

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

E.A.P. DE QUÍMICA

**Estudio fitoquímico, evaluación de la actividad
antioxidante y antimicrobiana de la corteza de
“triumfetta semitriloba” jacq (motecepo) y análisis de
parámetros reológicos del mucílago**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Químico

AUTOR

Milan Toledo Nauto

ASESOR

Julio César Santiago Contreras

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

*A DIOS Por ser el mayor soporte en mi vida,
el refugio en cada uno de los momentos vividos
y permitirme lograr ser lo que hoy en día soy.*

*A mis maravillosos padres, María y Pedro,
que siempre me han entregado lo mejor en la vida,
agradecerles todo esto y mucho más,
por haber creído en mí y apoyado todos mis sueños e ideales,
por enseñarme el valor de la perseverancia y el esfuerzo,
por luchar tanto para sacarnos adelante.
Gracias por ser como son.
Los amo.*

*A mis queridos hermanitos Anel, Irvin y Lenin
por su cariño y paciencia al realizar este trabajo.
Por su labor diaria como hermanos-amigos
dándome ánimos en todo momento y creyendo tanto en mí.
por su constante estímulo Por su apoyo, colaboración y
compañía incondicional en mi vida.*

*A mis abuelito, tios y primos
por el cariño y confianza que me brindan en todo momento,
pero sobre todo por estar, cada uno a su manera,
respaldándome para alcanzar mis objetivos.*

AGRADECIMIENTOS

Durante esta etapa de mi vida que hoy culmina, quiero agradecer de todo corazón a aquellas personas e instituciones que hicieron posible que el presente trabajo de Tesis llegue a un final feliz, aún a los que no se encuentren en esta lista, pero que estuvieron en este camino, GRACIAS!!!

A mi asesor, Dr. Julio Cesar Santiago Contreras, por abrirme las puertas de su laboratorio LIDQO y por la confianza depositada, quien leyó mis numerosas revisiones y me ayudó a dar sentido a la confusión.

A las jurados de tesis Mg. Gloria Eva Tomas Chota y Juana Huaman Malla por sus críticas y consejos para hacer de este un mejor trabajo.

Lic. Magali Bardalez y la profesora Isabel Cabello Liu por sus enseñanzas y orientaciones eficaces en el aislamiento de un compuesto y el uso de su equipamiento en el laboratorio farmacéutico Hersil.

Al Ing. A. Samuel Silva Baigorria profesor de la UNMSM, quien desinteresadamente me enseñó a determinar la reología en el Laboratorio de ciencia de los alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad Peruana Unión.

A Ulrike Tarazona por su colaboración y buena disposición en el desarrollo de la actividad antimicrobiana en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología de la UNMSM

A la Dra. Lelis Ticona Arenas por su apoyo en la determinación del peso molecular mediante la técnica de CPG. Profesora del Instituto de Química de la Universidad Federal De Rio Grande del Sur, Brasil.

A la Mg. Carmen Zegarra Urquia por sus consejos, comprensión, orientación y permanente ayuda en el desarrollo de esta tesis, además de ser amiga y darme la mano cuanto más lo necesitaba.

Al Mg. Fabio Espichan por su colaboración en algunas de las inquietudes que se presentaron en el desarrollo de esta tesis.

A Rosa Natalie Avilés, por compartir sus experiencias en la determinación de la actividad antioxidante y prestarme sus materiales.

A la profesora Marta Bravo quien me apoyó desinteresadamente y me permitió ingresar a su Laboratorio de Química de los Alimentos donde compartimos gratos momentos y trabajamos incansablemente para alcanzar nuestros objetivos.

A mis compañeros del laboratorio de Investigación y Desarrollo en Química Orgánica (LIDQO) por sus diversas formas de apoyo, colaboración y amistad en especial a Yury y Marlene.

A los profesores quienes de alguna u otra manera me apoyaron a lo largo del camino para culminar esta tesis, en especial al profesor Marco Guerrero, Ale Borja, profesora Scila Reategui, Ing. Reina, Crisostomo Gordillo, etc.

A la microbióloga Nadia Galindo, Lic. Susy Cruz secretaria del Decanato de la Facultad de Química y Amelia Collantes secretaria de USAQ por su apoyo para presentar este trabajo preliminar en el congreso de Argentina.

A mis amigos de USAQ que laboraron y laboran en el laboratorio, gracias por su apoyo y el tiempo compartido.

A todos mis amigos de la UNMSM por los gratos momentos que hemos compartido, su enorme apoyo y su inigualable amistad, en especial a Sonia, Meche, Layda y Gladis quienes están siempre pendientes de mí y me dan palabras de aliento para continuar, por compartir los altos y bajos de esta vida universitaria y por esta amistad que espero dure para toda la vida.

Al vicerrectorado de investigación de la UNMSM por financiar éste proyecto de Tesis con el "Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado 2013".

Finalmente a mi alma mater UNMSM por entregarme una educación de calidad que me da la seguridad necesaria para enfrentarme a la vida y al mundo.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- Abs: Absorbancia
- AG: Ácido gálico
- AT: Ácido Tánico
- ATCC: American Type Culture Collection
- CCF: Cromatografía en capa fina
- Cl_{50} : Cantidad de concentración necesaria para inhibir en un 50 % al radical
- CM: Concentración madre
- CPG: Cromatografía de permeación en gel
- DPPH: 2,2 – Difetil-1-Picrilhidrazil
- EAA: Espectroscopia de absorción atómica
- EM: Extracto metanólico
- EHT: Extracción hidro-alcohólico de taninos
- FM: Fase móvil
- K: Índice de consistencia
- IR: Infra rojo
- IC: Intervalo de confianza
- IP: Intervalo de predicción
- MIC: Concentración mínima inhibitoria
- n: Índice de fluidez
- PhOH: Polifenol
- Sm: Solución madre
- TTC: Cloruro-2, 3, 5 -Trifenil Tetrazolio
- UV-Vis: Ultra violeta visible
- %I: Porcentaje de inhibición
- τ : Esfuerzo de corte
- γ : Velocidad de deformación
- η_{app} : Viscosidad aparente
- \emptyset : Diámetro del Halo
- $\eta@50$: (viscosidad aparente respecto a la velocidad de deformación de $10\ s^{-1}$ y $10\ s^{-1}$)

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
4. OBJETIVO GENERAL	9
5. HIPÓTESIS	9
6. FUNDAMENTO TEÓRICO	10
6.1. Generalidades.....	10
6.1.1. " <i>Triumfetta semitriloba</i> " Jacq.....	10
6.1.2. Descripción botánica.....	10
6.1.3. Estudios realizados del arbusto de " <i>Triumfetta semitriloba</i> " Jacq.....	11
6.2. Estudio fitoquímico.....	11
6.3. Metabolismo.....	12
6.4. Compuestos fenólicos	13
6.4.1 Derivados del ácido cinámico y poliactato.....	15
6.5 Taninos	17
6.5.1 Taninos condensados o proantocianidina	18
6.5.2 Flobafenos.....	19
6.5.3 Hidrólisis y autocondensación ácida de taninos	19
6.5.4 Análisis químico de taninos condensados.....	20
6.5.4.1 Método de proantocianidina	20
6.5.4.2 Método de conversión de proantocianidinas en antocianidinas...20	
6.5.4.3 Método de la vainillina-HCl.....	20
6.6 Análisis químico de polifenoles y taninos.....	21
6.6.1 Método de Folin- Ciocalteu	21
6.7 Actividad antioxidante.....	21
6.7.1 Radicales libres	21
6.7.2 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante	21
6.7.3 Método del DPPH (2,2 – difenil-1-picrilhidrazil).....	22
6.8 Metabolitos de plantas como agentes antimicrobianos.....	23
6.9 Carbohidratos.....	24

6.9.1	Polisacáridos	24
6.9.1.1	Mucílagos vegetales o hidrocoloides vegetales.....	25
6.9.1.2	Análisis químico de carbohidratos.....	25
6.10	Reología.....	27
6.10.1	Ley de Ostwald o ley de potencia	28
6.10.2	Fluidos no Newtonianos, independientes del tiempo	29
6.11	Análisis instrumental	30
6.11.1	Espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-Vis)	30
6.11.2	Espectrometría de absorción atómica (EAA)	31
6.11.3	Espectroscopia de absorción molecular infrarrojo (IR)	31
6.11.4	Cromatografía de permeación en gel (CPG).....	32
7.	PARTE EXPERIMENTAL.....	33
7.1.	Material vegetal.....	33
7.2.	Materiales, equipos y reactivos de laboratorio.....	33
7.3.	Acondicionamiento del material vegetal	37
7.4.	Determinación del contenido de humedad de la corteza	37
7.5.	Determinación del contenido de ceniza de la corteza.....	37
7.6.	Determinación del contenido de minerales	37
7.7.	Comparación de técnicas de extracción de la corteza.....	38
7.8.	Extracción sucesiva de la corteza con solventes de polaridad creciente	38
7.9.	Análisis preliminar de la marcha fitoquímica.....	39
7.10.	Obtención del mucílago y del extracto metanólico (EM)	40
7.10.1.	Extracción y liofilización del mucílago	40
7.10.2.	Extracto metanólico (EM)	40
7.11.	Cuantificación de polifenoles totales	40
7.12.	Cuantificación de taninos condensados	41
7.13.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	42
7.13.1.	Ensayo preliminar para la actividad antioxidante.....	42
7.13.2.	Determinación de actividad antioxidante del ácido ascórbico, EM y mucílago	42
7.14.	Análisis de los posibles metabolitos responsables de la actividad antioxidante.....	44

7.14.1. Mapeo de metabolitos con actividad antioxidante	44
7.15. Análisis químico de taninos condensados.....	44
7.15.1. Análisis de proantocianidinas	44
7.15.2. Conversión de proantocianidinas en antocianidinas.....	44
7.15.3. Análisis de antocianidinas	45
7.15.4. Monitoreo de aislamiento de antocianidinas.....	45
7.16. Aislamiento del metabolito a partir del extracto EM para análisis por CPG .45	
7.16.1. Preparación de la fracción hexanica (método de partición)	45
7.16.2. Empacado y acondicionamiento de la columna cromatográfica	46
7.16.3. Preparación de la muestra para corrida en la columna cromatográfica	46
7.17. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico (EM).....	46
7.17.1. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana	46
7.17.2. Evaluación cuantitativa de concentración mínima inhibitoria (CMI)	47
7.17.3. Cálculos correspondientes, para la evaluación de la actividad antimicrobiana.....	48
7.18. Análisis de carbohidratos del mucílago.....	48
7.18.1. Aislamiento de carbohidratos	48
7.18.2. Análisis cualitativo preliminar.....	49
7.18.3. Cuantificación de carbohidratos totales: Método espectrofotométrico Fenol- ácido sulfúrico.....	49
7.19. Análisis de los parámetros reológicos del mucílago.....	50
7.19.1. Obtención del mucílago	50
7.19.2. Medida de la viscosidad.....	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
8.1. Determinación del contenido de humedad y ceniza de la corteza	51
8.2. Determinación del contenido de minerales de la corteza.....	51
8.3. Comparación de técnicas extracción de la corteza.....	51
8.4. Extracción sucesiva de la corteza con solventes de polaridad creciente	52
8.5. Análisis preliminar de la marcha fitoquímica.....	52
8.6. Determinación del pH de los extractos obtenidos.....	54
8.7. Cuantificación de polifenoles totales	54
8.8. Cuantificación de taninos	55

8.9. Evaluación de la actividad antioxidante.....	55
8.10. Análisis de los posibles metabolitos responsables de la actividad antioxidante.....	59
8.10.1. Mapeo de metabolitos con actividad antioxidante.....	59
8.10.2. Análisis químico de taninos condensados.....	60
8.11. Análisis instrumental de los extractos de la corteza.....	62
8.11.1. Espectro UV-Vis del extractos.....	62
8.11.2. Espectros IR del extractos	67
8.11.3. Aislamiento del metabolito a partir del extracto EM para análisis por CPG.....	70
8.12. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico (EM)	72
8.12.1. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana	72
8.12.2. Evaluación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI)..	72
8.13. Análisis de carbohidratos del mucílago	73
8.13.1. Prueba de Fehling:.....	73
8.13.2. Cromatografía en capa fina (CCF)	73
8.13.3. Cuantificación de carbohidratos totales: Método espectrofotométrico Fenol - ácido sulfúrico	73
8.14. Análisis de los parámetros reológicos del mucílago	74
9. CONCLUSIONES	78
10. RECOMENDACIONES.....	81
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
12. ANEXO	90
12.1. Acondicionamiento del material vegetal.....	90
12.2. Marcha fitoquímica de la corteza	90
12.3. Marcha fitoquímica de extractos de la corteza, obtenidos a partir de solventes de polaridad creciente.....	91
12.4. Obtención del mucílago de la corteza	93
12.5. Mucílago que coagula con el alcohol.....	93
12.6. Liofilización de la corteza	94
12.7. Evaluación de la actividad antioxidante.....	94
12.8. Conversión de proantocianidinas en antocianidinas.....	95
12.9. Cuantificación de polifenoles totales.....	95

12.10. Cuantificación de taninos	95
12.11. Cuantificación de carbohidratos totales.....	95
12.12. Columna cromatográfica.....	96
12.13. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico (EM).....	96
12.14. Análisis de los parámetros reológicos del mucílago.....	97
12.15. Constancia de la clasificación botánica de " <i>Triumfetta</i> <i>semitriloba</i> " Jacq.....	102
12.16. Publicación en el IV congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia - Argentina.....	103

ESQUEMAS

1. Esquema 1. Subfamilias de metabolitos secundarios.....	13
2. Esquema 2. Estructura básica de derivados del ácido cinámico.....	16
3. Esquema 3. Clasificación de taninos.....	17
4. Esquema 4. Clasificación de los carbohidratos.....	24
5. Esquema 5. Tipos de comportamiento de fluidos y modelos.....	28
6. Esquema 6. Esquema de trabajo de investigación.....	36

RESUMEN

El género *Triumfetta* tiene varias especies tales como *Triumfetta pilosa* Poth, con actividad hipoglucemiante y antihelmíntica (Deepak, 2011); *Triumfetta rhomboidea* Jacq, con actividad antibacteriana (Devmurari, 2010). La especie *Triumfetta semitriloba* Jacq ha sido muy poco estudiada. Sólo se conoce un estudio de sus hojas, las que presentaron actividad giardicida. (Barraza, 2011), sin embargo es muy utilizada en la medicina tradicional.

En este trabajo de investigación se pretende contribuir al conocimiento fitoquímico de la corteza de *Triumfetta semitriloba* Jacq, puesto que los reportes de metabolitos de esta parte de la planta son escasos.

Esta especie fue recolectada en la localidad de Generosa provincia de Chincheros departamento de Apurímac región quechua (entre 1900 y 2500 msnm), y fue clasificada en el Museo de Historia Natural como "*Triumfetta semitriloba*" Jacq, cuyo nombre vulgar es "Moteccepo".

Se acondicionó la corteza y se determinó 70,00 % de humedad; 2,76 % de ceniza, y mediante el análisis de minerales se encontró que posee una alta cantidad de Ca (4007,16 ppm). Luego se realizó una comparación de técnicas de extracción, determinándose un mayor rendimiento en la maceración durante 2 semanas. Después se realizó la extracción sucesiva de la corteza con solventes de polaridad creciente encontrándose mayor extracción con agua (41,00 %) y menor extracción con acetato de etilo (0,37 %).

En la marcha fitoquímica de la corteza se comprobó la presencia de saponinas esteroidales, taninos condensados, flavonoides y cumarinas. Al cuantificar polifenoles totales y taninos se encontró 1184,96 mgAG/100g y 751,20 mgAT/100g respectivamente.

La evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH del extracto metanólico y del extracto acuoso (mucílago liofilizado), reportó un CI_{50} de 21,08 $\mu\text{g/mL}$ y 169,90 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Luego se analizó los posibles metabolitos responsables de esta actividad antioxidante, mediante el análisis de los extractos por CCF, espectroscopia UV-Vis, IR y CPG encontrándose presencia de flavanoles de las proantocianidinas.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico, se observó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mientras que frente a *Bacillus subtilis* no.

Finalmente en la evaluación del mucílago liofilizado se encontró 12,55 g(Glucosa)/100g de carbohidratos totales y al analizar los parámetros reológicos del mucílago se determinó un comportamiento de fluido no Newtoniano, pseudoplástico.

Así el mucílago de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq, resultó ser un fluido con un futuro promisorio para la elaboración de fitofármacos, en la industria de los alimentos, etc.

2. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país con una diversidad de flora única en el mundo, alberga aproximadamente el 10% de todas las plantas existentes en el planeta, la misma que está representada por más de 25,000 plantas, de las cuales cerca de 1,400 tienen propiedades curativas y algunas fueron usadas desde tiempos muy remotos. Debido a sus cualidades medicinales estas plantas se han convertido en el principal insumo de la industria farmacéutica a nivel mundial convirtiéndose en un valioso botiquín verde.

Así el género *Triumfetta* de la familia de las *Tiliaceaes*, dedicado a Triumfetti, botánico italiano, establecido por Plumier, adaptado después por Linneo y por todos los botánicos. (Ronquillo, 1876), tiene buena actividad en el tratamiento de diversas enfermedades, utilizadas en forma de infusión como diurético y como astringente mucilaginoso (Meléndez, 2011), puesto que la corteza de *Triumfetta* tiene la característica de formar mucilagos al entrar en contacto con el agua.

La mayor diversidad de especies del género *Triumfetta*, existen en los países de Perú, México, Paraguay, Brasil; Panamá, Puerto Rico, etc. (Floro Perú, 1956).

En el Perú la especie *Triumfetta* existe en los departamentos como Apurímac, Cusco, Junín, La Libertad, Loreto, San Martín, entre otros. (Tropicos.org, 2011)

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La especie "*Triumfetta semitriloba*" Jacq (Moteccepo) es utilizada en la medicina tradicional para combatir diversas enfermedades tales como: úlceras, disentería, dolor de estómago, afecciones renales, anti blenorragico, hemorroides, alivio de bilis, cálculos renales, etc. Además es usada como: cicatrizante de quemaduras y desinflamante (Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, 2009); sin embargo, no se dispone de información farmacológica, experimental, ni histórica de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq que certifique el uso terapéutico, solo los conocimientos medicinales son de origen y experiencia colectiva de los pueblos (Avalos, 2009).

4. OBJETIVOS GENERALES

El presente trabajo de investigación pretende contribuir al conocimiento fitoquímico e identificar los posibles compuestos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq. Así como también determinar las propiedades reológicas del mucílago.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq.
- Cuantificar polifenoles totales y taninos.
- Evaluar la actividad antioxidante del mucílago liofilizado y del extracto metanólico de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq.
- Evaluar a los posibles metabolitos responsables de esta actividad antioxidante, mediante el análisis por CCF, espectroscopia UV-Vis, IR y CPG
- Evaluar la actividad antimicrobiana y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico (EM) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Bacillus subtilis*.
- Aislar y cuantificar los carbohidratos totales del mucílago de la corteza.
- Analizar los parámetros reológicos del mucílago.

5. HIPÓTESIS

La corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq, contiene taninos en mayor cantidad en comparación a los demás metabolitos, los que posiblemente sean los responsables de la actividad antioxidante y de la actividad antimicrobiana.

El mucílago extraído de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq tiene las características necesarias para ser utilizado en la industria farmacéutica, de los alimentos y cosmética.

6. FUNDAMENTO TEÓRICO

6.1 GENERALIDADES

6.1.1 "*Triumfetta semitriloba*" Jacq

Arbusto de 1 a 2 m de alto, muy ramificado. Sus hojas tienen forma rómbica y puntiagudas, un poco lobuladas, los bordes con dientes desiguales; por ambas caras son velludas, pero por el reverso son más densos. Tienen flores amarillas, pequeñas al igual que los frutos, los cuales son redondos y con muchas espinitas que se caen con el tiempo. (Ver figura 1)

Originario de la región tropical, presente en climas cálidos, semiáridos y templados. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales, de montaña, de encino y de pino. (Novara, 1992)



Figura 1

6.1.2 Descripción botánica

- Reino: Plantae.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida.
- Subclase: Dilleniidae.
- Orden: Malvales.
- Familia: Tiliaceae.
- Género: *Triumfetta*.
- Especie: "*Triumfetta semitriloba*" Jacq.
- Nombre vulgar: "Moteccepo"

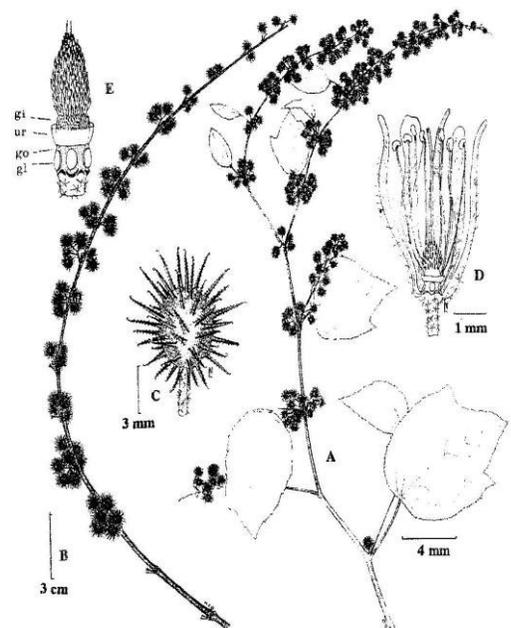


Figura 2

Sinónimos:

- *Triumfetta hirta* Vahl
- *Triumfetta ovata* DC.
- *Triumfetta tiliifolia* Vahl
- *Triumfetta althaeoides* Lam
- *Triumfetta rubricaulis* Kunth

6.1.3 Estudios realizados del arbusto de “*Triumfetta semitriloba*” Jacq.

Los estudios realizados sobre el arbusto de “*Triumfetta semitriloba*” Jacq, son escasos; sin embargo, se han encontrado reportes sobre su ecología de polinización (Covalletti, 1998), así como el estudio de las hojas, reportándose una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, ácido 1H-indol-3-carboxílico y flavonoides glicosidados (Barraza, 2011). También se han realizado análisis químico del aceite esencial de las hojas, encontrándose mayoritariamente trans- β -cariofilono, β -pineno, α -copaeno y α -humuleno (Quintero, 2013).

Por último hasta la fecha no han habido estudios sobre la corteza, solo se han reportado estudios del extracto acuoso, indicando la ausencia de acción inhibitoria in vitro de la actividad hidrolítica de la amilasa pancreática porcina, lipasa y proteasa, como modelo para las enzimas humanas (Arce y Urbina, 2003); por lo tanto, es la primera vez que se reporta el estudio fitoquímico, análisis instrumental, la actividad antioxidante y antimicrobiana de la corteza, así como el análisis de los parámetros reológicos del mucílago.

6.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO

La Fitoquímica es una disciplina científica, donde se inicia la etapa de la investigación permitiendo detectar o determinar cualitativamente los principales metabolitos presentes y a partir de allí orientar la extracción, aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales, se puede nombrar de distintas maneras a este estudio como: marcha fitoquímica, escreening fitoquímico, tamizaje fitoquímico, cribado, etc.

6.3 METABOLISMO

En los organismos vivos, los compuestos químicos son sintetizados y degradados por medio de una serie de reacciones químicas mediadas por enzimas; a estos procesos se le conoce como metabolismo, comprendiendo catabolismo (degradación) y anabolismo (síntesis). Todos los organismos poseen procesos metabólicos similares, sintetizando y utilizando ciertos compuestos esenciales: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y polímeros derivados de ellos, polisacáridos, proteínas, lípidos, RNA, DNA entre otros, proceso conocido como, metabolismo primario y los compuestos de estos procesos se les denomina metabolitos primarios .

Por otro lado, muchos organismos, entre ellos las plantas, utilizan vías o rutas metabólicas alternas para producir compuestos, los cuales, usualmente se cree, no tienen utilidad aparente, estos son conocidos como metabolitos secundarios y las rutas de síntesis y utilización constituyen el metabolismo secundario. Avances en la fisiología de las plantas, demuestran que los metabolitos secundarios no son producidos al azar, pueden poseer funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas, al funcionar como defensa contra bacterias, virus hongos, herbívoros y estrés ambiental, como la falta de agua, la radiación ultravioleta, la temperatura y la fertilidad del suelo, entre otros (Salonkhe y Chavan, 1990).

Los dos tipos de metabolismo están interrelacionados, así el metabolismo primario provee ciertas moléculas que son empleadas como materiales de construcción para todas las rutas metabólicas y algunos compuestos secundarios se originan de la combinación de dos o más rutas, al incorporar dentro de su estructura subunidades de dos o más rutas (Mann,1978).

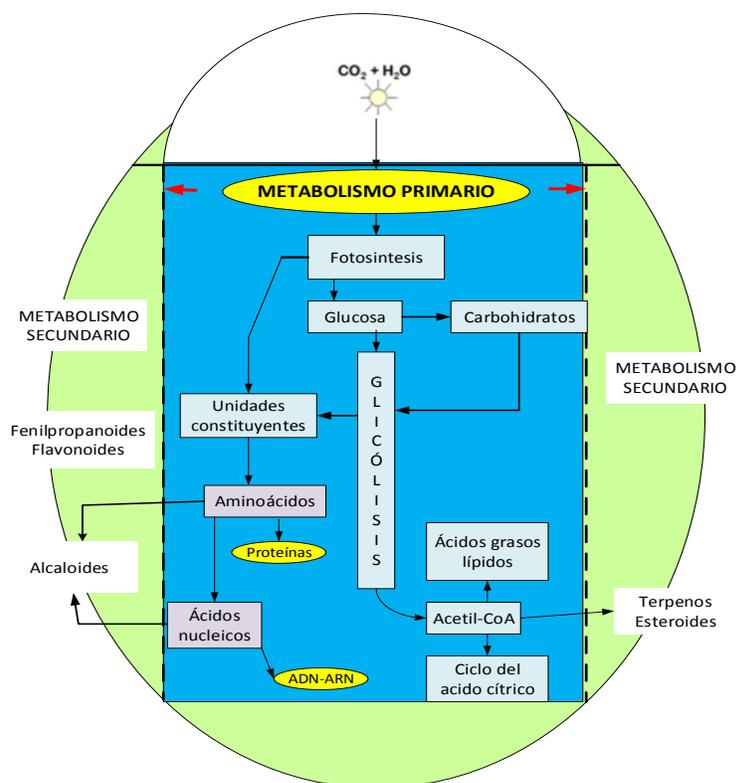
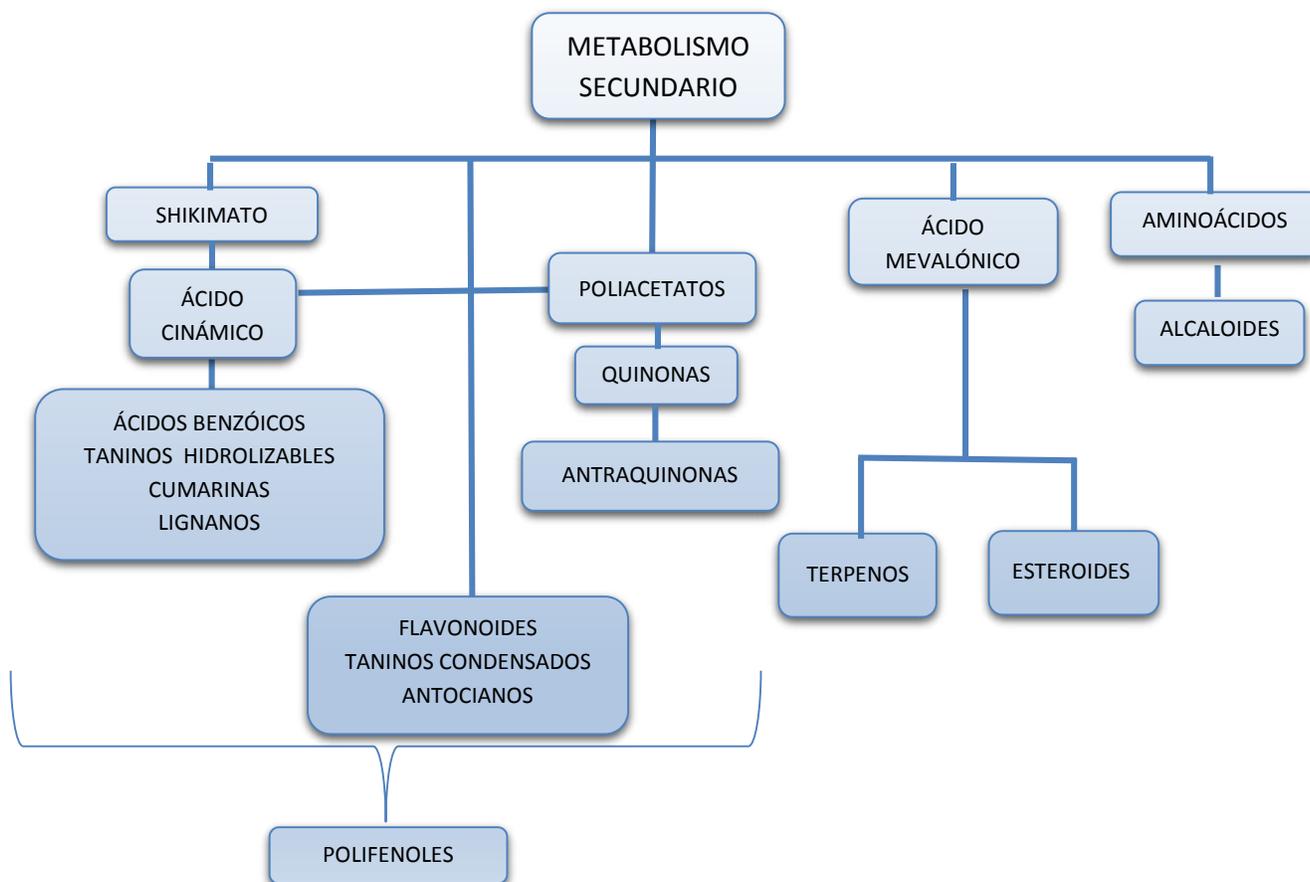


FIGURA 3. Rutas biosintéticas generales para la formación de metabolitos en plantas.



Esquema 1. Subfamilias de metabolitos secundarios

6.4 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Los compuestos polifenólicos constituyen un grupo diversificado de metabolitos secundarios, que poseen al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y que pueden encontrarse en la naturaleza en forma de distintos derivados (glicósidos, ésteres, metil éteres, etc.).

Presentan principalmente forma de heterósidos, con uno o más restos de azúcar ligados a uno o varios de sus grupos hidroxilo, aunque también existen compuestos en los que el azúcar se encuentra unido directamente a un carbono aromático (C-glicósidos).

Son también comunes las asociaciones con otras sustancias, como ácidos carboxílicos, aminas y lípidos, así como la unión con otros fenoles. Sin embargo, para delimitar el grupo de los compuestos polifenólicos, no es totalmente satisfactorio recurrir a una definición puramente química, dada la variedad de estructuras que incluyen y el hecho de que existen compuestos de naturaleza fenólica pero con origen terpenoide.

Por esta razón, es preferible una definición biogenética. Así, los compuestos fenólicos pueden surgir biogenéticamente de dos vías: la vía del shikimato, que conduce a fenilpropanoides, como los ácidos cinámicos y la vía del acetato que produce quinonas diversas. Los flavonoides, de lejos el mayor grupo de compuestos polifenólicos, derivan biosintéticamente de una combinación de ambas vías, ver esquema 1 (Harborne, 1989).

Hay una amplia variabilidad de compuestos polifenólicos, de modo que aun cuando se encuentren distribuidos por toda la planta, la concentración puede variar de forma importante de una parte a otra (Harborne, 1989).

Este grupo de compuestos posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarios, antimicrobianas, antirradicales libres, antimutagénicas, anticarcinogénicas, antiteratogénicas y quimioprotectoras, etc. (Hernández, 1999)

Clasificación de los polifenoles

Se han propuesto diversas clasificaciones de los compuestos fenólicos, dependiendo de su esqueleto estructural, variando su naturaleza desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos de naturaleza polimérica como las proantocianidinas. Su clasificación se centra principalmente en el número de átomos de carbono que presenta su estructura (ver figura 4).

Se diferencian dos grupos principales de compuestos polifenólicos, los derivados de ácidos benzoicos y los derivados de ácidos cinámicos (Spencer, 2008).

Por razones de estudio solo trataremos a los derivados de los ácidos cinámicos.

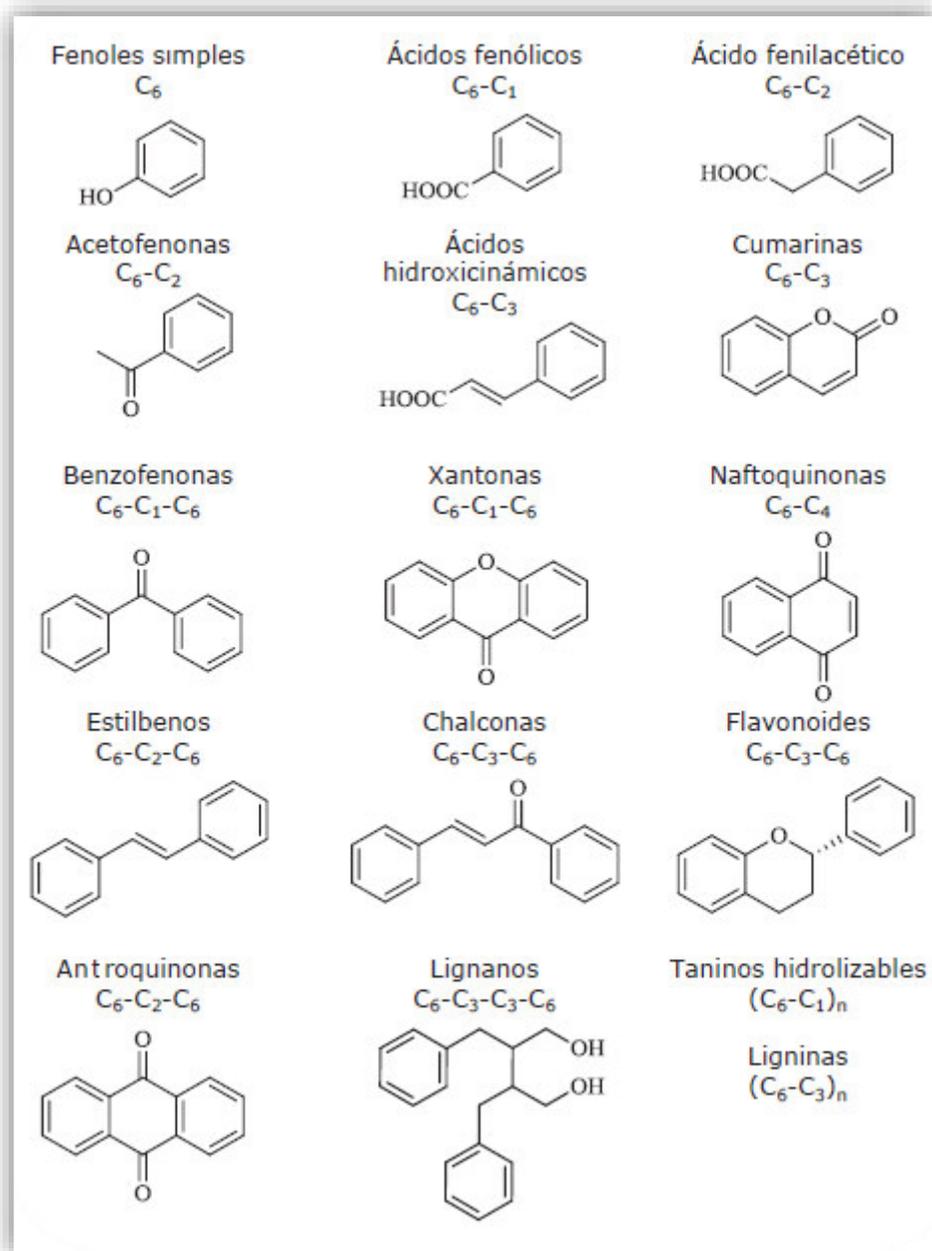


Figura 4. Principales clases de compuestos polifenólicos en plantas, representados sin los grupos hidroxilo sustituyentes.

6.4.1 DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO Y POLIACETATO

El grupo más importante de derivados del ácido cinámico y poliacetato son las flavanonas, compuestos que poseen un esqueleto básico de quince átomos de carbono, que en su nivel más simple consta de dos

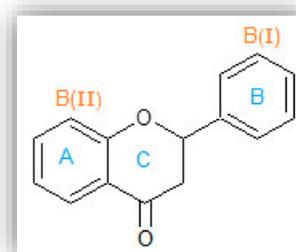
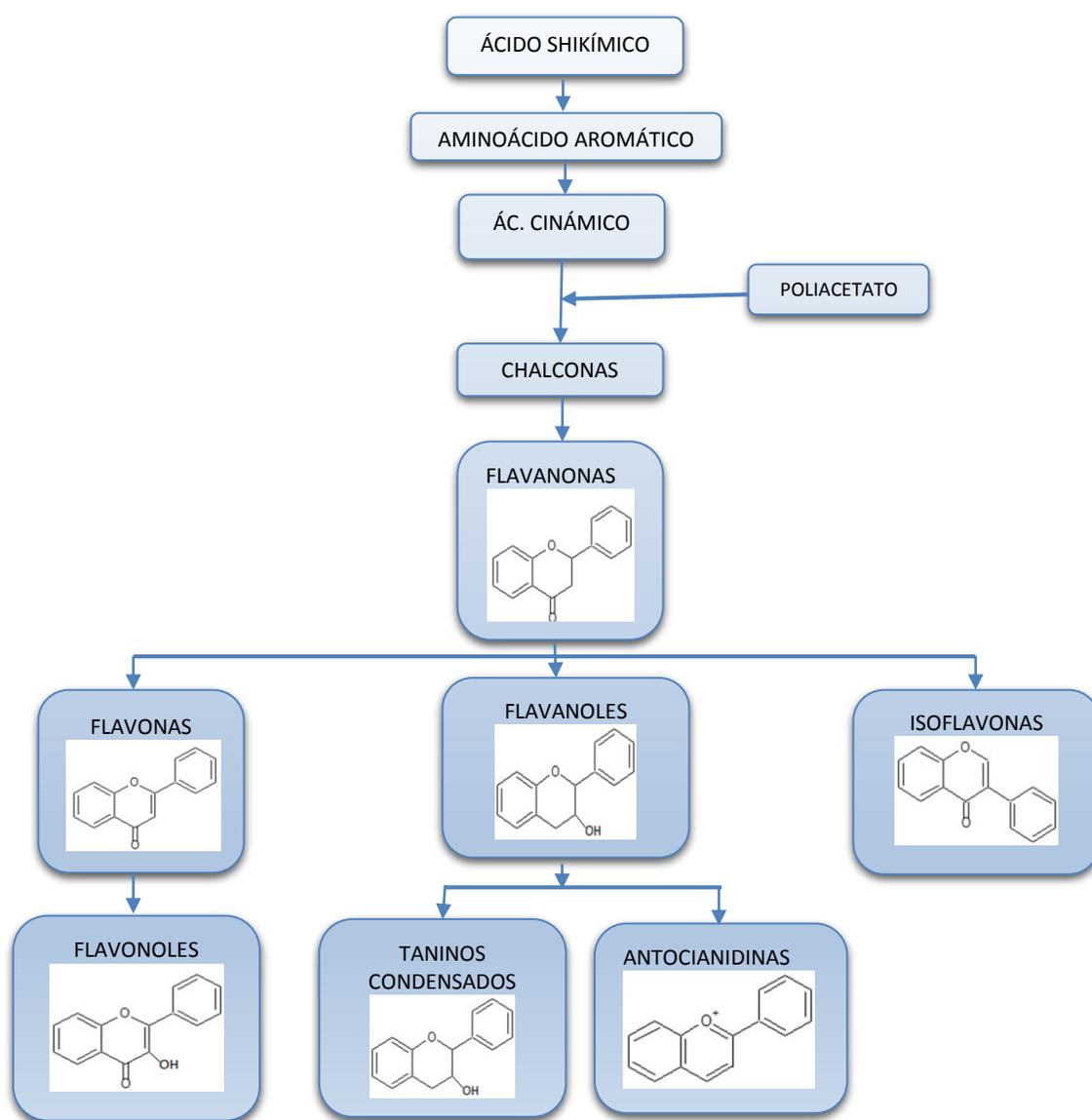


Figura 5

anillos fenilo (anillos A y B) ligados por un puente tricarbonado, que en la mayoría de clases se encuentra formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C) (ver figura 5).

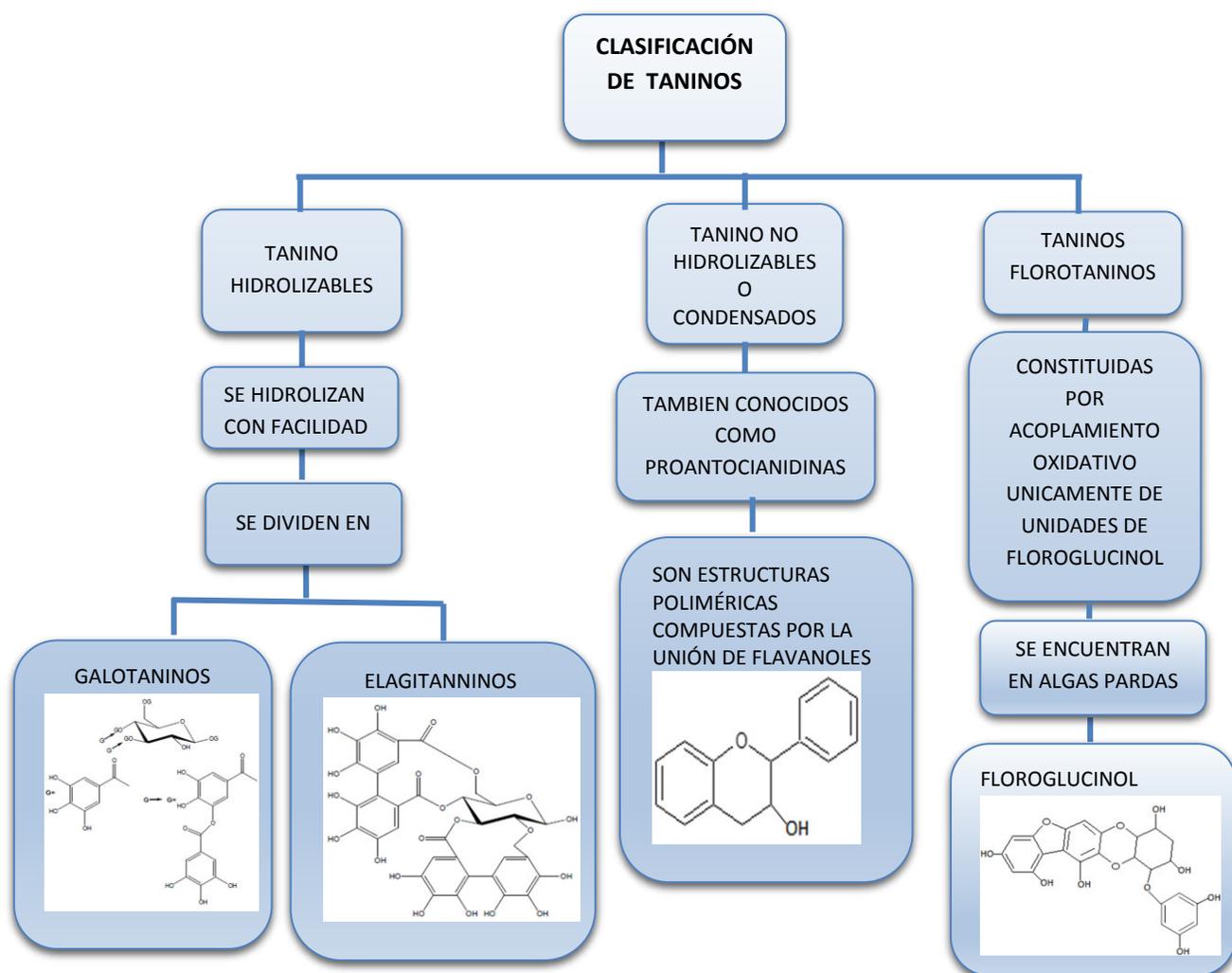
La clasificación más habitual de los flavanonas se realiza de acuerdo a las características estructurales de este puente tricarbonado y es la que se encuentra recogida en el esquema 2.



Esquema 2. Estructura básica del derivado del ácido cinámico y el poliacetato

6.5 TANINOS

Son compuestos químicos complejos resultantes de la combinación de fenoles y azúcares, tienen masas moleculares relativamente elevadas, de sabor astringente, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina), son también agentes quelantes; por esta razón se utilizan como antídoto en intoxicaciones causadas por metales pesados (mercurio, plomo, estaño, cinc), se oxidan con facilidad, sobre todo en medio ácido, y pueden actuar como reductores de ciertos compuestos. Los taninos se disuelven en agua formando disoluciones coloidales, son solubles en alcoholes y en acetona. Suelen acumularse en determinadas partes de la planta como las hojas, frutos, tallos, cortezas, semillas, raíces y en menor proporción en las flores. De acuerdo a las características estructurales se encuentra clasificada en el esquema 3.



Esquema 3. Clasificación de Taninos

6.5.1 Taninos condensados o proantocianidinas

Son polímeros de flavan-3-oles, presentan una estructura química similar a la de los flavonoides, puesto que biogénicamente proceden del mismo metabolismo. Químicamente se forman por condensación de catequina o catecoles (flavanoles) con uniones directa C-C entre C₄-C₈ y C₄-C₆.

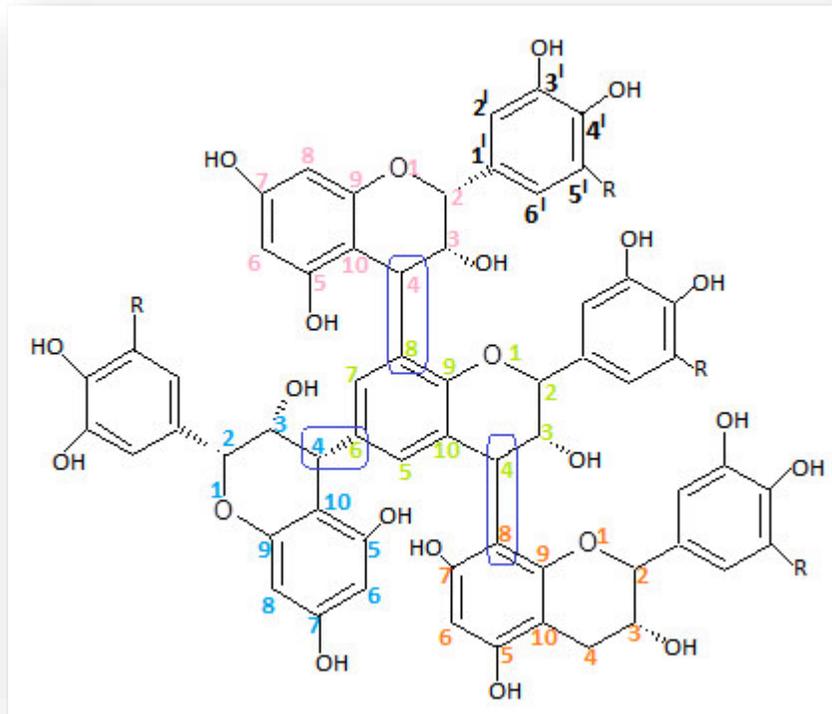


Figura 6. Estructura del tanino condensado

Este grupo de taninos presentan las siguientes características:

- ❖ Por calentamiento dan catecol.
- ❖ Por hidrólisis ácida se pueden obtener como productos: antocianidinas, catequinas y flobafenos rojos.
- ❖ Dan soluciones verdes con tricloruro de hierro.
- ❖ Precipitan con solución de bromo y acetato de plomo.
- ❖ Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas.

6.5.2 Flobafenos

Flobafenos o rojos de taninos son sustancias fenólicas amorfas solubles o insolubles en agua, alcohol rojizas. Estas se pueden extraer de las plantas, o productos que resultan del tratamiento del extracto de taninos con ácidos minerales (Varro, 1979).

Su estructura aún no ha sido elucidada del todo, se cree que son polímeros de los flavan-4-oles, en este grupo se encuentran el epiferol y el luteoferol. Se ha observado que la acumulación de los flobafenos produce coloraciones rojas.

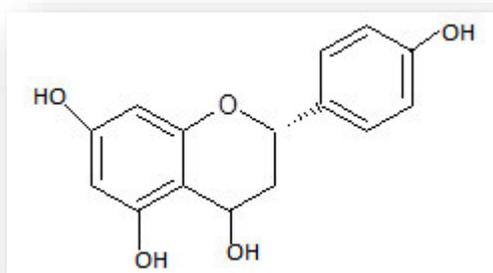


Figura 7. Estructura de un flobafeno, epiferol

6.5.3 Hidrólisis y autocondensación ácida de taninos condensados

Cuando los taninos se calientan en presencia de ácidos minerales fuertes, estos están sujetas a dos reacciones de competencia. La primera de degradación que conduce a la formación de antocianidina y catequina, la segunda de condensación como resultado de la hidrólisis de anillos heterocíclicos (enlaces p-hidroxibencil éter). Los iones p-hidroxibencil carbónico creados, condensan al azar interaccionando con centros nucleofílicos de otros taninos para dar flobafenos.

También hay otro tipo de condensaciones en presencia de oxígeno atmosférico, sin embargo en disoluciones alcohólicas tienen lugar preferentemente la hidrólisis y formación de antocianidinas, sin excluirse la autocondensación, mientras que en disoluciones acuosas predomina la formación de condensados insolubles o flobafenos.

6. 5.4 ANÁLISIS QUÍMICO DE TANINOS CONDENSADOS

6.5.4.1 Método de proantocianidina: Método específico para taninos condensados; el método implica la despolimerización de los taninos condensados por catálisis ácida en butanol y sulfato ferroso para aislar proantocianidinas (Waterman y col, 1994).

La limitante del método radica en que los polímeros de taninos son separados en dímeros o trímeros, en lugar de monómeros, por lo que los resultados del contenido de taninos condensados pueden ser subestimados; además exige el empleo de estándares específicos para cada tipo de taninos.

6.5.4.2 Método de conversión de proantocianidinas en antocianidinas: Método basado en la despolimerización de polifenoles, transformándose en carbocationes (antocianidinas) por la acción de una hidrólisis ácida en baño maría, tornándose en un color rojo intenso los cuales son extraídas con alcohol amílico. Son detectadas a un máximo de absorbancia de 550 nm (Mabry y Markham, 1982).

El principal inconveniente de este método es que la reacción no es completa ya que depende de la estructura y grado de polimerización de las proantocianidinas. Además, puede haber otras reacciones secundarias interferentes que absorben a la misma longitud de onda.

Este hecho, puede dar lugar a un error de estimación y por lo tanto su aplicación para el análisis cuantitativo de proantocianidinas es limitado (Scalbert, 1992).

6.5.4.3 Método de vainillina – HCl: Este método es específico para taninos condensados, por medio de CCF, utilizándose el revelador de Vainilla/HCl y tomando como positivo la aparición de manchas de coloración rosa o rojo cereza, es un tipo de reacción exo, donde la vainillina en medio ácido reacciona con el anillo A meta-substituído del flavano para formar un cromóforo.

La principal desventaja de este método consiste en que se reduce la capacidad de reaccionar la vainillina con el grado de polimerización de las proantocianidinas, porque la reacción se da preferentemente con las unidades terminales (Butler, 1982).

6.6 ANÁLISIS QUÍMICO DE POLIFENOLES Y TANINOS

6.6.1 Método de Folin-Ciocalteu: Es un método colorimétrico para determinar fenoles, muy usado en productos naturales (Singleton, 1965).

El mecanismo de este ensayo se rige por una reacción redox que consiste en la oxidación de los grupos hidroxilos, así los fenoles reducen al ácido fosfomolibdico en solución alcalina causando la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm. Se cuantifica por espectrofotometría tomando como referencia una recta patrón de ácido gálico (cuantificación de polifenoles totales) o ácido tánico (cuantificación de taninos). Se emplea frecuentemente en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales para la medida de la actividad antioxidante total.

6.7 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.7.1 Radicales libres

Los radicales libres son moléculas inestables porque contienen un electrón no apareado. Para poder convertirse en moléculas estables, los radicales libres buscan electrones de otras moléculas tales como el ADN, lípidos en las membranas celulares y en las proteínas de los tejidos corporales. Cuando estas moléculas son atacadas por los radicales libres, su estructura molecular se altera. Estas moléculas alteradas se convierten entonces en radicales libres que buscan, atacan y dañan moléculas aledañas, continuando así una reacción en cadena que crea radicales libres y causa daños moleculares (Slater, 1984).

6.7. 2 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical libre, previniendo la aparición de enfermedades degenerativas como el cáncer, el envejecimiento prematuro de la piel, entre otros. La estructura química de los polifenoles tienen la capacidad de secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno es donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura resultante que soporta un electrón desapareado (Bravo, 1998).

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contienen en su estructura, por ello resulta de gran utilidad la evaluación del contenido total de polifenoles, ya que de esta forma se podría determinar la relación entre esta y el CI_{50} de la actividad antioxidante (Pannala, 2001).

Entre aquellos ensayos que se basan en la medición de la capacidad antioxidantes para reaccionar con un radical libre, se encuentran:

- ❖ Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o capacidad de absorción de radicales libres)
- ❖ Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, o capacidad antioxidante como equivalente trolox)
- ❖ FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, o poder antioxidante de la reducción del hierro)
- ❖ Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y otros

6.7.3 Método del DPPH (2,2 – difenil-1-picrilhidrazil)

Este método se basa en la estabilidad del radical libre DPPH, a la cual se le atribuye la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización le otorga una coloración violeta que absorbe intensamente en el rango de 515 a 519 nm.

Así al confrontar el radical con el antioxidante, el antioxidante dona un átomo de hidrógeno al radical DPPH estabilizándola y tornándola de violeta a amarilla, esta pérdida de coloración violeta es monitoreada a través de un espectrofotómetro (Brand-Williams, 1995).

Los parámetros que se miden durante el transcurso de la reacción es la evolución en el tiempo de la absorbancia, a partir de la cual se calcula el % I (porcentaje de inhibición) y el CI_{50} (concentración necesaria para inhibir en un 50 % al radical, se expresa en $\mu\text{g} / \text{mL}$). Cuanto menor es el valor de CI_{50} menor cantidad de extracto será necesario para reducir 50 % del radical libre DPPH y mayor será la actividad antioxidante (Lima, 2008).

Sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes ya que existen otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda que el radical, por lo que interferirían en los resultados.

Por otro lado, las moléculas pequeñas tienen menor impedimento estérico para reaccionar con el radical, por lo que darían mayor actividad antioxidante que moléculas con mayor peso molecular (Prior, 2005).

Además el método no es adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante de las proteínas, debido a que precipitan con el metanol del medio de reacción (Sánchez y Moreno, 2002).

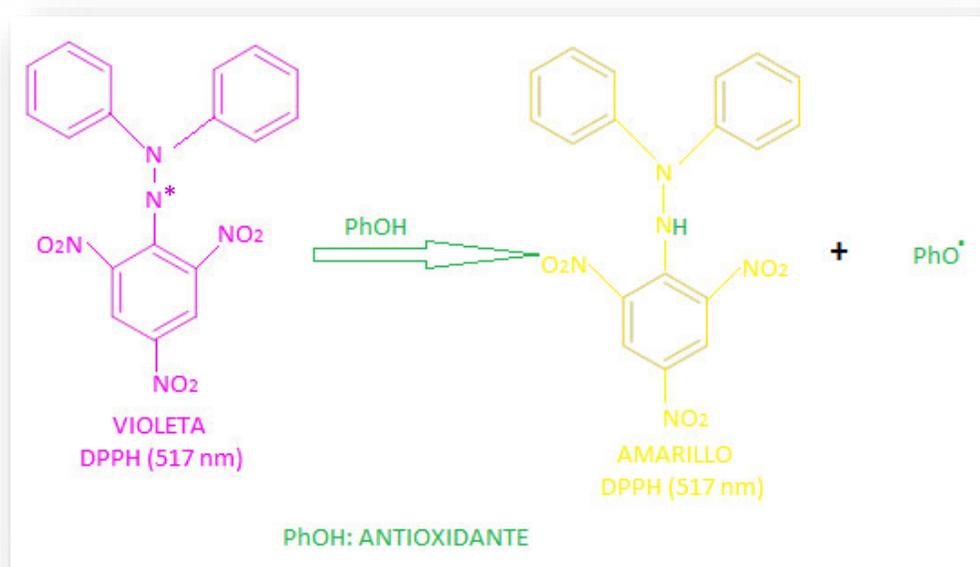


Figura 8. Estructura del DPPH antes y después de la confrontación con un antioxidante.

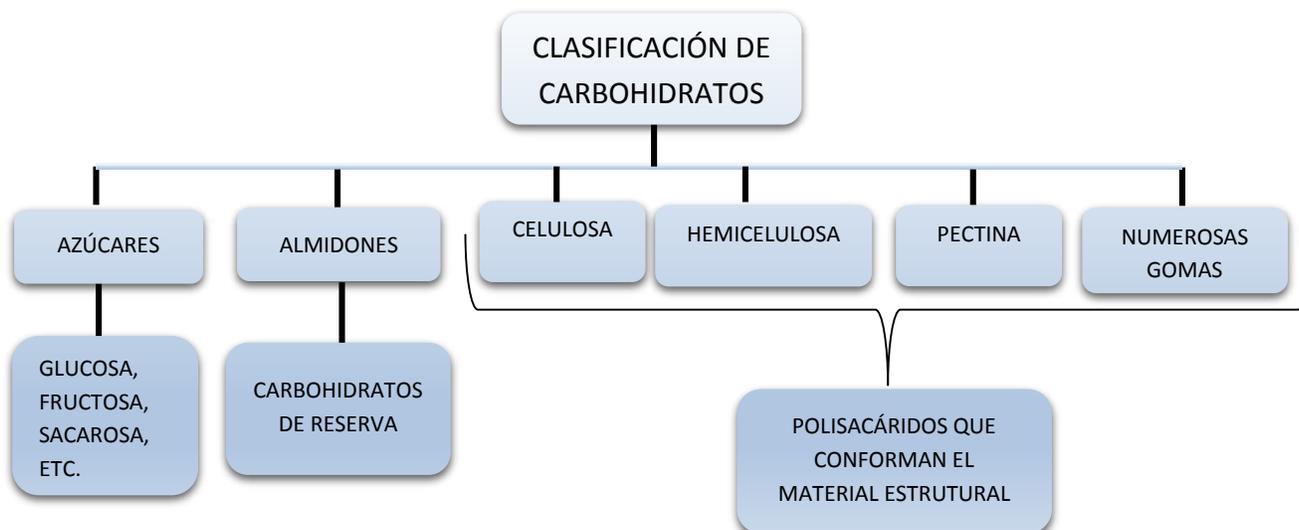
6.8 METABOLITOS DE PLANTAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los compuestos derivados de plantas que poseen actividad antimicrobiana son los polifenoles dentro de los cuales se encuentran: quinonas, flavonoides, taninos y cumarinas, otros son los terpenoides, aceites esenciales, los alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre otros (Guerra, 2004).

La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente, al privar a los microorganismos del medio apropiado para su desarrollo. Así hay inhibición enzimática y privación del sustrato, acción en membranas y pérdida de iones metálicos, además los taninos inducen cambios en la morfología de algunas especies de bacterias (Reed, 1995).

6.9 CARBOHIDRATOS

Los hidratos de carbono $(CH_2O)_n$, sacáridos o glúcidos se definen sencillamente, como polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas y sus derivados. Los carbohidratos constituyen la forma principal de almacenamiento de energía y son elementos estructurales de las células. (Lehninger, 1999). Así estos se clasifican de la siguiente manera (ver esquema 4).



Esquema 4. Clasificación de los carbohidratos

6.9.1 Polisacáridos

Los polisacáridos, también conocidos como glicanos, son sustancias poliméricas compuestas por varios cientos o miles de unidades de monosacáridos enlazados entre sí por uniones glicosídicas. Algunos de estos compuestos comunican rigidez estructural y fortaleza a las plantas, mientras que otras sirven como fuente de reserva de alimentos (Reusch, 1979). Así podemos encontrar a los mucílagos, gomas, celulosa, pectina, etc. Por hidrólisis completa, con ácidos o con enzimas específicos, estos polisacáridos producen monosacáridos y/o derivados sencillos de monosacáridos. La D-glucosa es la unidad monosacáridica predominante en los polisacáridos, pero son también corrientes polisacáridos de la D-manosa, la D-fructuosa, la D y L-galactosa, la D-xilosa y la D-arabinosa. También se encuentran, generalmente, derivados de los monosacáridos como productos de hidrólisis de los polisacáridos naturales, entre ellos la D-glucosamina, la D-galactosamina, el ácido D-glucorónico, el ácido N-acetilneuramínico y el ácido N-acetilmurámico (Lehninger, 1999).

6.9.1.1 Mucílagos vegetales o hidrocoloides vegetales

Es un polisacárido heterogéneo que contiene diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos (Hoffman, W. 1985), de peso molecular elevado, superior a 200.000 g/mol, cuya estructura molecular completa es desconocida. Estos se caracterizan por formar con el agua disoluciones que se hinchan en ellas para dar unaseudodisolución gelosa, coloidal, viscosa, coagulable al alcohol. (Bruneton, 2001)

Los mucílagos se forman en el interior de las plantas durante su crecimiento. Se asocia en ocasiones con otras sustancias como los taninos. Se cree que almacena agua, facilita la dispersión y germinación de las semillas, espesa las membranas y sirve de reserva alimenticia. Puede ser utilizada para suspender sustancias insolubles y para aumentar la viscosidad de un producto.

Estos mucílagos se suelen confundir con las gomas y pectinas, diferenciándose de estas solo en las propiedades físicas, por ello es difícil definir y se suele equiparar todo como gomas. Actualmente se considera que la diferencia está en que los mucílagos son constituyentes normales de las plantas que producen coloides muy poco viscosos, que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados; las gomas son productos que se forman en determinadas circunstancias, mediante la destrucción de membranas celulares o la exudación, el cual se hincha en el agua para dar dispersiones coloidales gruesas; mientras que las pectinas gelifican en contacto con el agua (Bruneton, 2001).

6.9.1.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE CARBOHIDRATOS

a) Método cualitativo de Fehling: La reacción de Fehling es utilizado para identificar grupos funcionales de azúcares los cuales, se basan en la capacidad que tienen los azúcares de reducir los iones cúpricos (Cu^{+2}), ya que la solución de Fehling es alcalina de Cu^{+2} acomplejada con iones tartrato (Fehling). Si una muestra analizada contiene un azúcar reductor, el ion cúprico se reduce al estado cuproso (Cu^{+}) que al calentarse, precipita en forma de Cu_2O . Esta reducción del cobre se manifiesta en la desaparición del color azul oscuro de la solución del reactivo debido al Cu^{+2} y en la aparición de un precipitado rojo de Cu_2O (ver figura 9).

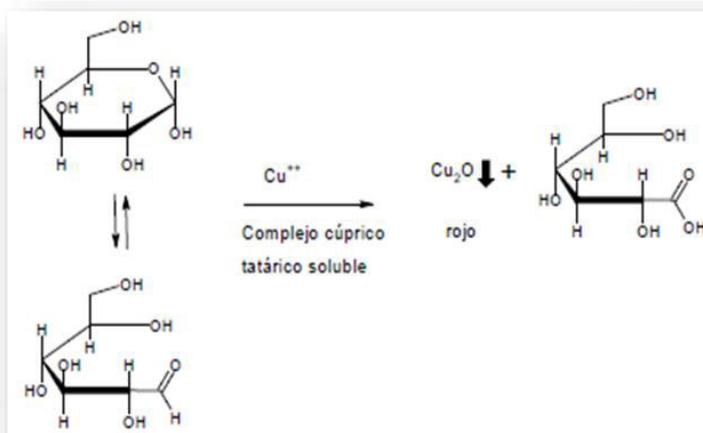


Figura 9. Reacción de glucosa con Fehling

b) Método de fenol-sulfúrico: Este método espectrofotométrico UV-Vis, se fundamenta en la reacción de azúcares con ácidos fuertes originando furfurales, que se condensan cuando reaccionan con fenol dando un compuesto de color naranja amarillo muy estable (la intensidad del color es proporcional a la cantidad total de azúcares presentes) (Dubois, 1956).

La concentración total de azúcares de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar y leída en la región del espectro visible. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar (ver figura 10).

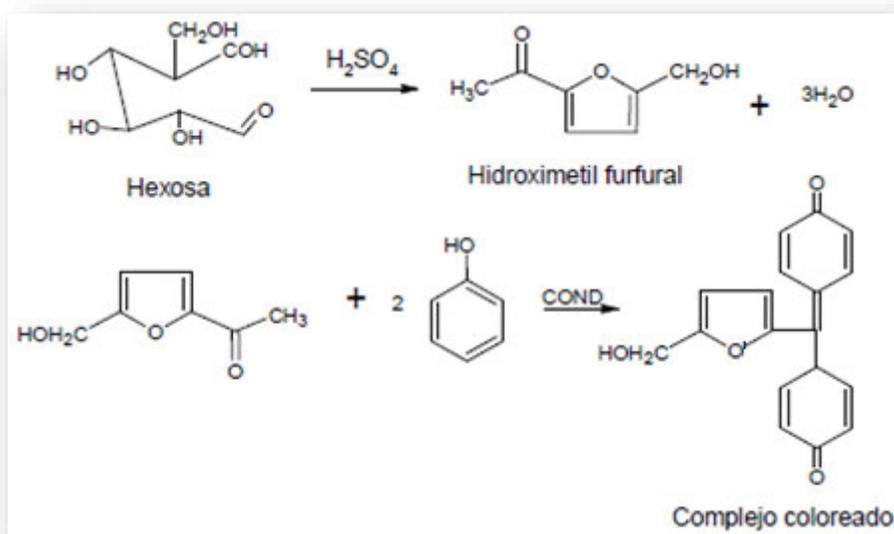


Figura 10. Reacción de hexosa con H_2SO_4

6.10 REOLOGÍA

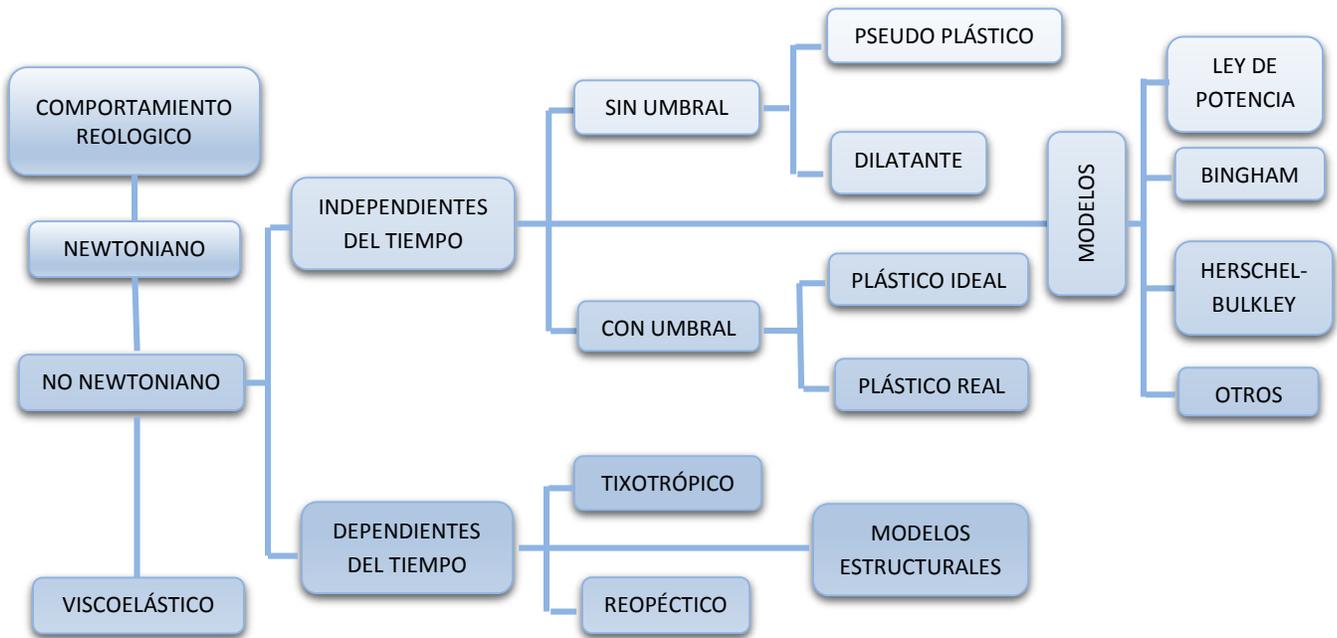
El concepto fue propuesto por el científico estadounidense Eugene Cook Bingham (1878-1945) en la primera mitad del siglo XX, es una disciplina científica que se dedica al estudio del flujo y la deformación de la materia, describe la interrelación entre fuerzas, deformaciones y tiempo de un cuerpo deformable, da información sobre la estructura interna de los materiales lo que determina los diferentes comportamientos. Es así que la reología estudia el comportamiento viscoso, elástico y plástico de los cuerpos.

Las propiedades que se encarga de estudiar la reología son analizadas con instrumentos conocidos como viscosímetros, reómetros, etc. Estos instrumentos posibilitan la realización de deformaciones bajo control, midiendo los esfuerzos que se ejerce sobre un material y la deformación que éste experimenta al fluir. Así se puede determinar la viscosidad y el coeficiente de esfuerzo, entre otras propiedades y a través de ecuaciones constitutivas o modelos matemáticos, es posible establecer un modelo acerca de la manera de comportarse de estas sustancias, permitiendo obtener, en principio, las funciones o propiedades que caracterizan el material.

Las características reológicas de un fluido son uno de los criterios esenciales en el desarrollo de productos en el ámbito industrial, frecuentemente, éstas determinan las propiedades funcionales de algunas sustancias e intervienen durante el control de calidad, tratamientos en el comportamiento mecánico, el diseño de operaciones básicas: como bombeo, mezclado, emvasado, almacenamiento, estabilidad física y al momento del consumo.

Así la reología es aplicable en medicina, cosméticos, artículos de aseo, alimentos, geología, minería, industria plástica, estudio de lubricantes, etc.

Por razones de estudio, solo trataremos los tipos de comportamiento reológico en fluidos (Ver esquema 5).



Esquema 5. Tipos de comportamiento de fluidos y modelos

6.10.1 Ley de Ostwald o Ley de potencia

$$\tau = K\gamma^n \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

- τ = Esfuerzo de corte, Pa
- γ = Velocidad de deformación, s^{-1}
- K = índice de consistencia
- n = índice de fluidez
- η_{app} = Viscosidad aparente

Linealización y regresión lineal para la obtención del índice de fluidez y del índice de consistencia.

$$\ln(\tau) = \ln(K) + n\ln(\gamma)$$

- Si:
- $n < 1$ Pseudoplástico
 - $n > 1$ Dilatante
 - $n = 1$ Newtoniano

Ecuación para determinar la viscosidad aparente (η_{app})

$$\tau_{soluta} = \tau_{solución}$$

$$K\gamma^n = \eta_{app}\gamma \longrightarrow \eta_{app} = K\gamma^{n-1}$$

6.10.2 FLUIDOS NO NEWTONIANOS, INDEPENDIENTES DEL TIEMPO

La figura 11 presenta la viscosidad aparente versus velocidad de deformación con la curva que caracteriza cada modelo reológico de fluidos independientes del tiempo. La figura 12 muestra el reograma de cada uno de los comportamientos reológicos.

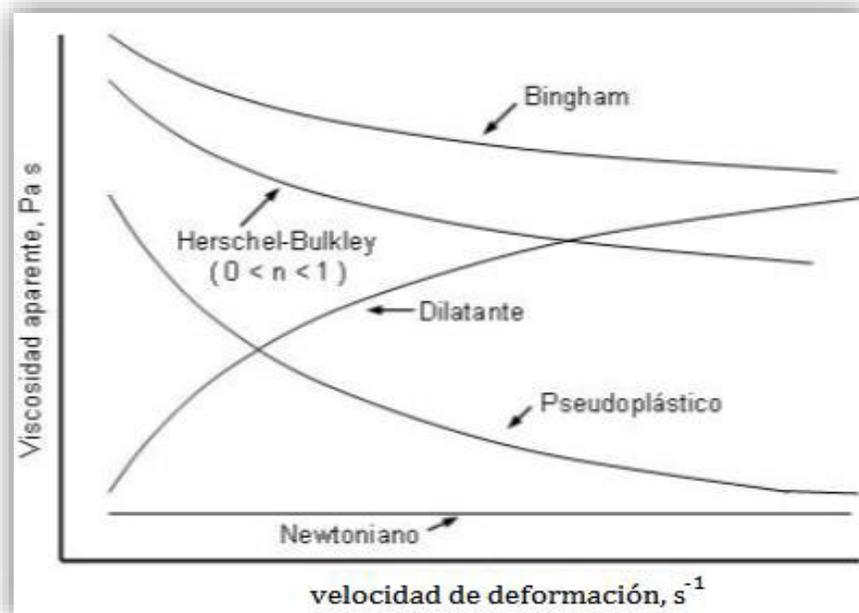


Figura 11. Curva de viscosidad aparente en fluidos independientes del tiempo

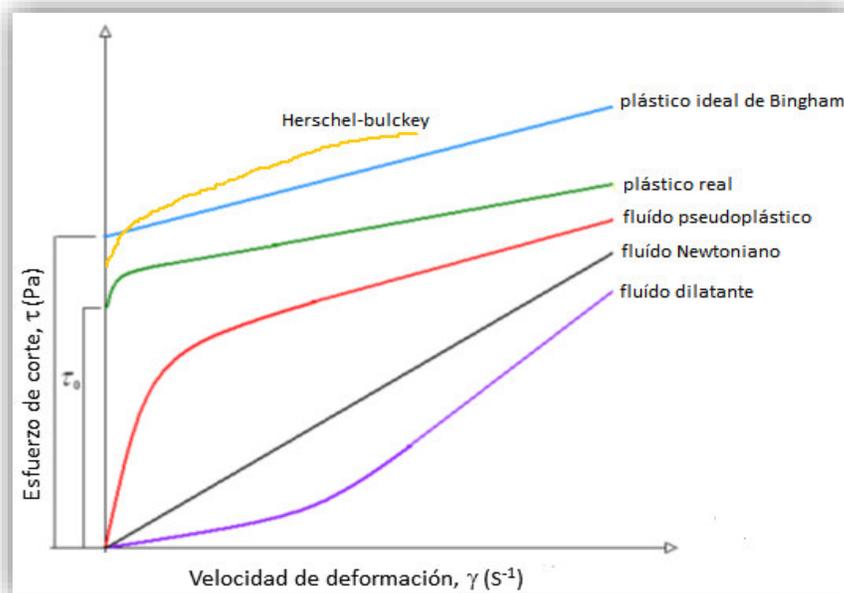


Figura 12. Reograma de la curva de fluidos independientes del tiempo.

6.11 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

6.11.1 Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis)

La absorción molecular en las regiones ultravioleta (190-400 nm) y visible (380-750 nm) consiste en bandas formadas por líneas que están muy cerca unas de otras. La absorción UV-Vis, se produce por lo general como consecuencia de la excitación de los electrones de enlace, debido a esto la longitud de onda de los picos de absorción se puede correlacionar con los tipos de enlace de la muestra que se estudia. Por lo que la espectroscopia de absorción resulta valiosa para la identificación de los grupos funcionales de una molécula.

Es uno de los métodos más comunes utilizado para la detección y cuantificación de los distintos tipos de polifenoles, gracias a los anillos fenólicos que presentan estos compuestos, los polifenoles son excelentes cromóforos, lo que facilita su detección con espectroscopia UV-Vis. Las diferentes familias absorben a una longitud de onda característica, la cual depende del número de sustituyentes del compuesto.

Así, los flavanoles presentan su máximo de absorbancia a 280 nm, los flavonoles a 360 nm y las antocianidinas a 550 nm. Existen varios métodos colorimétricos para la determinación de compuestos polifenólicos. Estos ensayos son generalmente utilizados para la detección y cuantificación de polifenoles en plantas.

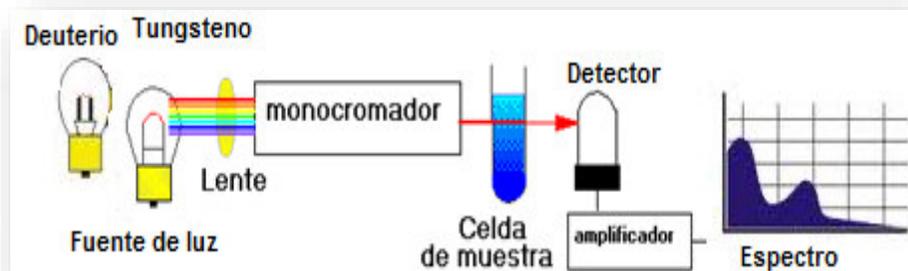


Figura 13. Partes básicas del equipo UV-Vis

6.11.2 Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

La espectroscopia de absorción atómica, se basa en el principio en el que los átomos libres en estado fundamental pueden absorber la luz UV-Vis a una cierta longitud de onda, donde la absorción es específica, por lo que cada elemento absorbe a longitudes de onda únicas.

La técnica analítica de EAA es aplicable al análisis de trazas de elementos metálicos en muestras orgánicas, aguas, geológicas, industrias químicas y farmacéuticas, etc.

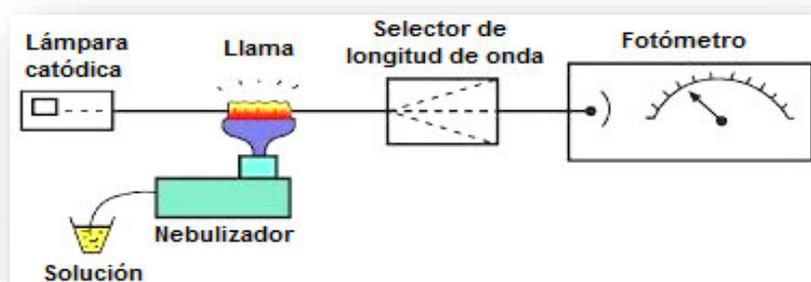


Figura 14. Partes básicas del equipo de EAA

6.11.3 Espectroscopia infrarroja (IR)

Equipo que permite la identificación de grupos funcionales, de compuestos orgánicos e inorgánicos por transmisión espectroscópica de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), en el rango espectral comprendido entre 400 y 4000 cm^{-1} , la absorción molecular de radiaciones en estas zonas del espectro produce transiciones vibracionales y rotacionales. Por lo tanto, todas las moléculas absorben en IR, excepto algunas diatómicas (O_2 , N_2 , Cl_2) de elevada simetría.

Las bandas de absorción son muy estrechas y corresponden a enlaces muy específicos y a menudo dependen de átomos más próximos. Un espectro de IR es como una "huella dactilar" de la molécula y esto implica que es una técnica idónea para identificar compuestos puros, pero no es tan adecuada para cuantificarla.



Figura 15. Partes básicas del equipo de IR

6.11.4 Cromatografía de Permeación en Gel (CPG)

La Cromatografía de Permeación en Gel, conocida también como de exclusión molecular es una potente técnica que utiliza partículas porosas para separar moléculas de diferentes tamaños y determina pesos moleculares y distribuciones de pesos moleculares de polímeros. Las moléculas que son más pequeños que el tamaño de poro puede entrar en las partículas y por lo tanto tienen una trayectoria más larga y mayor tiempo de tránsito y el transporte de moléculas más grandes que no pueden entrar las partículas.

Los materiales de relleno de una columna son principalmente vidrio y poliestireno poroso (entrecruzado e hinchado). Los cromatógrafos utilizados son similares a los de HPLC, siendo la columna y el detector las partes más importantes del instrumento (ver Figura 16).

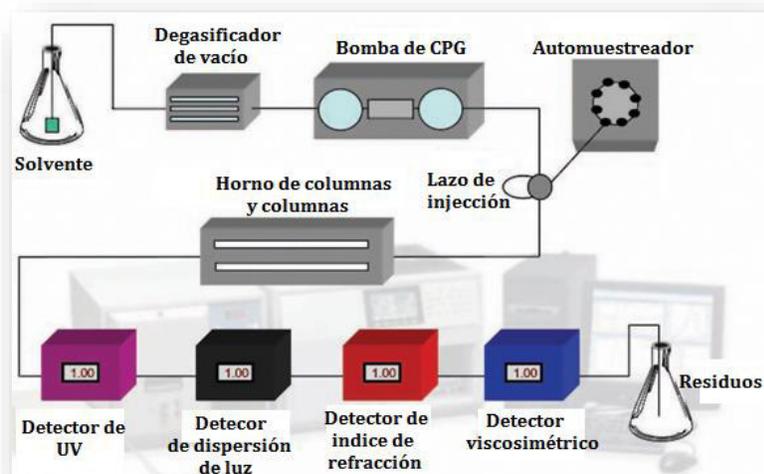


Figura 16. Partes básicas del equipo de CPG

7. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental realizado ha sido esbozado en el Esquema 6.

7.1 MATERIAL VEGETAL

La especie fue recolectada en la localidad de Generosa provincia de Chincheros departamento de Apurímac-Perú, región quechua (entre los 1900 y 2500 msnm) y la caracterización botánica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La muestra de corteza entregada permitió la identificación de la especie como "*Triumfetta semitriloba*" Jacq, conocida vulgarmente como "Moteccepo". (Ver certificado en anexo).

7.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS DE LABORATORIO:

a) MATERIALES

- Vasos de precipitado,
- viales
- Gradilla con tubos de ensayo
- Placa de toque
- Matraces de fondo redondo
- Ependorf
- Pipetas
- Micro pipetas
- Celdas de plástico
- Cromatofolio
- Placa Petri
- Columna cromatográfica (3 cm de diámetro, 30 cm de largo y 6 cm de punta).
- Llave de holfman

b) EQUIPOS

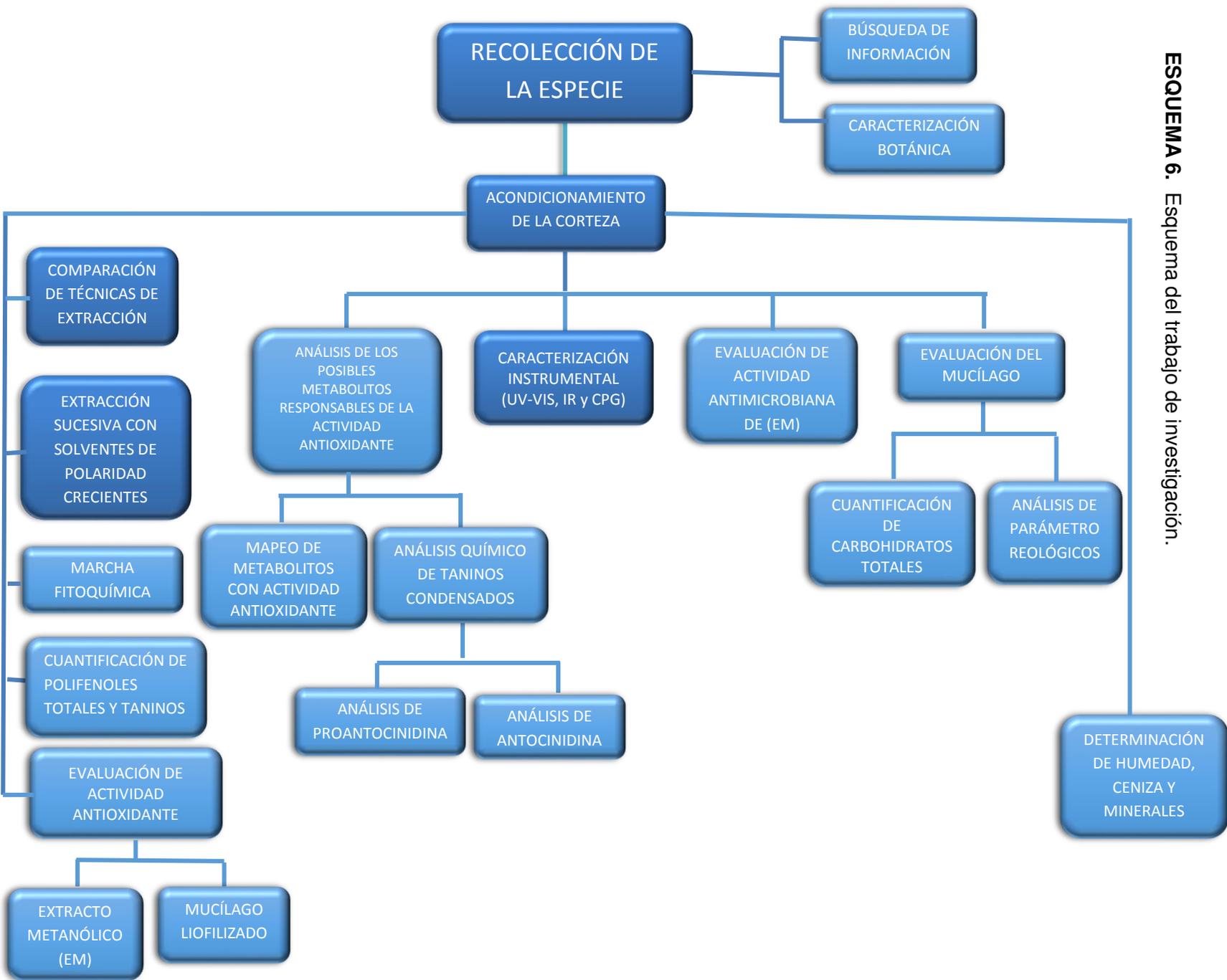
- Evaporador rotativo (marca Boeco Germany RVO 400 SD)
- Ultrasonido (marca Branson 1510)
- Bomba de vacío (marca Vacuubrand GMBH + Cokg)
- Vórtex (Ika 33 Lab Dancer 65000)
- Centrifuga 08 tubos (marca Greetmed)
- Lámpara de UV (marca UVP UVGL/254/365nm)
- Espectrofotómetro de UV-Visible, marca Thermo, modelo: Hehios Y, Software: visión pro), marca Shimadzu, modelo: UV-1700, software: UV- Probe (Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM).
- Espectrofotómetro de FTIR, marca Shimadzu, modelo: IR Affinity software: IR solution (Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM)
- Espectroscopia de absorción atómica, marca Shimadzu AA-6800 software: Wizaard (Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM).
- Cromatografía de Permeación en Gel (CPG, marca Viscotek VE 2001, viscotek TDA 302). (Instituto de Química, Universidad Federal Rio Grande del Sur, Brasil)
- Liofilizador, marca Risor LE 300 (Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM).
- Viscosímetro de Brookfield DV-III (Facultad de ingeniería, Universidad Peruana Unión)

c) REACTIVOS

- | | | |
|---------------------------|--|---|
| • Ácido acético | • Acetato de etilo | • Dicloro metano |
| • Anhídrido acético | • Ampicilina | • DPPH |
| • Ácido gálico | • Arabinosa | • Etanol |
| • Alcohol amílico | • Benceno | • Fehling |
| • Agar Tripticasa de soya | • $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | • FeCl_3 |
| • Agua de bromo | • Butanol | • $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| • Agua destilada | • Caldo Tripticasa Soya (TSB, Oxoid) | • Fenol |
| • Acetato de plomo | • CaCO_3 | • Folin ciocalteu |
| • Ácido fórmico | • Ciprofloxacino, | • Formaldehido |
| • Ácido pícrico | • Cloroformo | • Fructuosa |
| | | • Galactosa |

- Gelatina
- Gentamicina
- Glucosa
- Hexano
- HCl_{cc}
- HgCl_2
- HNO_3
- $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{cc}}$
- $\text{I}_{2(\text{s})}$
- KOH 5%
- KI
- Limadura
de magnesio
- Manosa
- Metanol
- Molibdato
de amonio
- NaOH 5%
- NaCl
- Na_2CO_3
- Na_2SO_4
- N-butanol
- NH_4OH
- Na_2HPO_4
- Ribosa
- THF
- Vainillina
- Xilosa

ESQUEMA 6. Esquema del trabajo de investigación.



7.3 ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La corteza se separó del tallo, se picó en trozos de entre 1 a 1,5 cm y se llevó a secar a 40 °C en la estufa durante 4 días, luego se pulverizó.

7.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA CORTEZA

Se trozó la corteza, se pesó 2 g en una placa Petri (placa previamente seca y pesada), este proceso se realizó por triplicado y se llevó a la estufa a 110 °C durante 2 horas (hasta peso constante).

7.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZA EN LA CORTEZA

Del procedimiento anterior (contenido de humedad de la corteza) se pesó 1 g de corteza seca en un crisol (crisol previamente seco y pesado) y se llevó a la mufla a 550 °C durante 2 horas.

7.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MINERALES

El análisis de los minerales de la corteza, se realizó mediante la espectroscopia de absorción atómica, por la técnica de flama.

7.6.1 Preparación de la Solución estándar de las curvas de calibración: Se preparó las curvas de calibración utilizando estándares de Ca, Fe, Zn, Na, Mn, Cu y Cr (estándares certificados de 1000 ppm).

7.6.2 Tratamiento de muestra: Se pesó 0,50 g de ceniza de la corteza en un vaso precipitado de 150 mL, se añadió 5 mL de agua ultra pura y 5 mL de HNO₃(cc) y se esperó hasta sequedad, se añadió 3 mL de HClO₄(cc), se calentó lentamente hasta eliminar los vapores, se enfrió y filtró a un matraz volumétrico de fondo redondo de 100 mL (se usó papel filtro whatman N° 40).

Una vez lista las soluciones, se llevó a lectura al analito de interés con su respectivo estándar en la espectroscopia de absorción atómica.

7.7 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE LA CORTEZA

7.7.1 Maceración en frío: Se dejó macerando 10 g de corteza con 200 mL de hexano durante 2 semanas, luego se concentró en el evaporador rotativo y se llevó a secar hasta peso constante.

7.7.2 Extracción por reflujo: Se extrajo 10 g de corteza con 70 mL de hexano durante 2 horas. Pasado este tiempo, se filtró en el equipo de bomba al vacío, colectándose el filtrado en un balón y añadiendo hexano al residuo (proceso que se repitió por triplicado). Una vez terminada la extracción se concentró en evaporador rotativo y fue llevado a estufa hasta peso constante.

7.7.3 Extracción por ultrasonido: Se sonicó 10 g de corteza con 70 mL de hexano durante 1 hora. Pasado este tiempo, se filtró y se colectó el filtrado en un balón y luego se añadió hexano sobre el residuo (proceso que se repitió por triplicado). Una vez terminada la extracción se concentró en evaporador rotativo y fue llevado a estufa hasta peso constante.

7.8 EXTRACCIÓN SUCESIVA DE LA CORTEZA CON SOLVENTES DE POLARIDAD CRECIENTE

La extracción se realizó con solventes de polaridad creciente tales como: hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y agua destilada. Para la extracción se pesó 200 g de corteza, se introdujo en un balón de fondo redondo de 250 mL, se añadió 100 mL de solvente y se sonicó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se filtró con el equipo de bomba al vacío, utilizándose el papel whatman N° 42 (proceso que se repitió por triplicado), Se juntó los filtrados en un balón de 250 mL y se concentró en un rota evaporador y posteriormente se secó en la estufa durante 3 días.

Para continuar con la extracción sucesiva al residuo se secó en la estufa a 40 °C hasta peso constante, una vez seco se continuó extrayendo con el siguiente solvente.

7.9 ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

La marcha fitoquímica se realizó utilizando la metodología convencional de análisis cualitativo (Tomas y Huamán, 2012).

Las muestras analizadas fueron la corteza pulverizada y las fracciones de los diferentes extractos de la corteza, obtenidos a partir de solventes de polaridad creciente (ver Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos secundarios con sus respectivos reactivos de identificación

METABOLITOS	REACTIVOS DE IDENTIFICACIÓN
Aceites esenciales	Agua destilada
Saponinas	Prueba de la espuma
	Reactivo de Salkowski
	Variante A de reacción de Salkowski
	Variante B de reacción de Salkowski
	Reactivo de Liebermann- Burchard
Proantocianidinas	NaOH 20%
	Reacidificación del NaOH 20% con HCl 1N
	Adición de NH ₃ y reacidificación
	Acetato de plomo 5%
	Distribución de alcohol isoamílico y agua
Flavonoides	Shinoda
	FeCl ₃
Taninos	Gelatina-NaCl
	FeCl ₃
	Agua de bromo
	Formaldehido
Antocininas y Betalainas	Todos los reactivos de antocianidinas
Quinonas y Antroquinonas	NaOH 5%
	Borntranger
	Acetato de magnesio alcohólico
	Reducción con Sn/HCl
Cumarinas	Muestra en papel filtro con NaOH 10%, revelado con lámpara UV
Alcaloides	Dragendorff
	Mayer
	Wagner
Carbohidratos	Fehling A y B

7.10 OBTENCIÓN DEL MUCÍLAGO Y DEL EXTRACTO METANÓLICO (EM)

7.10.1 Extracción y liofilización del mucílago

En un vaso de precipitado de 2000 mL se colocó 110 g de corteza (seca) y se añadió 1100 mL de agua destilada, al cual se dejó macerando durante 24 horas a temperatura ambiente, se filtró el mucílago y se liofilizó durante 4 días.

7.10.2 Extracto metanólico (EM)

Se pesó 270 g de corteza, se dejó macerando con 2500 mL de metanol durante 2 semanas a temperatura ambiente, se concentró en el evaporador rotativo y se llevó a la estufa a 40 °C durante 3 días (hasta peso constante), obteniéndose así el extracto metanólico (EM).

7.11 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

a) Preparación de la curva de calibración: Se preparó la curva de calibración utilizando como patrón al ácido gálico.

Se pesó 25 mg del ácido gálico y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de fondo redondo de 25 mL (Concentración de 1000 ppm), se tomó 10 mL de la solución de 1000 ppm y se enrasó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 100 mL (Concentración de 100 ppm), finalmente se tomó 5 mL de la solución de 100 ppm y se enrasó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 50 mL (concentración de 10 ppm = Sm).

Se realizó la curva de calibración tomándose concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ppm. Para ello se tomó volúmenes de Sm, de acuerdo a las concentraciones deseadas y se colocó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 10 mL, seguidamente se añadió con una micro pipeta 1500 µL de Na₂CO₃ 20 % y 5 mL de agua destilada, después de 1 minuto se añadió 500 µL de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó en reposo durante 1 hora.

b) Preparación de muestra: En un matraz volumétrico de fondo redondo de 10 mL, se introdujo 25 µL de EM, se añadió 1500 µL de Na₂CO₃ 20 % y 5 mL de agua destilada, después de 1 minuto se añadió 500 µL de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó en reposo durante 1 hora. (Todo el proceso se realizó por triplicado). Pasado 1 hora de reposo, se llevó a lectura a 760 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

7.12 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS

a) Extracción hidroalcohólica de Taninos (EHT): Se pesó 10,07 g de corteza, se añadió 500 mL de etanol al 50 %, se dejó macerando con agitación durante 17 horas a temperatura ambiente, obteniéndose al extracto hidroalcohólico de taninos (EHT) (Gutiérrez, 2000).

b) Preparación de la curva de calibración: Se preparó la curva de calibración utilizando como patrón al ácido tánico.

Se pesó 25 mg del ácido tánico y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de fondo redondo de 25 mL (concentración de 1000 ppm), se tomó 10 mL de la solución de 1000 ppm y se enrasó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 100 mL (concentración de 100 ppm), finalmente se tomó 5 mL de la solución de 100 ppm y se enrasó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 50 mL (concentración de 10 ppm = Sm).

Se realizó la curva de calibración tomándose concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ppm. Para ello se tomó volúmenes de Sm, de acuerdo a las concentraciones deseadas y se colocó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 10 mL, seguidamente se añadió con una micro pipeta 600 µL de Na₂CO₃ 20 % y 5 mL de agua destilada, después de 1 minuto se añadió 100 µL de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó en reposo durante 10 minutos.

c) Preparación de muestra: En un matraz volumétrico de fondo redondo de 10 mL, se introdujo 300 µL de EHT, 600 µL de Na₂CO₃ al 20 % y 5 mL de agua destilada, después de 1 minuto se añadió 100 µL de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó en reposo durante 10 minutos (se realizó todo el proceso por triplicado). Pasado los 10 minutos de reposo se leyó a 755 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

d) Cálculos correspondientes para la cuantificación de polifenoles totales, taninos y carbohidratos.

Ecuación para determinar concentraciones

$$[\text{Metabolito}] = \frac{[\text{Lectura}] \times V_t \times f_d}{w} \dots\dots\dots \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

- $[]_{\text{Metabolito}}$ = Concentración de metabolito (polifenoles, taninos, carbohidratos; expresado en mg/100g de estándar o g/100g de estándar)
- $[]_{\text{lectura}}$ = Concentración de lectura en el equipo (mg/mL)
- V_t = Volumen total (mL)
- fd = Factor dilución
- W = Peso inicial de muestra (g)

7.12 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

7.13.1 Ensayo preliminar para la actividad antioxidante

Se sembró con un capilar alícuotas del mucílago y del extracto metanólico (EM) en una placa cromatografica, se esperó que secan, se rocío el radical (DPPH) al 0, 2 % en etanol y luego se examinó la placa a la luz del día. Los compuestos activos aparecen como manchas amarillo-blancuzcas contra un fondo púrpura (Kurt, 2008).

7.13.2 Determinación de actividad antioxidante del ácido ascórbico, EM y el mucílago.

a) Preparación de la concentración madre (CM): Se pesó 1,7 mg de ácido ascórbico, 10,50 mg de EM y 33,50 mg de mucílago liofilizado se redisolvió con 5, 7 mL de etanol y 5 mL de agua destilada, respectivamente. Siendo las concentraciones madre (CM) para el ácido ascórbico 340 $\mu\text{g/mL}$, el EM 1500 $\mu\text{g/mL}$ y el mucílago liofilizado 6700 $\mu\text{g/mL}$.

b) Preparación de DPPH: Se pesó 20 mg de DPPH y se disolvió con 50 mL de etanol, tomándose 4 mL de esta solución y llevándose a un matraz volumétrico de fondo redondo de 50 mL. Para asegurarse que esta solución de DPPH se encontrara en el rango de absorbancia (1-1,4), se llevó a lectura en el espectrofotómetro UV-Vis.

c) Búsqueda del factor dilución (Fd): Para encontrar el factor dilución se hizo una serie de confrontaciones entre el DPPH y la muestra (llevándose a volumen total de 1000 μL). Así el Fd que se tomó fue aquella confrontación que viró de violeta a amarillo y fue utilizado para los cálculos posteriores.

- Ácido ascórbico: 40 μL (CM) con 960 μL (DPPH) siendo el Fd: 25
- EM: 10 μL (CM) con 990 μL (DPPH) siendo el Fd: 100
- Mucílago liofilizado: 200 μL (CM) con 800 μL (DPPH) siendo el Fd: 5

d) Diluciones sucesivas: Una vez conocida el factor dilución se procedió a hacer los cálculos correspondientes para preparar las concentraciones deseadas.

- Ácido ascórbico: 14,4; 14,1; 13; 12; 8; 4; 1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$.
- EM: 75, 70, 60, 50, 40, 20, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/mL}$.
- Mucílago liofilizado: 1340, 1000, 800, 500, 200, 100, 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

e) Reducción del DPPH (confrontación):

- 25 μL (diluciones del ácido ascórbico) con 960 μL (DPPH)
- 10 μL (diluciones del EM) con 990 μL (DPPH)
- 200 μL (diluciones del mucílago liofilizado) con 800 μL (DPPH)

Después de la confrontación se dejó en incubación todas las muestras durante 30 minutos, pasado este tiempo se llevó a lectura a 517 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

f) Cálculos correspondientes para la evaluación de la actividad antioxidante.

$$\%I = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación (2)}$$

f.1) La ecuación para la curva de calibración es: $y = ax + b$

Dónde: $y = (\%I)/2$, $x = \text{Cl}_{50}$

f.2) Cálculo para el Cl_{50} :

$$\text{Cl}_{50} = (\%I)/2 - b \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación (3)}$$

Donde:

- A_{DPPH} = Absorbancia del DPPH
- A_{muestra} = Absorbancia de la muestra
- $\% I$ = Porcentaje de inhibición
- Cl_{50} = Cantidad de concentración necesaria para inhibir en un 50 % al radical DPPH

7.14 ANÁLISIS DE LOS POSIBLES METABOLITOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

7.14.1 Mapeo de metabolitos con actividad antioxidante

Se sembró al extracto EM en una placa de sílica gel y se desarrolló con el disolvente de elución (FM), se esperó que seicara y se roció con DPPH al 0,2 %. Finalmente se examinó el cromatograma a la luz del día y con la lámpara UV, antes y después de 30 minutos.

Fase móvil: - FM1: Hexano – cloroformo – acetato de etilo (6:1:1)

- FM2: Hexano – cloroformo – agua destilada (4:1:1)

- FM3: Butanol – ácido acético glacial – agua destilada (6:1:2)

Revelador: Lámpara UV

7.15 ANÁLISIS QUÍMICO DE TANINOS CONDENSADOS

De acuerdo al análisis preliminar de la marcha fitoquímica de la corteza, se sabe que uno de los metabolitos presentes son los taninos condensados y al cuantificarlos, se encontró mayor cantidad de ellos. Mediante el ensayo del mapeo de metabolitos con actividad antioxidante, se sabe que presenta carácter polar lo cual indicaría presencia de estos taninos, por ello se le analizará a continuación.

7.15.1 Análisis de proantocianidinas: Se colocó 500 μ L del extracto EM (1:10) en un tubo de ensayo con tapa rosca, añadiéndose 7 mL de reactivo (mezcla de 5 mL de HCl_(cc) con 0,07 g de FeSO₄.7H₂O y se enrazó a un matraz de fondo redondo de 10 mL con butanol) y se llevó a ebullición en baño maría durante 1 hora, una vez fría la solución se hizo un barrido en el espectrofotómetro UV-Vis.

7.15.2 Conversión de proantocianidinas en antocianidinas

Se tomó 1 mL de EM se llevó a sequedad y se redisolvió con 5 mL de HCl 2 N, se llevó a ebullición en baño maría durante 1 hora, después de este tiempo, se colocó en una pera de decantación de 50 mL y se añadió alcohol amílico, observándose la aparición de color rojo intenso en la fase amílica, luego se hizo un barrido en el espectrofotómetro UV-Vis.

7.15.3 Análisis de antocianidinas

- **Cromatografía unidimensional:** Se sembró en cromatofolios alícuotas del extracto EM y de la fracción amílca, se esperó que secan las alícuotas (mancha de producto depositado) y se desarrolló con el disolvente de elución (FM).
 - Fase móvil (FM): Sec-butanol-ácido acético-agua destilada (14:1:5)
 - Revelador: Lámpara UV.
- b) **Cromatografía bidimensional:** Después de conseguir las separaciones del producto depositado (cromatograma unidimensional), se volvió a colocar el cromatograma en la cubeta (cubeta previamente acondicionada con otra fase móvil) con un giro de 90 °C.
 - Fase móvil: Ácido acético al 6 %
 - Revelador: Lámpara UV.

7.15.4 Monitoreo de aislamiento de antocianidinas:

Este análisis se realizó a la fracción amílca mediante la CCF y el barrido en el espectrofotómetro UV-Vis.

- Fase móvil: - Forestal: ácido acético – HCl_(cc) – agua destilada (30:3:10)
 - Fórmico: ácido fórmico – HCl_(cc) – agua destilada (5:2:3)
 - BAA: butanol: ácido acético – agua destilada (6:1:2)
- Revelador: Lámpara UV.

7.16 Aislamiento del metabolito a partir del extracto EM para análisis por CPG

7.16.1 Preparación de la fracción hexánica (método de partición)

Se disolvió 1 g del extracto EM con 50 mL metanol, se separó por partición, colocándose el extracto EM en una pera de decantación de 250 mL, se añadió 50 mL de agua destilada y 50 mL de hexano (formación de dos fases), se colectó la fase hexánica y se continuo con la separación de la fase acuosa para ello se añadió 50 mL de acetato de etilo, observándose dos fases que se recolectaron y se llevaron a estufa a 40° C hasta peso constante, obteniéndose 3 fracción: de hexano, acetato de etilo y agua.

7.16.2 Empacado y acondicionamiento de la columna cromatográfica

Se pesó 70 g de sílica, se humedeció con metanol hasta observar pastosidad, seguidamente se vació en la columna cromatográfica dejándose que fluya el metanol de la columna y agregándose constantemente el mismo metanol recolectado, manteniendo a la sílica siempre sumergida con el solvente (proceso que se repitió de 3 a 4 veces para evitar burbujas de aire y un mejor control de empacado de la columna). Una vez empacada la columna se agregó el solvente de elución (cloroformo) hasta desplazar todo el metanol de la columna dejándose reposar durante un día (proceso de acondicionamiento).

7.16.3 Preparación de la muestra para corrida en la columna cromatográfica

En un vaso de precipitado de 100 mL, se mezcló 0,1 g de la fracción hexánica con 1 g de sílica y 15 mL de cloroformo (se agregó de apoco hasta homogenizar totalmente la muestra, evitando que se vuelva pastosa), se dejó secar durante un día y se colocó en la columna cromatográfica, añadiéndose luego los solventes de elución (MeOH: CHCl₃). La elución consistió en partir del solvente más apolar (CHCl₃) y añadiéndose 2%, 7%, 15%, etc. de MeOH (mezcla de metanol-cloroformo) hasta llegar al 100% de MeOH (cada solvente de elución fue añadida por triplicado o hasta observar que las manchas que se iban separando se recolectora en un vaso o vial). Así se obtuvo 60 fracciones y se analizó en una placa cromatografica con solventes de elución (Hexano-cloroformo-acetato de etilo (6:1:1)).

Las fracciones 13 y 14 se juntaron obteniéndose 1,2 mg del metabolito aislado y se determinó el peso molecular mediante el análisis de CPG con solvente de elución THF y columna PS/DVB.

7.17 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO EM

7.17.1 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana

El enfrentamiento de los patógenos con el EM se realizó mediante el método de difusión por pocillos (MDP). Para lo cual se utilizaron placas con agar Tripticasa de soya, se sembraron los cultivos activos de los patógenos por hisopado, colocándose 30 µL y 50 µL de muestra en cada pocillo y se utilizaron antibióticos de referencia (Ciprofloxacino, Gentamicina y Ampicilina, como control positivo de inhibición).

Finalmente se dejó en incubación durante 24 horas a 37 °C, pasado este tiempo se examinaron los resultados.

Patógenos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 13706 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

7.17.2 Evaluación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

En esta evaluación las cepas fueron mantenidas en Caldo tripticasa de soya, con crecimiento a 37°C de incubación. (Karthy, 2009)

Se preparó una suspensión bacteriana calibrada a 0,5 de la escala Mc. Farland, a partir de un cultivo en fase exponencial y los extractos fueron resuspendidos en sus respectivos solventes, se prepararon diluciones 1:2 de dicha suspensiones, aplicando 10 µL de cada una en los pocillos de micro dilución (microplacas). Posteriormente, 80 µL de caldo Tripticasa de Soya 2X (doble concentración) se vertieron y se mezclaron con la suspensión de prueba.

Finalmente, 10 µL de la suspensión bacteriana fue vertida en cada uno de los pocillos y llevada a incubación durante 24 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo se vertió 40 µL de Cloruro - 2, 3, 5 -Trifenil Tetrazolio (TTC; 5 mg/mL) a cada uno de los pocillos y se llevó nuevamente a incubación por 20 minutos. El viraje de amarillo a rojo fue considerado como indicativo de crecimiento microbiano y se tomó el valor de la CMI a la menor concentración del extracto en la que no hubo crecimiento.

Patógenos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Muestras: EM Antiguo (6 meses de extraído), EM fresco y extracto de acetato de etilo.

Diluciones:

- Concentración madre (CM): 174,0 mg/mL
- Diluciones a partir de (CM): 100; 50; 25; 12,5 mg/mL

7.17.3 Cálculos correspondientes para la evaluación de la actividad antimicrobiana

a) Cálculo para determinar el halo (mm)

$$\varnothing = \frac{D_{\text{inhibición}}}{2} \dots\dots\dots \text{Ecuación (6)}$$

b) Cálculo para determinar porcentaje de inhibición (%I)

$$\% I = \frac{D_{\text{inhibición}} - D_{\text{Disco}}}{D_{\text{inhibición}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ecuación (7)}$$

Donde:

- \varnothing = Valores de los halos
- % I = Porcentaje de inhibición
- $D_{\text{inhibición}}$ = Diámetro de inhibición
- D_{Disco} = Diámetro de disco

7.18 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DEL MUCÍLAGO

7.18.1 Aislamiento de carbohidratos: Se pesaron 0,52 g de mucílago liofilizado en un tubo de centrifuga con tapa rosca, se añadió 5 mL de metanol y se sonicó durante 3 horas a 67 °C, luego se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y al residuo se le añadió nuevamente 5 mL de metanol (proceso para eliminar los polifenoles presentes en la muestra, se repitió 2 veces).

Luego se cambió de solvente, añadiéndose 5 mL de acetona sobre el residuo y se sonicó durante 3 horas, se eliminó el sobrenadante y al residuo se añadió éter etílico, llevándose a centrifugar durante 30 minutos (proceso para secar el residuo por intercambio de solventes). Finalmente se llevó a estufa durante 3 horas a 40 °C hasta peso constante.

Posteriormente se pesaron 100 mg de la muestra seca y se añadió 5 mL de H_2SO_4 2 N y se llevó a ebullición durante 2 horas, la solución ácida fue neutralizada con Na_2CO_3 (sólido) y centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos (muestra tratada).

7.18.2 Análisis cualitativo preliminar

a) **Prueba de Fehling:** A un tubo de ensayo se añadió 1 mL Fehling A y 1 mL Fehling B, luego se adicionó 3 gotas de muestra y se llevó a calentar en baño maría durante 10 minutos.

b) **Cromatografía en capa fina (CCF):** Este análisis se realizó en cromatofolios, empleándose kit de carbohidratos (estándares de 0,1 % de azúcares); glucosa, fructuosa, galactosa, manosa, arabinosa, ribosa y xilosa, luego se sometió al sistema de elución (FM).

- Fase móvil (FM): butanol-etanol-agua destilada (52:33:15)
- Revelador: vainillina

7.18.3 Cuantificación de carbohidratos totales: Método espectrofotométrico Fenol-ácido sulfúrico

a) **Preparación de la curva de calibración:** Se preparó la curva de calibración utilizando como patrón la glucosa.

Así se introdujo 25,00 mg de glucosa en un matraz volumétrico de fondo redondo de 25 mL y se enrasó con agua destilada (concentración de 1000 ppm), se tomó 10 mL de solución de 1000 ppm y se enrasó en un matraz volumétrico de fondo redondo de 100 mL (concentración de 100 ppm = Sm). Luego se realizó la curva de calibración en tubos de ensayo de 15 mL, se tomó de la Sm, volúmenes de 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; 1 mL; se completó a 1 mL con agua destilada y se añadió 1000 μ L de fenol 5 %, 5 mL de H₂SO_{4 (cc)}, luego se agitó y se llevó a baño de agua fría durante 20 minutos para el desarrollo del color amarillo – naranja. Pasado los 20 minutos, se leyó a 486 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

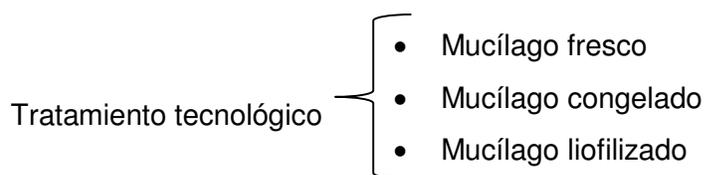
- **Preparación de muestra:** Se tomó en un tubo de ensayo 300 μ L de muestra aislada, se añadió 1000 μ L de fenol 5 % y 5 mL de H₂SO_{4(cc)}, Se agitó y se llevó a baño de agua fría durante 20 minutos (tiempo en que desarrolla el color). Pasado los 20 minutos, se leyó a 486 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

7.19 ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS REOLÓGICOS DEL MUCÍLAGO

7.19.1 Obtención del Mucílago

La extracción del mucílago se realizó en la proporción de: corteza-agua (1 g: 10 mL), dejándose en maceración durante 24 horas. (Este proceso se realizó por duplicado)

El mucílago obtenido después de 24 horas, fue sometido a la medida de la viscosidad, luego para su conservación se llevó a congelar, mientras que la otra muestra mucilaginoso fue liofilizada a estos procesos de extracción y conservación se les denominó tratamiento tecnológico, así las muestras utilizadas para medir la viscosidad fueron:



7.19.2 Medida de la viscosidad

500 mL del mucílago a temperatura de 22°C fue sometido a rangos de rotación de entre 5 y 120 rpm con el viscosímetro de Brookfield y spindle # 2, tomándose medidas cada 0,5 segundos. Los valores de porcentaje de torque a las revoluciones por minutos fueron tratados mediante la metodología de Mitschka (1982) en el software Microsoft Office Excel, obteniéndose el esfuerzo de corte (τ , Pa) y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$, s⁻¹), mediante la linealización del modelo de ley de potencia se calculó los parámetros reológicos de índice de consistencia (K, pa.sⁿ⁻¹) e índice de fluidez (n), con estos valores se calcularon la mínima y máxima viscosidad aparente (η).

Finalmente estos resultados fueron analizados en el Software Statgraphics Centurión XVI.1.18 mediante diseños experimentales de factorial mixto 2 x 3 y factorial 2².

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y CENIZA DE LA CORTEZA

La Tabla 3 muestra la determinación del contenido de humedad y ceniza de la corteza.

Tabla 3. Porcentaje de humedad y ceniza.

MUESTRA	HUMEDAD %	CENIZA %
Corteza fresca	74,70	2,76

8.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MINERALES DE LA CORTEZA

La Tabla 4 muestra algunos minerales analizados de la corteza, donde el calcio analizado de entre los minerales, se encuentra en mayor cantidad.

Tabla 4. Valores de concentración de minerales en ppm.

Ppm						
Ca	Fe	Zn	Na	Mn	Cu	Cr
4007,16	41,83	9,27	70,95	5,37	5,65	2,23

8.3 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE LA CORTEZA

Se encontró mayor rendimiento, mediante la técnica de maceración en frío. En esta técnica el solvente se encuentra en contacto con los componentes de la corteza por mucho más tiempo, siendo la técnica más recomendable porque evita la degradación de los metabolitos, puesto que no se encuentra expuesta a temperaturas altas (reflujo), ni a vibraciones (ultrasonido), etc. (Ver Tabla 5)

Tabla 5. Rendimiento de extracción de la corteza con hexano.

MUESTRA	TÉCNICAS		
	Maceración en frío	Extracción por reflujo	Extracción por ultrasonido
RENDIMIENTO (%)	2,90	0,63	0,53

8.4 EXTRACCIÓN SUCESIVA DE LA CORTEZA CON SOLVENTES DE POLARIDAD CRECIENTE

El extracto acuoso presenta mayor rendimiento, esto indica que la mayoría de los componentes de la corteza tienen una mayor afinidad con el agua, por tanto tienen carácter polar.

(Ver Tabla 6).

Tabla 6. Valores del porcentaje de rendimiento de los extractos

N°	MUESTRA	RENDIMIENTO (%)
1	EXTRACTO HEXANICO	0,53
2	EXTRACTO CLOROFORMICO	0,48
3	EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	0,37
4	EXTRACTO ETANÓLICO	0,59
5	EXTRACTO ACUOSO	41,00

8.5 ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

La Tabla 7 muestra los distintos metabolitos encontrados en la corteza mediante el análisis de la marcha fitoquímica, encontrándose lo siguiente:

Corteza pulverizada: saponinas esteroidales (abundante), flavonoides (escaso), taninos catéquicos (abundante), cumarinas (escaso) y azúcares reductores (abundante).

Extractos: En el extracto hexánico y clorofórmico saponinas (moderado), en el extracto de acetato de etilo saponinas (poco), antocianidinas (moderado), flavonoides y taninos (moderado), en el extracto etanólico saponinas (poco), proantocianidinas (abundante), flavonoide (poco), taninos catéquicos (moderado), cumarinas (poco), alcaloides (poco), en el extracto acuoso saponinas (poco), proantocianidina (abundante), taninos (abundante.).

Por otro lado, de acuerdo a la literatura solo se puede confirmar la presencia de alcaloides si 4 de los ensayos son positivos, por lo que la corteza no contiene alcaloides.

Tabla 7. Metabolitos encontrados en la corteza

MUESTRA		AE	SAP	PRO ANTO	FLAV	TAN	ANT Y BET	CUM	Q Y A	ALC	CARB
Corteza pulverizada		---	+++						---		
Extractos de corteza pulverizada	Acuoso		+++	+++		+++	---				+-
	Etanólico			+++	+-			+-			+-
	Acuoso acidificado									---	+-
	Etanólico acidificado						---			---	+-
Extracción sucesiva de corteza	Hexanico		++	---	---	---	---		---	---	
	Clorofórmico		++	---	---	---	---		---	---	
	Acetato de etilo		+-	++	+-	+-	---		---	---	
	Etanólico		+-	+++	+-	++	---	+-	---	+-	
	acuoso		+-	+++	---	+++	---		---	+-	

Leyenda:

- AE: Aceites esenciales
- SAP: Saponinas
- PRO ANTO: Proantocianidinas
- FLAV: Flavonoides
- TAN: Taninos
- ANT: Antocianinas
- BET: Betalaínas
- QA: Quinonas y antraquinonas
- CUM: Cumarinas
- ALCA: Alcaloides
- CARB: Carbohidratos
- Nula (- - -)
- Poco (+ - -)
- Moderado (++ -)
- Abundante (+ + +)
- Cuadros en blanco (No se realizó el ensayo)

8.6 DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

El pH de los extractos utilizados para los análisis posteriores, presentan comportamientos ligeramente ácidos, lo cual indicaría presencia de ácidos fenólicos (Bruneton, 2001) (ver Tabla 8).

Tabla 8. Valores de pH de los extractos.

Extracto	pH
EM	4,5
EHT	5,5
Mucílago	6,5

8.7 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La Tabla 14 muestra valores de concentración y absorbancia de la muestra (EM), al realizar los cálculos correspondientes mediante la ecuación 5, se encontró $1184,96 \frac{mg}{100g}$ (AG) de polifenoles totales.

Tabla 14. Valores de Concentración y absorbancia de muestras.

	[mg/L]	Abs (760nm)
EM1	3,194	0,104
EM2	3,024	0,098
EM3	3,556	0,116

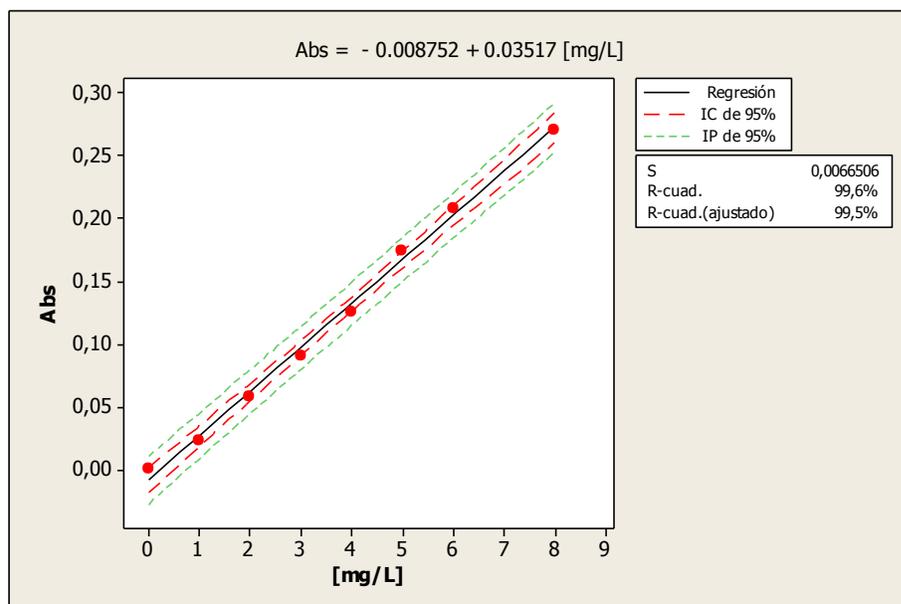


Figura 17. Curva de Ácido Gálico

8.8 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS

La Tabla 15 muestra valores de concentración y absorbancia de la muestra (EHT), al realizar los cálculos correspondientes mediante la ecuación 5, se encontró $751,20 \frac{mg}{100g}$ (AT) de taninos condensados.

Tabla 15. Valores de Concentración y Absorbancia

Muestras	[mg/L]	Abs (755nm)
EHT1	4,529	0,140
EHT2	4,805	0,148
EHT3	4,882	0,151

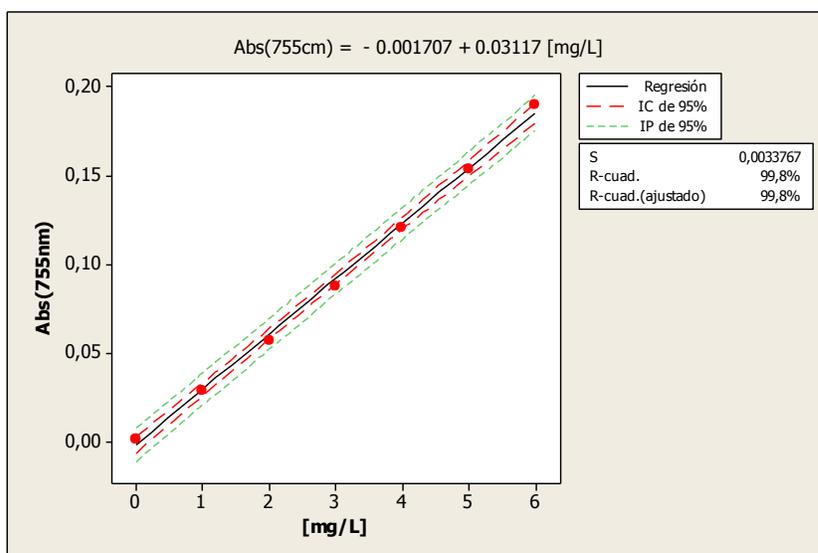


Figura 18. Curva de Ácido Tánico

En este análisis se encontró mayor cantidad de taninos condensados, quedando aproximadamente $433,76 \frac{mg}{100g}$ (AG) de los otros metabolitos polifenólicos (flavonoides, cumarinas, etc.), presentes en la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq.

8.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

8.9.1 Ensayo preliminar de actividad antioxidante

Las manchas amarillo-blancuzcas contra un fondo púrpura del cromatofolio, indican que el mucílago y el extracto metanólico (EM), muestran actividad antioxidante frente al radical DPPH (ver Figura 19).

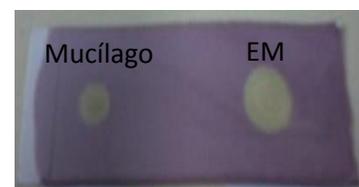


Figura 19

8.9.2 Determinación de la actividad antioxidante

Las Figuras 20, 22 y 24 muestran la decoloración del DPPH de violeta a amarillo (gráfica de dispersión de % I vs ($\mu\text{g/mL}$)) y las Figuras 21, 23 y 25 muestran gráficos de análisis de regresión de % I vs. ($\mu\text{g/mL}$) para determinar el parámetro del CI_{50} .

8.9.2.1 Determinación de la actividad antioxidante del ácido ascórbico

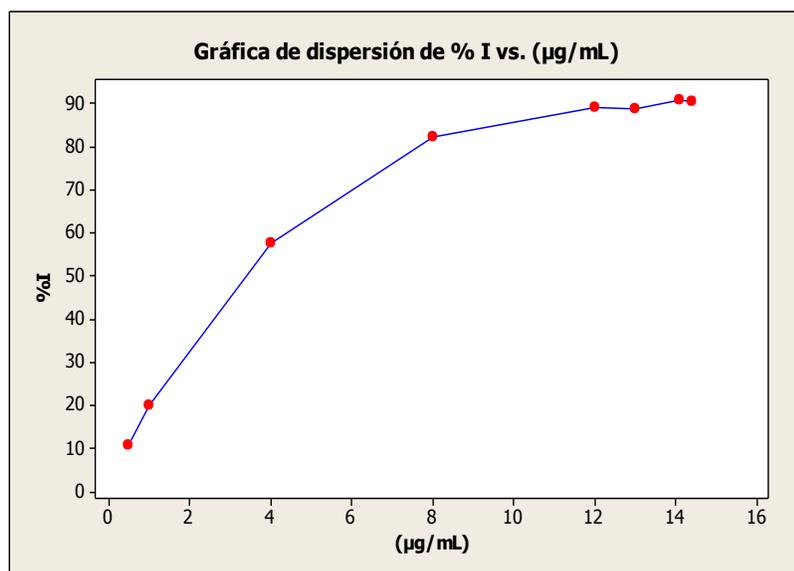


Figura 20. Decoloración del color violeta del radical DPPH al ser confrontado con el ácido ascórbico

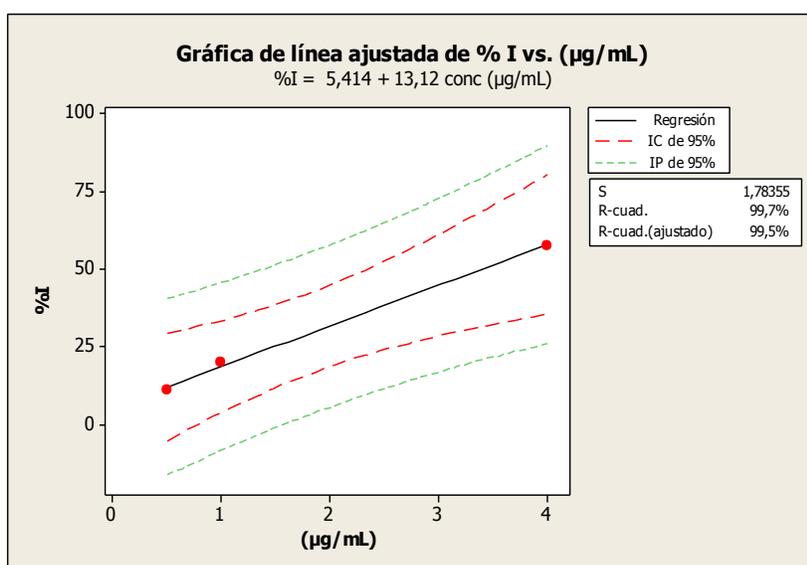


Figura 21. Análisis de regresión para determinar el parámetro de CI_{50} del ácido ascórbico

8.9.2.3 Determinación de la actividad antioxidante del EM

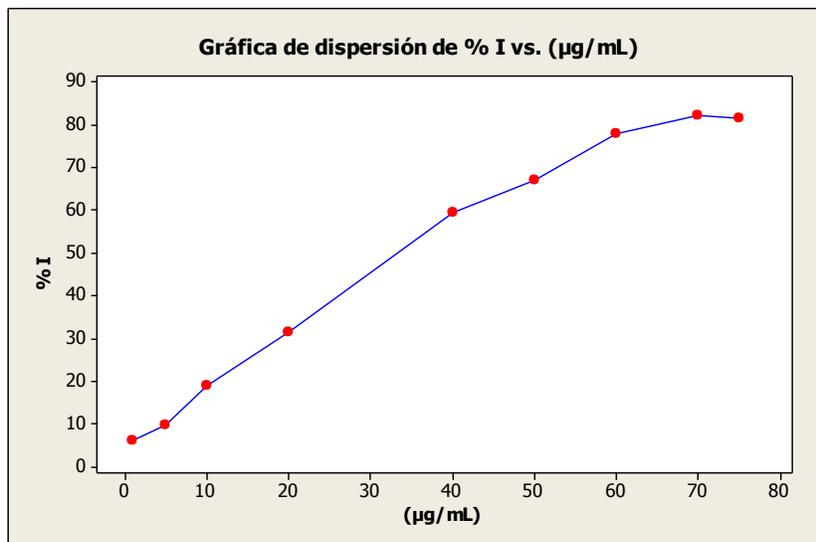


Figura 24. Decoloración del color violeta del radical DPPH al ser confrontado con el EM

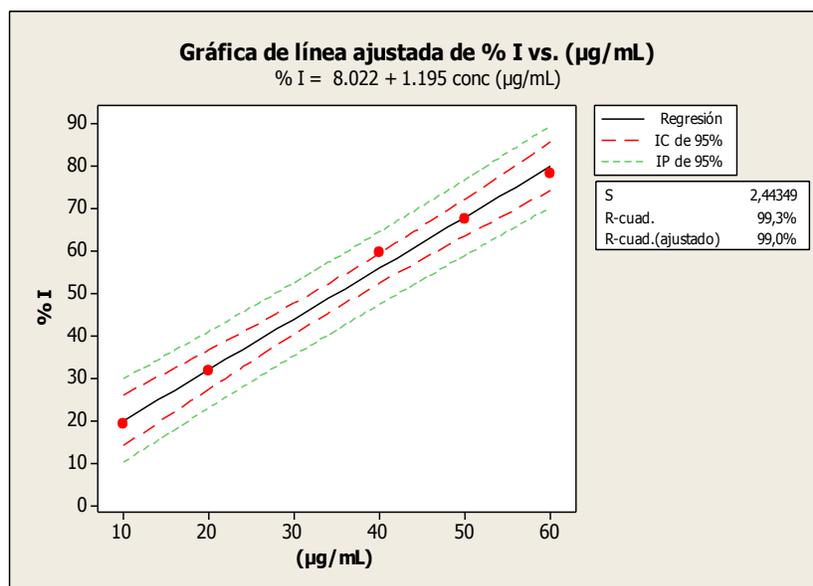


Figura 25. Análisis de regresión para determinar el parámetro de CI_{50} del EM.

8.9.2.2 Determinación de la actividad antioxidante del mucílago

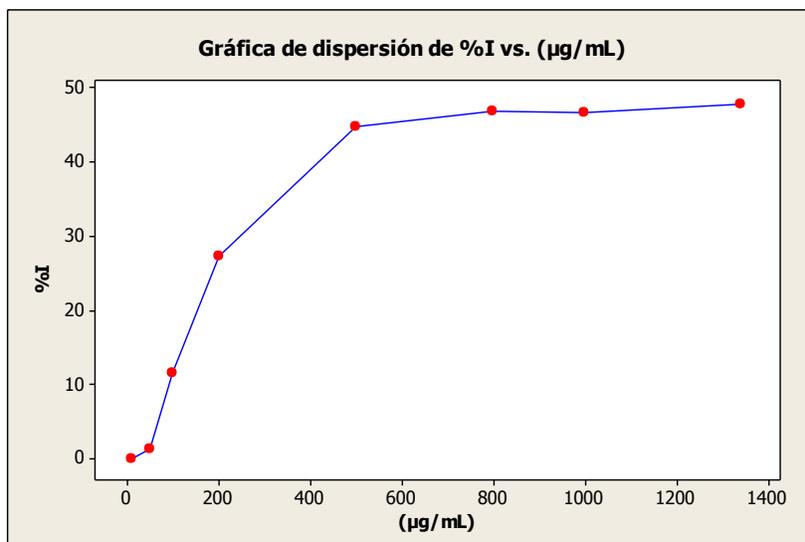


Figura 22. Decoloración del color violeta del radical DPPH al ser confrontado con el mucílago.

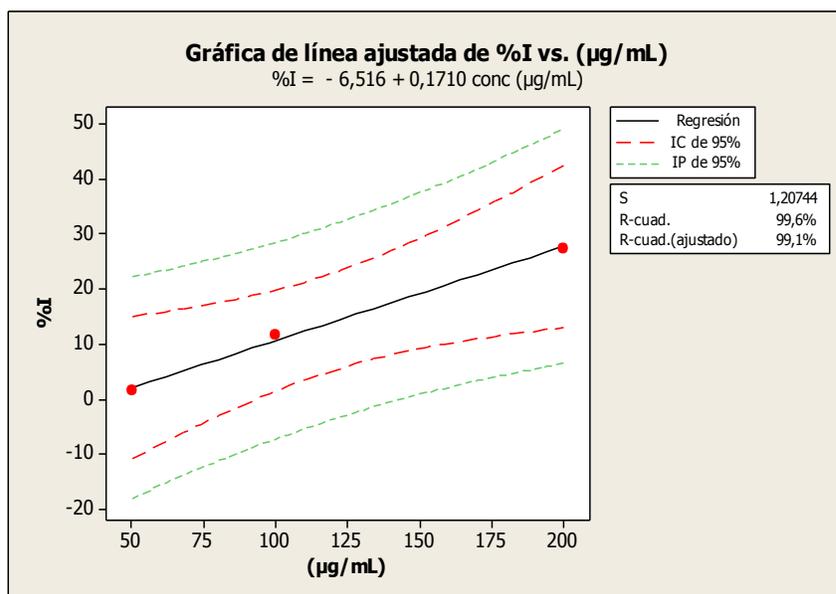


Figura 23. Análisis de regresión para determinar el parámetro de CI₅₀ del mucílago.

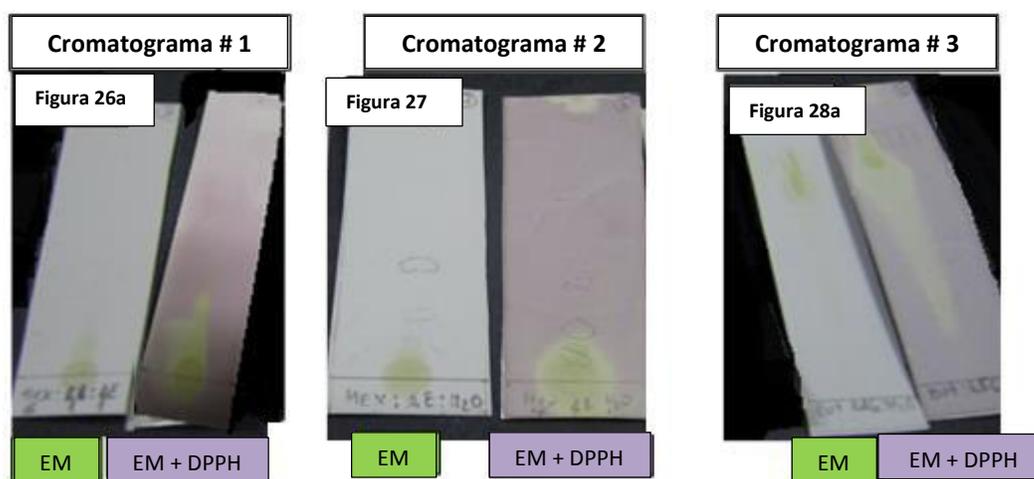
Para verificar esta técnica se determinó la actividad antioxidante del ácido ascórbico encontrándose un CI_{50} 2,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ demostrándose así que esta técnica fue eficaz al comparar con la bibliografía (Khalaf, 2007 y Cuentas, 2008).

Por otro lado en la evaluación del extracto EM, se determinó que este extracto, tiene más actividad antioxidante que el mucílago, puesto que el CI_{50} es 21,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 169,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

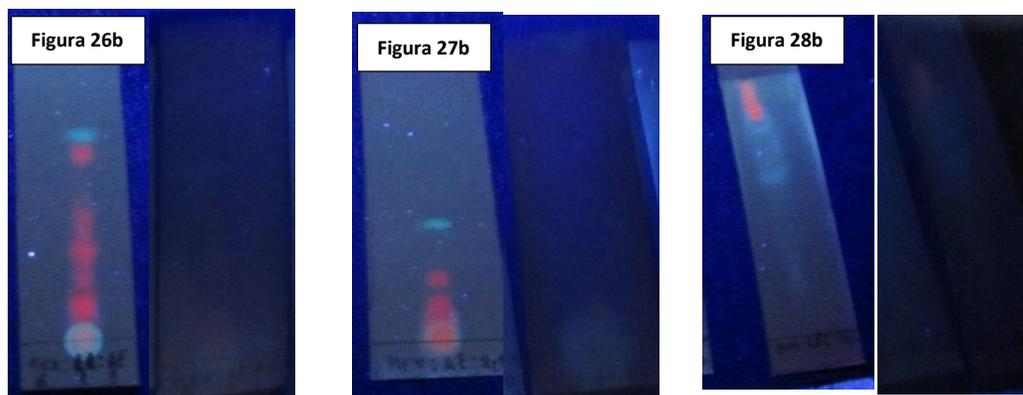
8.10 ANÁLISIS DE LOS POSIBLES METABOLITOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

8.10.1 Mapeo de metabolitos con actividad antioxidante

Cromatograma
vista a la luz del
día.



Cromatograma
al revelarse de
con lámpara
UV de onda
larga
(365 nm)



Los cromatogramas 1, 2 y 3 muestran el desarrollo del EM con los disolventes de elución apolar (cromatograma # 1), entre apolar y polar (cromatograma # 2) y polar (cromatograma # 3), analizadas a la luz del día y con la lámpara UV.

En este mapeo, se observa que los cromatogramas a la luz del día presentan, manchas amarillo-blancuzcas contra un fondo púrpura, por lo que el extracto EM, tienen buena actividad antioxidante.

Al revelarse los cromatofolios con la lámpara UV, las manchas amarillo-blancuzcas (partes reducidas del DPPH) son las manchas rojas y celestes, los cuales posiblemente sean los compuestos activos que reducen los radicales libres, tal como se puede deducir del análisis de los cromatofolios. (Ver figuras 26, 27 y 28) Estas manchas que reducen los radicales libres tienen carácter polar, ya que los cromatofolios # 1 y # 2 se desarrollan con solventes apolares (manchas amarillo blancuzcas que se encuentran en la parte inferior del cromatofolio) y el cromatofolio # 3 se desarrolla con solventes polares (manchas que se encuentran en mayor proporción en la parte superior del cromatofolio).

8.10.2 Análisis químico de taninos condensados

8.10.2.1 Conversión de proantocianidinas en antocianidinas

Luego de la Conversión de proantocianidinas en antocianidinas mediante la hidrólisis ácida y la aparición del color rojo intenso secuestrada por la fase amílica, indicaría la presencia de taninos condensados (ver Figura 29).



Figura 29

8.10.2.2 Análisis de antocianidina

Para este mapeo se analizó unidimensional y bidimensionalmente el extracto (EM) (extracto no tratado) y la fracción tratada de la fase amílica (antocianidina) sometidos ambos a distintos solventes de elución. Así se observó con la lámpara UV, presencia de antocianidina (mancha de color rojo) en la fracción de la fase amílica; pero no en el extracto (EM) (ver Figuras).

a) Cromatografía unidimensional

Revelado con lámpara UV de onda corta

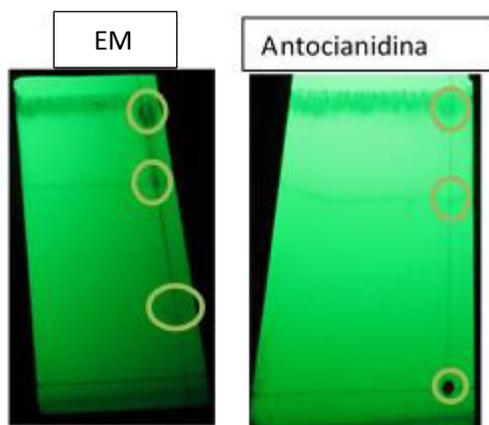


Figura 30

Revelado con lámpara UV de onda larga

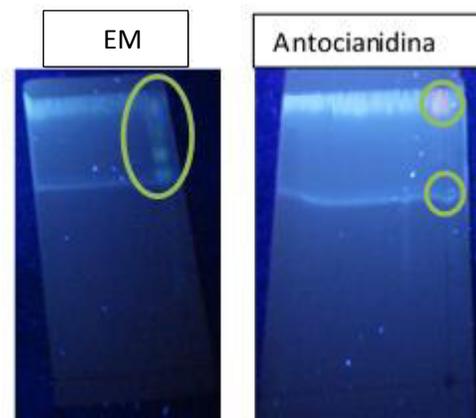


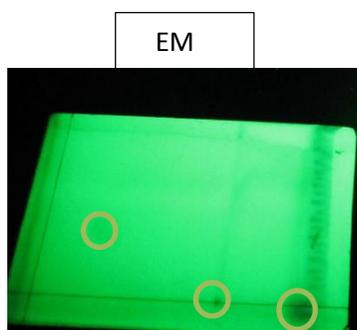
Figura 31

b) Cromatografía bidimensional

Revelado con lámpara UV de onda corta

(254 nm)

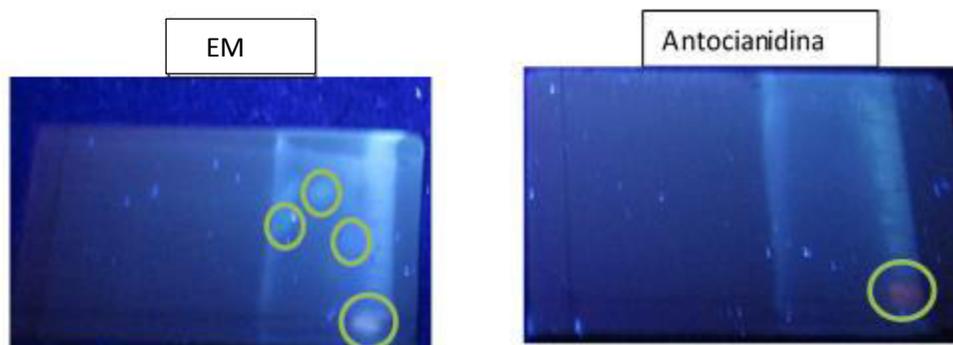
Figura 32



Revelado con lámpara UV de onda larga

(365 nm)

Figura 33



8.10.2.4 Monitoreo de aislamiento de antocianidinas

La CCF de la fracción amílica sometida a los solventes de elución, mostraron Rfs semejante a los de las antocianidinas (ver Figura 34).

Solvente de elución Experimental	Rf x 100			
	Fórmico	Forestal	BAA	Color
	23	75	90	rojo

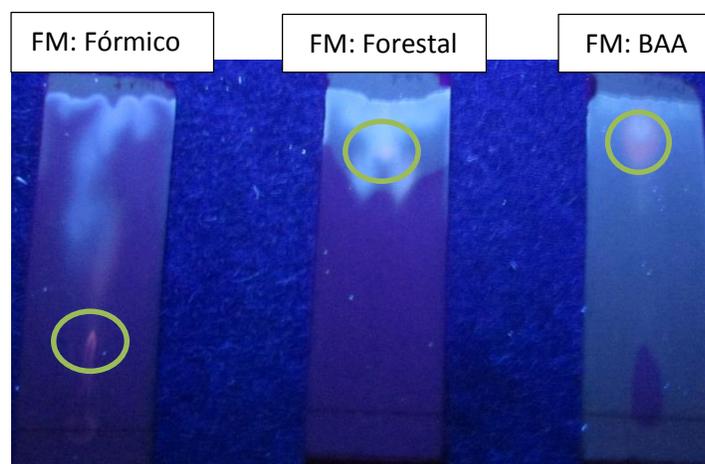


Figura 34

8.11 ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE UV-VIS E IR DE LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA

8.11.1 Espectros UV-Vis de extractos y taninos aislados.

Espectros UV-Vis de muestras extraídas con solventes de polaridad creciente y muestras aisladas para el análisis de taninos condensados, considerando como patrón al espectro UV-Vis de la Quercetina.

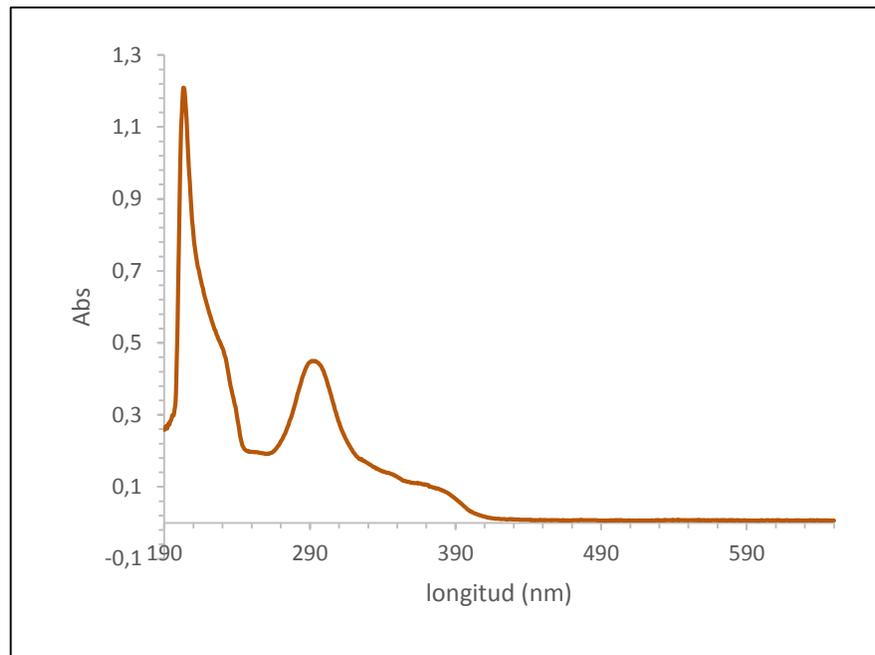


Figura 35. Espectro de bandas de absorción del patrón de la quercetina.

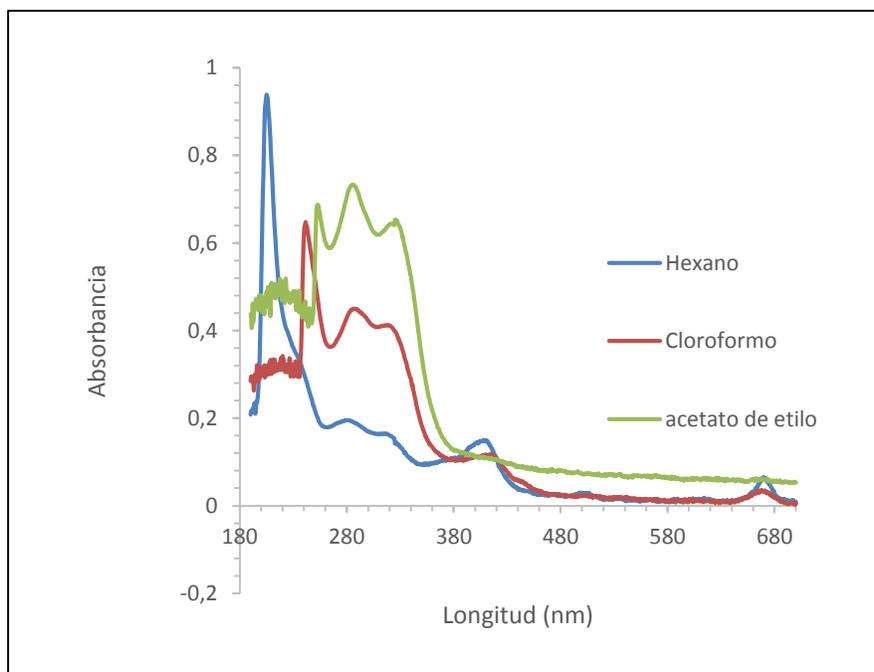


Figura 36. Superposición de espectros de bandas de absorción de extractos (obtenidos con solventes apolares a partir de la corteza).

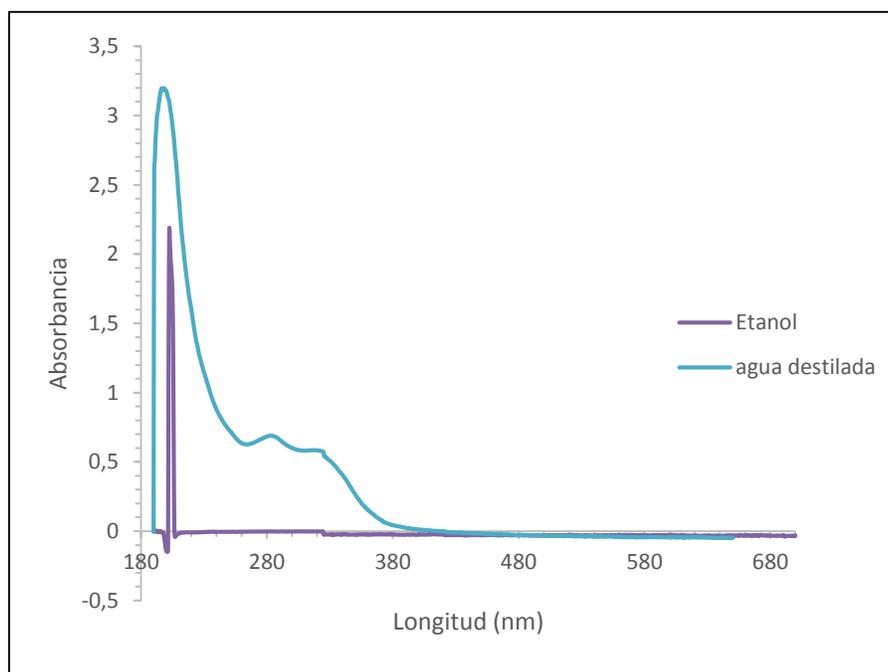


Figura 37. Superposición de espectros de bandas de absorción de extractos (obtenidos con solventes polares a partir de la corteza).

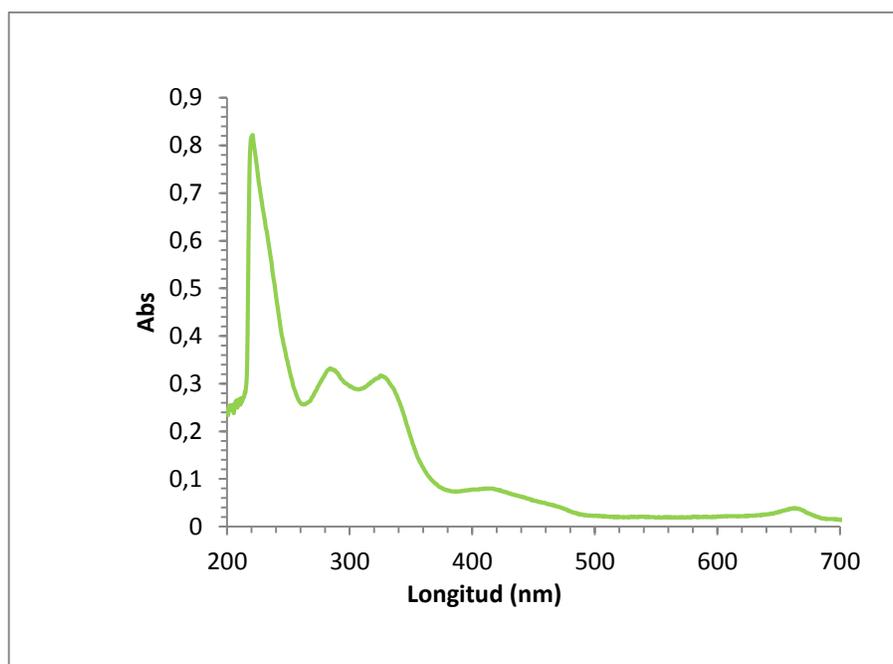


Figura 38. Espectro de bandas de absorción del extracto metanólico (EM).

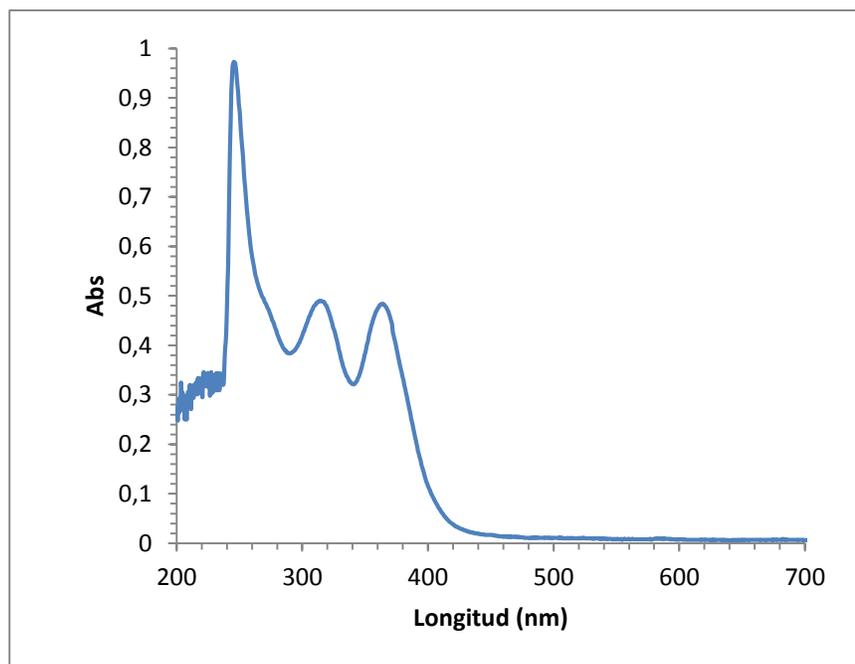


Figura 39. Espectro de bandas de absorción de la muestra aislada (Proantocianidina del tanino condensado)

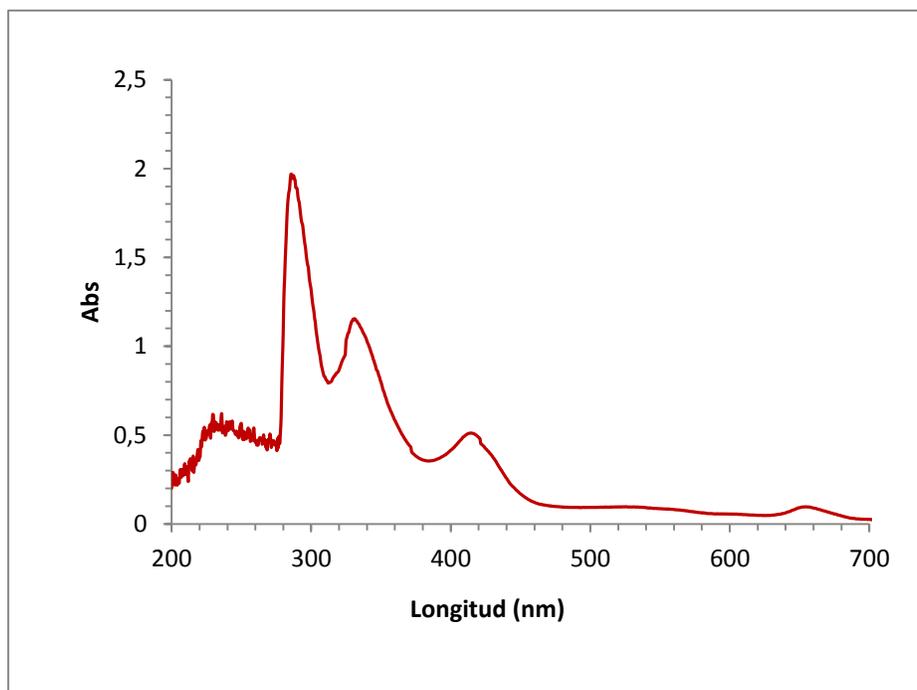


Figura 40. Espectro de bandas de absorción de la muestra aislada (antocianidina)

El perfil de la Quercetina es semejante al perfil de los extractos de hexano, agua destilada, EM, proantocianidina y antocianidina, además los precursores de la Quercetina (flavonoide) y los taninos condensados son las flavanonas. Esto indicaría la presencia de flavanonas en la corteza y con ello a las proantocianidinas (ver Tabla 12)

Tabla 12. Valores de longitud de onda teóricos y experimentales para las bandas (B1) y (BII) de los distintos tipos de flavanonas.

		Extractos	Longitudes de onda (nm)
Teórica (Lock, 1994)	Espectro teórico de flavonoides. B(II) 240-285 nm B(I) 300-550 nm)	Flavanona y dihidroflavonoles	B(II) 275-298, Hombro B(I) 300-330
		Isoflavonas	B(II) 245-275, Hombro B(I) 310-300
Experimental	Patrón	Quercetina	B(II) 205, Hombro B(I) 297
	Muestras	Hexano	B(II) 206.5, Hombro B(I) 293
		Cloroformo	B(II) 251 B(I) 294,5
		Acetate de etilo	B(II) 290 B(I) 329,5
		Etanol	B(II) 203
		Acuoso	B(II) 290,5 B(I) 329
		Extracto metanólico (EM)	B(II) 287,5 B(I) 336,5
		Proantocianidina	B(II) 249,5, Hombro B(I) 320,5
		Antocianidina	B(II) 288,5 nm B(I) 334,5 nm

8.11.2 Espectros IR de extractos obtenidos con solventes de polaridad creciente

Las Figuras del 41 al 46 muestran bandas características de los grupos funcionales de los extractos obtenidos con solventes de polaridad creciente.

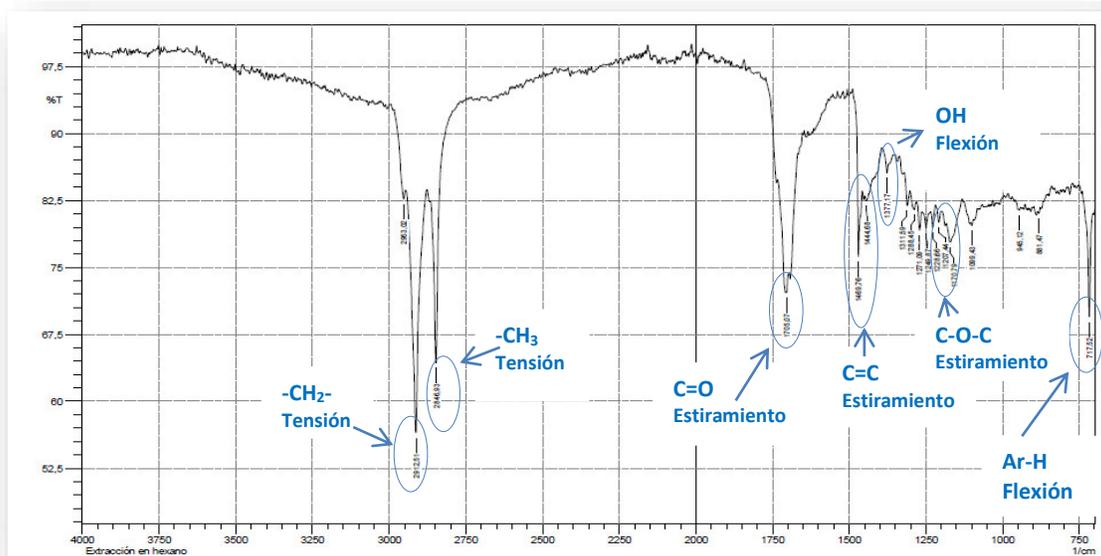


Figura 41. Espectro del Extracto hexanico.

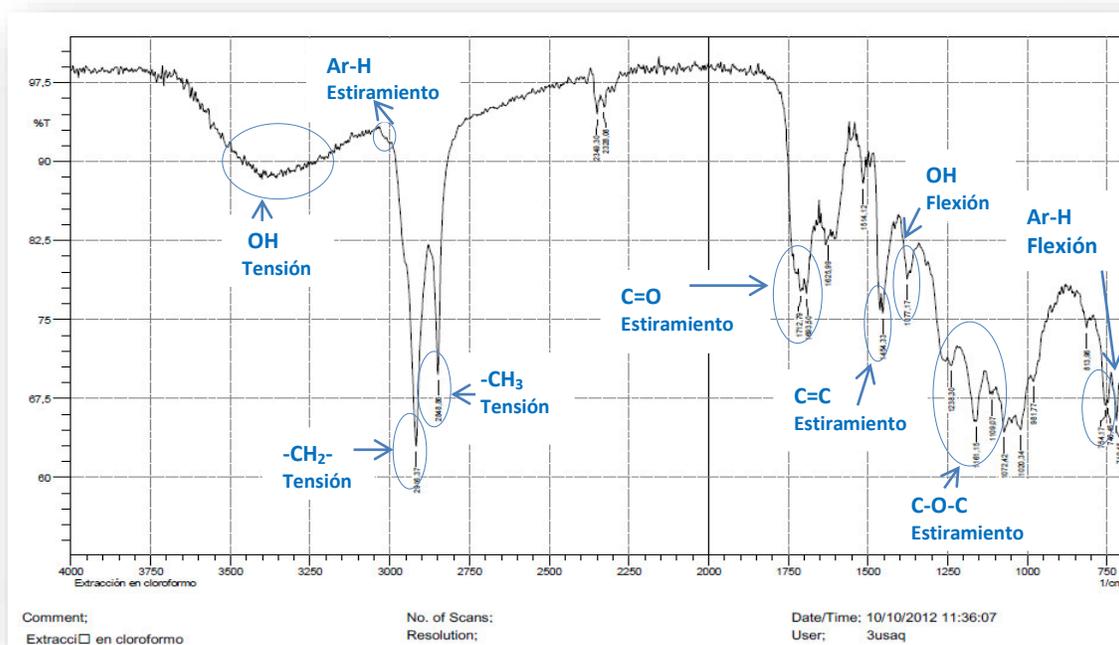


Figura 42. Espectro del extracto clorofórmico

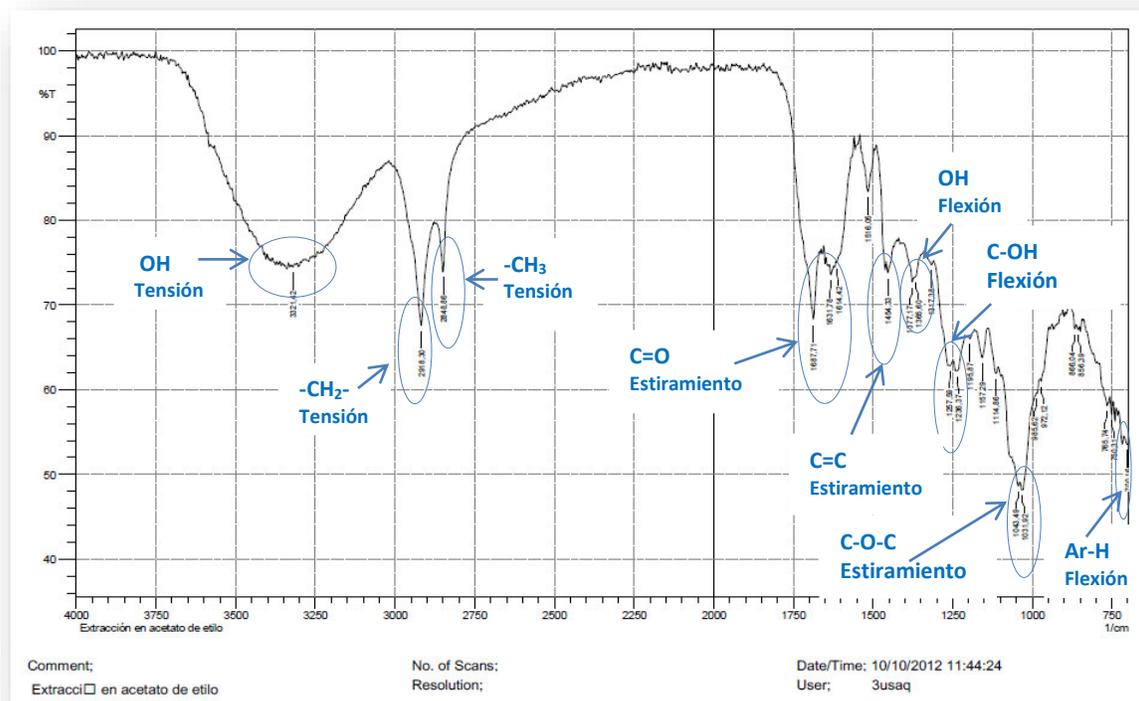


Figura 43. Espectro del extracto del acetato de etilo

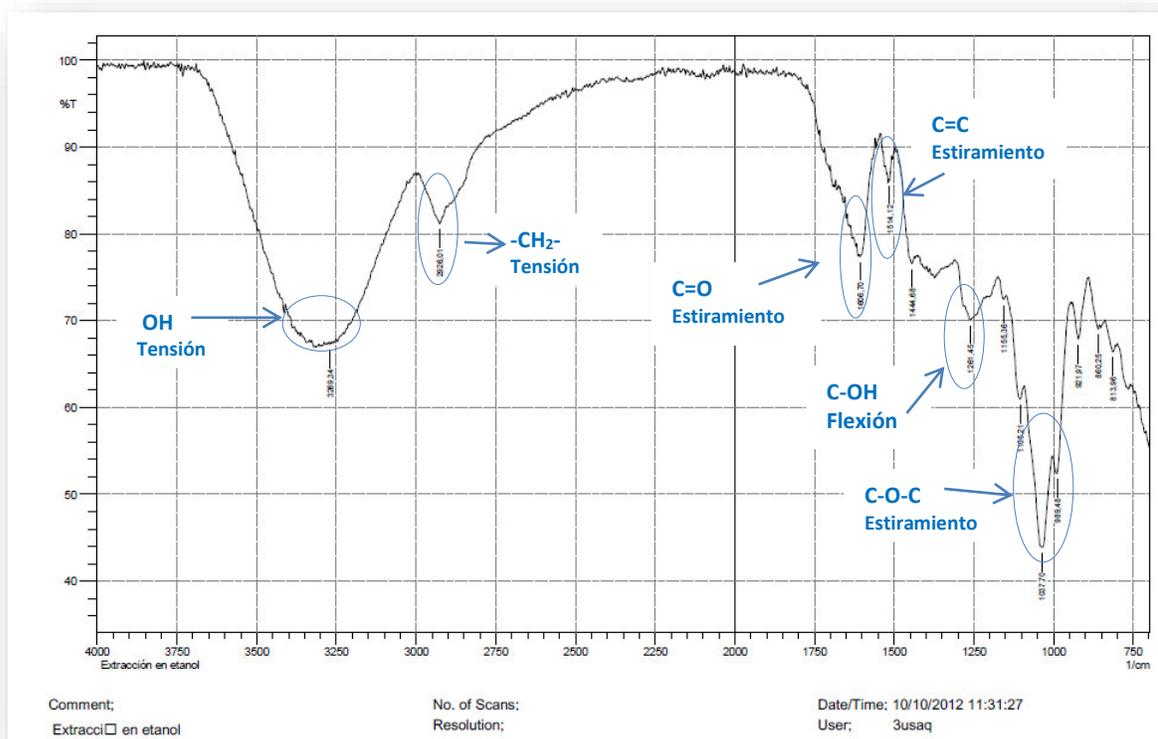


Figura 44. Espectro del extracto etanólico

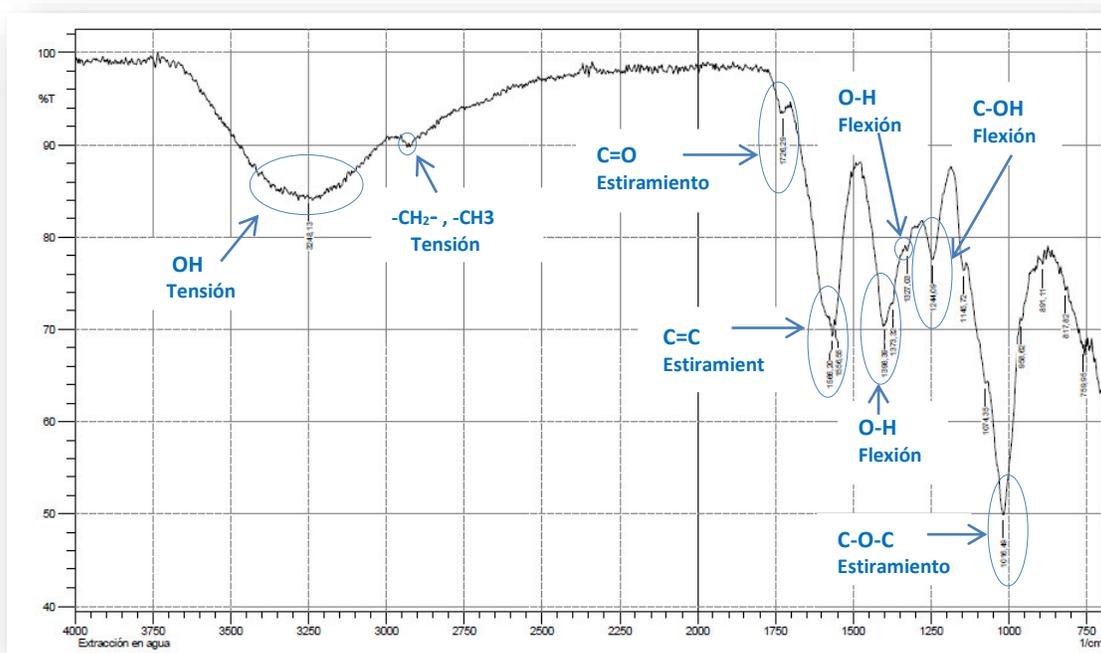


Figura 45. Espectro del extracto acuoso

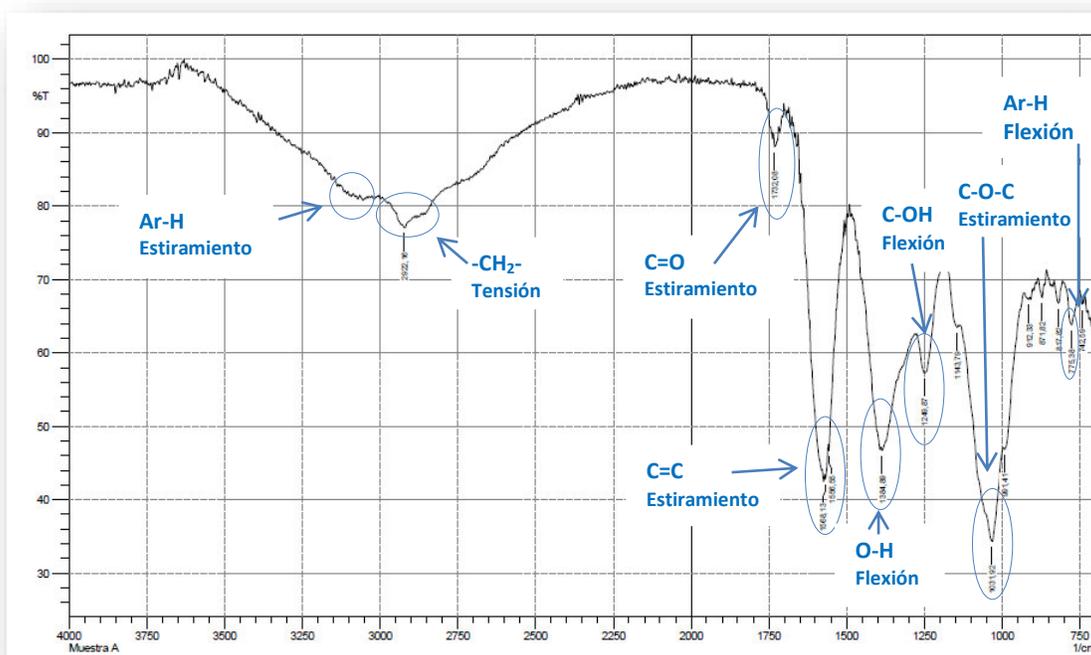


Figura 46. Espectro del mucílago liofilizado

Estos valores de las bandas características de los grupos funcionales, a partir de las transiciones vibracionales, indican la presencia de grupos aromáticos (fenoles) (ver Tabla 13).

Tabla 13. Valores de las bandas características de los grupos funcionales.

Grupo funcional	Vibración experimental (cm ⁻¹)					
	Hex	Clorf	AE	EtOH	H ₂ O	Mucílago liofilizado
Tensión O-H		3350	3321,42	3269,34	3248,13	
Estiramiento Ar-H		3000				3100
Tensión -CH ₂ -	2912,51	2916,37	2918,30	2926,01	2925	2922,16
Tensión -CH ₃	2846,93	2848,86	2848,86		2900	
Tensión C=O	1705,07	1712,79 1693,50	1687,71 1631,78	1606,70	1726,29	1732,08
Estiramiento C=C	1469,76 1444,68	14,54,33	1454,33	1514,12	1566,20 1556,55	1568,13 1556,55
Flexión OH	1377,17	1377,17	1377,17			1384,89
Flexión C-OH		1238,30	1257,59 1236,37	1261,45	1244,09	1249,87
Estiramiento C-O-C	1170,79	1072,42 1020,34	1043,49 1031,92	1037,70	1016,49	1031,92
Flexión Ar-H	717,52	574,17 746,45	700,16			775,38

8.11.3 Aislamiento del metabolito a partir del extracto EM para análisis por CPG

Análisis de las fracciones 13 y 14 en una placa cromatografica con solventes de elución (Hexano-cloroformo-acetato de etilo (6:1:1)), (Ver Figura 47),

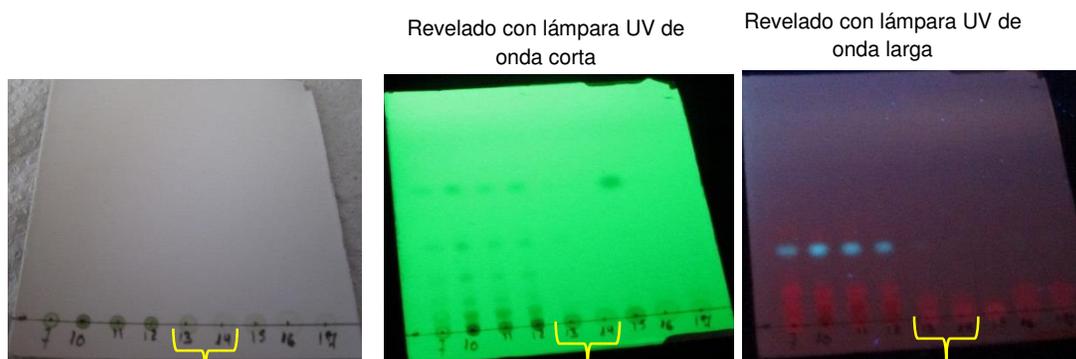


Figura 47.

Determinación del peso molecular de las fracciones aisladas mediante Cromatografía de Permeación en Gel (CPG).

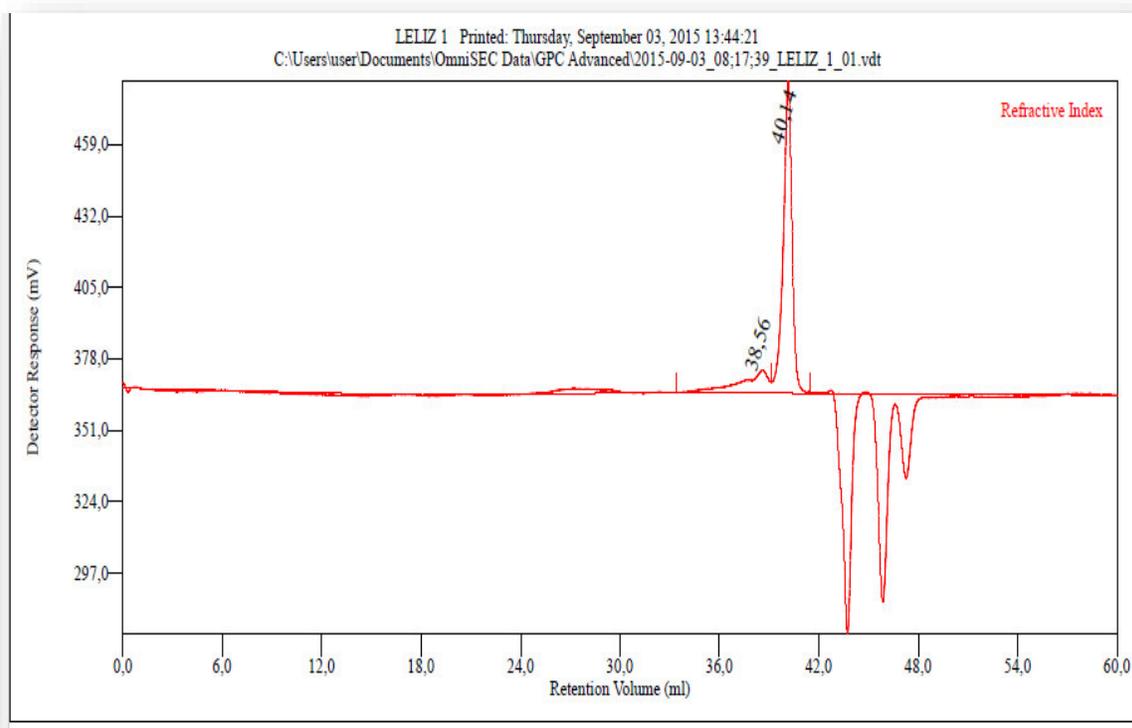


Figura 48. Cromatograma de permeación en gel de la fracción 13 y 14.

El cromatograma de permeación en gel muestra 2 pesos moleculares promedio en peso uno de 371 Da con volumen de retención de 40,14 mL y una polidispersión de 1,040 y la otra de 1946 Da con volumen de retención de 38,56 mL y una polidispersión de 1,416.

8.12 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO (EM)

8.12.1 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana

La Tabla 18 muestra halos de inhibición y la Tabla 19 el porcentaje de inhibición frente a los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Por lo que en esta evaluación el extracto (EM) presentó actividad antimicrobiana (ver tablas).

Tabla 18. Valores de los diámetros de halos (\emptyset , mm).

	\emptyset (<i>Staphylococcus aureus</i>) (mm)	\emptyset (<i>Escherichia Coli</i>) (mm)	\emptyset (<i>Bacillus subtilis</i>) (mm)
EM	6,5	6,0	5,0
Ampicilina	20,5	7,0	6,0
Cipromicina	14,5	12,5	11,0
Gentamicina	11,5	11,0	12,5

Tabla 19. Porcentaje de inhibición (%I) del extracto EM.

	%I (<i>Staphylococcus aureus</i>)	%I (<i>Escherichia Coli</i>)	%I (<i>Bacillus subtilis</i>)
EM	38,46	33,46	20,00
Ampicilina	80,49	42,86	33,33
Cipromicina	72,41	68,00	63,63
Gentamicina	65,22	63,64	68,00

8.12.2 Evaluación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las pruebas de CMI, del extracto metanólico (EM), indicó buena actividad inhibitoria frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mostrando actividad bactericida a concentraciones de 25 mg/mL y 12,5 mg/mL respectivamente. Mientras que para la cepas de *Bacillus subtilis*, no presentó actividad inhibitoria. Se debe considerar que los patógenos usados para esta evaluación no son los mismos que para la evaluación cualitativa.

8.13 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DEL MUCÍLAGO

8.13.1 Prueba de Fehling

Se observó precipitado rojo ladrillo, lo que indica presencia de azúcares reductores (ver Figura 49).



Figura 49

8.13.2 Cromatografía en capa delgada (CCF)

Los Cromatogramas muestran patrones de monosacáridos (Figura 50) y mucílago hidrolizado (Figura 51), donde los valores encontrados de Rfs, nos indican que el mucílago posiblemente este compuesto de glucosa, galactosa y fructuosa, por otro lado las manchas de color rojo cereza (ver Figura 51), son flavanoles precursores de las proantocianidinas, que al reaccionar con la vainillina presentan este color característico.

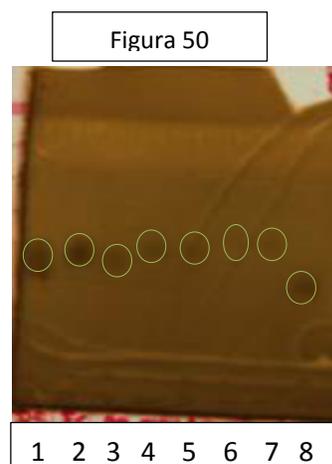


Figura 50

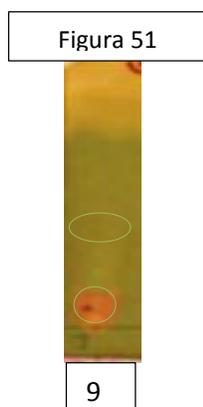


Figura 51

Leyenda:

1. Glucosa: $R_f = 0,45$
2. Fructuosa: $R_f = 0,47$
3. Galactosa: $R_f = 0,45$
4. Manosa: $R_f = 0,50$
5. Arabinosa: $R_f = 0,51$
6. Ribosa: $R_f = 0,55$
7. Xilosa: $R_f = 0,59$
8. Maltosa: $R_f = 0,39$
9. Mucílago hidrolizado: $R_f = 0,46;$
 $0,079$

8.14.3 cuantificación de carbohidratos totales: Método espectrofotométrico fenol- ácido sulfúrico

La tabla 16 muestra valores de concentración y absorbancia del estándar (glucosa) y muestra (mucílago hidrolizado) y mediante la ecuación 5 se encontró 12,55 g/100g(Glucosa) de carbohidratos totales.

Tabla 16. Valores de Concentración y absorbancia de las muestras.

	[mg/L]	Abs (486 nm)
JA	4,89	0.257
JB	4,76	0.25
JC	4,67	0.245

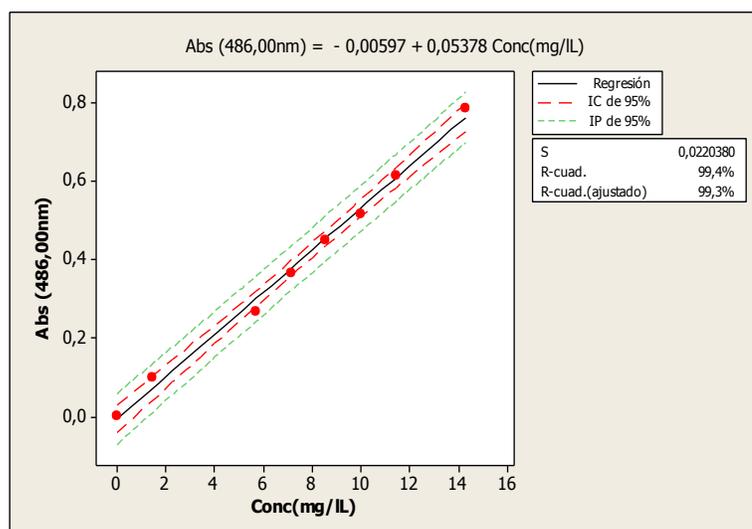


Figura 52. Curva de glucosa

8.14 ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS REOLÓGICOS DEL MUCÍLAGO

La Tabla 17 muestra resultados calculados mediante el Excel de los parámetros (k y n), los tratamientos tecnológicos (mucílago fresco, congelado, liofilizado) y el cálculo de la viscosidad aparente (η) a las velocidades de deformación mínima ($\gamma = 10 \text{ s}^{-1}$) y máxima ($\gamma = 50 \text{ s}^{-1}$).

Tabla 17. Valores de los parámetros reológicos y la viscosidad aparente (η)

TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS			
PARÁMETROS	Mucílago fresco	Mucílago congelado	Mucílago liofilizado
K(ida)	1.5755	1.927	2.144
n(ida)	0.7834	0.6459	0.5622
K(vuelta)	2.9777	2.3196	2.2779
n(vuelta)	0.5934	0.5952	0.5509
η ida ($\gamma = 10\sigma^{-1}$)	0.956793921	0.852671436	0.782392684
η vuelta ($\gamma = 10\sigma^{-1}$)	1.167564659	0.913299248	0.809906071
η ida ($\gamma = 50\sigma^{-1}$)	0.675183009	0.482254664	0.38673699
η Vuelta ($\gamma = 50\sigma^{-1}$)	0.606847738	0.476069153	0.393121889

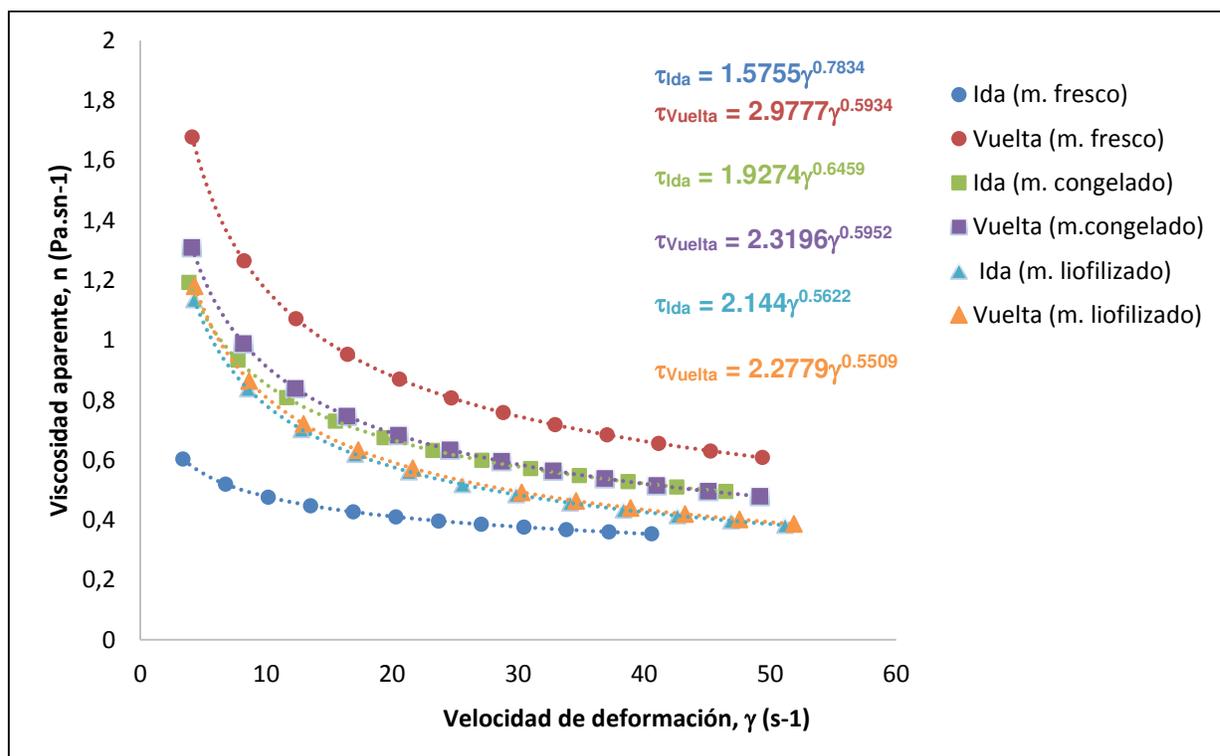


Figura 53. Curva de la viscosidad aparente del mucílago de la corteza, bajo tratamiento tecnológico, versus velocidad de deformación.

Tabla 18. Valores de los parámetros reológicos y la viscosidad aparente (η), mínimo (min), promedio (prom) y máximo (máx), calculados en Excel.

ida	fresco	congelado	liofilizado
Kmáx	1,849981825	2,129973779	2,389556269
Kmin	1,569695896	1,9273889	2,144022429
Kprom	1,331875358	1,744072161	1,923717903
$\eta@50$ máx	0,97276168	0,604582323	0,492165377
$\eta@50$ prom máx	0,676346971	0,482354213	0,386756697
$\eta@50$ min	0,470254159	0,384836901	0,303923741
$\eta@10$ máx	1,267230307	1,014991181	0,942804924
$\eta@10$ prom máx	0,956311242	0,852845832	0,782419518
$\eta@10$ min	0,721677177	0,716603285	0,6493181

Tabla 19. Valores de los parámetros reológicos y la viscosidad aparente (η), mínimo (min), promedio (prom) y máximo (máx) calculados en Excel.

vuelta	fresco	congelado	liofilizado
Kmáx	3,335802696	2,410431748	2,543094301
Kmin	2,991942008	2,319638416	2,277905663
Kprom	2,683527113	2,232264981	2,040370349
$\eta@50$ máx.	0,764689216	0,518826764	0,501964631
$\eta@50$ prom máx	0,605575367	0,476109776	0,393129243
$\eta@50$ min	0,479569369	0,436909842	0,307891417
$\eta@50$ máx.	1,401745118	0,976025987	0,978561254
$\eta@50$ prom máx	1,168414533	0,913351341	0,809915818
$\eta@50$ min	0,973923508	0,854701291	0,670334769

Luego de realizar los cálculos en el Excel, estos resultados de los efectos principales en el sentido de deformación (ida y vuelta) y el tratamiento tecnológico la viscosidad aparente respecto a la velocidad de deformación a 10 s^{-1} y 50 s^{-1} ($\eta@10$ y $\eta@50$, fueron analizados en el Software Statgraphics Centurión XVI.1.18, mediante diseños experimentales factorial mixto 2×3 . Observándose que la viscosidad aparente del mucílago fresco y liofilizado es semejantes, mientras que la viscosidad del congelado si varía. Por ello se evaluó nuevamente solo al mucílago fresco y congelado mediante el diseño experimental de factorial 2^2 (Ver Figura 54).

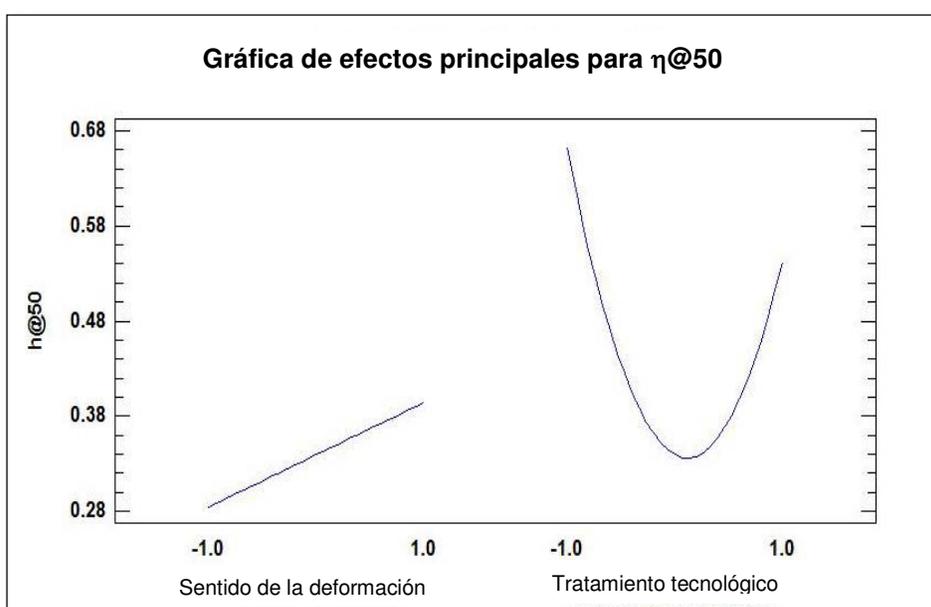


Figura 54. Análisis en el Software Statgraphics mediante diseño experimental de factorial 2^2 .

Leyenda:

Sentido de la deformación

- ❖ -1 (Vuelta)
- ❖ +1 (Ida)

Tratamiento tecnológico

- ❖ -1 (Fresco)
- ❖ +1 (Congelado)

Al analizar todos estos valores y gráficos el mucílago presenta un comportamiento de tipo fluido no Newtoniano, pseudoplástico que cumple con la ley de potencia en los tratamientos tecnológicos (mucílago fresco, congelado y liofilizado).

El índice de fluidez (n) no varían en los tres tipos de tratamiento tecnológico es decir se mantienen constante, sin embargo, el material se deforma al ser sometido a rotaciones altas. Por otro lado el índice de consistencia (K) varía con los distintos tipos de tratamiento tecnológico y con el sentido de la deformación debido a que los sólidos suspendidos se diferencian en su comportamiento plástico. Finalmente la viscosidad aparente (η) respecto al mucílago fresco y liofilizado no varía, pero respecto al congelado sí, es decir el material se deforma, pero la variación no es trascendental.

9. CONCLUSIONES

1. Entre los minerales que se detectaron al analizar las cenizas de la corteza de *Triumfetta semitriloba* Jacq, se encontró mayor cantidad de calcio (4007,16 ppm).
2. De acuerdo a los ensayos realizados, la técnica de maceración en frío es la más adecuada, puesto que se obtiene 2,90 % de rendimiento en comparación a las técnicas por reflujo con 0,63 % y ultrasonido con 0,53%. y según los reportes con otras bibliografías, macerar como mínimo por 2 semanas es la más recomendable. Además esta técnica permite un mejor control de degradación de los metabolitos secundarios.
3. En la extracción sucesiva de la corteza con solventes de polaridad creciente, se obtuvo mayor cantidad de extracto con el agua destilada (41 % de mucílago). Esto indica que los componentes de la corteza tienen más afinidad por el agua destilada y tienen carácter polar.
4. La marcha fitoquímica de la corteza y los extractos indicaron la presencia de saponinas esteroidales, taninos catequicos, cumarinas, flavonoides y azúcares reductores.
5. El contenido de polifenoles $1184,96 \frac{mg}{100g}$ (AG) y el de taninos $751,20 \frac{mg}{100g}$ (AT), por lo que se deduce que hay mayor cantidad de taninos presentes en la corteza que los demás metabolitos polifenólicos (flavonoides y cumarinas) encontrados mediante la marcha fitoquímica, quedando así $433,76 \frac{mg}{100g}$ entre flavonoides y cumarinas.
6. Se comprobó que el método utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante era eficaz, ya que previamente se analizó la actividad antioxidante del ácido ascórbico, determinándose un CI_{50} 2,90 $\mu g/mL$, similar a los reportes en la bibliografía.
7. Se determinó que el extracto metanólico con un CI_{50} de 21,08 $\mu g/mL$ tiene mayor actividad antioxidante que el mucílago con un CI_{50} 169,90 $\mu g/mL$.

8. Al someter la corteza a hidrólisis ácida, las proantocianidinas polimerizan menos al estar en solvente etanólico, por ello casi todo el análisis de taninos se trabajó con el extracto metanólico.
9. En el mapeo de los posibles metabolitos responsables de la actividad antioxidante, se observó claramente que la mayor actividad antioxidante está en la mancha roja. Según el análisis químico e instrumental de esta mancha, posiblemente se trata de las flavanoles de las proantocianidinas, además presentan un carácter polar, propio de los taninos.
10. El cromatograma de permeación en gel muestra 2 pesos moleculares promedio en peso uno de 371 y 1946 Da, estos pesos moleculares dan indicios de la presencia de antocianidina y taninos respectivamente, puestos que las antocianidinas presentan un peso molecular de alrededor de 250 y 400 Da, mientras que los taninos presentan pesos moleculares de 500 a 3000 Da.
11. Las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico, indicó actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922, mostrando actividad bactericida a concentraciones de 250 mg/mL y 12,5 mg/mL respectivamente, mientras que frente a *Bacillus subtilis* no.
12. El Rf del mucílago hidrolizado es 0,46 semejante a los Rfs de la glucosa (0,45), galactosa (0,45) y fructuosa (0,47), lo que confirmaría presencia de estos monosacáridos en la corteza.
13. En la cuantificación de carbohidratos totales se determinó $12,55 \frac{g}{100g}$ (Glucosa), esto indica un alto contenido de carbohidratos en el mucílago.
14. El mucílago de la corteza, presentó un comportamiento de fluido no Newtoniano, pseudoplástico y la viscosidad aparente (η) respecto al mucílago fresco y liofilizado no varían; pero respecto al congelado sí, es decir el material se deforma, debido a que al congelarse el mucílago sufre ruptura polimérica por la dilatación anómala del agua perdiendo parcialmente su viscosidad, sin embargo estas variaciones no son trascendentales por lo que se concluye que la viscosidad promedio en los tres casos

sería 0,86 y 0,51 a la velocidad de deformación mínima (10 s^{-1}) y máxima (50 s^{-1}) respectivamente. Estos resultados darían lugar a la aplicación del mucílago en diversos productos que requieren determinadas condiciones de comportamiento, tales como agente espesante o estabilizante.

15. Finalmente estos resultados pueden ser empleados como punto de partida para posteriores estudios que involucren el análisis de las propiedades medicinales y alimenticias, etc.

10 RECOMENDACIONES

1. Para obtener los extractos, sobre todo en productos naturales, es recomendable utilizar la técnica de maceración en frío, dejando macerar la matriz vegetal como mínimo durante 2 semanas, así se evitaría la degradación de los metabolitos mediante las otras técnicas de extracción.
2. En la evaluación de la actividad antioxidante, se recomienda realizar un ensayo preliminar de cromatografía en capa fina, de esta manera se estaría evitando una evaluación vana sobre muestras que no tengan actividad antioxidante.
3. Para la evaluación de la actividad antioxidante de polímeros (polisacáridos (mucílagos), proteínas, etc.), no es recomendable la evaluación mediante el método del DPPH, sobre todo si este polisacárido no tiene buena actividad frente a los radicales, esto debido a que el DPPH en agua precipita, de la misma manera el polisacárido (soluble en agua) precipita con el alcohol, por ello se recomienda trabajar con otros métodos compatibles a muestras acuosas.
4. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se recomienda trabajar con un solo tipo de cepa, de lo contrario esto dará distintos resultados.
5. Antes de cuantificar los carbohidratos totales, se recomienda someter a la matriz vegetal a una hidrólisis ácida, para asegurarse la presencia de los azúcares libres y si fuera posible tratar de identificarlos.
6. En el análisis de los parámetros reológicos se recomienda antes de someter la muestra a las medidas con el viscosímetro, acondicionarla durante 10 minutos.
7. Se recomienda continuar con los estudios de la corteza de "*Triumfetta semitriloba*" Jacq, sobre todo completar el análisis de permeación en gel (CPG), elucidando los metabolitos presentes mediante técnicas instrumentales como HPLC-masas, RMN, etc.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arce U. María , Cyra H. Opfer y. Mata S. Julio. "The aqueous extract of triumphetta semitriloba (tiliaceae) does not inhibit the in-vitro hydrolytic activity of the major pancreatic enzymes". Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.pdf>
2. Álvarez A. Carmen, Lock de U. Olga, "Taninos". PUCP, Dpto. de Ciencias, Secc. Química, Lima.
3. Álvarez J. (2007). "Tanino, la revolución enológica mito o realidad". Revista enología N°2.
4. Alves P. María, Lopes da Silva. (2004). "Caracterización de fracciones polifenólicas de la fresa y sus implicaciones tecnológicas". Universidad de Salamanca.
5. Andrade Y. Álvaro, Rivadeneira V. José (2010) "Determinación de los parámetros óptimos en la elaboración de vino de miel de abeja, utilizando dos tipos de aglutinantes naturales, mucílago de cadillo negro (*Triumfetta lappula* L.) y mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*), como clarificantes". Tesis, universidad técnica del norte, Ecuador.
6. Arango G. Pharm. (2010). "Introducción al metabolismo secundario". Medellín. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>
7. Avalos G. Adolfo, Pérez U. Elena. (2009). "Metabolismo secundario de plantas departamento de biología vegetal (fisiología vegetal)". Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: http://eprints.ucm.es /9603/1/metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
8. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. (2009). "Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana". Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia>
9. Barraza A., Medrano D., Peraza S. (2001). "Estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Triumfetta semitriloba*". Rev. Latinoamericana. Quím.
10. Bernard S. Meyer, Donald B. Anderson, Richard H. Bohning (1966) "Introducción a la Fisiología Vegetal". Buenos Aires, Argentina.
11. Bravo D. Luis (2011). "Farmacognosia" Elsevier, España.

12. Bravo L. Polyphenols. (1998). "*Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*". Nutr. Rev.
13. Bruneton Jean (2001). "*Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales*". España.
14. Bu' Lock LD.(1969) "*Biosíntesis de productos naturales, introducción al metabolismo secundario*". España.
15. Caicedo V. Marcela, Saa R. Isabel. (2011) "Estandarización de una fórmula de aglutinante natural extraído de la planta cadillo (*triumfetta láppula*) para emplearse como clarificante en la producción de panela" Tesis, Universidad de San Buenaventura, Colombia.
16. Casey M. Leonardo J. Ligo B. Procter G. (1990) "*Advanced practical Organic Chemistry*". London, Glasgow, New York, Tokio.
17. Capitani I. Marianela, Corzo J. Luís, Chel-Guerrero A. Luis, Betancur A. David, Nolasco M. Susana, Tomás A. David. (2013) "*Caracterización reológica de dispersiones de mucílago de chíá (Salvia hispanica L.)*" Argentina-México.
18. Chirinos Noemí. (1972) "*Los constituyentes de la ambrosia Peruviana Will*". Tesis. UNMSM, Perú.
19. Clément Saidou, Ndjouenkeu Robert, Roux Denis, Bosco Jean, Heyraud Alain, Nadia El Kissi. "*Effect of Drying Conditions on rheological properties of hydrocolloids gums from Triumfetta cordifolia and Bridelia thermifolia barks*". Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.46080>
20. Collevatti R, Campos L, Da Silva A. (1998). "*Pollination ecology of the tropical weed "Triumfetta semitriloba" Jacq. (Tiliaceae)*", in the south-Eastern Brazil. Res. Brazil Biol.
21. Cuenta, De la cruz, Hernandez, Mateo, Castañeda, Ibañez, Ramos. (2008) "*Evaluación del efecto antioxidante de hojas de Lepidium Peruvianum Chacón, Maca*" Rev. Horizonte Medio.
22. Devmurari VP. Ghodasara TJ, Jivani NP. (2010). "*Antibacterial Activity and Phytochemical Study of Ethanolic Extract of Triumfetta Rhomboidea Jacq*". Disponible en: www.ijpsdr.com. India

23. Deepak R. Gade, N Duganath, D Rama Krishna, Pavan Kunala. "Anthelmintic activity and preliminary phytochemical screening of the alcoholic extract of *Triumfetta pilosa*". Disponible en: www.jpronline.info.
24. Diana M. Caicedo e Isabel C. Saa Rivera. (2011) "Estandarización de una fórmula de aglutinante natural extraído de la planta cadillo (*Triumfetta láppula*) para emplearse como clarificante en la producción de panela". Tesis. Universidad de San Buenaventura
25. Do Prado Marco p., Sandro S. de Oliveira, Vera Lúcia G. Klein. (2013) "A subfamília *grewioideae* (*malvaceae*) da serra dos pireneus goiás". (datos preliminares). Universidade Federal de Goiás. Brasil
26. Floro Perú. (1956) "Lay the American Species of *Triumfetta* Lann Missouri Bot".
27. Ferrucci S. María, Lattar C. Elsa. (2006) "*Triumfetta rhomboidea* (*Tiliaceae*), nueva cita para la flora de Paraguay y del sur de Brasil". Universidad nacional del nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas.
28. Gallardo C. Cecilia, Pazmiño A. Jhonathan, Enríquez B. Iván (2013). "Extracción y caracterización reológica del mucílago de *Malvaviscus penduliflorus* (San Joaquín)". Rev Cubana Plant Med vol.18 no.4 Ciudad de la Habana.
29. González L. Rubén. (2003). "Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino". Artículo de investigación, *Madera y Bosques*. Disponible en: publicaciones@ecologia.edu.mx
30. Guerra, Vega, Rivero, R.; Menéndez, R.; Gutiérrez, A. (2004). "Actividad antimicrobiana y toxicidad de un extracto acuoso de *Boerhaavia erecta*". Revista Cubana de Plantas Medicinales.
31. Gutiérrez G. Yamilet, Martínez Migdalia, Varona T. Noel y Rodríguez Aida. (2000). "Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (*quercetina*) en *psidium guajaba*, l". Revista Cubana.
32. Harborne J. Grayer R. (1988) "The anthocyanins. En the flavonoids advances in research since". 1st ed. Chapman & Hall, London.
33. Harborne J. B. (1989) "General Procedures and Measurement of Total Phenolics. En *Methods in Plant Biochemistry*". Plant Phenolics. Harborne J B (ed). Academic.

34. Hernández, M. Prieto, E. (1999). "*Plantas que contienen polifenoles y antioxidantes dentro del estilo de vida*". Revista Cubana Invest Biomed.
35. Huang XD, Liang JB, Tan HY, Yahya R. , Khamseekhiew B, Ho YW. (2010) "*El peso molecular y la afinidad de unión a proteínas de Leucaena condensan taninos y sus efectos en la in vitro parámetros de fermentación*" Rev. Science Direct.
36. Inocente C. Miguel. (2009). "*Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de Triplaris americana L. (Tangarana colorada)*". Tesis. UNMSM.
37. Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos (INTA)
Disponible en: <http://www.portalantioxidantes.com/analisis-de-antioxidantes/>
38. Jamilet I. Gutiérrez Gaitén, Migdalia z Miranda, Noel Varona y Rodríguez T. Aida. (2000). "*Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en Psidium Guajaba, l*". Revista Cubana.
39. John k. Francis, "*Triumfetta Semitriloba Jacq*", Burweed Department of Agriculture, forest service, international institute of tropical forestry, garden Botanic Sur, in cooperation with the University of Puerto Rico.
Disponible en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/triumfetta%20semitriloba.pdf>
40. Kasay Ganoza I. (2013) "*Estudio cualitativo y cuantitativo, actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de Oenothera rosea Lher. Ex Aiton*". Tesis. UNMSM. Perú
41. Kennedy A. James, Taylor W. Alan. (2003) "*Análisis de proantocianidinas por cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento*". Rev. Science Direct.
42. Kuklinski Claudia. (2003). "*Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*", España.
43. Kurt Hostettmann, Mahabir P. Gupta, Andrew Marston, Emerson Ferreira Queiroz. (2008). "*Handbook of strategies for the insolation of bioactive natural products*".
44. Khalaf, Shakya, Othman, Agbar, Farah. (2008). "*Antioxidante Activity of some common plants*" Turk J. Biol Jordan.
45. Lázaro Juan N. (2012) "*Tiliaceae Juss*", Herbario MCNS facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta Buenos Aires – Argentina.
46. Lehninger L. Albert. (1999) "*Bioquímica*".

47. Libro de resúmenes (2014). "IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia". Rio Gallegos – Argentina.
48. Li-kang Ho, Chiann-Rong Chang and Yuan-Shiun Chang. (1995) "Chemical components from *Triumfetta bartramia*". Journal of the Chinese Chemical Society.
49. Lock de U. Olga. (1994). "Investigación fitoquímica". Lima.
50. Madaleno, Isabel. "Traditional medicinal knowledge in Costa Rica" Portuguese tropical research institute, Lisboa, Portugal.
51. Mahabir p. Gupta. (2006) "Medicinal plants originating in the Andean high plateau and central Valleys region of Bolivia, Ecuador and Perú".
Disponible en: http://www.unido.org/fileadmin/import/58569_medicinal_final.pdf
52. Mann, J. (1978). "Secondary metabolism". Oxford University Press.
53. Martín B. José, Montes O. Angélica. (2012) "Evaluación de las actividades antibacteriana y alelopática del extracto en acetato de etilo y de algunas fracciones de *Miconia caudata* (Bonpl.) DC". Tesis Pereira.
54. Martínez Icarte Rodrigo M. (2002). "Caracterización del comportamiento reológico de sopa crema orientada a control de calidad". Tesis. Universidad Austral de Chile.
55. Medeiros A. Isabelle, Dantas C. Ivan Iranildo M José. De Melo; Delcio de Castro Felismino. (2011). "A família Malvaceae sensu lato em uma área do agreste paraibano, nordeste do Brasil". Brasil
56. Núñez M. Esteban. (2011) "plantas medicinales de Puerto Rico: Folklore y fundamentos científicos, *Triumfetta semitriloba*" Jacq". National germplasm resources laboratory, Beltsville, Maryland.
57. Novara L. Juan. (1992) "*Tiliacea Juss*". Herbario MCNS Facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta, Argentina.
58. Pannala A.; Chan T.; O'Brien, P.; Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics". Biochem. Biophys. Res. Com.
59. Pryor, W. (1982) "Xenobiotics, cancer and aging, in: vitamin E: Biochemical, Hematological and Clinical Aspects. Free Radical Biology".

60. Reed J.D., Horvath P.J., Allen M.S., Van Soest P.J. (1985). "Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium". J. Sci. Food Agric.
61. Reed, J.D. (1995). "Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage Legumes".
62. Ricco A. Rafael, Agudelo Ignacio, Garcés Mariana, Evelson Pablo, Wagner L Marcelo. & Gurni A. Alberto. "Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L.(*Equisetaceae*)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*". Disponible en: www.blacpma.usach.cl. Chile
63. Rojas Orlando, Briceño María y Avendaño Jorge. (2012) "Fundamentos de reología". Mérida, Venezuela.
64. Romero Claudia Lara. (2000) "Efecto del pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados en *Gliricidia sepium* (Jacq) Walp en el trópico seco". Tesis
65. Romo de vivar A. (1985). "Productos naturales de la flora Mexicana". México.
66. Ronquillo O. José. "Diccionario de materia mercantil, industrial y agrícola"
Disponible: <https://books.google.com.pe/books>
67. Rosales C. Martha, Galindo A. y Gonzale R.F. (2002). "Taninos condensados en la corteza de *Pinus chihuahuana* y *pinus durangensis*". Article in información tecnológica, Revista Internacional.
68. Rosane G. Collevatti, Lúcio A. Campos and Alexandre F. da Silva. (1998). "Pollination Ecology of the tropical weed *Triumfetta Semitriloba* Jacq. (*Tiliaceae*), in the south-eastern Brazil". Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbbio/v58n3/4566.pdf>
69. Rosane G. Collevatti, Frederico S. Lopes and Maria Eugenia . Amarap "reproductive success in the tropical weed *Triumfetta semitriloba* (tiliaceae): Spatial and temporal variation in seed set". Disponible en:
http://www.ots.ac.cr/rbt/attachments/volumes/vol454/07_collevatti_Triumfetta_semitribola.pdf
70. Rozycki Victor R. (2007) "Evaluación de las Características Reométricas de Hidrocoloides Obtenidos de Semillas de *Prosopis* sp (Algarrobos)". Tesis. Universidad Nacional de Litoral. Chile.
71. San Feliciano, Alice L. Perez, Esther del olmo. (2008) "Manual de determinación estructural de compuestos naturales". Universidad de Salamanca, España.

72. Sandoval Manuel, Okuhama Nataly, Angeles Fausto. (2001) "*Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de plantas medicinales de la amazonia*". 1st Internacional workshop. Perú
73. Slater, T. (1984). "*Free radical mechanisms in tissue injury*". Journal Biochemistry.
74. Soriano Marcela, Bonilla pablo, arroyo Jorge, Pereyra Sonia. (2004) "*actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de Senecio Culcitoides Weed*". Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/vol15_n3/pdf/a04.pdf. Perú
75. Spolador L. Carlos (2001) "*Caracterización estructural de los nectarios de Triumfetta semitriloba Jacq (Tiliaceae)*". Vicosa, Minas Gerais, Brasil
76. Stringano Elisabetta, Pekka S. Juha, Mueller H. reneuna. (2011) "*Una solución simple para un problema complejo: proantocianidinas, glucosas galoil y elagitaninos caben en una sola curva de calibración en la cromatografía de permeación de gel de alto rendimiento*". Rev. Science Direct.
77. Orestes Guerra, de León José y Nogueiras Clara. (2008) "*Las saponinas y sapogeninas esteroideas*". Disponible en:
<http://www.revistaciencias.com/publicaciones/eeaaflallzamfjzjkp.php>. Perú
78. Orellana C. Maira. (2007). "*Determinacion cuantitativa de taninos en extracto hidroalcoholico de hojas de fragaria vesca l. (fresa) por espectrofotometria ultravioleta / visible*". Tesis. Disponible: <http://virtual.ues.edu.sv>. El Salvador
79. Odimegwu C., Uche I., Ozioko C., Ogbuanya C., Gugu H. and Esimone O. "*In vitro antimicrobial evaluation of methanol extract of Triumfetta Rhomboidea Leaves Against some Clinical Bacterial Isolates*". Disponible en: <http://ajol.info/index.php/ijbcs>
80. Tomás Ch. Gloria y Huamán M. Juana. (2011). "*Guía de Prácticas de Laboratorio de Productos Naturales*". UNMSM, Lima, Perú.
81. "*Triumfetta Semitriloba*" Jacq., file:///c:/users/usuario/downloads/tropicospdf.pdf
82. Tropicos.org. Jardín Botánico de Missouri. (2001) "*Triumfetta Semitriloba*" Jacq
Disponible en: <http://www.tropicos.org/name/>
83. Varro E. Tyler, Linn R. Brady, James E. Robbers.(1979). "*Farmacognocia*" Argentina.
84. Vivas Nicolas, Françoise N. Marie, Vivas de G. Nathalie, Absalon Christelle , Bertrand Alain , Mirabel Marie. (2003) "*La diferenciación de proantocianidina taninos de las*

semillas, las pieles y los tallos de la uva (Vitis vinifera) y el duramen de Quebracho (Schinopsis balansae) por desorción láser asistida por matriz / espectrometría de masas de ionización de tiempo de vuelo y de tioacidolisis espectrometría de masas / cromatografía / ionización por electrospray líquido" Rev. Science Direct.

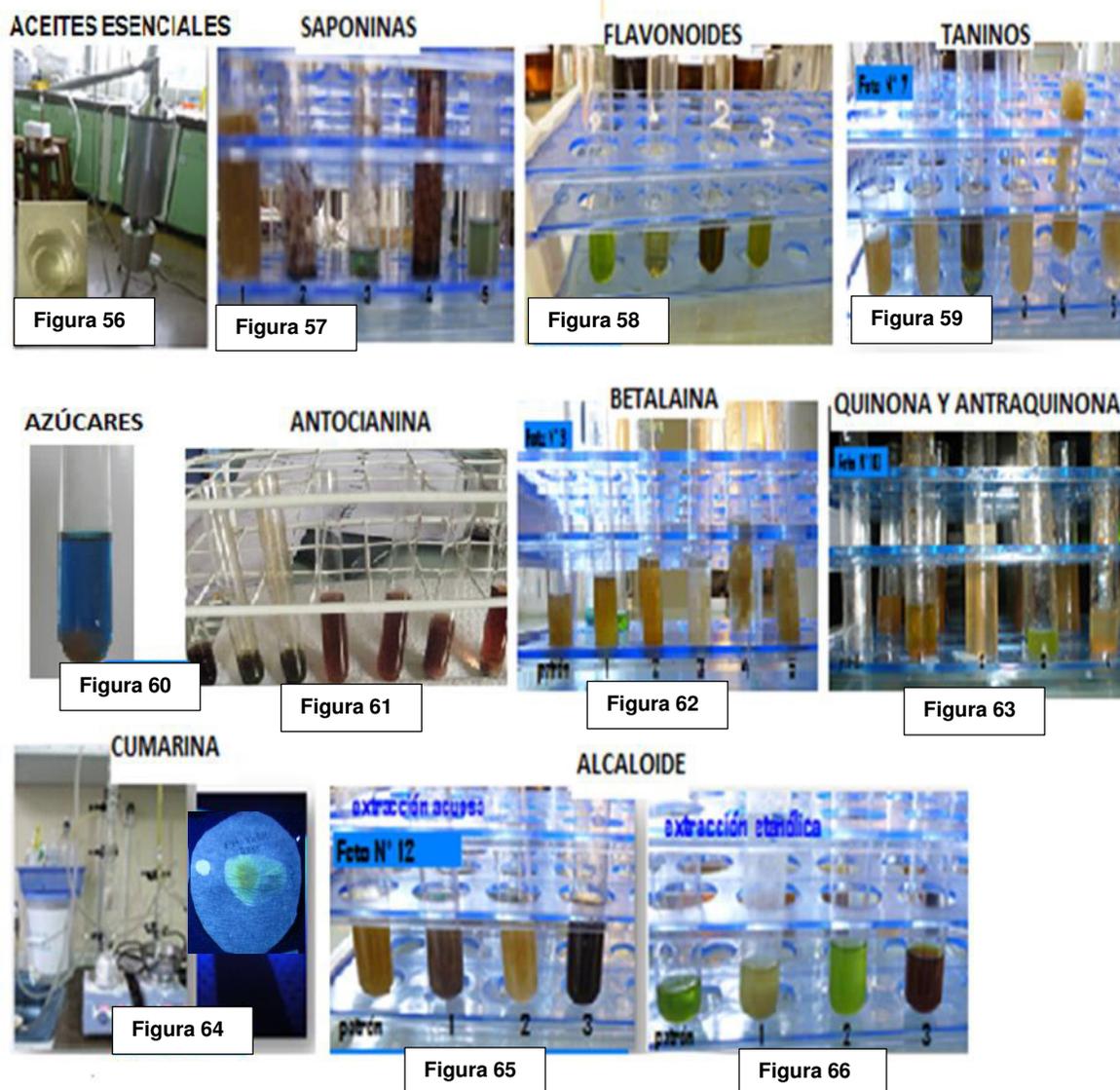
85. Wagner H. Bladt S. Zgainski E.M. (1984) "*Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*". Traslated by Th. Scott. Berlin Heidelberg New York Tokio.
86. Wen W. Pai, Sun H. Lucy. (2002) "*Determinación del tanino de caqui soluble mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento*" Rev. Science Direct.
87. Zalacain A. Amaya. (2001). "*Estudios de Extractos Tánicos Optenidos Apartir de la Hoja de Zumaque, (Rhus Coriaria L.)*". Tesis. Universidad Castilla la Mancha, España.

12 ANEXO

12.1 ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

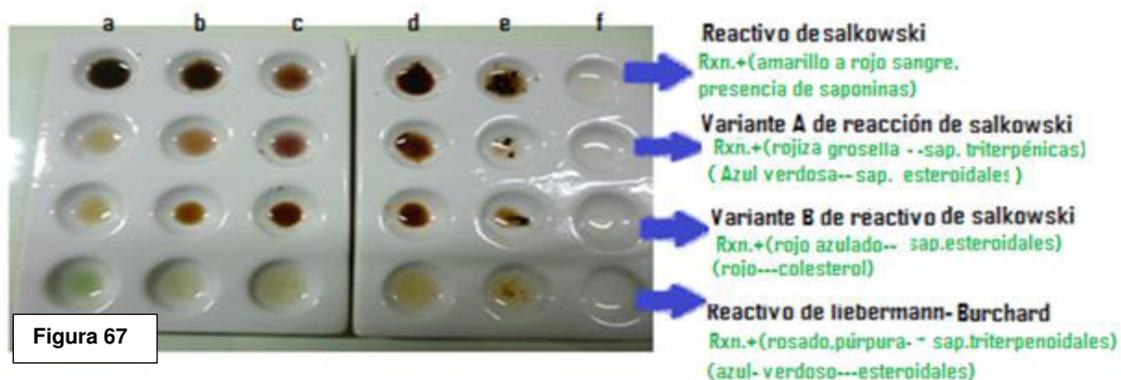


12.2 MARCHA FITOQUÍMICA DE LA CORTEZA

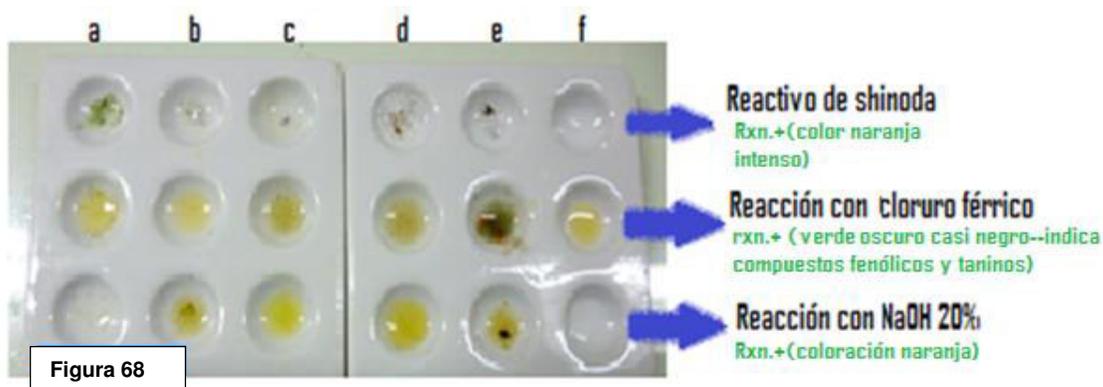


12.3 MARCHA FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE LA CORTEZA, OBTENIDOS A PARTIR DE SOLVENTES DE POLARIDAD CRECIENTE.

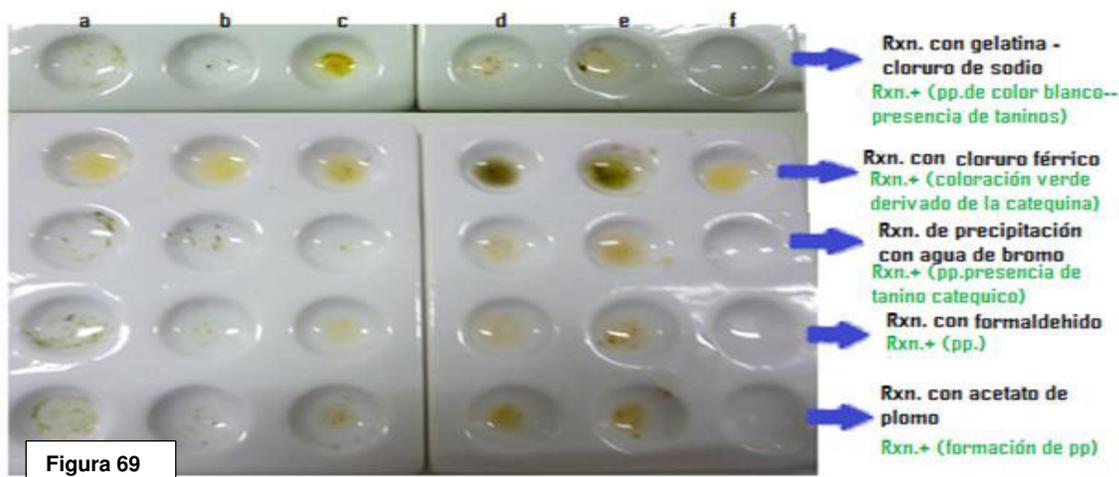
a) Saponinas



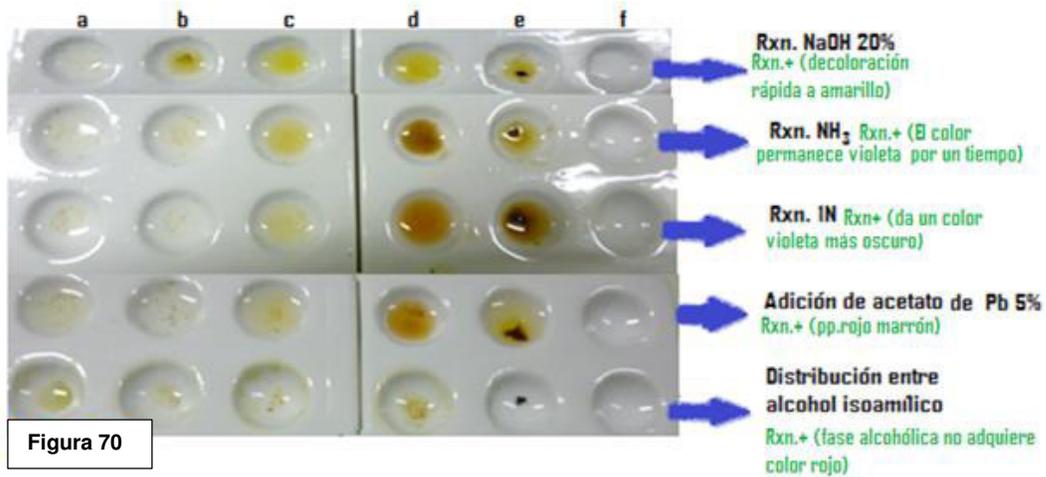
b) Flavonoides



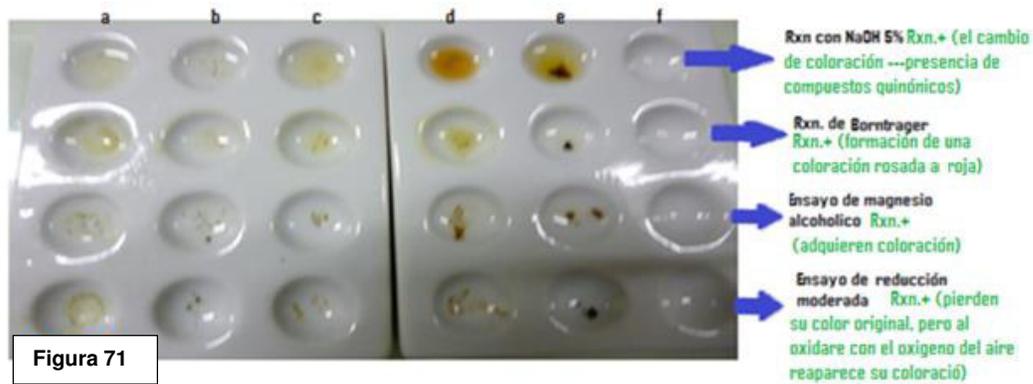
c) Taninos



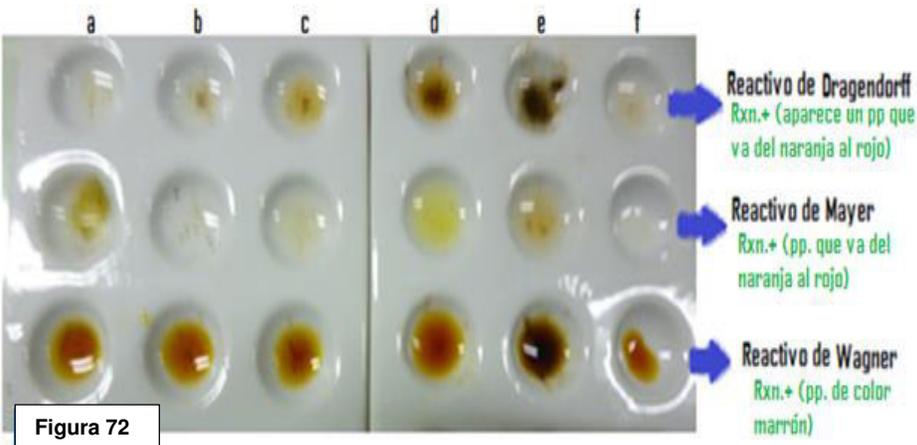
d) Antocianinas y Betalaínas



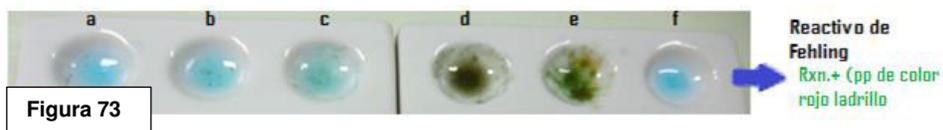
e) Quinonas y Antraquinonas



f) Alcaloides



g) Azúcares reductores



Leyenda:

- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| a. Extracto de hexano | d. Extracto de etanol |
| b. Extracto de cloroformo | e. Extracto de agua |
| c. Extracto de acetato de etilo | f. en blanco |

12.4 OBTENCIÓN DEL MUCÍLAGO DE LA CORTEZA



12.5 MUCÍLAGO QUE COAGULA CON EL ALCOHOL



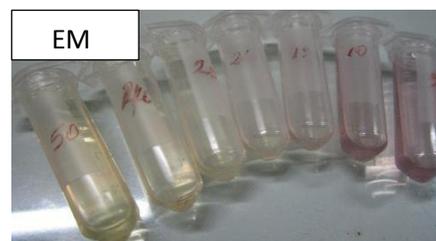
Figura 75

12.6 LIOFILIZACIÓN DEL MUCÍLAGO

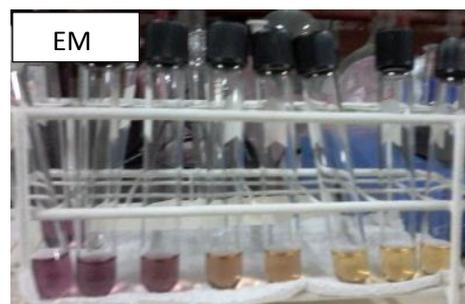
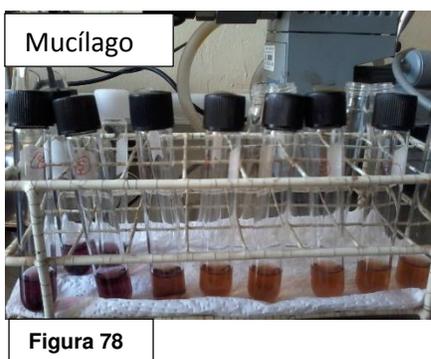


12.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

a) Búsqueda del factor dilución



b) Confrontación



12.8 CONVERSIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN ANTOCIANIDINAS

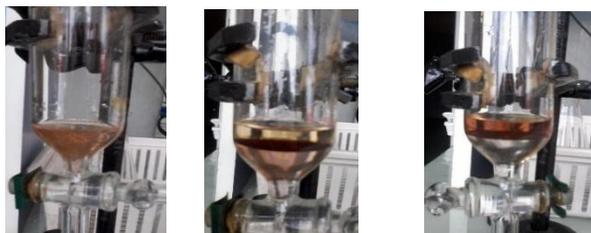


Figura 79

12.9 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES



Figura 80

12.10 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS



Figura 81

12.11 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

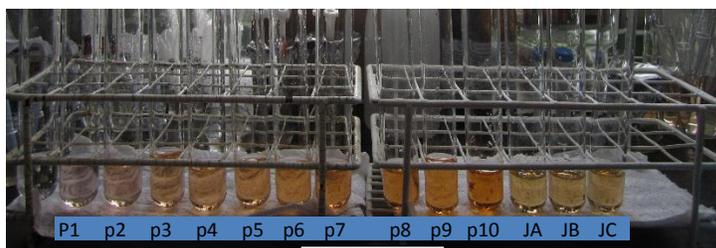


Figura 82

12.12 COLUMNA CROMATOGRÁFICA



Figura 83

12.13 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO (EM)

12.13.1 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

Enfrentamiento de patógenos con EM

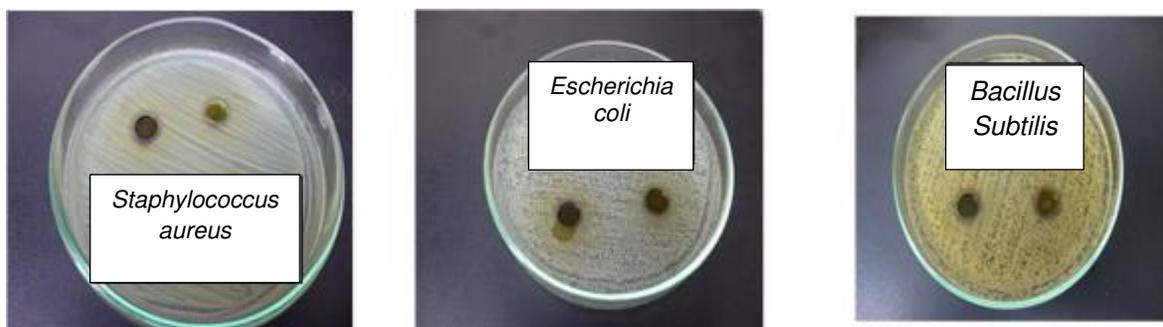


Figura 84

12.13.2 Control positivo: Enfrentamiento de patógenos con antibióticos y solventes.



Figura 85

12.13.3 Evaluación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

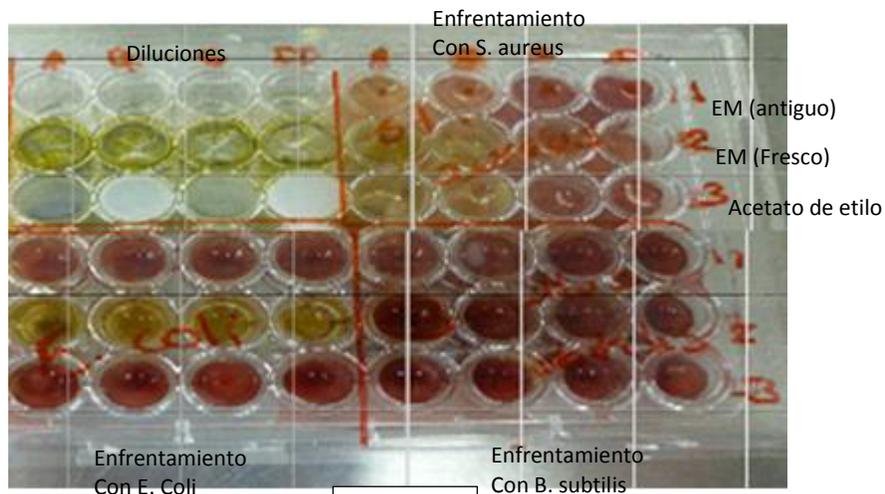


Figura 86

12.14 ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS REOLÓGICOS DEL MUCÍLAGO

12.14.1 Muestras:

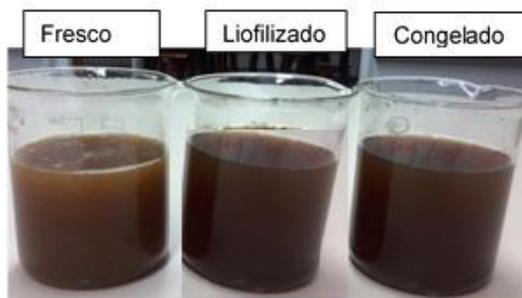


Figura 87



Figura 88

12.14.2 Datos de lectura del viscosímetro (% torque, n, VNE) y los valores de los cálculos matemáticos de las variables (τ , γ , η).

a) Muestra: Mucílago Fresco

% Torque	N	FC	VNE	τ , Pa	γ , s ⁻¹	η , app
10.05	10	10	404	4.8076	3.38298256	0.60372072
14.23	20	5	284	6.7592	6.76596511	0.5200553
18.79	30	3.33333333	250.67	8.948919	10.1489477	0.47659757
22.8	40	2.5	228	10.8528	13.5319302	0.44798449
27.18	50	2	217.6	12.9472	16.9149128	0.42697886
33.91	60	1.66666667	226	16.1364	20.2978953	0.41054926
39.72	70	1.42857143	226.86	18.897438	23.6808779	0.39715244
43.49	80	1.25	217.5	20.706	27.0638605	0.38590147
50.13	90	1.11111111	222.67	23.847957	30.446843	0.37624226
55.95	100	1	224	26.656	33.8298256	0.36780685
58.64	110	0.90909091	213.09	27.893481	37.2128081	0.36033914
61.24	120	0.83333333	204	29.1312	40.5957907	0.35365412
62.08	120	0.83333333	207	29.5596	49.3942878	0.60859691
61.6	110	0.90909091	224	29.3216	45.2780971	0.63061012
53.85	100	1	215.2	25.6088	41.1619065	0.65563767
53.13	90	1.11111111	236	25.2756	37.0457158	0.68446186
48.37	80	1.25	242	23.0384	32.9295252	0.71818727
46.53	70	1.42857143	265.71	22.133643	28.8133345	0.75843624
40.95	60	1.66666667	273.33	19.515762	24.6971439	0.80771326
37.13	50	2	296.8	17.6596	20.5809532	0.87014448
33.55	40	2.5	335	15.946	16.4647626	0.95315861
26.95	30	3.33333333	360	12.852	12.3485719	1.07197507
21.9	20	5	438	10.4244	8.23238129	1.26500618
14.87	10	10	596	7.0924	4.11619065	1.67888179

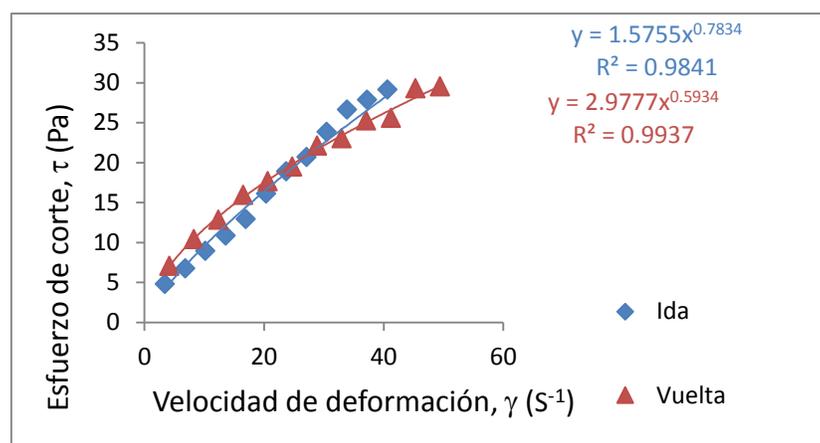


Figura 89 Reograma de curva de fluidez del mucílago fresco τ vs γ

b) Muestra: Mucílago congelado

% Torque	N	FC	VNE	τ , Pa	γ , s ⁻¹	η , app
10.2	10	10	408	4.8552	3.87288705	1.1932925
15.3	20	5	306	7.2828	7.74577411	0.93358216
18.7	30	3.33333333	249.33	8.901081	11.6186612	0.80872122
22.2	40	2.5	222	10.5672	15.4915482	0.73039565
27.3	50	2	218.4	12.9948	19.3644353	0.67490471
30.9	60	1.66666667	206	14.7084	23.2373223	0.63270967
34.7	70	1.42857143	198.29	16.517557	27.1102094	0.59909913
37.6	80	1.25	188	17.8976	30.9830964	0.57143102
39.7	90	1.11111111	176.44	18.896724	34.8559835	0.54808859
44.5	100	1	178	21.182	38.7288705	0.52801723
47.2	110	0.90909091	171.64	22.467676	42.6017576	0.51049441
47.7	120	0.83333333	159	22.7052	46.4746446	0.49500559
50.3	120	0.83333333	167.67	23.943276	49.1881583	0.47927511
46.8	110	0.90909091	170.18	22.276562	45.0891451	0.4964563
44.5	100	1	178	21.182	40.9901319	0.51598378
41.1	90	1.11111111	182.67	19.563957	36.8911187	0.5384655
39.1	80	1.25	195.5	18.6116	32.7921055	0.56475947

35.9	70	1.42857143	205.14	17.088162	28.6930923	0.59612542
33.2	60	1.66666667	221.33	15.802962	24.5940791	0.63450716
29.4	50	2	235.2	13.9944	20.4950659	0.68310538
25.5	40	2.5	255	12.138	16.3960528	0.74767898
21.8	30	3.33333333	290.67	10.376919	12.2970396	0.8400172
16.6	20	5	332	7.9016	8.19802638	0.98984416
11.5	10	10	460	5.474	4.09901319	1.31044403

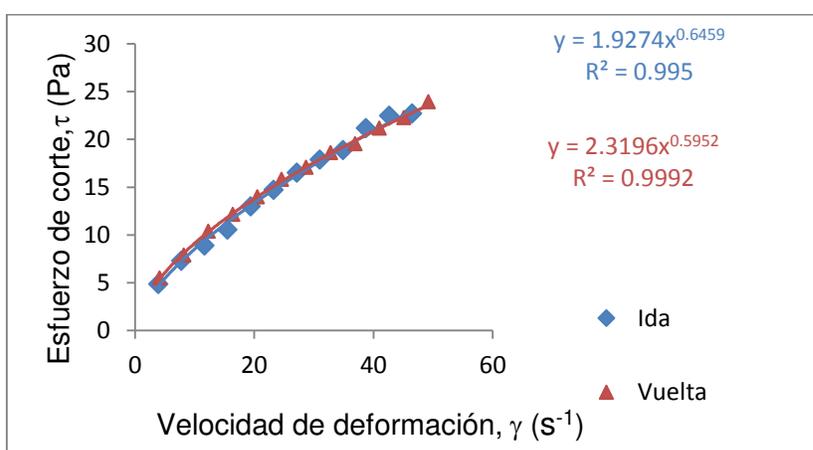


Figura 90 Reograma de curva de fluidez de mucílago congelado τ vs γ

b) Muestra: Mucílago liofilizado

% Torque	N	FC	VNE	τ , Pa	γ , s^{-1}	η , app
9.8	10	10	392	4.6648	4.2646599	1.13624622
14.7	20	5	294	6.9972	8.5293198	0.83885063
19.2	30	3.33333333	256	9.1392	12.7939797	0.70241489
23	40	2.5	230	10.948	17.0586396	0.61929393
25.9	50	2	207	12.3165	21.3232995	0.56165628
29	60	1.66666667	193	13.7802	25.5879594	0.51856821
32	70	1.42857143	182	15.1606	29.8526193	0.48472708
32.5	80	1.25	162	15.4224	34.1172792	0.45720293

35.6	90	1.111111111	158.22	16.945362	38.3819391	0.43422514
37.2	100	1	148.8	17.7072	42.646599	0.41465108
37.3	110	0.90909091	135.64	17.755276	46.9112589	0.39770542
38.7	120	0.833333333	129	18.4212	51.1759188	0.38284068
40.2	120	0.833333333	134	19.1352	51.9029686	0.38658948
38.7	110	0.90909091	140.73	18.421557	47.5777212	0.40199506
38.2	100	1	152.8	18.1832	43.2524739	0.41957538
37.4	90	1.111111111	166.22	17.802162	38.9272265	0.43990561
33.7	80	1.25	168.5	16.0412	34.6019791	0.46380122
33	70	1.42857143	188.57	15.707881	30.2767317	0.49246552
27.3	50	2	200.4	11.9238	21.6262369	0.57279777
23.5	40	2.5	235	11.186	17.3009895	0.6331742
20.4	30	3.333333333	272	9.7104	12.9757422	0.72049783
15.9	20	5	318	7.5684	8.65049477	0.86439955
10.3	10	10	412	4.9028	4.32524739	1.18006479

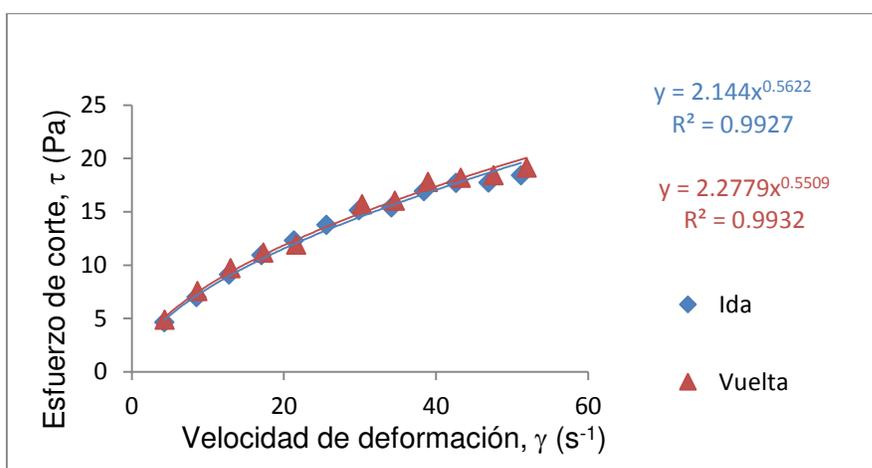


Figura 91 Reograma de curva de fluidez del mucílago liofilizado τ vs γ

12.14 Constancia de clasificación botánica de "*Triumfetta Semitriloba*" Jacq.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Biodiversidad"

CONSTANCIA N° 90-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM), DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (completa), recibida por el alumna **MILAN TOLEDO NAUTO**, estudiante de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Triumfetta semitriloba* Jacq.**, y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: MALVALES

FAMILIA: TILIACEAE

GENERO: ***Triumfetta***

ESPECIE: ***Triumfetta semitriloba* Jacq.**,

Nombre vulgar: "Moteccepo"

Determinado por: Dra. Haydeé Montoya Terreros (Blgo. Paúl Gonzáles).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada y para los fines de investigación.

Lima, 10 de mayo de 2012



DRA. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA
HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Yrene H.

12.5 Publicación en el IV congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia – Argentina

IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia: La Diversidad Química y Biología
Río Gallegos 28, 29 y 30 de Septiembre de 2014

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CORTEZA "TRIUMFETTA SEMITRILOBA" JACQ (MOTECCEPO)

Milan Toledo Nauto, Magaly Bardales Rojas, Isabel Cabello Liu, Julio Santiago Contreras

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Av. Venezuela 509 Lima
01, Perú,

E-mail: milan.unmsm@gmail.com

La especie *Triumfetta semitriloba* Jacq es usada en la medicina tradicional, como desinflamante y en el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras, hemorroides, afecciones renales, etc. Sin embargo, no se dispone de información científica que avale el uso terapéutico.

En este trabajo de investigación se pretende contribuir al conocimiento fitoquímico de la corteza ya que los reportes de metabolitos son escasos [1]. Para ello se recolectó la corteza vegetal (Apurímac - Perú), se clasificó en el Museo de Historia Natural, se pulverizó, se extrajo con metanol y se realizó el screening fitoquímico comprobándose la presencia de Saponinas esteroidales, Taninos catéquicos, Furanocumarinas y Flavonoides.

Se obtuvo 11,85 mg/g de polifenoles (expresado como equivalentes de ácido Gálico), 46.70% de taninos, 70.00% de humedad, 2.76% de cenizas y los minerales encontrados fueron: 4007.16 ppm de Ca, 1.83 ppm de Fe, 5.37 ppm de Mn, 70.94 ppm de Na, 5.65 ppm de Cu y 9.27 ppm de Zn. Se evaluó la actividad antioxidante por el método del radical DPPH (2,2-Difenil -1-picrylhydrazyl) reportándose 21,08 µg/mL de concentración inhibitoria en un cincuenta por ciento (IC₅₀).

Las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), del extracto metanólico indico buena actividad inhibitoria frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922, mostrando actividad bactericida a concentraciones de 250000 µg/mL y 12500 µg/mL respectivamente.

Estos resultados presentan un futuro promisorio para el empleo del extracto metanólico de *Triumfetta semitriloba* Jacq como materia prima natural para la elaboración de fitofármacos.