-1} en resolución de 4 cm^{-1} y registrados mediante 32 barridos acumulativos, durante cada lectura se limpió la cabina de muestra con alcohol isopropílico (64).

8.1 Análisis de Datos

La identificación de los picos de absorción característicos de los grupos funcionales se realizó mediante la comparación de las frecuencias obtenidas con la base de datos espectral NIST Chemistry. Para el adecuado procesamiento de los datos, se empleó el software del equipo Essential FT-IR, el cual permitió la corrección de la línea base, la normalización de los espectros y la comparación de las lecturas correspondientes a ambas muestras.

9. Cuantificación del contenido de Oleuropeína en extracto vegetal por HPLC

9.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un sistema HPLC-DAD para identificar y cuantificar la Oleuropeína del extracto alcohólico con mayor capacidad antioxidante. La fase estacionaria usada fue una columna analítica reversa Hypersil ODS-C18 (con partículas de 0.5 μm , 100 \times 4.6 mm de diámetro interior) a una temperatura constante de 30 $^{\circ}\text{C}$. La fase móvil utilizada fue: Acetonitrilo:Agua (20:80 v/v, previamente tratada en un sistema de filtración al vacío) acidificada con ácido acético al 0.1% a un caudal isocrático de 1.2 mL/min y un volumen de inyección en forma automática de 20 μL . La Oleuropeína fue identificada mediante la comparación de su tiempo de retención con su estándar correspondiente, utilizando una longitud de onda de detección de 230 nm y un tiempo total de corrida de 20 minutos. (65),(66).

9.2 Estandarización de parámetros para la cuantificación de Oleuropeína

9.2.1 Linealidad

Permite determinar la proporcionalidad entre la concentración del analito (Oleuropeína) y su respuesta demostrando la capacidad del método de obtener resultados linealmente proporcionales a su concentración.

9.2.1.1 Preparación de la solución stock de Oleuropeína

Se pesó 2 mg del reactivo estándar Oleuropeína, enrasándolo con acetonitrilo en una fiola de 2 mL obteniendo una concentración de 1000 ppm, luego se extrajo 0.5 mL a una fiola de 5 mL para enrasarlo con acetonitrilo y se obtuvo una concentración de 100 ppm (Anexo 6). Si la fiola no es ámbar, se debe envolver con papel aluminio para evitar la fotooxidación y refrigerarla si no es usada.

9.2.1.2 Preparación de la curva de calibración

De la solución 100 ppm de Oleuropeína se preparó 6 patrones de diferentes concentraciones en fiolas de 2 mL, enrasados con la fase móvil de Acetonitrilo:Agua (20:80) (Tabla 7). Para poder ser leídos en el equipo de HPLC, a los patrones se les extrajo una alícuota y fueron filtrados, a través de una jeringa unida a un filtro Anotop 0.22 μm , hacia un vial de HPLC de 2 mL (Anexo 7), bajo las mismas condiciones se preparó el blanco con la fase móvil.

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de Oleuropeína en HPLC

Estándar	Concentración (ppm)	Volumen de Solución de Oleuropeína (mL)
1	2	0.2
2	4	0.4
3	6	0.8
4	8	1
5	10	1.2
6	12	1.4

Nota: Elaboración propia

Cada lectura fue realizada por triplicado y con las condiciones cromatográficas elegidas a un tiempo de corrida de 10 minutos, tras el preacondicionamiento de la columna (caudal y temperatura) durante 15 min. Al conseguir las lecturas se realizó la curva de calibración entre la concentración del analito y área de pico, obteniendo la ecuación de regresión lineal:

$$y = m * x + b$$

Donde:

y = Respuesta/Señal del método

m = Pendiente

x = Concentración del analito

b = Intercepto

El coeficiente de determinación (R^2) es un parámetro estadístico obtenido de la curva de calibración para determinar la fuerza de la relación lineal entre la variable dependiente e

independiente, cuyo valor máximo es 1, por lo que si el coeficiente se acerca a la unidad (≥ 0.999 lo ideal), presenta un excelente ajuste lineal del modelo (67).

9.2.2 Precisión

Es un parámetro que indica la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados cuando son repetidas bajo las mismas o diferentes condiciones de experimentación, respectivamente.

9.2.2.1 Repetibilidad

Se fundamenta en la evaluación de la precisión del método bajo condiciones idénticas de análisis, empleando la misma muestra y analizada por un único analista en el mismo laboratorio, utilizando los mismos equipos y reactivos dentro de un intervalo de tiempo reducido. Para obtener una buena precisión, según la guía analítica ICH Q2(R2) y AOAC, el coeficiente de variación (CV o RSD en inglés) debe ser menor al 2% generalmente, obtenido a través de la siguiente fórmula (67),(68):

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

σ = Desviación estándar de las muestras

\bar{x} = Promedio de las lecturas de muestras

9.2.2.2 Precisión intermedia

Se utilizó para determinar la variabilidad del método en diferentes condiciones, se siguió el mismo procedimiento de la curva de calibración y condiciones cromatográficas, pero analizado por otro analista en un diferente día. Para obtener una buena precisión, según la guía analítica ICH Q2(R2), el coeficiente de variación también debe ser menor al 2% (68).

9.2.3 Sensibilidad

La sensibilidad es un parámetro evaluado por la pendiente de la curva de calibración para poder determinar la capacidad del método en detectar y cuantificar la mínima concentración del analito en la muestra. Se utilizó estos 2 indicadores:

9.2.3.1 LOD (Límite de Detección)

Según la ICH Q2(R2), se utilizó la siguiente fórmula para determinar el límite de detección de la Oleuropeína:

$$LOD = \frac{3.3 * \sigma}{S}$$

Donde:

σ = Error estándar del intercepto

S = Pendiente de la curva de calibración

9.2.3.2 LOQ (Límite de Cuantificación)

Según la ICH Q2(R2), se utilizó la siguiente fórmula para determinar el límite de cuantificación de la Oleuropeína (68):

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{S}$$

9.2.4 Exactitud

Es un parámetro para determinar la proximidad entre un valor verdadero (nominal, teórico o de referencia) y un valor experimental, comprobando la veracidad del método expresado en porcentaje de recuperación (%), un 100% es la eficacia ideal en el rescate del analito en la matriz de la muestra, el cual se determinó mediante la siguiente formula (67):

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(M.E.) - (M)}{(St)} * 100$$

Donde:

M = Área/Concentración de la Muestra

St = Área/Concentración del Estándar

M.E. = Área/Concentración de la Muestra enriquecida

9.2.4.1 Preparación de las soluciones

Para poder desarrollar el parámetro al extracto de hojas de olivo, se preparó 3 soluciones: la

solución estándar de Oleuropeína con una alícuota de 200 μL , la muestra del extracto metanólico que presentó mayor capacidad antioxidante al 0.1% m/v y la misma muestra enriquecida con 200 μL de la solución estándar de Oleuropeína; enrasadas con la fase móvil (Acetonitrilo:Agua) en fiolas de 2 mL, bajo las mismas condiciones se preparó el blanco solo con la fase móvil. Cada lectura fue realizada por triplicado y con las condiciones cromatográficas elegidas tras el preacondicionamiento de la columna (66),(69).

9.3 Cuantificación de Oleuropeína en las muestras

Del extracto 1:10 con mayor capacidad antioxidante, se preparó una dilución de 1:3000 v/v, con la fase móvil Acetonitrilo:Agua (20:80) en fiolas de 5 mL, a las muestras se le extrajo una alícuota y fueron filtrados, a través de una jeringa unida a un filtro Anotop 0.22 μm , hacia un vial de HPLC de 2 mL, bajo las mismas condiciones se preparó el blanco solo con la fase móvil. Cada lectura fue realizada por triplicado y con las condiciones cromatográficas elegidas a un tiempo de corrida de 16 minutos por muestra, tras el preacondicionamiento de la columna.

Al obtener las lecturas de los picos de las muestras con sus respectivas áreas, se calculó sus concentraciones (en ppm) con la ecuación de regresión lineal de los patrones de la solución stock de Oleuropeína (66),(69).

10. Síntesis biológica de nanopartículas de Oro

Para la síntesis de nanopartículas se inició con la limpieza de todo el material de vidrio y las barras magnéticas usadas en los ensayos, empleando agua regia ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$) a una proporción 1:3 y enjuagándolo tres veces con agua ultrapura, esperando a que se seque a temperatura ambiente. Todo el procedimiento de la síntesis biológica de las AuNPs se realizó siendo

protegido de la luz para minimizar la fotooxidación.

10.1 Preparación de solución stock HAuCl_4 0.001 M

Para preparar la solución stock de Ácido Tetracloroáurico (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.001 M, se pesó 0.020 g y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 50 mL.

10.2 Preparación de solución de Citrato de Sodio 38.8 mM

Para preparar la solución de Citrato de Sodio 38.8 mM, se pesó 0.1 g de Citrato de Sodio y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 10 mL.

10.3 Procedimiento para la síntesis biológica de AuNPs

Se prepararon dos vasos de precipitado de 50 mL con una barra de agitación magnética en cada una, estos vasos fueron trasladados a una habitación oscura, colocándolos sobre agitadores magnéticos programados a 250 rpm. De esta manera, se usó una pipeta volumétrica de vidrio y se agregaron 10 mL de la solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.001 M, pasado un minuto, se adicionó 2 mL de la solución de Citrato de Sodio 38.8 mM, dejándolo estabilizar por otro minuto. Finalmente, se añadió 1 y 5 mL del extracto alcohólico a los vasos de precipitado, dejándolos en agitación constante por una hora y media, obteniendo dos soluciones coloidales de AuNPs en diferentes concentraciones, 1:0.1 mL (v/v) y 1:0.5 mL (v/v), respectivamente (Anexo 8). Por otro lado, se realizó un monitoreo constante al pH a lo largo de la reacción, debido a la necesidad de un pH ligeramente básico otorgado por la solución de Citrato de Sodio (Anexo 9). Una vez sintetizadas las AuNPs en los vasos de precipitado y para su respectivo

almacenamiento, se trasladaron a tubos Falcon diferenciados y fueron llevados a refrigeración (2 – 8 °C) hasta su uso (59).

10.4 Purificación de AuNPs

Se llevó 15 mL de la solución coloidal de AuNPs a un tubo Falcon para llevarlo a la centrifugadora a 10000 rpm por 15 minutos, seguido de ello se conserva el pellet y el sobrenadante fue llevado a un nuevo tubo Falcon, donde se repitió el proceso de centrifugación y resuspensión del nuevo pellet con agua ultrapura, mientras que el sobrenadante fue desechado. Por consiguiente, se trasladó el contenido resuspendido al primer tubo con el pellet y sonificarlo por 5 minutos; finalmente, se repitió el ensayo en una segunda ronda, obteniendo así la solución coloidal de AuNPs purificada (70).

11. Caracterización de nanopartículas UV-Vis

Al obtener la solución coloidal de AuNPs purificada, se realizó las lecturas de los espectros de absorción en el rango visible de 400 a 800 nm usando el Espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis para las soluciones coloidales de AuNPs 1:0.1 mL (v/v) (N1), AuNPs 1:0.5 mL (v/v) (N2) y AuNPs purificadas (N3) (71).

12. Caracterización de nanopartículas DLS

Se empleó el equipo Zetasizer Nano ZS90, operado por el software de análisis Malvern versión 2.2. Para una correcta medición debemos tener en cuenta la concentración de la muestra. De esta manera, si la concentración es demasiado baja, no habrá suficiente luz dispersada para

realizar una medición; y si la muestra está demasiado concentrada, la luz dispersada por una partícula volverá a ser dispersado por otro provocando una dispersión múltiple. Para ello, diluimos 250 μL de solución coloidal de AuNPs N2, previamente tratada con ultrasonido (Anexo 10) en 25 mL de agua ultrapura a temperatura ambiente, obteniendo una mezcla translúcida con una concentración de 0.1 mg/mL, concentración recomendable para lecturas de nanopartículas (72).

13. Caracterización de nanopartículas STEM

La caracterización de las nanopartículas de oro se realizó por microscopía electrónica de transmisión de barrido mediante el equipo Talos F200i. Este servicio fue proporcionado por el Área de Microscopía de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA) en Arequipa. Una vez se obtuvieron las imágenes del STEM, mediante análisis directo, se usó el software ImageJ para la determinación de la distribución y diámetro de las nanopartículas (73).



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención del extracto de hojas de olivo

Se pesó 1 g de cada muestra de la zona recolectada y se realizó la maceración asistida por sonicación, obteniendo 4 extractos de hojas de olivo en solvente etanólico y metanólico preparados en tubos Falcon, como se observa en la Figura 15, designando A (La Huerta en etanol), B (Yaral en etanol), C (Yaral en metanol) y D (La Huerta en metanol) con una mayor intensidad de color comparada a las demás.

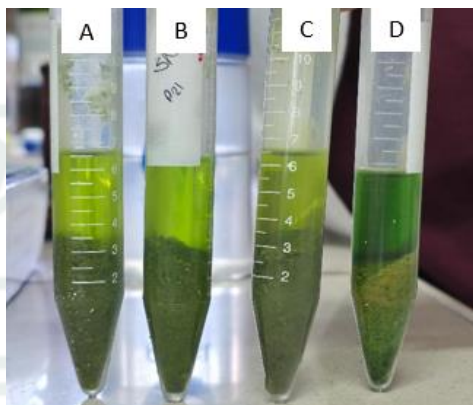


Figura 15. Extractos vegetales alcohólicos de las hojas de olivo

2. Determinación del contenido de polifenoles totales

Primero se realizó la preparación de los blancos para evitar interferencias y ruido en las lecturas de los patrones y muestras, obteniendo las absorbancias mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Absorbancia de blancos para ensayo de Polifenoles Totales

BLANCO	
FOLIN-CIOCALTEU	
BK ETOH	0.0628
BK MEOH	0.0377

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 9 se observan los valores obtenidos en las diferentes lecturas de patrones de calibración (entre un rango de concentración de 15 a 100 ppm). De esta manera, la curva de calibración obtenida mediante la regresión lineal mostrada en la Figura 16 proporciona una ecuación de $y = 0.0107x + 0.032$ y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997, superior al valor mínimo requerido aceptable ($R^2 \geq 0.995$), evidenciando un buen ajuste lineal del método.

Tabla 9. Lecturas de patrones de la curva de calibración de Polifenoles Totales

NOMBRE	CC (ppm)	LECTURA	PROMEDIO
Patrón 1	15	0.1843	0.1846
		0.1846	
		0.1848	
Patrón 2	25	0.3041	0.3042
		0.3044	
		0.3042	
Patrón 3	50	0.5736	0.5745
		0.5751	
		0.5748	
Patrón 4	75	0.8423	0.8424
		0.8425	
		0.8424	
Patrón 5	100	1.0975	1.0988
		1.1007	
		1.0983	

Nota: Elaboración propia

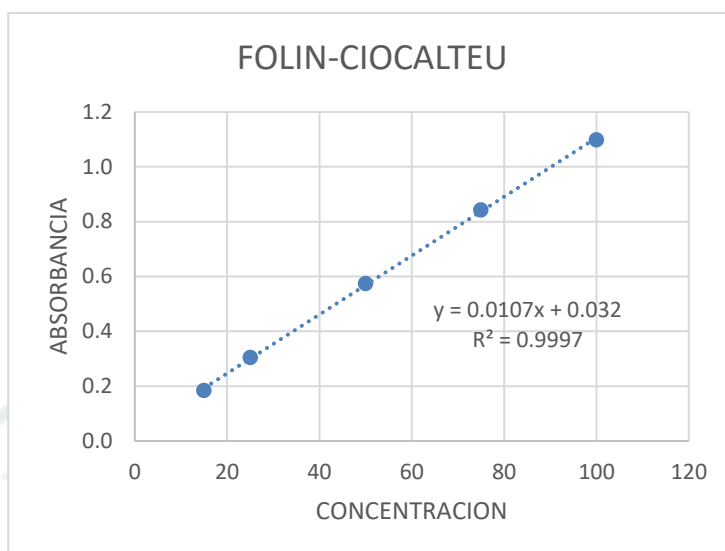


Figura 16. Curva de calibración de Polifenoles Totales

Por consiguiente, se determinaron los polifenoles totales en las hojas de olivo de los diferentes periodos de recolección (floración y cosecha), usando el extracto vegetal a partir del metanol, para cada muestra se calculó el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) (Tabla 10). Los resultados expresados para las hojas en periodo de floración de La Huerta (LH) fue de 293.18 mg GAE/g y de Yaral (Y) 162.62 mg GAE/g de muestra seca, mientras que en el periodo de cosecha fue de 142.40 mg GAE/g, mostrando una clara diferencia en las concentraciones para floración, por el hecho de tratarse de la fase fenológica del olivo, en la cual las hojas se concentran los compuestos fenólicos necesarios para el desarrollo del fruto, de esta manera, cuando sucede la primera cosecha existe un cambio drástico en el contenido fenólico. Adicionalmente, los cambios climáticos propios de la costa sur peruana podrían influir en la presencia de estos metabolitos, pues las épocas de recolección de muestras coinciden con los cambios de periodo, entre las primeras semanas de primavera y otoño respectivamente.

Los extractos metanólicos de hojas de olivo en otros estudios presentaron concentraciones de 44.4 ± 2.3 mg GAE/g (74) esta reducción de contenido fenólico se le atribuye al clima árido de

esa región (Emiratos Árabes Unidos), la recolección de esas muestras se realizaron en el periodo de cosecha tardía, es decir, la última cosecha de olivos antes de iniciarse nuevamente la época de floración, además las hojas en ese periodo han sufrido menor estrés oxidativo debido a la moderadas temperatura de la zona (entre 14 °C a 29 °C), reduciendo la generación de radicales libres en el olivo y por ende menor concentración de polifenoles para combatirlos. En contraste, otra muestra de hojas de olivo en periodo de cosecha del estudio de (75) muestran una concentración de 192 mg GAE/g, un nivel mucho más cercano a la nuestra, aunque manteniendo la diferencia entre la floración y la cosecha. Los olivos de este estudio se encuentran en la zona mediterránea de Turquía, donde la irrigación y explotación del olivo es más típica, al igual que lo es en Ilo. De esta manera, el extracto vegetal de hojas de olivo en floración a partir de metanol posee la mayor eficacia cuantitativa entre los extractos metanólicos.

Tabla 10. Contenido de Polifenoles Totales en extractos vegetales metanólicos

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	CC (mg/L)	mg GAE/g muestra	PROMEDIO	D.E.	C.V.
FLORACION METANOL							
LH1	0.3506		29.7757	297.7570			
LH2	0.3419	0.3457	28.9626	289.6262	293.1776	4.1618	1.4195
LH3	0.3446		29.2150	292.1495			
Y1	0.2057		16.2336	162.3364			
Y2	0.2033	0.2060	16.0093	160.0935	162.6168	2.6746	1.6447
Y3	0.2090		16.5421	165.4206			
COSECHA METANOL							
LH1	0.1834		14.1495	141.4953			
LH2	0.1816	0.1844	13.9813	139.8131	142.3988	3.1365	2.2026
LH3	0.1881		14.5888	145.8879			
1 en 1000 en AGUA DESTILADA							

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 11 se determinaron los polifenoles totales en las hojas de olivo de diferentes periodos de recolección (floración y cosecha) usando el extracto vegetal a partir del etanol. Siendo así, que los resultados expresados para las hojas en periodo de floración de La Huerta fueron de 126.39 mg GAE/g y de Yaral 104.39 mg GAE/g, siendo de nuestra elección las hojas obtenidas en la zona de La Huerta. En el caso del periodo de cosecha se obtuvo solamente 64.55 mg GAE/g, inferior a los anteriores resultados obtenidos en floración. En contraste, bajo el método de extracción por maceración de las hojas de olivo realizado en Túnez y Argelia, ubicados en el Mediterráneo, llegaron a valores de 135.74 ± 1.41 ; 160.53 ± 1.17 ; 121.33 ± 2.11 ; 142.46 ± 2.45 ; 141.90 ± 1.71 ; 161.54 ± 0.99 ; 123.17 ± 2.15 ; 106.32 ± 0.32 mg GAE/g (76), no tan alejado a los resultados obtenidos de nuestras muestras, lo cual poseen una alta concentración de polifenoles. De esta manera, el extracto vegetal de hojas de olivo en floración a partir de etanol posee buena eficacia cuantitativa entre los extractos etanólicos.

Tabla 11. Contenido de Polifenoles Totales en extractos vegetales etanólicos

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	CC (mg/L)	mg GAE/g muestra	PROMEDIO	D.E.	C.V.
FLORACION ETANOL							
LH1	0.1698		12.8785	128.7850			
LH2	0.1609	0.1672	12.0467	120.4673	126.3863	5.1566	4.0800
LH3	0.1710		12.9907	129.9065			
Y1	0.1431		10.3832	103.8318			
Y2	0.1479	0.1437	10.8318	108.3178	104.3925	3.6771	3.5223
Y3	0.1401		10.1028	101.0280			
COSECHA ETANOL							
LH1	0.1044		6.7664	67.6636			
LH2	0.0978	0.1011	6.1495	61.4953	64.5483	3.0846	4.7787
LH3	0.1010		6.4486	64.4860			
1 en 1000 en AGUA DESTILADA							

Nota: Elaboración propia

En la Figura 17 podemos observar la determinación de polifenoles totales de cada uno de los extractos vegetales; (A) indica el blanco, (B) el ensayo resultante del extracto metanólico de la Huerta y (C) de Yaral, ambos del periodo de floración. Se evidencia notoriamente una mayor concentración de polifenoles en los extractos metanólicos de acuerdo con las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro y sus respectivas concentraciones, además de una clara intensidad del color azul en las cubetas del ensayo B.

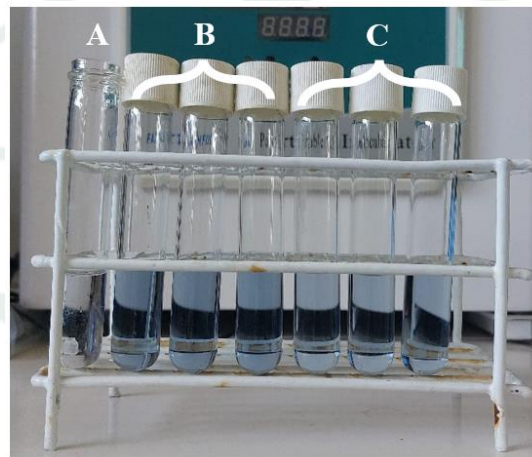


Figura 17. Ensayo de Polifenoles Totales

Tanto la Tabla 10 y 11 muestran la eficacia de la extracción de polifenoles en las hojas de olivo, con una diferencia cuantitativa entre las hojas obtenidas en los periodos de floración en solvente metanólico, siendo la zona de La Huerta donde se presenta el mayor contenido fenólico, siguiendo la línea del estudio (77) puede variar significativamente según la variedad, origen geográfico, así como como el tiempo de muestreo.

3. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Al seguir los procedimientos del método DPPH, En la Tabla 12 se muestran las absorbancias de los blancos para los patrones y extractos en el periodo de floración, para evitar interferencias

y ruido en las lecturas.

Tabla 12. Blancos para ensayos de DPPH

BLANCO	
DPPH	
BK ETOH	1.1610
BK MEOH	1.0310

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 13 se observa las absorbancias obtenidas de los patrones de Trolox en un solvente etanólico (entre un rango de concentración de 100 a 500 μM) por triplicado en el espectrofotómetro a 515 nm, observando un cambio de coloración de morado a un amarillo tenue al pasar los 30 minutos de reacción.

Tabla 13. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente etanólico

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
Patrón 1	100	0.8015	0.8002
		0.7995	
		0.7995	
Patrón 2	200	0.6757	0.6757
		0.6759	
		0.6756	
Patrón 3	300	0.5713	0.5705
		0.5705	
		0.5696	
Patrón 4	400	0.4732	0.4736
		0.4737	
		0.4740	
Patrón 5	500	0.3790	0.3792
		0.3792	
		0.3794	

Nota: Elaboración propia

En la Figura 18 se analiza la curva de calibración obtenida de las absorbancias frente a la concentraciones de los patrones, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9967, cercano a la unidad, donde la ecuación de regresión lineal presentó una pendiente (m) de -0.001 y un intercepto (b) de 0.8931, sirve de referencia para obtener el porcentaje de inhibición (%) y se realizó otra curva entre el % de inhibición frente a la concentración (Figura 19), obteniendo un R^2 de 0.9967 con una pendiente de 0.0899 y un intercepto de 23.079, indicando un buen ajuste lineal del método.

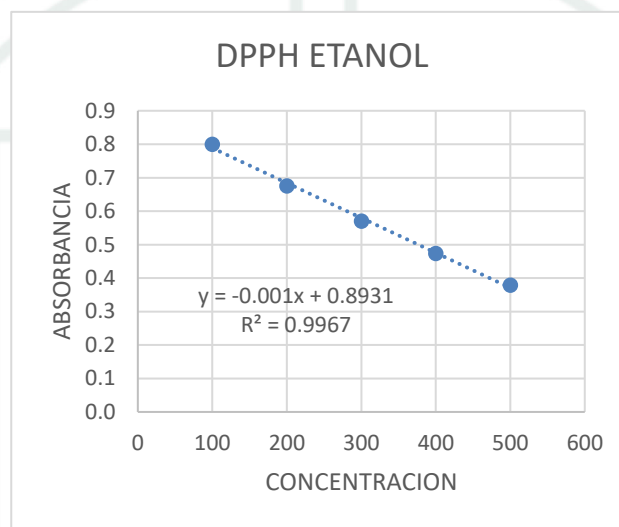


Figura 18. Curva de calibración de DPPH en etanol

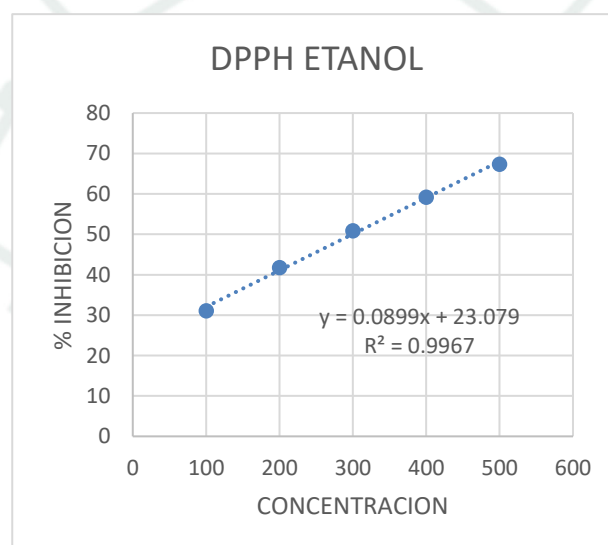


Figura 19. Porcentaje de Inhibición de DPPH en etanol

En el caso del periodo de cosecha de los olivos, se hizo las lecturas de las absorbancias de los blancos en cada uno de los solventes orgánicos en periodo de cosecha como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Blancos para ensayos de DPPH en periodo de cosecha

BLANCO	
DPPH	
BK ETOH	1.1440
BK MEOH	1.1098

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 15 se observa los valores obtenidos de las diferentes lecturas de los patrones de Trolox por triplicado en el espectrofotómetro a 515 nm.

Tabla 15. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente metanólico

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
Patrón 1	100	0.7769	0.7768
		0.7768	
		0.7766	
Patrón 2	200	0.6539	0.6541
		0.6540	
		0.6543	
Patrón 3	300	0.5578	0.5576
		0.5576	
		0.5574	
Patrón 4	400	0.4573	0.4577
		0.4579	
		0.4579	
Patrón 5	500	0.3659	0.3660
		0.3659	
		0.3661	

Nota: Elaboración propia

La curva de calibración obtenida de las absorbancias frente a las concentraciones de los patrones (Figura 20) tuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9971, cercano a la unidad, cuya ecuación de regresión lineal presentó una pendiente de -0.001 y un intercepto de 0.8678, sirviendo de referencia para obtener el porcentaje de inhibición y se realizó otra curva entre el % de inhibición frente a la concentración (Figura 21), obteniendo un R^2 de 0.9971 con una pendiente de 0.0987 y un intercepto de 15.828, indicando un buen ajuste lineal del método.

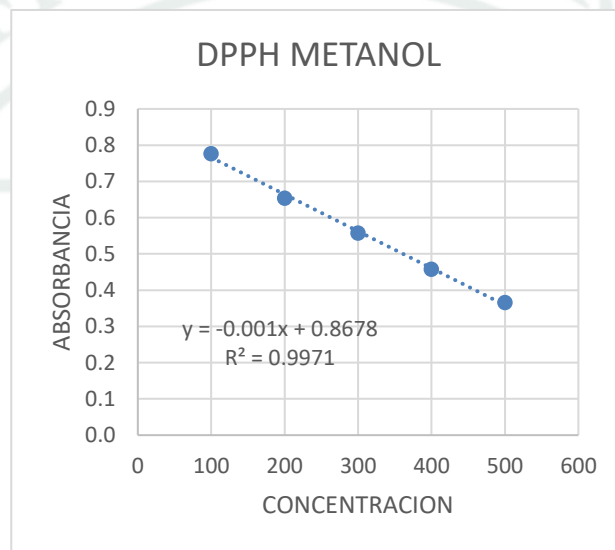


Figura 20. Curva de calibración de DPPH en metanol

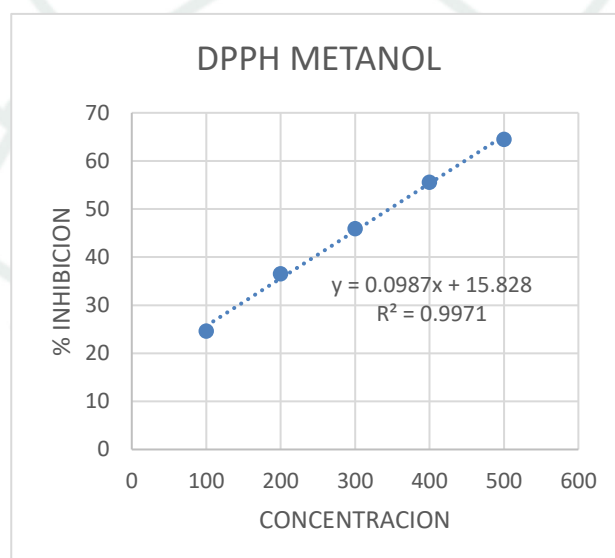


Figura 21. Porcentaje de Inhibición de DPPH en metanol

En la Tabla 16 y 17 se realizó el análisis estadístico de las lecturas de cada uno de los extractos vegetales: La Huerta (LH) y Yaral (Y) en diferentes solventes alcohólicos y periodos (floración y cosecha del olivo) bajo el mismo procedimiento de los patrones, luego se calculó su porcentaje de inhibición y capacidad antioxidante del extracto expresado en micromoles de Trolox equivalente por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol TE/g}$) tomando en cuenta el factor de dilución usado y el volumen de la fiola (L).

Tabla 16. Capacidad Antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	%INHIBICION	$\mu\text{mol TE/g}$	PROMEDIO	D.E.	C.V.
DPPH ETANOL							
LH1	0.7911		31.8605	732.6028			
LH2	0.7855	0.7863	32.3428	772.8427	766.8546	31.6851	4.1318
LH3	0.7824		32.6098	795.1184			
Y1	0.8138		29.9053	569.4873			
Y2	0.8201	0.8168	29.3626	524.2173	547.6906	22.6815	4.1413
Y3	0.8166		29.6641	549.3673			
DPPH METANOL							
LH1	0.5474		46.9059	2361.5438			
LH2	0.5252	0.5329	49.0592	2525.1646	2468.1676	92.4124	3.7442
LH3	0.5262		48.9622	2517.7943			
Y1	0.5855		43.2105	2080.7352			
Y2	0.5962	0.5872	42.1726	2001.8729	2067.9600	60.7160	2.9360
Y3	0.5800		43.7439	2121.2719			
1 EN 1500							

Nota: Elaboración propia

Tabla 17. Capacidad Antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de cosecha

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	%INHIBICION	μmol TE/g	PROMEDIO	D.E.	C.V.
DPPH ETANOL							
LH1	0.8383		26.7220	303.9234			
LH2	0.8418	0.8406	26.4161	278.3997	286.9076	14.7361	5.1362
LH3	0.8418		26.4161	278.3997			
DPPH METANOL							
LH1	0.7958		28.2934	947.2178			
LH2	0.7982	0.7977	28.0771	930.7850	934.2085	11.6801	1.2503
LH3	0.7991		27.9960	924.6227			
1 EN 1500							

Nota: Elaboración propia

Los resultados obtenidos muestran una capacidad antioxidante promedio en el extracto metanólico del periodo de floración con 2468.17 μmol TE/g frente al etanólico 766.85 μmol TE/g, mientras que, en el periodo de cosecha, sus valores disminuyeron más del 50% frente al de floración, en ambos periodos las muestras provenientes de La Huerta fueron mayores. En comparación a un estudio realizado por Talhaoui, N. et al (78). demuestran que mezclas de metanol/agua o etanol/agua son más efectivas, sin embargo, el metanol puro, como fue utilizado en esta extracción, muestra una cinética de reacción más alta en pruebas de radicales libres (DPPH). Además, los resultados obtenidos en el extracto metanólico se alinean con los rangos reportados por Botsoglou y Biotech Studies en el periodo de cosecha, donde la capacidad antioxidante alcanzo los 850 μmol Trolox/g y 1010 μmol Trolox/g, respectivamente, dependiendo tanto de la variedad y el solvente elegido (75),(79),(80).

4. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Al seguir los procedimientos del método ABTS, en la Tabla 18 se muestran las absorbancias

de los blancos en cada uno de los solventes orgánicos para los patrones y extractos en el periodo de floración.

Tabla 18. Blancos para ensayos de ABTS

BLANCO	
ABTS	
BK ETOH	1.0520
BK MEOH	1.0570

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 19 se observa los valores obtenidos en las diferentes lecturas de los patrones de Trolox en un solvente etanólico (entre un rango de concentración de 100 a 500 μM) por triplicado en el espectrofotómetro a 732 nm, se observó un cambio de coloración de verde azulado a un azul tenue al pasar los 7 minutos de reacción.

Tabla 19. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente etanólico

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
Patrón 1	100	0.6967	0.6968
		0.6970	
		0.6966	
Patrón 2	200	0.6094	0.6090
		0.6084	
		0.6091	
Patrón 3	300	0.5213	0.5212
		0.5214	
		0.5209	
Patrón 4	400	0.4482	0.4483
		0.4482	
		0.4484	
Patrón 5	500	0.3529	0.3528
		0.3525	
		0.3529	

Nota: Elaboración propia

La curva de calibración obtenida de las absorbancias frente a las concentraciones de los patrones (Figura 22) tuvo un coeficiente de determinación de 0.9988 cercano a la unidad y la ecuación de regresión lineal presentó una pendiente de -0.0008 y un intercepto de 0.7802, sirve de referencia para obtener el porcentaje de inhibición, por lo que se realizó otra curva entre el % de inhibición frente a la concentración (Figura 23), obteniendo un R^2 de 0.9988 con una pendiente de 0.0807 y un intercepto de 25.836, indicando un buen ajuste lineal del método.

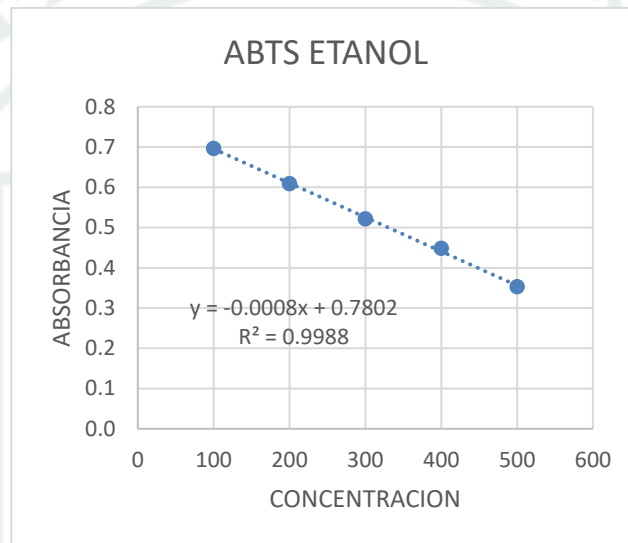


Figura 22. Curva de calibración de ABTS en etanol

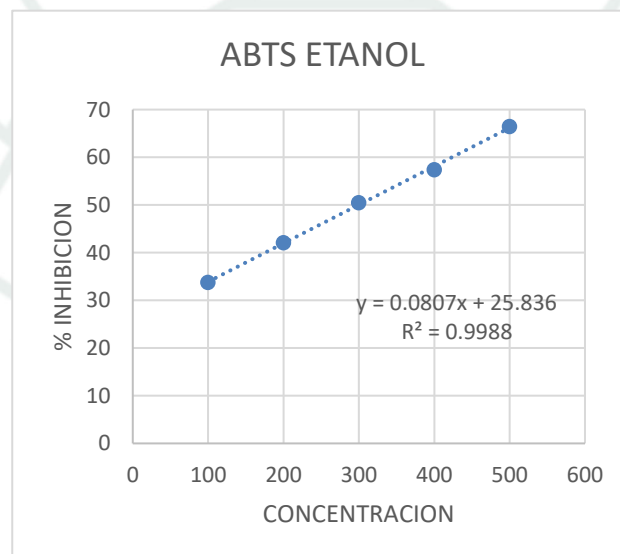


Figura 23. Porcentaje de Inhibición de ABTS en etanol

En la Tabla 20 se observa los valores obtenidos en las diferentes lecturas de los patrones de Trolox en un solvente metanólico (entre un rango de concentración de 100 a 500 μM) por triplicado en el espectrofotómetro a 732 nm.

Tabla 20. Absorbancias de los patrones de Trolox en solvente metanólico

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
Patrón 1	100	0.5519	0.5523
		0.5524	
		0.5525	
Patrón 2	200	0.4327	0.4314
		0.4290	
		0.4325	
Patrón 3	300	0.3131	0.3130
		0.3134	
		0.3126	
Patrón 4	400	0.2126	0.2126
		0.2128	
		0.2125	
Patrón 5	500	0.0870	0.0872
		0.0872	
		0.0873	

Nota: Elaboración propia

La curva de calibración obtenida de las absorbancias frente a las concentraciones de los patrones como se observa en la Figura 24, tuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.999 cercano a la unidad, donde la ecuación de regresión lineal presentó una pendiente de -0.0011 y un intercepto de 0.664, sirviendo de referencia para obtener el porcentaje de inhibición, por lo que se realizó otra curva entre el % de inhibición frente a la concentración (Figura 25), obteniendo un R^2 de 0.9999 con una pendiente de 0.1087 y un intercepto de 37.182, indicando un buen ajuste lineal del método.

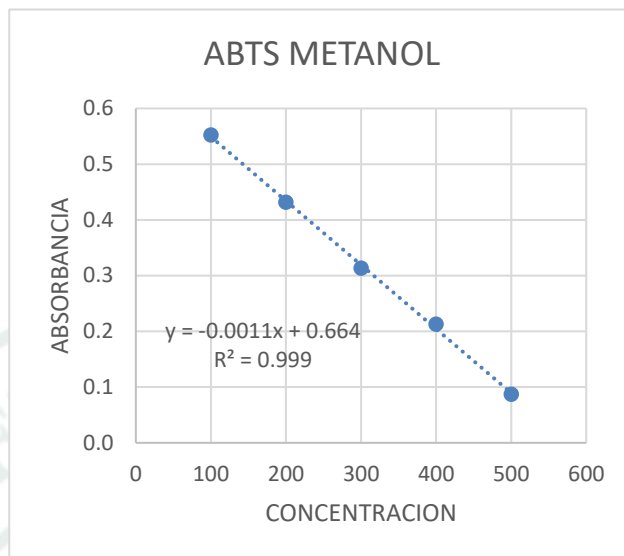


Figura 24. Curva de calibración de ABTS en metanol

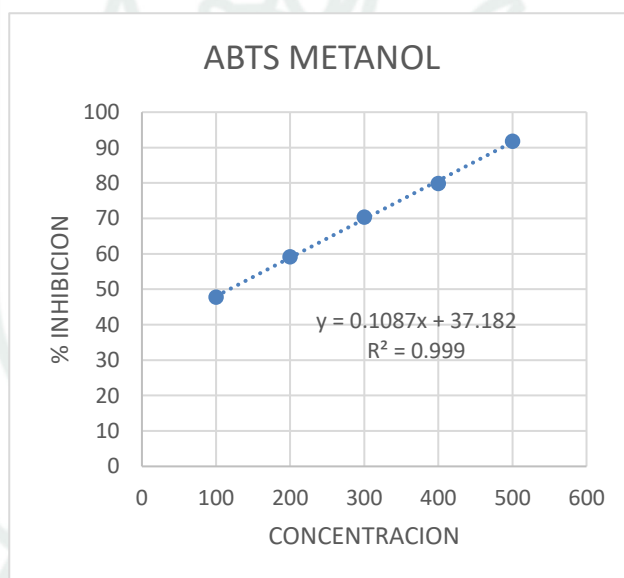


Figura 25. Porcentaje de Inhibición de ABTS en metanol

En la Tabla 21 se realizó el análisis estadístico de las lecturas de cada uno de los extractos vegetales: La Huerta y Yaral en diferentes solventes alcohólicos, bajo el mismo procedimiento de los patrones y se calculó su porcentaje de inhibición y capacidad antioxidante del extracto expresado en micromoles de Trolox equivalente por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol TE/g}$).

Tabla 21. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	%INHIBICION	μmol TE/g	PROMEDIO	D.E.	C.V.
ABTS ETANOL							
LH1	0.5654		46.2548	1897.6536			
LH2	0.5672	0.5615	46.0837	1881.7519	1932.1074	73.8761	3.8236
LH3	0.5519		47.5380	2016.9166			
Y1	0.6209		40.9791	1407.3501			
Y2	0.6070	0.6144	42.3004	1530.1469	1464.4786	61.8422	4.2228
Y3	0.6154		41.5019	1455.9388			
ABTS METANOL							
LH1	0.4120		61.0218	1644.8776			
LH2	0.4216	0.4158	60.1135	1582.2122	1619.8550	33.1842	2.0486
LH3	0.4139		60.8420	1632.4751			
Y1	0.4140		60.8325	1631.8223			
Y2	0.4285	0.4216	59.4607	1537.1714	1582.4298	47.4607	2.9992
Y3	0.4222		60.0568	1578.2956			
1 EN 1500							

Nota: Elaboración propia

En comparación con el estudio de Botsoglou et al. la capacidad antioxidante a través del método ABTS del extracto metanólico de hojas de olivo fue de 1670 μmol TE/g (80), teniendo un resultado similar a nuestro trabajo que fue en promedio de 1619.86 μmol TE/g, sugiriendo la presencia de una combinación más amplia de antioxidantes, incluyendo flavonoides y otros compuestos fenólicos de distinta polaridad, tanto hidrofílicos como lipofílicos, lo que amplía el espectro de acción antioxidante frente al radical. Mientras que la mayor respuesta del extracto metanólico frente al radical DPPH puede atribuirse a una mayor solubilización de compuestos fenólicos polares, como la Oleuropeína, siendo el analito de interés en el estudio.

5. Determinación de Capacidad antioxidante por método de CUPRAC

Al seguir los procedimientos del método CUPRAC, en la Tabla 22 se muestran las absorbancias de los blancos para cada uno de los solventes orgánicos de los patrones y extractos vegetales en periodo de floración.

Tabla 22. Lectura de blancos para ensayo CUPRAC

BLANCO	
CUPRAC	
BK ETOH	0.0808
BK MEOH	0.0817

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 23 se observan los valores obtenidos en las diferentes lecturas de patrones de Trolox para muestras etanólicas (entre un rango de concentración de 100 a 500 μM) por triplicado en el espectrofotómetro a 450 nm. De esta manera, la curva de calibración obtenida (Figura 26) proporciona una ecuación de regresión lineal $y = 0.0016x + 0.0876$ con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9981, superior al valor mínimo requerido aceptable, manteniendo así un buen ajuste lineal del método.

Tabla 23. Lectura de patrones para ensayo CUPRAC en etanol

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
CUPRAC ETANOL			
		0.2413	
Patrón 1	100	0.2412	0.2412
		0.2411	
		0.4333	
Patrón 2	200	0.4335	0.4334
		0.4333	

		0.5682	
Patrón 3	300	0.5710	0.5699
		0.5704	
		0.7408	
Patrón 4	400	0.7420	0.7412
		0.7409	
		0.9047	
Patrón 5	500	0.9047	0.9047
		0.9047	

Nota: Elaboración propia

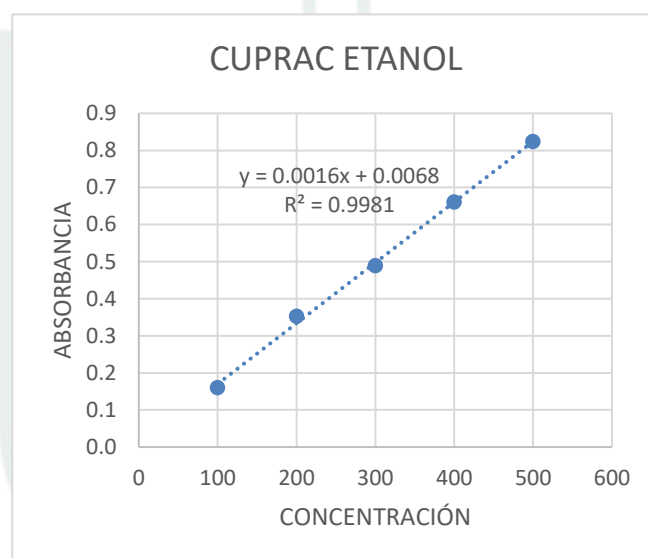


Figura 26. Curva de calibración para ensayo CUPRAC en etanol

En la Tabla 24 se observan los valores obtenidos en las diferentes lecturas de los patrones de Trolox en un solvente metanólico (entre un rango de concentración de 100 a 500 μM) por triplicado en el espectrofotómetro a 450 nm. De esta manera, la curva de calibración obtenida (Figura 27) proporciona una ecuación de regresión lineal $y = 0.0029x + 0.0933$ con un coeficiente de determinación de 0.9992, superior al valor mínimo requerido aceptable, manteniendo así un buen ajuste lineal del método.

Tabla 24. Lectura de patrones para ensayo CUPRAC en metanol

NOMBRE	CC (μM)	LECTURA	PROMEDIO
CUPRAC METANOL			
Patrón 1	100	0.3795	0.3793
		0.3793	
		0.3791	
Patrón 2	200	0.6687	0.6688
		0.6688	
		0.6688	
Patrón 3	300	0.9704	0.9703
		0.9706	
		0.9699	
Patrón 4	400	1.2710	1.2716
		1.2714	
		1.2725	
Patrón 5	500	1.5287	1.5287
		1.5280	
		1.5293	

Nota: Elaboración propia

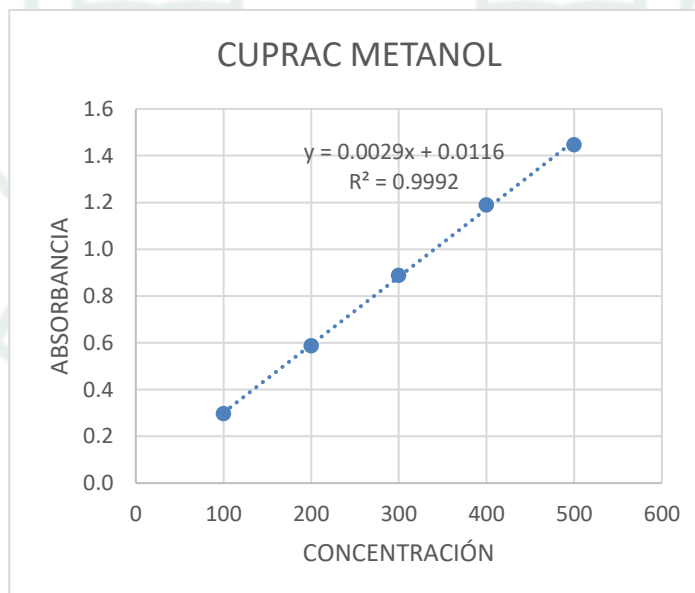


Figura 27. Curva de calibración para ensayo CUPRAC en etanol

En la Tabla 25 se determinó la capacidad antioxidante en las hojas de olivo expresado en $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra seca. Siendo así que los resultados obtenidos para las hojas en periodo de floración en La Huerta fue de 2181.75 $\mu\text{mol Trolox/g}$ y de Yaral 1677 $\mu\text{mol Trolox/g}$, superior a lo mostrado en el estudio (75) con un resultado de 630 $\mu\text{mol Trolox/g}$. De la misma manera, se obtuvieron los resultados para los extractos vegetales a partir de metanol, mostrando que las hojas de olivo de la zona de La Huerta cuentan con una capacidad antioxidante mayor con 2243.03 $\mu\text{mol Trolox/g}$ y Yaral de 2023.17 $\mu\text{mol Trolox/g}$.

Tabla 25. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de floración

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	$\mu\text{mol TE/g}$	PROMEDIO	D.E.	C.V.
CUPRAC ETANOL						
LH1	0.2837		2076.7500			
LH2	0.3049	0.2977	2235.7500	2181.7500	90.9450	4.1684
LH3	0.3045		2232.7500			
Y1	0.2272		1653.0000			
Y2	0.2277	0.2304	1656.7500	1677.0000	38.3675	2.2879
Y3	0.2363		1721.2500			
CUPRAC METANOL						
LH1	0.5436		2201.3793			
LH2	0.5443	0.5537	2204.2759	2243.0345	69.6554	3.1054
LH3	0.5731		2323.4483			
Y1	0.4885		1973.3793			
Y2	0.4973	0.5005	2009.7931	2023.1724	57.6590	2.8499
Y3	0.5158		2086.3448			
1 en 3000						

Nota: Elaboración propia

Comparando los resultados del periodo de floración, podemos distinguir que las hojas de olivo de La Huerta poseen mayor capacidad antioxidante en solvente metanólico.

Para el periodo de cosecha, primero se obtuvieron las absorbancias de los blancos para cada uno de los solventes de los extractos vegetales (Tabla 26), siguiendo el procedimiento del método establecido.

Tabla 26. Lectura de blancos para ensayo CUPRAC en muestras de cosecha

BLANCO	
CUPRAC	
BK ETOH	0.0877
BK MEOH	0.0728

Nota: Elaboración propia

En la Tabla 27 se determinó la capacidad antioxidante en las hojas de olivo de la zona de La Huerta en el periodo de cosecha, usando los extractos etanólicos. Los resultados obtenidos en promedio fue de 489 $\mu\text{mol Trolox/g}$, superior a los ensayos realizados por Khelouf, donde se muestran resultados entre 398.0 ± 0.9 ; 382.2 ± 1.3 ; 271.3 ± 2.7 ; $420.6 \pm 4.5 \mu\text{mol Trolox/g}$ (76). De la misma manera, se obtuvieron los resultados para los extractos metanólicos, mostrando una capacidad antioxidante de 373.38 $\mu\text{mol Trolox/g}$.

Tabla 27. Capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos vegetales en periodo de cosecha

NOMBRE	LECTURA	PROMEDIO	$\mu\text{mol TE/g}$	PROMEDIO	D.E.	C.V.
CUPRAC ETANOL						
LH1	0.0750		511.5000			
LH2	0.0716	0.0720	486.0000	489.0000	21.1601	4.3272
LH3	0.0694		469.5000			
CUPRAC METANOL						
LH1	0.1048		385.6552			
LH2	0.1000	0.1018	365.7931	373.3793	10.7294	2.8736
LH3	0.1007		368.6897			
1 en 3000						

Nota: Elaboración propia

Al comparar los resultados obtenidos durante el periodo de cosecha, se evidenció una menor capacidad antioxidante en los extractos etanólicos. Asimismo, de acuerdo con los ensayos CUPRAC, las hojas de olivo provenientes de la zona de La Huerta, recolectadas en el periodo de floración, presentaron la mayor capacidad antioxidante con un valor promedio de 2243.03 $\mu\text{mol Trolox/g}$.

En la Figura 28 muestra una correlación visual directa de cada uno de los extractos vegetales; (A) indica los ensayos resultantes para extractos metanólicos, (B) para etanólicos, ambos del periodo de floración y (C) el blanco. Se evidencia notoriamente un color verde intenso en los extractos metanólicos, al contrario de los etanólicos, mostrando un color verde más claro, siguiendo los resultados obtenidos en el espectrofotómetro.



Figura 28. Ensayo CUPRAC

La ligera igualdad entre los valores de los extractos metanólicos y etanólicos en el periodo de floración, se debe a su afinidad en reducir al ion Cu^{2+} por la alta presencia de compuestos fenólicos, independientemente del solvente.

Estos resultados evidencian que la evaluación del potencial antioxidante depende tanto del tipo de solvente de extracción como del mecanismo de reacción de cada método, resaltando la importancia de emplear diferentes ensayos antioxidantes para obtener una caracterización más completa de los

compuestos fenólicos presentes y la elección adecuada para la síntesis biológica de nanopartículas.

6. FT-IR

En la Figura 29 y 30 se analizaron los espectros dados por el IR de las muestras secas de las hojas de olivo de las zonas de La Huerta y Yaral, mostrando completa similitud entre ellas a excepción del pico 1457 cm^{-1} ligeramente mayor en las hojas de Yaral. Las señales se identificaron de acuerdo con el programa SpectraGryph, siendo la primera en identificar una onda estirada entre 3500 a 3200 cm^{-1} , con pico en 3216 cm^{-1} , perteneciente a los grupos funcionales hidroxilos (OH^-) característico de los compuestos fenólicos y alcoholes. La siguiente señal mostró un estiramiento en el pico 2919 cm^{-1} , pertenecientes a grupos alifáticos (C-H , CH_2/CH_3) típico de cadenas de lípidos y terpenos. Las bandas intensas de la siguiente señal mostró un pico en 1636 cm^{-1} , pertenecientes a grupos conjugados (C=O) y aromáticos (C=C), propio de los compuestos fenólicos como la Oleuropeína; además, de una señal flexionada con pico en 1457 cm^{-1} , propio de componentes alifáticos (C-H). Finalmente, la última señal visible con estiramiento en el pico 1019 cm^{-1} , perteneciente a los grupos de alcoholes, ésteres y compuestos glucosídicos (C-O). Investigaciones recientes como (81),(82), realizaron análisis FT-IR a las muestras secas de las hojas de olivo para identificar a las biomoléculas responsables de la síntesis de nanopartículas, además de verificar su composición, asociando picos en 3413 , 3251 cm^{-1} para grupos oxidrilos; 2943 , 2925 cm^{-1} para cadenas de terpenos; 1640 , 1598 cm^{-1} para compuestos fenólicos y 1089 , 1100 cm^{-1} para compuestos glucosídicos.

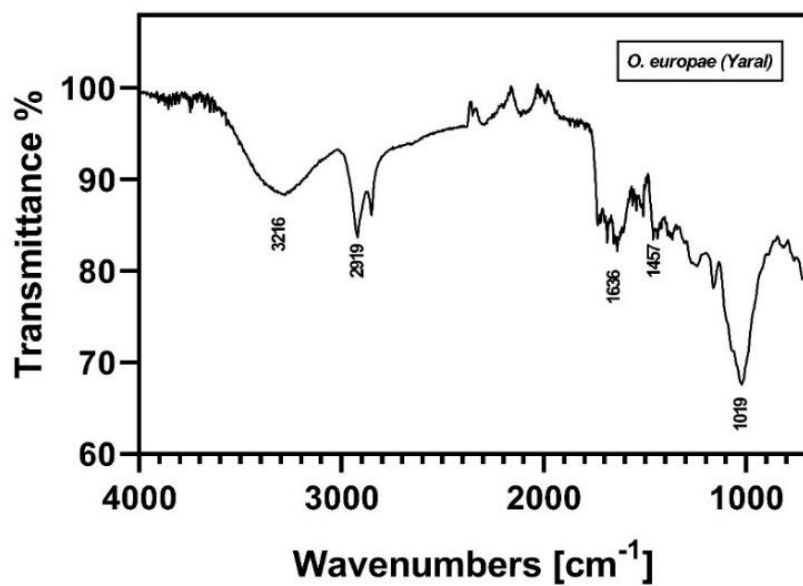


Figura 29. Espectro IR de muestra Yaral

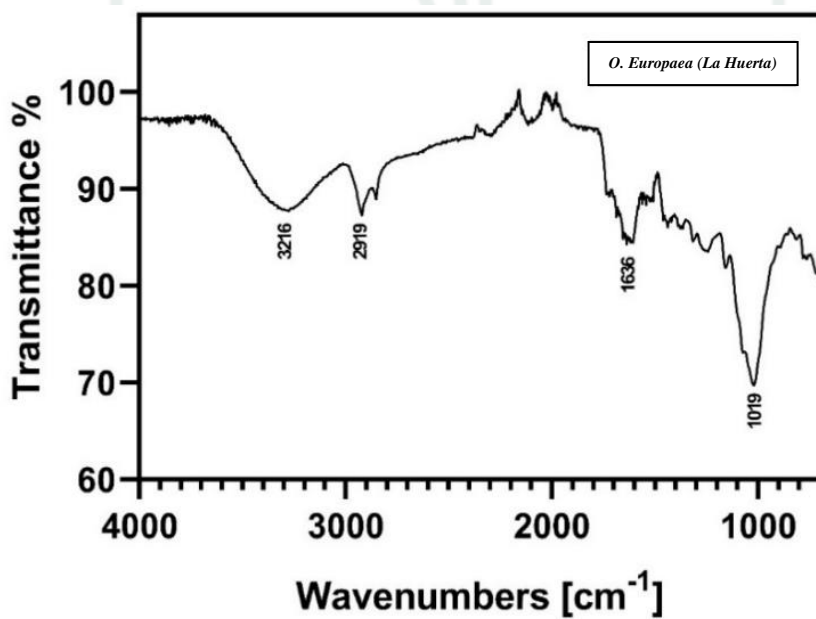


Figura 30. Espectro IR de muestra La Huerta

7. Estandarización de parámetros para la cuantificación de Oleuropeína en HPLC

7.1 Linealidad

Se preparó 6 patrones de Oleuropeína (entre un rango de concentración de 2 a 12 ppm) por triplicado y se llevaron al equipo HPLC con las condiciones cromatográficas elegidas, obteniendo sus respectivas áreas de pico y tiempos de retención como se observa en la Tabla 28.

Tabla 28. Áreas de pico de los patrones de Oleuropeína

CC (ppm)	Área de pico	PROMEDIO	Tiempo de retención (min)	PROMEDIO
2	27273	27317	7.553	7.547
	27363		7.547	
	27315		7.54	
4	54320	54377.67	7.56	7.547
	54452		7.54	
	54361		7.54	
6	82213	81855.67	7.56	7.551
	81672		7.54	
	81682		7.553	
8	109870	109683.33	7.553	7.544
	109621		7.54	
	109559		7.54	
10	138874	138043.33	7.547	7.536
	137521		7.533	
	137735		7.527	
12	167001	166851.67	7.553	7.531
	166746		7.527	
	166808		7.513	

Nota: Elaboración propia

Por consiguiente, se realizó la curva de calibración para obtener la ecuación de regresión lineal a través de cálculos estadísticos y conseguir la concentración real de los patrones usados (2.04 ppm, 3.97 ppm, 5.95 ppm, 8.03 ppm, 10.03 ppm y 11.99 ppm) mostrado en la Figura 31. El coeficiente de correlación (r) fue de 0.9999, indicando un alto grado de correlación entre la concentración y el área respuesta del analito; cuyo R^2 también fue 0.9999, es decir, el 99% de la variación de respuesta instrumental es explicada por la concentración. El valor del intercepto fue de -820.58, también representa un parámetro para tener una buena linealidad, al obtener un valor cercano a cero implica que existen señales mínimas de ruido basal en las lecturas. El error típico o error estándar del intercepto representa una medida en la variabilidad en los resultados respecto a la recta de regresión. En nuestro análisis, el error típico obtenido fue de 542.07, valor que representa menos del 1% de la respuesta analítica, y por su bajo valor entre la diferencia del área medida y el área predicha por la ecuación de regresión, alcanzó una cercanía a cero, confirmando una buena linealidad en el método.

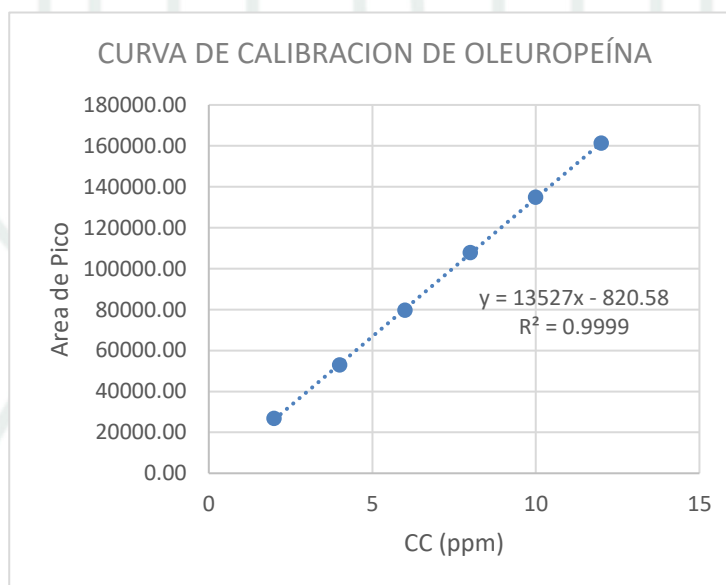


Figura 31. Curva de calibración de la Oleuropeína

7.2 Sensibilidad

A través de las fórmulas (a) y (b) se obtuvo el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), los cuales fueron 0.1322 mg/L (ppm) y 0.4007 mg/L respectivamente, por lo que presenta una sensibilidad para detectar y cuantificar a la Oleuropeína a muy bajas concentraciones.

(a)

$$LOD = \frac{3.3 * \sigma}{S}$$
$$LOD = \frac{3.3 * 542.07}{13527}$$
$$LOD = 0.1322 \text{ ppm}$$

(b)

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{S}$$
$$LOQ = \frac{10 * 542.07}{13527}$$
$$LOQ = 0.4007 \text{ ppm}$$

7.3 Precisión

7.3.1 Repetibilidad

Se preparó 3 patrones de Oleuropeína en diferentes concentraciones dentro del rango reportable (2 ppm, 6 ppm y 12 ppm) por triplicado, realizado por un analista dentro de un periodo corto de tiempo en el mismo día bajo las mismas condiciones (Tabla 29).

Tabla 29. Lecturas de Repetibilidad del método

CC (ppm)	LECTURA 1		LECTURA 2		PONDERADO	D.E. AMBAS	C.V. 1 (%)	C.V. 2 (%)	C.V. AMBAS (%)
	Área	D.E. 1	Área	D.E. 2					
2	27273		27450						
	27363	45.03	27184	141.97	27302.67	95.50	0.16	0.52	0.35
	27315		27231						
6	82213		81959						
	81672	309.5	81486	381.51	81702.67	353.02	0.38	0.47	0.43
	81682		81204						
12	167001		165607						
	166746	132.99	165103	255.04	166114.67	827.58	0.08	0.15	0.50
	166808		165423						

Nota: Elaboración propia

Según la guía analítica del AOAC se utiliza 3 niveles distintos de concentración dentro de la curva de calibración para comparar sus coeficientes de variación (CV), por lo que se obtuvo un %CV de 0.35 % en el patrón de 2 ppm, 0.43 % para el patrón de 6 ppm y 0.50 % en el de 12 ppm, teniendo un coeficiente de variación aceptable inferior al 7.3 %, el cual corresponde a una concentración máxima en el rango de 10 ppm según los criterios de aceptación de la AOAC (83).

7.3.2 Precisión intermedia

Se preparó 3 patrones de Oleuropeína en diferentes concentraciones dentro del rango reportable (2 ppm, 6 ppm y 12 ppm) por triplicado y realizado por 2 analistas (A y B) en diferentes días. Para cada patrón se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Los

resultados obtenidos (Tabla 30) tuvo un % CV de 1.22 % en el patrón de 2 ppm, 1.51 % para el patrón de 6 ppm y 1.83 % en el de 12 ppm. Para determinar la precisión intermedia del método, se toma la concentración máxima en la realización de la curva de calibración, la cual fue 11.99 ppm de Oleuropeína con un % CV de 1.83 %, que, al ser comparado con la precisión esperada según la guía del AOAC, fue inferior al límite aceptable de 7.3 %, presentando una buena precisión en el método usado (83).

Tabla 30. Lecturas de Precisión intermedia del método

CC (ppm)	ANALISTA A (15/07/25)		ANALISTA B (16/07/25)		PONDERADO	D.E. AMBAS	C.V. 1 (%)	C.V. 2 (%)	C.V. AMBAS (%)
	Área	D.E. 1	Área	D.E. 2					
	2	27273 27363 27315	45.03	26802 26550 26941					
6	82213 81672 81682	309.5	79750 79815 79463	187.3	80765.83	1215.58	0.3781	0.2351	1.51
12	167001 166746 166808	132.99	161400 161182 161526	174.04	164110.5	3005.99	0.0797	0.1079	1.83

Nota: Elaboración propia

7.4 Exactitud

Se preparó 3 soluciones: una solución patrón de 2 ppm de Oleuropeína (a), una solución del extracto vegetal que presentó mayor capacidad antioxidante al 0.1 % (b) (se eligió esta concentración del extracto para que estuviera dentro del rango de lectura y se usó el mismo método de extracción) y, por último, una solución patrón de 2 ppm enriquecida con una alícuota del extracto vegetal al 0.1% (c), todas las soluciones fueron enrasadas en fiolas de 10 mL con

la fase móvil, luego filtradas hacia un vial para ser leídas por triplicado bajo las mismas condiciones cromatográficas (Tabla 31), obteniendo un porcentaje de recuperación promedio de 90.14 %, estando dentro del rango de aceptación (80 – 110 %) de recuperación esperada en función de la concentración del analito según la AOAC, por lo que se considera que el método presenta una exactitud aceptable para la cuantificación de Oleuropeína (83).

Tabla 31. Porcentaje de Recuperación de Oleuropeína

CC (ppm)	Área de pico	Promedio	Tiempo de retención (min)	Promedio	CC real (ppm)
(a) 2 ppm standard	29534		7.633		
	30078	29747.67	7.633	7.629	2.26
	29631		7.62		
(b) Muestra LH Floración Extracto 0.1%	200131		7.62		
	199871	200081.67	7.613	7.615	14.85
	200243		7.613		
(c) Muestra + 2 ppm	227661		7.613		
	227328	227634.67	7.62	7.613	16.89
	227915		7.607		
Diferencia entre (c) y (b) (ppm)					2.04
Porcentaje de Recuperación (%)					90.14

Nota: Elaboración propia

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(M.E.) - (M)}{(St)} * 100$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(16.89) - (14.85)}{(2.26)} * 100$$

$$\% \text{ Recuperación} = 90.14 \%$$

Los resultados del HPLC concordaron con un estudio realizado por Carrara et al., donde se recolectaron hojas de olivo de las variedades Picholine y Olivière (en Francia) (84), también extraídas en metanol, pero leídas a 280 nm en una temperatura de 40° C con un modo gradiente, donde la repetibilidad y la precisión intermedia fueron inferiores al 5 % de CV. Mientras que

la recuperación de la extracción fue superior al 90 %, observando una fuerte relación lineal con el método utilizado en este estudio.

7.5 Cuantificación de Oleuropeína en las muestras

Al tener los parámetros aceptables para tener una lectura precisa y confiable de la Oleuropeína, se tomó los extractos de hojas con mayor capacidad antioxidante en solvente metanólico (de la zona de Yaral en periodo de floración y La Huerta en ambos periodos) a una dilución de 1:3000 v/v, enrasado con la fase móvil de Acetonitrilo:Agua (20:80). El cálculo de las concentraciones fue realizado tomando la ecuación de regresión lineal entre la concentración del estándar conocida y el área del pico de cada muestra, obteniendo las concentraciones reales de las muestras como se observa en la Tabla 32.

Tabla 32. Cuantificación de Oleuropeína de diferentes muestras

CC (ppm)	Área de pico	PROMEDIO	Tiempo de retención (min)	PROMEDIO	CC real (ppm)
YARAL FLOR	78459	78730.67	7.587	7.590	5.88
	78691		7.6		
	79042		7.583		
LH FLOR	186270	186552.67	7.593	7.589	13.85
	186938		7.587		
	186450		7.587		
LH COSECHA	38588	38512.67	7.6	7.593	2.91
	38544		7.587		
	38406		7.593		

Nota: Elaboración propia

8. Caracterización de nanopartículas por UV-Vis

En la Figura 32 muestra 3 soluciones coloidales de nanopartículas de oro realizadas a partir de la síntesis biológica entre el Ácido Tetracloroáurico y el extracto vegetal óptimo (zona La Huerta en periodo de floración) a una proporción de 1:0.1 (v/v) (N1) respectivamente; 1:0.5 (N2) y de la solución coloidal purificada 1:0.5 (N3). La formación de un color púrpura en la reacción confirmó la síntesis de nanopartículas de oro, consistente con lo reportado por Folorunso et al (85).

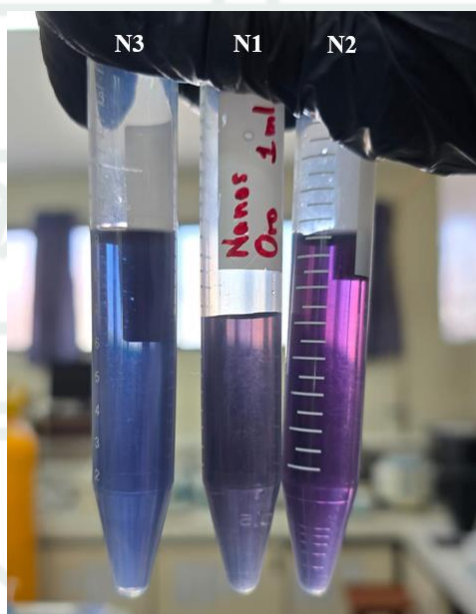


Figura 32. Soluciones coloidales de nanopartículas de oro por síntesis biológica

En la Figura 33 muestra el barrido de las AuNPs sintetizadas en el espectrofotómetro, mostrando una banda de absorción entre los 540 a 580 nm y una clara actividad de la resonancia del plasmón superficial (SPR en inglés), característicos del Au^0 . La solución coloidal N1 con pico de absorbancia en 560 nm indica una adecuada formación de AuNPs a una baja concentración; la solución coloidal N2 con pico en 550 nm demostró una mejor lectura para

nanopartículas aún más pequeñas por la SPR, acompañado de un color violeta rosáceo propio de las dispersiones coloidales estables de AuNPs esféricas (<50 nm); mientras que en la solución coloidal N3 con pico en 610 nm demuestra una pérdida de nanopartículas menores a 50 nm debido a la prolongación del pico de absorbancia, posiblemente provocado por la previa purificación de la solución coloidal, donde el sobrenadante es extraído y desechado, haciendo que las nanopartículas más pequeñas se perdieran con el sobrenadante o se vieran agregadas al momento de formar los pellets en la centrifugación. Estudios relacionados muestran bandas de absorción similares a la obtenidas, con picos de absorción entre los 520 a 550 nm, demostrando que la síntesis de AuNPs se realizó de forma satisfactoria; sin embargo, no se puede afirmar la existencia de dichas nanopartículas hasta haber realizado una caracterización más profunda, relacionado a su tamaño (73).

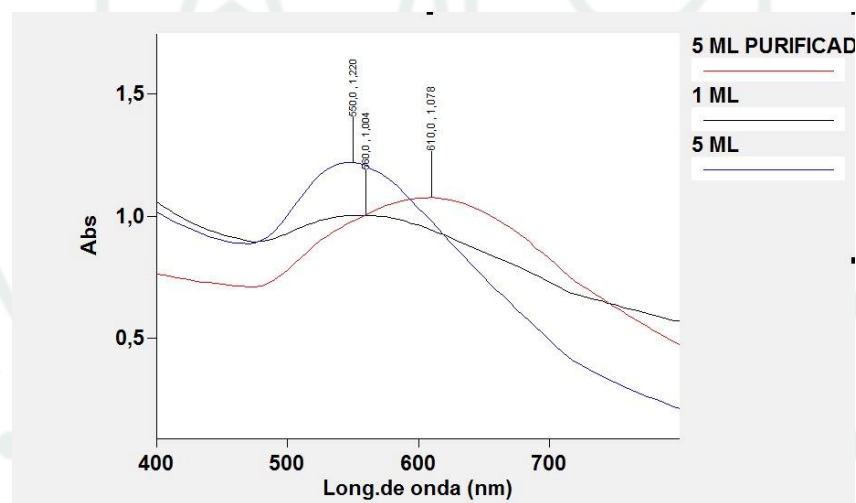


Figura 33. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro

9. Caracterización de nanopartículas por DLS

Se obtuvieron las lecturas realizadas en el equipo Zetasizer Nano ZS90 para la muestra N2 (Figura 34), teniendo una lectura idónea en el espectro UV-Vis, expresando así una población

de nanopartículas con diámetro hidrodinámico promedio de 137.2 ± 31.15 nm. Además, de un índice de polidispersidad (PdI) a 0.396. Al tratarse de una sola población, demuestra que no hubo agregación en la solución coloidal N2 que supere el rango de nanopartículas y con el PdI ligeramente superior al rango aceptable de 0.3 (73), demostrando la poca agregación y buena estabilidad de las AuNPs sintetizadas.

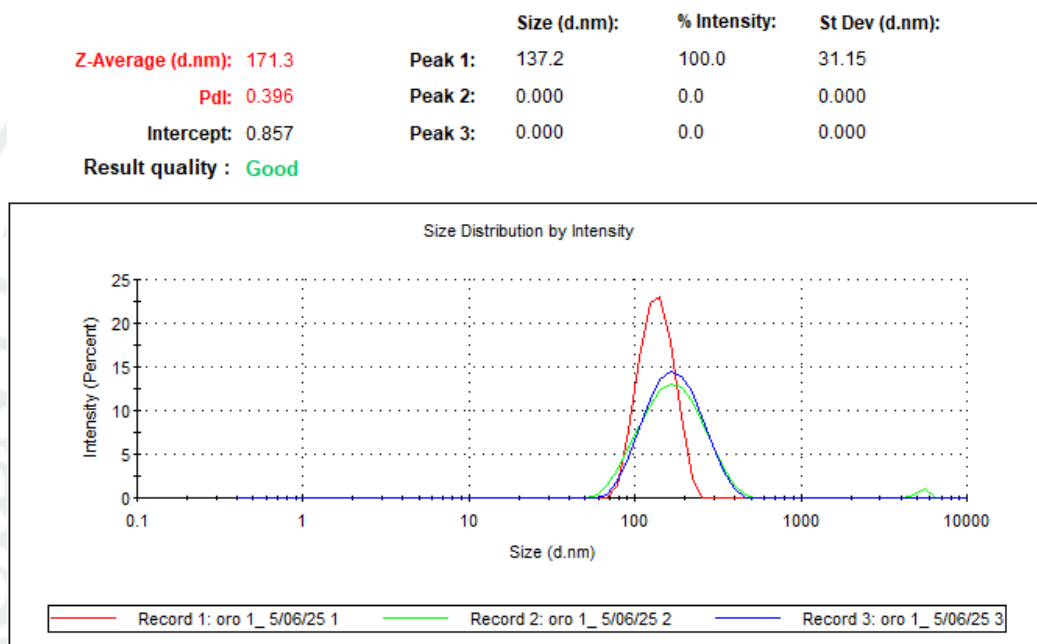


Figura 34. Informe de distribución de tallas por intensidad

La lectura muestra que la síntesis llegó a la escala nanométrica sin ninguna dificultad, siendo que los ensayos por DLS tienden a complicarse cuando se trata de síntesis biológica, debido a que la dispersión de luz que generan los halos del extracto vegetal hacen que encapsulen a las nanopartículas durante su formación y lo detecte como parte integral de la partícula. Estudios similares sufren el mismo problema (70), que es inherente a esta síntesis, por lo que son necesarios análisis más determinantes al momento de caracterizar nanopartículas.

10. Caracterización de nanopartículas por STEM

En la Figura 35 se muestran las micrografías obtenidas por el equipo STEM a rangos de 100, 50, 20 y 5 nm, donde se evidencia satisfactoriamente la síntesis de las AuNPs en forma esféricas, distribuidas en la matriz orgánica causada por el extracto vegetal, aquella que provoca lecturas imprecisas en el equipo Zetasizer.

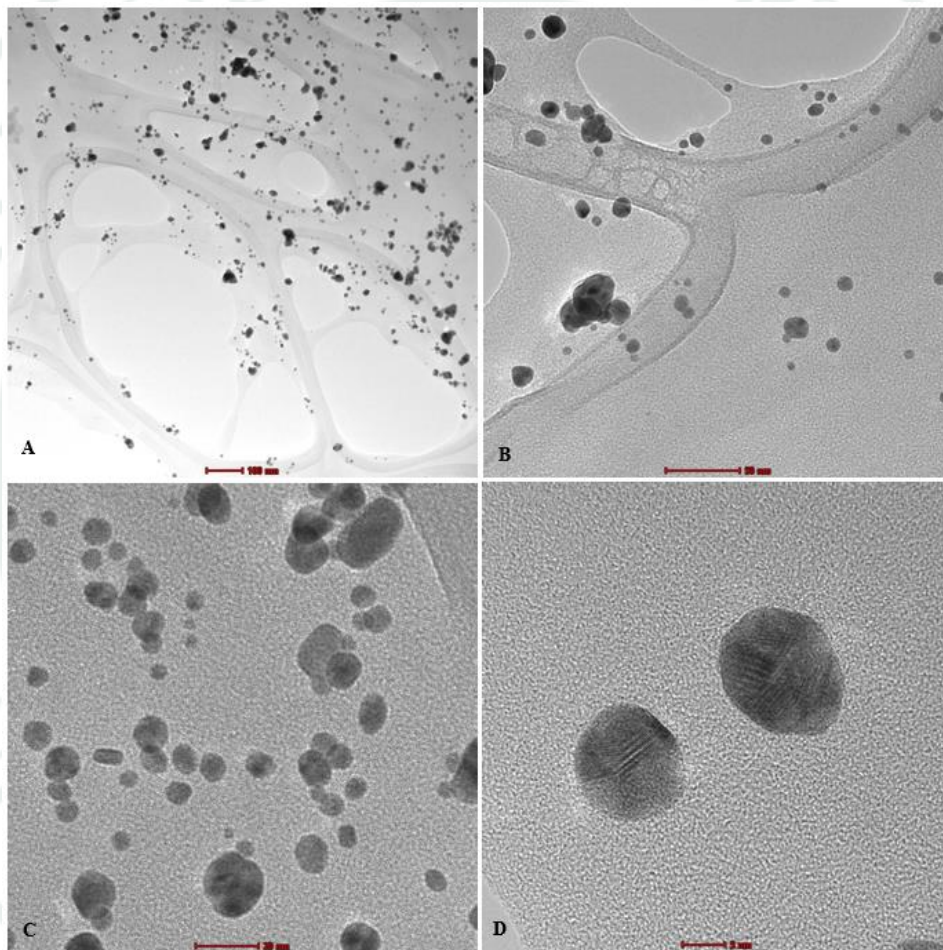


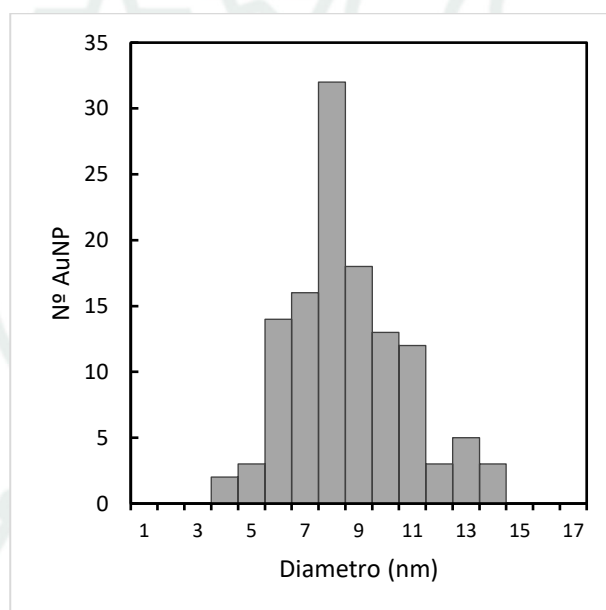
Figura 35. Micrografías de nanopartículas de oro por síntesis biológica

En la sección A muestra que ninguna de las nanopartículas sintetizadas exceden de su rango terminológico de 100 nm, demostrando así que la síntesis tuvo éxito en lo que respecta al tamaño del material. La sección B acerca el lente para una mejor vista de la población de

nanopartículas y las nucleaciones múltiples durante el proceso de reducción del Au^{+3} a Au^0 , además, de la interacción de estas con la matriz vegetal, propio del extracto alcohólico que usamos para la síntesis, evidenciando su clara función como agente estabilizante. En las secciones C y D se muestran la morfología de las AuNPs, manteniendo una clara forma esférica, típica en este tipo de síntesis.

En la Tabla 33 se muestra la frecuencia de tamaños de nanopartículas provenientes de la Figura 35 sección C, agrupándose en intervalos de 1 a 17 nm, evidenciando una mayor presencia de AuNPs de 8 nm con una desviación estándar de 0.0713. Los materiales sintetizados denotan una monodistribución moderada similar a los mostrados en el estudio realizado por Palomba (86).

Tabla 33. Tabla de frecuencia de nanopartículas de oro



Estos resultados confirman que nuestra síntesis biológica con el extracto de las hojas de olivo obtuvo nanopartículas de oro a un nivel nanométrico menor a 50 nm, con una morfología esférica y distribución dispersa.

CONCLUSIONES

PRIMERA. Se obtuvo los extractos de las hojas de olivo a través de la maceración asistida por sonicación, donde el extracto metanólico presentó una mayor concentración de compuestos extraídos en comparación con el extracto etanólico en base a su intensidad del color. Estos resultados indican que el metanol fue más eficiente para la extracción de los compuestos hidrofílicos de interés como lo es la Oleuropeína.

SEGUNDA. El análisis cuantitativo de compuestos fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu reveló que el extracto metanólico de hojas de olivo en época de floración presenta la mayor concentración de polifenoles totales, destacando la muestra de La Huerta (293.1776 mg GAE/g). Esta superioridad se explica tanto por la mayor eficacia del metanol como solvente extractante y por la elevada biosíntesis de metabolitos secundarios durante la floración, la fase fenológica de máxima actividad antioxidante foliar (formación de flores de olivo). La consistente reducción observada en la cosecha confirma la redistribución metabólica hacia el fruto. Los resultados validan el potencial fitoquímico del olivo de la provincia de Ilo – Moquegua y se presentan con valores similares a los reportes en bibliografías recientes. Así, las hojas de olivo de La Huerta en floración, extraídas con metanol, se establecen como la matriz óptima para la síntesis biológica de AuNPs por su alta concentración de polifenoles.

TERCERA. Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas de olivo mediante los métodos DPPH y ABTS, donde el extracto etanólico presentó la mayor capacidad antioxidante por ABTS con un valor promedio de 1932.11 $\mu\text{mol TE/g}$, mientras que el extracto metanólico con mayor capacidad antioxidante por DPPH mostró un valor promedio de 2468.17 $\mu\text{mol TE/g}$, ambas provenientes de la zona de La Huerta. Estos

resultados confirman la naturaleza complementaria de ambos métodos y la elección para una buena selectividad del extracto. El método CUPRAC también presentó la mayor capacidad antioxidante en el extracto metanólico de la zona de La Huerta en el periodo de floración con un valor promedio de 2243.0345 $\mu\text{mol TE/g}$, por lo que se refleja una diversidad de mecanismos antioxidantes presentes en los extractos y la selectividad de cada método y solvente, siendo óptimo el extracto metanólico para poder obtener la mayor concentración de Oleuropeína.

CUARTA. El análisis FT-IR de las hojas de olivo provenientes de las zonas La Huerta y Yaral permitió identificar y comparar los principales grupos funcionales bioactivos presentes. Las señales mostraron una marcada similitud estructural, con bandas características correspondientes a hidroxilos (3216 cm^{-1}), cadenas alifáticas de lípidos y terpenos (2919 cm^{-1}), grupos carbonilo y anillos aromáticos de compuestos fenólicos como la Oleuropeína (1636 cm^{-1}), y enlaces glucosídicos (1019 cm^{-1}). Esta firma espectral es consistente con lo reportado en la literatura para hojas de olivo empleadas en síntesis biológica de nanopartículas. La única variación significativa observada fue un ligero estiramiento de la banda en el pico 1457 cm^{-1} (estiramiento C–H alifática) en las muestras de Yaral, lo que sugiere diferencias cuantitativas menores en la composición de metabolitos secundarios, asociadas a la diferencia de las zonas de recolección de muestra. Por otro lado, la identificación de los bioactivos principales como hidroxilos, grupos conjugados y aromáticos, son responsables de la actividad reductora y se mantiene homogénea entre ambas zonas, debido a que las muestras son de la misma especie vegetal (*Olea europaea var. Sevillana*). Esto indica que, desde la perspectiva fitoquímica evaluada por FT-IR, el material vegetal de ambas localidades presenta una base funcional equivalente para su potencial antioxidante.

QUINTA. Se estandarizó el método de HPLC para la cuantificación de Oleuropeína, evidenciando una adecuada selectividad. El método presentó una excelente linealidad en el rango de 2–12 ppm, con un coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9999$). El LOD y LOQ fueron de 0.1322 ppm y 0.4007 ppm respectivamente, siendo detectada y cuantificada a muy bajas concentraciones. La precisión, expresada como %CV, fue inferior al 2 %, mientras que la exactitud mostró un valor de recuperación del 90.14%, estando dentro del rango de aceptación según las guías internacionales. Estos resultados confirman que el método es sensible, preciso y reproducible, siendo adecuado para la cuantificación de Oleuropeína en los extractos metanólicos y etanólicos.

SEXTA. Se cuantificó exitosamente el contenido de Oleuropeína en el extracto metanólico mediante HPLC, obteniéndose resultados confiables y reproducibles, siendo la muestra de La Huerta en periodo de floración con la mayor concentración de Oleuropeína (13.85 ppm), lo que permitió evaluar la presencia de este compuesto bioactivo y la posible razón de su alta capacidad antioxidante.

SEPTIMA. La síntesis biológica del extracto metanólico demostró la relación entre la concentración del extracto y la formación de nanopartículas. La condición 1:0.5 (HAuCl₄: Extracto) resultó como la única exitosa bajo los parámetros visuales como la lectura espectral UV-Vis, caracterizado por un pico de plasmón superficial resonante agudo y bien definido a 550 nm, acompañado de un color violeta rosáceo propio de las dispersiones coloidales estables de AuNPs esféricas pequeñas (<50 nm). Este resultado muestra la concentración aceptable de fitoquímicos reductores y estabilizantes del extracto vegetal, capaz de reducir completamente los iones Au³⁺ y controlar cinéticamente el crecimiento del nanomaterial.

OCTAVA. La caracterización de las nanopartículas de oro en solución coloidal muestra satisfactoriamente una morfología esférica, dimensiones nanométricas y estabilidad moderada. La técnica UV-Vis proporcionó la primera evidencia de formación de AuNPs metálicas, mostrando una banda de plasmón superficial resonante definida a 550 nm, propio de nanopartículas esféricas pequeñas. El análisis por Dispersión de Luz Dinámica con el Zetasizer reveló un diámetro hidrodinámico promedio de 137.2 ± 31.15 nm, con un índice de polidispersidad del 0.396. Este tamaño y agregación aparentemente mayor al obtenido por microscopía es atribuible a la matriz orgánica del extracto adsorbidos en la superficie de las nanopartículas, componentes que el DLS detecta como parte integral de la partícula en movimiento browniano. La verificación morfológica y el tamaño real del núcleo metálico se obtuvieron mediante STEM, la cual mostró nanopartículas esféricas con un diámetro promedio de núcleo de 8.10 ± 2.2 nm y un índice de polidispersidad de 0.0713. Esta marcada diferencia con el tamaño hidrodinámico valida el espesor de la matriz orgánica estabilizante destacando el papel crucial del extracto no solo como agente reductor, sino como un estabilizante coloidal de las AuNPs en medio acuoso.

RECOMENDACIONES

- Diseñar una metodología en HPLC para realizar un fraccionamiento y una mejor purificación de la Oleuropeína en los extractos.
- Realizar ensayos de estrés oxidativo en animales de experimentación para comprobar su capacidad antioxidante *in vivo*.
- Realizar ensayos antimicrobianos a las nanopartículas de oro sintetizadas con las hojas de olivo para determinar su capacidad antimicrobiana.
- Comparar los datos de capacidad antioxidante frente a los otros órganos vegetativos del olivo.
- Difundir los datos obtenidos de las hojas de *Olea europaea* para incrementar su conocimiento e incentivar a la investigación por parte de la población.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* [Internet]. 2020 [citado el 3 de diciembre de 2025];25(1). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
2. Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges [Internet]. Vol. 14, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2023 [citado el 13 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
3. Goh ET, Kirby G, Rajadas J, Liang XJ, Tan A. Accelerated Wound Healing Using Nanoparticles. En: *Nanoscience in Dermatology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016 [citado el 1 de diciembre de 2025]. p. 287–306. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
4. Khan Y, Sadia H, Ali Shah SZ, Khan MN, Shah AA, Ullah N, et al. Classification, Synthetic, and Characterization Approaches to Nanoparticles, and Their Applications in Various Fields of Nanotechnology: A Review [Internet]. Vol. 12, *Catalysts*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022 [citado el 7 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/catal12111386>
5. Burlec AF, Corciova A, Boev M, Batir-Marin D, Mircea C, Cioanca O, et al. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles [Internet]. Vol. 16, *Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023 [citado el 7 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/10/1410>
6. Thakur M, Sharma A, Chandel M, Pathania D. Modern applications and current status

- of green nanotechnology in environmental industry. En: Green Functionalized Nanomaterials for Environmental Applications [Internet]. Elsevier; 2022 [citado el 9 de diciembre de 2025]. p. 259–81. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823137-1.00010-5>
7. Khursheed R, Dua K, Vishwas S, Gulati M, Jha NK, Aldhafeeri GM, et al. Biomedical applications of metallic nanoparticles in cancer: Current status and future perspectives [Internet]. Vol. 150, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson s.r.l.; 2022 [citado el 15 de septiembre de 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222003407>
 8. Bansal M, Deepika, Jyoti N, Bharti A, Sharma S, Kumar R. Plant-Mediated green synthesis of copper, gold, and silver nanoparticles: Biomedical applications and future prospects. Indian J Nat Prod Resour [Internet]. el 1 de diciembre de 2025 [citado el 16 de octubre de 2025];16(4):523–43. Disponible en: <https://or.niscpr.res.in/index.php/IJNPR/article/view/18724/5180>
 9. Bharadwaj KK, Rabha B, Pati S, Sarkar T, Choudhury BK, Barman A, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as beneficial prospect for cancer theranostics [Internet]. Vol. 26, Molecules. MDPI; 2021 [citado el 10 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules26216389>
 10. George G, Wilson R, Joy J. Ultraviolet Spectroscopy: A Facile Approach for the Characterization of Nanomaterials. En: Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization [Internet]. Elsevier; 2017 [citado el 8 de diciembre de 2025]. p. 55–72. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00003-0>
 11. Saqr A Al, Khafagy ES, Alalaiwe A, Aldawsari MF, Alshahrani SM, Anwer MK, et al. Synthesis of gold nanoparticles by using green machinery: Characterization and in vitro toxicity. Nanomaterials [Internet]. el 1 de marzo de 2021 [citado el 9 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.03.001>

- 2025];11(3):1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/nano11030808>
12. Coman C, Leopold LF, Rugină OD, Barbu-Tudoran L, Leopold N, Tofană M, et al. Green synthesis of gold nanoparticles by *Allium sativum* extract and their assessment as SERS substrate. *Journal of Nanoparticle Research* [Internet]. enero de 2014 [citado el 8 de diciembre de 2025];16(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2158-4>
 13. Dutta A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En: *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado el 22 de septiembre de 2025]. p. 73–93. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>
 14. Tosi MM, Ramos AP, Esposto BS, Jafari SM. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. En: *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado el 7 de octubre de 2025]. p. 191–211. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00006-7>
 15. Ponce A, Mejía-Rosales S, José-Yacamán M. Scanning transmission electron microscopy methods for the analysis of nanoparticles. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2012 [citado el 10 de noviembre de 2026];906:453–71. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_37
 16. Dargent Chamot E. *Olivos y olivas en la historia del Perú* [Internet]. Primera Edición. Lima: Universidad Ricardo Palma, Escuela de Turismo, Hotelería y Gastronomía; 2021 [citado el 19 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/20929/n/libro-olivos-y-olivas.pdf>
 17. Barreda Polar C. Análisis exploratorio de la condición de vigor en el cultivo de olivo. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [Internet]. 2024 [citado el 15 de octubre de 2025]; Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/7308160/5543457-analisis->

- exploratorio-de-la-condicion-de-vigor-en-el-cultivo-de-olivo.pdf?v=1732917106
18. ENFEN. Informe técnico N° 35-2025: 02273SENA-35 [Internet]. Lima; 2025 ago [citado el 9 de diciembre de 2025]. Disponible en: <http://enfen.imarpe.gob.pe>
 19. Ravindran PN. The encyclopedia of herbs & spices. Vol. 1. CAB International; 2017.
 20. Instituto Tecnológico de la Producción (ITP). Aceite de oliva extra virgen gana medalla de oro en concurso internacional. Gobierno del Perú [Internet]. el 10 de octubre de 2021 [citado el 31 de diciembre de 2025]; Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/itp/noticias/543607-aceite-de-oliva-extra-virgen-gana-medalla-de-oro-en-concurso-internacional?utm_source=chatgpt.com
 21. Acar-Tek N, Ağagündüz D. Olive Leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia [Internet]. Vol. 76, Annals of Nutrition and Metabolism. S. Karger AG; 2020 [citado el 16 de septiembre de 2025]. p. 10–5. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000505508>
 22. Montaña A, Sánchez AH, López-López A, De Castro A, Rejano L. Chemical Composition of Fermented Green Olives: Acidity, Salt, Moisture, Fat, Protein, Ash, Fiber, Sugar, and Polyphenol. En: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 [citado el 6 de noviembre de 2025]. p. 291–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00031-0>
 23. Zhang C, Xin X, Zhang J, Zhu S, Niu E, Zhou Z, et al. Comparative Evaluation of the Phytochemical Profiles and Antioxidant Potentials of Olive Leaves from 32 Cultivars Grown in China. *Molecules* [Internet]. el 14 de febrero de 2022 [citado el 10 de octubre de 2025];27(4). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules27041292>
 24. Martínez-Navarrete N, Camacho Vidal M, Martínez Lahuerta J. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética* [Internet]. 2008 [citado el 31 de agosto de 2025];12:64–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/S1138->

0322(08)75623-2

25. Mex-Álvarez R, Garma-Quen PM, Guillen-Morales MM, Yanez-Nava D, Kantún-Haas JL, Novelo-Pérez MI, et al. POLIFENOLES Y ANTIOXIDANTES EXÓGENOS [Internet]. Atena Editora, editor. 2023 [citado el 2 de septiembre de 2025]. Disponible en: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/download-post/80156>
26. García Martínez EM, Fernández Segovia I, Fuentes López A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu [Internet]. Valencia; 2015 jun [citado el 9 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>
27. Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran T Bin, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. Food Chem X [Internet]. el 30 de marzo de 2022 [citado el 7 de octubre de 2025];13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
28. Boluda C, Terrero D. Iridoides y secoiridoides (1): clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. Revista de Fitoterapia [Internet]. 2013 [citado el 6 de noviembre de 2025];13:153–61. Disponible en: https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4347&doc_r=sn&num_volumen=34&secc_volumen=5963
29. Pubchem. National Center for Biotechnology Information. 2025 [citado el 2 de noviembre de 2025]. Oleuropein. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleuropein#section=Other-Identifiers>
30. Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation - A mini-review [Internet]. Vol. 18, Journal of

- Functional Foods. Elsevier Ltd; 2015 [citado el 25 de noviembre de 2025]. p. 926–40.
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.001>
31. Swiss Institute of Bioinformatics. SwissADME. 2025 [citado el 15 de octubre de 2025].
Oleuropein. Disponible en: <https://www.swissadme.ch/>
32. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. MSKCC. 2023 [citado el 28 de agosto de 2025]. Olive Leaf: Purported Benefits, Side Effects & More. Disponible en: <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/olive-leaf>
33. Zaric BL, Macvanin MT, Isenovic ER. Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications [Internet]. Vol. 154, International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd; 2023 [citado el 5 de diciembre de 2025].
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106346>
34. Tvrdá E, Benko F. Free radicals: what they are and what they do. En: Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants [Internet]. Elsevier; 2020 [citado el 5 de diciembre de 2025]. p. 3–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00001-9>
35. Pawan Kumar M. Animal Biotechnology as a Tool to Understand and Fight Aging. En: Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation [Internet]. Second Edition. Elsevier Inc.; 2020 [citado el 8 de octubre de 2025]. p. 235–50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00010-0>
36. NCI Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute. [citado el 5 de agosto de 2025].
Antioxidant. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/antioxidant>
37. Parrish AR. Hypoxia/Ischemia Signaling. En: Comprehensive Toxicology [Internet]. Second Edition. 2010 [citado el 11 de octubre de 2025]. p. 529–42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00228-1>

38. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action [Internet]. Vol. 19, *Molecules*. MDPI AG; 2014 [citado el 3 de octubre de 2025]. p. 19180–208. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
39. Quintanar A, Calderón J. LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES. *Revista de Educación Química* [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre de 2025];28(3):89–101. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49016098004>
40. Siddeeg A, AlKehayez NM, Abu-Hiamed HA, Al-Sanea EA, AL-Farga AM. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview [Internet]. Vol. 28, *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V.; 2021 [citado el 16 de septiembre de 2025]. p. 1633–44. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
41. Mendoza Isaza NA, Hoyos–Arbeláez JA, Peláez-Jaramillo CA. Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de Stevia rebaudiana en varios modelos in vitro. *Revista EIA* [Internet]. el 10 de agosto de 2020 [citado el 14 de octubre de 2025];17(34):1–9. Disponible en: <https://doi.org/10.24050/reia.v17i34.1282>
42. Pérez Jiménez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos [Internet]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid; 2007 [citado el 12 de septiembre de 2025]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/1671>
43. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review [Internet]. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021 [citado el 16 de octubre de 2025]. p. 3380. Disponible en:

<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

44. Guajardo-Fajardo P. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de diferentes Variedades Autóctonas de Higo (*Ficus carica*) de las Islas Baleares [Internet]. Universitat de les Illes Balears; 2019 [citado el 21 de septiembre de 2025]. Disponible en: https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149796/Estevez_GuajardoFajardo_Paula.pdf
45. Rioja A, Vizaluque B, Aliaga-Rossel E, Tejeda L, Book O, Mollinedo P, et al. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL, FENOLES TOTALES, Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UNA BEBIDA NO LÁCTEA EN BASE A GRANOS DE CHENOPODIUM QUINOA UTILIZADO. *Revista Boliviana de Química* [Internet]. 2018 [citado el 15 de septiembre de 2025];35(5):168–76. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4263/426358213006/html/>
46. Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Bakan KS, Erçağ E, Esin Çelik S, et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology [Internet]. Vol. 3, *Analytical Methods*. 2011 [citado el 13 de octubre de 2025]. p. 2439–53. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C1AY05320E>
47. Raposo F, Borja R, Gutiérrez-González JA. A comprehensive and critical review of the unstandardized Folin-Ciocalteu assay to determine the total content of polyphenols: The conundrum of the experimental factors and method validation [Internet]. Vol. 272, *Talanta*. Elsevier B.V.; 2024 [citado el 6 de septiembre de 2025]. p. 125771. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125771>
48. Dominguez-López I, Pérez M, Lamuela-Raventós RM. Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples [Internet]. Vol. 64, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd.; 2023 [citado el 16 de septiembre de 2025]. p. 10048–54. Disponible en:

<https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031>

49. Topuz S, Bayram M. Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. *J Food Process Preserv* [Internet]. julio de 2022 [citado el 10 de octubre de 2025];46(6). Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15697>
50. Kousar Z, Manzoor S, Naz S, Shafiq Shahid M. Extraction, Fractionation, Phytochemical Profile, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Cassia absus* L. and *Citrus medica* L. *Pharmaceutical and Biomedical Research* [Internet]. el 1 de abril de 2023;9(2):133–46. Disponible en: <http://pbr.mazums.ac.ir/article-1-502-en.html>
51. Waters Corporation. Waters Corporation. 2025 [citado el 15 de noviembre de 2025]. ¿Qué es la HPLC (cromatografía líquida de alta resolución)? Disponible en: <https://www.waters.com/nextgen/xg/es/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography.html>
52. Waters Corporation. Waters Corporation. 2025 [citado el 15 de noviembre de 2025]. Modos de separación por HPLC. Disponible en: <https://www.waters.com/nextgen/mx/es/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography.html>
53. Cerón Lilian JC, Ramírez Orellana J. VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC), PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA + BENZOCAÍNA + ENOXOLONA EN COMPRIMIDOS ORALES [Internet]. 2017 [citado el 11 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7224>
54. Harvey D. Cromatografía de Reparto. En: *Análisis Instrumental* [Internet]. DePauw University; 2022 [citado el 6 de octubre de 2025]. Disponible en:

<https://espanol.libretexts.org/@go/page/79031>

55. Gomis Yagües V. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN. En: Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial [Internet]. Universidad de Alicante; 2008 [citado el 12 de octubre de 2025]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10045/8248>
56. Sub Gerencia de Planeamiento. Gobierno Regional de Moquegua. 2022 [citado el 16 de octubre de 2025]. PLAN DE DESARROLLO REGIONAL CONCERTADO MOQUEGUA 2032. Disponible en: <https://consultas.regionmoquegua.gob.pe/wp-content/uploads/2022/12/PLAN-DE-DESARROLLO-REGIONAL-CONCERTADO-MOQUEGUA-AL-2032-VISADO.pdf>
57. Sifuentes E, Castro Ballvé E, Paredes J. Boletín Estadístico Mensual “Valor Bruto de la Producción Agropecuaria”: Diciembre 2024 [Internet]. Sistema Integrado de Estadística Agraria. Lima: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI); 2025 [citado el 16 de octubre de 2025]. Disponible en: https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos_estadisticas/mensual/VBP/2024/VBP_12_2024.pdf
58. Incore Perú. Incore Perú. 2025 [citado el 11 de noviembre de 2025]. Economía de Moquegua cayó 3.6% en el segundo trimestre de 2025. Disponible en: <https://incoreperu.pe/noticias/economia-de-moquegua-cayo-36-en-el-segundo-trimestre-de-2025>
59. Daruich De Souza C, Ribeiro Nogueira B, Rostelato MECM. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction [Internet]. Vol. 798, Journal of Alloys and Compounds. Elsevier Ltd; 2019 [citado el 13 de noviembre de 2025]. p. 714–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>

60. Musci M, Yao S. Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. el 17 de noviembre de 2017 [citado el 4 de octubre de 2025];68(8):913–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1311844>
61. Berrocal Graciano S. Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de *Solanum nitidum* R. & P. “ñuñunga” [Internet]. Ayacucho; 2018 [citado el 8 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/e7f5e583-5122-4577-a8df-bd103650b762/content>
62. Vargas Paucar H. Contenido de flavonoides y fenoles totales en hojas de tres especies del género *Senecio* y determinación de su actividad antioxidante in vitro [Internet]. [Huamanga]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017 [citado el 9 de octubre de 2025]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4156>
63. Apak R, Bener M, Çelik SE, Bekdeşer B, Şen FB. The CUPRAC method, its modifications and applications serving green chemistry. En: *Green Analytical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2025 [citado el 13 de octubre de 2025]. p. 357–83. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16122-3.00007-X>
64. Genc N, Yildiz I, Chaoui R, Erenler R, Temiz C, Elmastas M. Biosynthesis, characterization and antioxidant activity of oleuropein-mediated silver nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* [Internet]. el 14 de julio de 2021 [citado el 31 de octubre de 2025];51(3):411–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1792495>
65. Al-Rimawi F. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2014 [citado el 16 de octubre de 2025];22(3):285–9. Disponible en:

- <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.10.002>
66. Huguet-Casquero A, López-Méndez TB, Gainza E, Pedraz JL. Development and validation of an eco-friendly HPLC-DAD method for the determination of oleuropein and its applicability to several matrices: olive oil, olive leaf extracts and nanostructured lipid carriers. *Green Chemistry* [Internet]. el 7 de junio de 2020 [citado el 11 de octubre de 2025];22(11):3495–505. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/D0GC00965B>
 67. Ccencho Huayhua JA, Valero Quispe GE. Determinación del Ácido 1,5-Dicafeoilquínico (CINARINA) por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en Productos Comerciales de Alcchofa, Arequipa - 2015 [Internet]. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María; 2015 [citado el 16 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/5866>
 68. International Council for Harmonisation. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures [Internet]. 2023 dic [citado el 15 de noviembre de 2025]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf
 69. Santa Cruz A. CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN MIEL [Internet]. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María; 2019 [citado el 9 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/server/api/core/bitstreams/42d2e24d-81b0-41cf-b288-cf33956680e8/content>
 70. Zegarra Zegarra M. Síntesis verde de catalizadores de oro para la obtención de ácido lactobionico [Internet]. Arequipa; 2022 oct [citado el 15 de agosto de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/5530ca52-d757-4824-98b8-aad80431f6a4>
 71. Rashid EU, Nawaz S, Munawar J, Sarker A, Hussain S, Iqbal HMN, et al. Organic and

- inorganic nanoparticles. En: Smart Polymer Nanocomposites: Design, Synthesis, Functionalization, Properties, and Applications [Internet]. Elsevier; 2022 [citado el 12 de septiembre de 2025]. p. 93–119. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91611-0.00014-1>
72. Malvern. Zetasizer Nano User Manual MAN0485 Issue 1.1 [Internet]. United Kingdom; 2013 abr [citado el 6 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>
73. Varenne F, Vauthier C. Practical guidelines for the characterization and quality control of nanoparticles in the pharmaceutical industry. En: Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing [Internet]. Springer; 2021 [citado el 19 de noviembre de 2025]. p. 487–508. Disponible en: <https://hal.science/hal-03358147/document>
74. Al-Dabbas MM, Al-Jaloudi R, Hamad HJ, Al-Nawasrah BA, Al-Refaie D, Abughoush M, et al. Antioxidant, Antibacterial, and Antidiabetic Activities of Different Extracts from Wild Olive Leaves Grown in United Arab Emirates. En: Processes [Internet]. 2nd Edition. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025 [citado el 15 de octubre de 2025]. p. 998. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pr13040998>
75. Önder D, Erdoğan Ü, Önder S. Comparison of biochemical and antioxidant activities of ultrasonic-assisted extraction with different solvents in olive leaf. Biotech Studies [Internet]. 2023 [citado el 15 de noviembre de 2025];32(1):31–40. Disponible en: <https://doi.org/10.38042/biotechstudies.1274148>
76. Khelouf I, Karoui IJ, Lakoud A, Hammami M, Abderrabba M. Comparative chemical composition and antioxidant activity of olive leaves *Olea europaea* L. of Tunisian and Algerian varieties. Heliyon [Internet]. el 1 de diciembre de 2023 [citado el 13 de septiembre de 2025];9(12). Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22217>

77. Kabbash EM, Abdel-Shakour ZT, El-Ahmady SH, Wink M, Ayoub IM. Comparative metabolic profiling of olive leaf extracts from twelve different cultivars collected in both fruiting and flowering seasons. *Sci Rep* [Internet]. 2023 [citado el 17 de septiembre de 2025];13(1):612. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27119-5>
78. Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* [Internet]. 2015 [citado el 15 de noviembre de 2025];77:92–108. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691530185X>
79. Žuntar I, Putnik P, Kovačević DB, Nutrizio M, Šupljika F, Poljanec A, et al. Phenolic and antioxidant analysis of olive leaves extracts (*olea europaea* L.) obtained by high voltage electrical discharges (HVED). *Foods* [Internet]. el 7 de julio de 2019 [citado el 16 de octubre de 2025];8(7). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/foods8070248>
80. Botsoglou E, Govaris A, Pexara A, Ambrosiadis I, Fletouris D. Effect of dietary olive leaves (*Olea europaea* L.) on lipid and protein oxidation of refrigerated stored n-3-enriched pork. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. el 1 de enero de 2014 [citado el 18 de octubre de 2025];49(1):42–50. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12272>
81. Moura-Alves M, Souza VGL, Silva JA, Esteves A, Pastrana LM, Saraiva C, et al. Characterization of Sodium Alginate-Based Films Blended with Olive Leaf and Laurel Leaf Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Technology. *Foods* [Internet]. el 8 de noviembre de 2023 [citado el 11 de noviembre de 2025];12(22). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/foods12224076>
82. Sivakavinesan M, Vanaja M, Lateef R, Alhadlaq HA, Mohan R, Annadurai G, et al. Citrus limetta Risso peel mediated green synthesis of gold nanoparticles and its

- antioxidant and catalytic activity. *J King Saud Univ Sci* [Internet]. octubre de 2022 [citado el 30 de septiembre de 2025];34(7):102235. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364722004165>
83. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Appendix F - Guidelines for Standard Method (AOAC). AOAC International [Internet]. 2016 [citado el 9 de diciembre de 2025]; Disponible en: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
84. Carrara M, Kelly MT, Griffin L, Margout-Jantac D. Development and cross-validation of simple HPLC-fluorescence and UPLC-MS-UV methods for rapid determination of oleuropein in olive leaves. *Phytochemical Analysis* [Internet]. abril de 2024 [citado el 10 de diciembre de 2025];35(3):476–82. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pca.3302>
85. Folorunso A, Akintelu S, Oyebamiji AK, Ajayi S, Abiola B, Abdusalam I, et al. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of gold nanoparticles from leaf extracts of *Annona muricata*. *J Nanostructure Chem* [Internet]. 2019 [citado el 14 de noviembre de 2025];9(2):111–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40097-019-0301-1>
86. Palomba M, Carotenuto G, Raucci MG, Ruotolo A, Longo A. Sustainable Eco-Friendly Synthesis of Gold Nanoparticles Anchored on Graphene Oxide: Influence of Reductant Concentration on Nanoparticle Morphology. *Materials* [Internet]. 2025 [citado el 1 de noviembre de 2025];18(13):3003. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ma18133003>

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de Clasificación Taxonómica



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



CONSTANCIA N° 43-2024-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica presentada por Sandro Adrian Solorzano Villanueva y Jose Efrain Villanueva Lambruschini, Egresados de la Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Bioquimicas y Biotecnologicas, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquimica de la Universidad Catolica de Santa Maria, para la realización de su tesis **SINTESIS VERDE Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE ORO Y CUANTIFICACION DE OLEUROPEINA A PARTIS DE HOJAS DE OLIVO (OLEA EUROPAEA VARIEDAD SEVILLANA) PROVENIENTES DEL VALLE EL ALGARROBAL ILO.** La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente especie.

Division Magnoliophyta
Clase Magnoliopsida
Subclase Asteridae
Orden Lamiales
Familia Oleaceae
Genero Olea
Especie *Olea europaea* L Var. *sevillana*

Se le expide la presente a solicitud del interesado

Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Arequipa, 13 de Diciembre del 2024

Anexo 3. Recolección de las hojas de olivo en la provincia de Ilo



Anexo 4. Secado de las hojas de olivo



Anexo 5. Molienda de las hojas de olivo



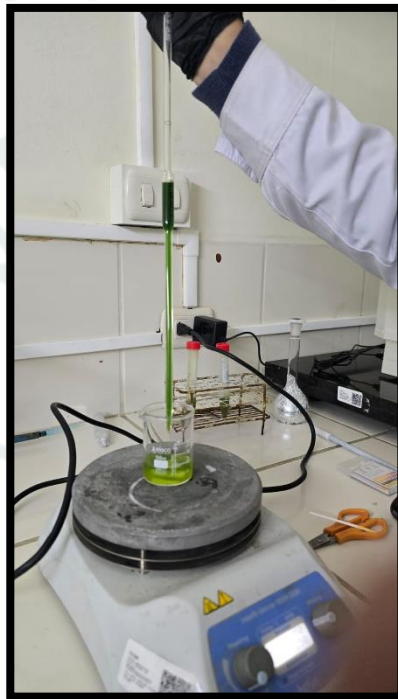
Anexo 6. Pesaje del estándar de Oleuropeína



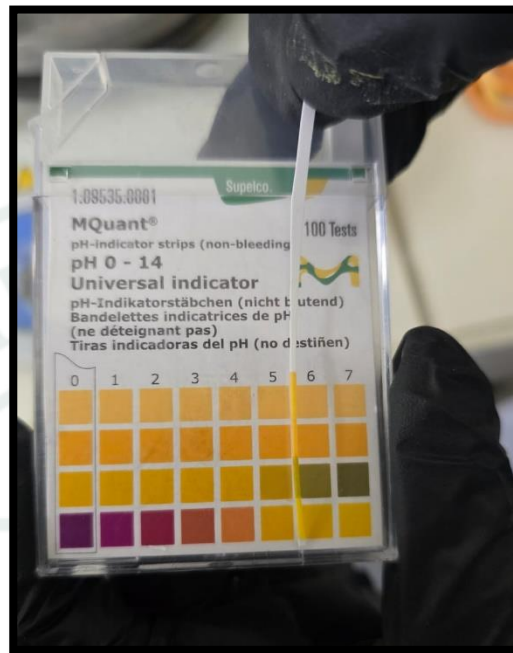
Anexo 7. Filtración previa para la lectura en el HPLC



Anexo 8. Síntesis biológica de las nanopartículas de oro (AuNPs)



Anexo 9. Lectura de pH de las soluciones coloidales de AuNPs



Anexo 10. Ultrasonicación de las soluciones coloidales de AuNPs

