



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Evaluación de los componentes bioactivos, actividad
inhibitoria hialuronidasa y la capacidad antioxidante
de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius “Uvilla
Amazónica”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

AUTOR

María Rosario CALIXTO COTOS

ASESOR

Dra. María Mercedes SOBERÓN LOZANO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Calixto, M. Evaluación de los componentes bioactivos, actividad inhibitoria hialuronidasa y la capacidad antioxidante de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius “Uvilla Amazónica” [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2020.

HOJA DE METADATOS

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0002-7735-278X

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0001-5063-1407

DNI DEL AUTOR: 10710049

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

ALIMENTOS NATIVOS, RECURSOS NATURALES Y METABOLISMO OXIDATIVO

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

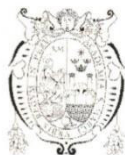
UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN, DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:

FACULTAD DE MEDICINA: CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y
NUTRICIÓN

12º 03' 28'' S Y 77º 01' 23'' O

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

2014-2018 (4 años)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú. Decana de América
 Facultad de Medicina



Vicedecanato de investigación y Posgrado
 Sección Doctoral

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

En la ciudad de Lima, a los siete días, del mes de enero del año dos mil veinte, siendo las **13.00 hrs.**, ante el Jurado de Sustentación, bajo la Presidencia del **Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo**, y los Miembros del mismo, los Doctores:

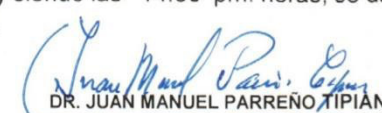
Dr. JORGE LUIS ARROYO ACEVEDO	PRESIDENTE
Dra. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI	MIEMBRO
Dr. JUAN MANUEL PARREÑO TIPIÁN	MIEMBRO
Dr. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS	MIEMBRO
Dra. MARÍA MERCEDES SOBERÓN LOZANO	ASESORA

LA postulante al Grado de Doctor en Ciencias de la Salud, es Magister en Bioquímica, doña: **MARÍA ROSARIO CALIXTO COTOS**, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su Tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS, ACTIVIDAD INHIBITORIA HIALURONIDASA Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Pourouma cecropiifolia* C. Martius "Uvilla Amazónica", para optar el grado Académico de Doctor.

Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, después de la cual obtuvo la siguiente calificación de "A" **EXCELENTE 19 (DIECINUEVE)** a continuación la Presidente del Jurado recomienda que la Facultad de Medicina, proponga que se le otorgue a la Magister: **MARÍA ROSARIO CALIXTO COTOS**, el Grado Académico de **Doctor en Ciencias de la Salud**.

Se expide la presente Acta en seis originales y siendo las 14.30 pm. horas, se da por concluido el acto académico de sustentación.


 DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


 DR. JUAN MANUEL PARREÑO TIPIÁN
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


 DR. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


 DRA. MARÍA MERCEDES SOBERÓN LOZANO
 ASESORA DE LA TESIS


 DR. JORGE LUIS ARROYO ACEVEDO
 PRESIDENTE DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme vivir y darme la fuerza necesaria

A mi querida familia
Que siempre estuvo a mi lado
Por su amor, cariño y atenciones

Al pueblo de **La Libertad, Sicaya**, Huancayo, valle rodeado de eucaliptos y guindas, fuente de inspiración. A los sicainos Abraham y Maura por querer a su pueblo y transmitir su cultura. Gracias

AGRADECIMIENTO

A la **Dra. Mercedes Soberón Lozano**, por su excelente orientación y dedicación en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. **Inés Arnao Salas** por su conocimiento, experiencia y sugerencia en el desarrollo de la tesis

Al Dr. **Alejandro Cifuentes Gallego** y la Dra **Elena Ibáñez E**; investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Laboratorio Foodomics. Madrid-España por su valiosa colaboración en el uso de HPLC-EM

A la Dra. **Lidia Montero García**, investigadora de CSIC, por su entusiasmo, ya que través de ella aprendí a interpretar los datos de espectro de masa.

A la Dra. **Teresa Arbaiza Fernández**, docente de la Fac. Medicina Veterinaria, por el apoyo recibido para la realización del análisis proximal.

A la memoria de la Dra. **Bertha Jurado T.** por su apoyo en la ejecución del análisis fitoquímico.

A mis profesores del doctorado de Ciencias de la Salud de la Facultad de Medicina

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM por brindarme las instalaciones para la ejecución de presente trabajo.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM por el financiamiento parcial de la tesis (A17010166a)

Al Dr. **João Barreira C.M.** Universidade do Porto, Porto, Portugal, por el envío de información para determinar el poder reductor (2016)

Al Ing Agroind. **Pedro Nascimento H.** por las muestras de estudio enviado desde Puerto Maldonado.

A la Ing. **Carmen Orihuela R.** por sus consejos y colaboración para terminar el presente trabajo

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
RESUMO	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación Problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	4
1.3 Justificación teórica.....	4
1.4 Justificación práctica.....	5
1.5. Objetivos.....	6
1.5.1. Objetivos Generales.....	6
1.5.2. Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes de investigación.....	7
2.1.1. Descripción de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	7
2.1.2. Características del fruto y uso tradicional de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	11
2.1.3. Investigaciones previas al estudio.....	13
2.2. Bases Teóricas.....	16
2.2.1. Hialuronidasa.....	16
2.2.2. Ácido hialurónico.....	17
2.2.3. Inhibidores de la hialuronidasa.....	19
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	25
3.1. Tipo de Investigación.....	25
3.2. Materiales.....	25

3.3. Métodos	26
3.3.1. Análisis químico proximal de la fruta <i>P. cecropiifolia</i>	26
3.3.2. Análisis de minerales de la fruta de <i>P. cecropiifolia</i>	27
3.3.3. Extracción de compuestos bioactivos.....	27
3.3.4. Análisis fitoquímico del extracto de uvilla	28
3.3.5. Cuantificación de compuestos bioactivos	33
3.3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	41
3.3.7. Análisis cromatográfico del extracto de uvilla.....	52
3.3.8. Análisis cinético del extracto de uvilla sobre la actividad hialuronidasa.....	56
3.3.9. Tratamiento de los datos estadísticos.....	65
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
4.1. Presentación de resultados.....	66
4.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	99
CONCLUSIONES.....	129
RECOMENDACIONES	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXOS	150

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas que hidrolizan al ácido hialurónico	17
Tabla 2. Análisis proximal y contenido de minerales zinc y cobre en la fruta de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	67
Tabla 3. Rendimiento y humedad del EU de la fruta de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	68
Tabla 4. Análisis fitoquímico preliminar del extracto liofilizado de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	69
Tabla 5. Contenido de polifenólicos totales en el EU de <i>P. cecropiifolia</i>	70
Tabla 6. Contenido de flavonoides totales en el EU de <i>P. cecropiifolia</i>	71
Tabla 7. Contenido de antocianinas monoméricas y de ácido ascórbico del EU de <i>P. cecropiifolia</i>	73
Tabla 8. IC ₅₀ del EU y de las referencias mediante el ensayo de captación del radical DPPH y ABTS.....	76
Tabla 9. Capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH del EU de <i>P. cecropiifolia</i>	77
Tabla 10. Eficiencia antirradical y comportamiento cinético	80
Tabla 11. Características de los picos del grupo de ácidos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD.....	82
Tabla 12. Características de los picos del grupo de flavonoides obtenidos por HPLC-DAD	87
Tabla 13. Características de los picos del grupo de antocianinas obtenidas por HPLC-DAD	88
Tabla 14. Análisis de HPLC-DAD-EM/EM: Componentes bioactivos del EU de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	91
Tabla 15. Resumen de los parámetros cinéticos de la hialuronidasa con dos concentraciones del EU de <i>P. cecropiifolia</i>	94
Tabla 16. Porcentaje de inhibición del EU en etanol 80 % sobre la actividad Hiasa	96
Tabla 17. Porcentaje de inhibición del EU en buffer fosfato sobre la actividad Hiasa	97
Tabla 18. IC ₅₀ del EU, dexametasona y la quercetina.....	98

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Distribución y abundancia de <i>Pourouma cecropiifolia</i> en la Gran Amazonía.	9
<i>Figura 2.</i> A. B. C. Ramas y racimos con frutos de <i>P. cecropiifolia</i>	10
<i>Figura 3.</i> Racimo con frutos maduros de <i>P. cecropiifolia</i>	11
<i>Figura 4.</i> Diseño experimental de la investigación de EU de <i>P. cecropiifolia</i> C. <i>Martius</i>	32
<i>Figura 5.</i> Contenido de antocianinas	72
<i>Figura 6.</i> Poder reductor del EU <i>P. cecropiifolia</i> y ácido ascórbico.....	74
<i>Figura 7.</i> Capacidad Antioxidante del EU por radical ABTS	75
<i>Figura 8.</i> Capacidad Antioxidante del EU mediante el radical DPPH	75
<i>Figura 9.</i> Comportamiento cinético de reacción del radical DPPH frente al EU	78
<i>Figura 10.</i> Evaluación de EC ₅₀ mediante el porcentaje remanente de DPPH.....	79
<i>Figura 11.</i> Perfil cromatográfico (I) HPLC-DAD de ácidos fenólicos del EU	81
<i>Figura 12.</i> Perfil cromatográfico (II) por HPLC-DAD ácidos fenólicos del EU.....	82
<i>Figura 13.</i> Curvas espectrales por HPLC-DAD de los ácidos fenólicos del EU.....	84
<i>Figura 14.</i> Perfil cromatográfico (I) de flavonoides del EU	85
<i>Figura 15.</i> Perfil cromatográfico (II) de flavonoides del EU.	85
<i>Figura 16.</i> Curvas espectrales de flavonoides del EU.	86
<i>Figura 17.</i> Perfil cromatográfico del grupo de las antocianinas del EU.....	88
<i>Figura 18.</i> Perfil de curvas espectrales de antocianinas del EU	89
<i>Figura 19.</i> Perfil cromatográfico HPLC-EM/EM de compuestos fenólicos del EU de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	90
<i>Figura 20.</i> Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad de hialuronidasa	92
<i>Figura 21.</i> Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad hialuronidasa con EU del fruto de <i>P. cecropiifolia</i>	93
<i>Figura 22.</i> Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad hialuronidasa con quercetina y sin quercetina	95
<i>Figura 23.</i> Porcentaje de inhibición de la actividad hialuronidasa por efecto de la dexametasona y la quercetina.....	98
<i>Figura 24.</i> Estructura del ácido hidroxicinámico	110
<i>Figura 25.</i> Dímeros de procianidinas (Picos 1, 3 y 11)	113
<i>Figura 26.</i> Ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) (Pico 2).....	115
<i>Figura 27.</i> A: Cianidin-3-glucósido B: Cianidina-3-(6“malonil) glucósido. (Picos 5 y 10).....	117
<i>Figura 28.</i> Algunas estructuras de flavonoides en el EU de <i>P. cecropiifolia</i>	119

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación botánica de <i>Pourouma cecropiifolia</i>	151
Anexo 2. Análisis de minerales de la fruta <i>Pourouma. cecropiifolia</i>	152
Anexo 3. Curva de calibración de ácido gálico	153
Anexo 4. Curva de calibración de ácido clorogénico	153
Anexo 5. Curva de calibración de catequina.....	153
Anexo 6. Curva calibración de quercetina.....	154
Anexo 7. Curva de calibración de ácido ascórbico	154
Anexo 8. Porcentaje de captación del radical ABTS versus concentración de trolox	154
Anexo 9. Porcentaje de captación del radical ABTS versus concentración de Ácido ascórbico.....	155
Anexo 10. Porcentaje de captación del radical ABTS versus concentración de quercetina	155
Anexo 11. Porcentaje de captación del radical DPPH versus concentración trolox	155
Anexo 12. Porcentaje de captación del radical DPPH versus concentración de ácido ascórbico.....	156

ABREVIATURAS

AA	: Ácido ascórbico
Ab	: Absorbancia
AbE	: Absorbancia de la solución de sustrato con enzima
AcEnz	: Actividad enzimática
ABTS	: Radical 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)
AbS	: Absorbancia de la solución de sustrato
AbSND	: Absorbancia del sustrato no digerido
Ab _{Quer}	: Absorbancia de la quercetina
AcH	: Acido hialurónico o sustrato
AClo	: Ácido clorogénico
AG	: Ácido gálico
AHC	: Ácido hidroxicinámico
ANT	: Antocianinas
AOX	: Solución de ácido oxálico 0.4%
BA	: Buffer acetato de sodio
BHT	: Butilhidroxitolueno
CETAB	: Bromurocetiltrimetilamonio en solución de cloruro de sodio
CACO	: Catequina conjugada
CAET	: Capacidad antioxidante equivalente trolox
CAEVC	: Capacidad equivalente a vitamina C
CB	: Compuestos bioactivos
CPT	: Compuestos polifenólicos totales
CFT	: Compuestos flavonoides totales
DCI	: 2,6-dicloroindofenol
DPPH	: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EA	: Eficiencia antirradical
EC	: Concentración eficiente
ERO	: Especies reactivas de oxígeno
EAClo	: Equivalente de ácido clorogénico
EAG	: Equivalente de ácido gálico
ECi	: Equivalente de cianidina

ECA	: Equivalente de catequina
EQ	: Equivalente de quercetina
EM/EM	: Fragmentación de espectro de masa
EQ	: Equivalente de quercetina
EU	: Extracto de uvilla liofilizado
Eta	: Etanol
FLA	: Flavonoides
Hiasa	: Hialuronidasa
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
HVS	: Hialuronidasa de veneno de serpiente
MEC	: Matriz extracelular
OA	: Osteoartritis
PM	: Peso molecular
Quer	: Quercetina
PR	: Poder reductor
Sol.AA	: Solución de ácido ascórbico
TR	: Tiempo de retención

RESUMEN

Los compuestos bioactivos tienen la capacidad de inhibir enzimas pro-inflamatorias como a la hialuronidasa. Al respecto, no existe estudios de estos componentes y de su actividad antihialuronidasa de la “uvilla amazónica”. El objetivo del presente estudio fue evaluar los compuestos bioactivos, la actividad inhibitoria hialuronidasa y la capacidad antioxidante de la fruta *Pourouma cecropiifolia*. Las frutas fueron recolectadas en Puerto Maldonado y clasificadas taxonómicamente en el Museo de Historia Natural. El extracto metanol/agua de la fruta fue liofilizado, este se denominó extracto de uvilla (EU) y este constituyó la unidad experimental. Los compuestos bioactivos del EU como el contenido total de polifenoles (CPT), contenido de flavonoides totales (CFT), antocianinas (ANT) y ácido ascórbico (AA). fueron analizados por espectrofotometría. Se utilizaron tres pruebas *in vitro* para medir la capacidad antioxidante: poder reductor, capacidad de captación del radical DPPH y capacidad de captación del radical ABTS. La técnica HPLC y HPLC/EM/EM se llevo a cabo para evaluar el perfil de polifenoles e identificar los compuestos. El comportamiento cinético inhibitorio y la concentración inhibitoria del EU frente a la hialuronidasa se evaluó mediante el ensayo turbidimétrico. Los resultados fueron 142.25 ± 3.19 mg EAClo/ 100 g. de CPT, 61.72 ± 17.00 mg ECA/100 g. de CFT, 1.86 ± 0.05 mg AA/100 g de AA y 34.82 ± 6.03 mg ECi/kg de ANT; en cada caso es de 100 g de fruta. La capacidad antioxidante fue 169.12 ± 1.29 , 134.44 ± 1.62 y 115.07 ± 1.30 $\mu\text{g/mL}$, como IC₅₀ de PR, DPPH y ABTS respectivamente. Los análisis por HPLC detectaron ácidos fenólicos de tipo hidroxicinámicos; flavonoides y antocianinas. Diez compuestos fenólicos fueron identificados tentativamente por HPLC/EM/EM, destacando el ácido clorogénico y las procianidinas. Además, la ampelopsina fue registrado por primera vez en la fruta. El modo de inhibición del EU sobre la hialuronidasa fue de tipo no competitivo mixto y tuvo IC₅₀= 1.55 ± 0.06 mg/mL, comparado con la dexametasona y quercetina como antiinflamatorio conocidos. Los resultados proporcionaran soporte científico para la aplicación del EU como antiinflamatorio e insumo para productos cosméticos.

Palabras clave: *Pourouma cecropiifolia* C. Martius, EU, perfil de polifenoles, inhibición hialuronidasa, antioxidante.

SUMMARY

The bioactive components have the ability to inhibit pro-inflammatory enzymes such as hyaluronidase. In this regard, there are no studies of these components and their antihyaluronidase activity of the "Amazonian uvilla"

The objective of the present study was to evaluate the bioactive compounds, the hiase inhibitory activity and the antioxidant capacity of the fruit *Pourouma cecropiifolia*. The fruits were collected in Puerto Maldonado and taxonomically classified in the Natural History Museum. The methanol / water extract of the fruit was lyophilized, this was called uvilla extract (EU) and this constituted the experimental unit. EU bioactive compounds such as total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), anthocyanins (ANT) and ascorbic acid (AA) were analyzed by spectrophotometry. Three in vitro tests were used to measure antioxidant capacity: reducing power, DPPH radical scavenging capacity and ABTS radical scavenging capacity. The HPLC and HPLC / MS / MS technique was carried out to evaluate the polyphenol profile and identify the compounds. The kinetic inhibitory behavior and the inhibitory concentration of the EU against hyaluronidase was evaluated by the turbidimetric assay. The results were 142.25 ± 3.19 mg EAClo / 100 g of TPC; 61.72 ± 17.00 mg ECA / 100 g of TFC; 1.86 ± 0.05 mg AA / 100 g of AA and 34.82 ± 6.03 mg ECi / kg of ANT; in each case it is 100 g of fruit. The antioxidant capacity was 169.12 ± 1.29 , 134.44 ± 1.62 and 115.07 ± 1.30 $\mu\text{g} / \text{mL}$, as IC₅₀ of PR, DPPH and ABTS respectively. HPLC analyzes detected phenolic acids, from the hydroxycinnamic type; flavonoids and anthocyanins and by HPLC / MS / MS. ten phenolic compounds were, tentatively, identified, highlighting chlorogenic acid and procyanidins. In addition, ampelopsin is registered in this fruit for the first time. The mode of inhibition of the EU on hyaluronidase was of the noncompetitive mixed type and had IC₅₀ = 1.55 ± 0.06 mg / mL, compared with dexamethasone and quercetin as known anti-inflammatory. The results will provide scientific support for the application of the EU as an anti-inflammatory and an input for cosmetic products.

Key words: *Pourouma cecropiifolia* C. Martius, uvilla extract, polyphenols profile, hyaluronidase inhibition, antioxidants.

RESUMO

Os compostos bioativos têm a capacidade de inibir enzimas pró-inflamatórias, como a hialuronidase. Nesse sentido, não há estudo desses compostos na “uvilla amazônica”. O objetivo do presente estudo foi avaliar os compostos bioativos, a atividade inibidora da hialuronidase e a capacidade antioxidante do fruto de *P. cecropiifolia*. Os frutos foram coletados em Puerto Maldonado e classificados taxonomicamente no Museu de História Natural. O extrato de metanol / água do fruto foi liofilizado, denominado extrato de uvilla (EU). Os compostos bioativos da UE foram analisados por espectropometria como o conteúdo total de polifenóis (CTP) total de flavonóides (CTF), antocianinas (ANT) e ácido ascórbico (AA). A capacidade antioxidante in vitro foi medida pelo poder redutor (PR) e pela capacidade de capturar os radicais DPPH e ABTS. Além disso, utilizando a técnica de HPLC e HPLC / MS / MS, foram realizados o perfil de polifenóis e a caracterização dos compostos. O comportamento inibitório cinético e a concentração inibitória da UE contra a hialuronidase foram avaliados pelo ensaio turbidimétrico. Os resultados foram $142,25 \pm 3,19$ mg de EAClo / 100 g. de CPT, $61,72 \pm 17,00$ mg ECA / 100 g. da CFT, $1,86 \pm 0,05$ mg AA / 100 g de AA e $34,82 \pm 6,03$ mg ECi / kg de ANT, com base em 100 g de fruto. A capacidade antioxidante foi de $169,12 \pm 1,29$, $134,44 \pm 1,62$ e $115,07 \pm 1,30$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, conforme IC₅₀ de PR, DPPH e ABTS, respectivamente. A HPLC analisa ácidos fenólicos detectados no grupo hidroxicinâmico; flavonoides e antocianinas. Dez compostos fenólicos foram identificados tentativamente por HPLC / MS / MS, destacando o ácido clorogênico e procianidinas. Além disso, a ampelopsina no fruto é registrada pela primeira vez. O modo de inibição da UE na hialuronidase era do tipo misto não competitivo e apresentava IC₅₀ = $1,55 \pm 0,06$ mg / mL, comparado com dexametasona e quercetina como anti-inflamatório conhecido. Os resultados fornecerão apoio científico para a aplicação da UE como anti-inflamatório e insumo para produtos cosméticos.

Palabras clave: *Pourouma cecropiifolia* C. Martius, UE, perfil de polifenóis, inibição hialuronidasa, antioxidante.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

Los compuestos bioactivos (CB) son metabolitos secundarios que han alcanzado relevancia por sus efectos biológicos. A pesar que no tienen una función nutricional clásica, o no son esenciales para la salud humana, pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad y ser indispensables a largo plazo para nuestra salud. Actualmente ocupan un área de investigación emergente y con un gran futuro, dada la enorme variedad de alimentos que los contienen. En las frutas predominan dos tipos de CB según su estructura, las terpénicas y las fenólicas (Martínez, Camacho y Martínez, 2008). Las plantas medicinales constituyen una fuente de compuestos bioactivos con acción terapéutica y han demostrado ser muy eficaces y seguras en el tratamiento de diversos trastornos fisiopatológicos, tales como inflamación y artritis. (Santhosh et al., 2013).

El ácido hialurónico (ACh) es un polímero de alto peso molecular (PM), componente de la matriz extracelular (MEC). Bajo condiciones inflamatorias es degradado por la hialuronidasa (Hiasa) a fragmentos de bajo PM. Se afirma que estos, están asociados con algunas patologías del tejido conectivo, como la artritis reumatoidea. Los fragmentos de bajo PM inducen la liberación de citoquinas, las que activan a otras enzimas degradantes de MEC, dando paso a la progresión de la enfermedad (Sgariglia, Soberon, Sampietro, Quiroga y Vattuone, 2007).

Con el tiempo, el tejido conectivo se altera ocasiona cambios en la síntesis y degradación del AcH, causa disminución de la síntesis, y se producen inflamaciones como la osteoartritis (OA). Los desequilibrios pueden atribuirse a un aumento del estrés oxidativo que causan la formación de mediadores inflamatorios. Al aumentar la actividad de la Hiasa, se produce cambios degenerativos en los tejidos conectivos (Bralley, Greenspan, Hargrove y Hartle, 2007). La degradación de AcH puede producir acciones proinflamatorias, como artritis reumatoidea e insuficiencia venosa crónica (Termeer, Seeman y Simon, 2003; Bustamante, Torres y Morales, 2009; Ferreira *et al.*, 2015).

Mientras más alto sea el PM del AcH en los tejidos, estos estarán intactos y sanos. Las formas fragmentadas del AcH indican señales de riesgo y abundan en los tumores malignos. Estas formas promueven la angiogénesis, estimulan la producción de citoquinas inflamatorias y activan vías de señalización que son cruciales para la progresión del cáncer (Stern, 2008).

La fragmentación del AcH está asociada con la producción masiva de radicales de oxígeno. Los captadores de radicales libres (antioxidantes) pueden inhibir las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Schenck, Scheider, Miehlke, y Prehm, 1995). Los radicales libres y las Hiasas pueden tener actividades coordinadas en determinadas situaciones patológicas (Stern, Asari y Sugahara, 2006).

La degradación de AcH es una etapa limitante en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos que van desde la embriogénesis hasta el envejecimiento. Los inhibidores de Hiasa son considerados como potentes reguladores que pueden actuar como antiinflamatorios, antienvjecimiento, antimicrobianos, agentes anticancerígenos, antitoxinas y anticonceptivos (Sunitha *et al.*, 2013).

En Colombia, Bravo, Alzate, y Osorio (2016) investigaron treinta y cinco frutas silvestres y cultivadas como fuente de compuestos con actividad antioxidante

y evaluaron la inhibición sobre la colagenasa, hialuronidasa y elastasa. Estas enzimas al activarse por las ERO destruyen el AcH, elastina y colágeno componentes propios de la MEC de la piel y ocasiona problemas de fotoenvejecimiento, disminuyendo la hidratación de la piel y aparición de arrugas.

Los inhibidores de Hiasa pueden ser de diferentes estructuras químicas, como la heparina, sulfato de condroitin, antioxidantes (ácido ascórbico, curcumina y ácido clorogénico), componentes bioactivos de plantas (alcaloides, flavonoides y terpenoides) y drogas antiinflamatorias sintéticas (dexametasona, indometacina y salicilatos) (Isoyama *et al.*, 2006; Girish y Kemparaju, 2005). Los compuestos naturales tienen la capacidad de inhibir enzimas proinflamatorias incluyendo a la lipooxigenasa y la hialuronidasa (Torres, D'Almeida, Isla y Alberto, 2016).

“En el Perú, durante el año 2016, la incidencia de artrosis fue elevada en personas mayores de 59 años (72.6/1000 habitantes). Este registro fue mayor a la encontrada en estudios nacionales previos” (Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación, 2018). Por otro lado, es destacable mencionar que el consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), por un periodo prolongado, ha sido asociado a efectos secundarios (toxicidad gástrica y renal), el cual puede aumentar el costo sanitario (Torres *et al.*, 2016)

La flora de la selva baja, es la región más extensa de la amazónica peruana. Está compuesta por más de 20000 especies de plantas (árboles de madera fina, frutos útiles al hombre y plantas medicinales). Las frutas son más numerosas con gran aporte a la alimentación humana y al desarrollo de una agroindustria local. Se han identificado 162 especies frutales, que son consumidas regularmente por los pobladores y, de ellas, unas 100 son comercializadas. El Tratado de Cooperación Amazónica conjuntamente con el Programa de Naciones para el Desarrollo estudiaron 56 especies importantes de gran utilidad para los pobladores de la Amazonía. Los

resultados destacaron a 45 frutas, entre ellas, está la uvilla amazónica. (Dirección de Investigación y Desarrollo Social, 2009). Sin embargo, la comercialización de frutales nativos, en la Amazonía peruana, es una actividad poco registrada. (Gonzales, 2007). A pesar de su importancia, hasta la actualidad no se ha reportado indicadores estadísticos de su consumo, áreas de extensión, ni la cantidad de cultivo de esta especie (Boletín Estadístico Mensual, Ministerio de Agricultura y Riego 2019).

Los investigadores Villachica (1996) y Gonzáles (2006) informaron que la fruta *Pourouma cecropiifolia* posee elementos nutritivos, que le confieren características promisorias para el desarrollo de la agroindustria en el Perú

Hasta la fecha, no existe estudios del comportamiento inhibitorio de los compuestos bioactivos de la *P. cecropiifolia* sobre la actividad de la hialuronidasa, ni su relación con la dexametasona como antiinflamatorio convencional. Estos metabolitos secundarios de la fruta probablemente posean acciones benéficas para el ser humano

Por lo tanto, existe una gran necesidad de conocer y desarrollar nuevos agentes antiinflamatorios y antioxidantes de fuentes vegetales con ningún o escasos efectos adversos. El uso adecuado de los C.B de *P. cecropiifolia* Martius representaría una alternativa saludable y podría desempeñar un rol para el tratamiento de los procesos inflamatorios aprovechando sus componentes bioactivos con propiedades antioxidantes.

1.2. Formulación del problema

¿Los componentes bioactivos del fruto de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius presentan actividad antioxidante y capacidad inhibitoria sobre la enzima hialuronidasa?

1.3. Justificación teórica

La investigación ofrece la posibilidad de caracterizar los componentes bioactivos y la actividad antioxidante de la fruta de *P. cecropiifolia* M, mediante

métodos científicos, conocimiento fundamental para proporcionar un uso adecuado como producto nutracéutico e insumo en la industria cosmética. Además, se pretende conocer, mediante un estudio *in vitro*, el comportamiento cinético de los compuestos bioactivos de la fruta y la concentración que logra inhibir a la Hiasa, de manera que se alcance reducir la degradación del ACh y, en consecuencia, evitar y prevenir enfermedades.

1.4. Justificación práctica

Descubrir los componentes bioactivos de la fruta *Pourouma cecropiifolia* sería un importante paso en la búsqueda de antioxidantes con capacidad de capturar radicales libres y actuar como antiinflamatorio sin efectos secundarios. El consumo de la fruta amazónica ofrecería la posibilidad de protección contra el estrés oxidativo causante de enfermedades degenerativas.

Asimismo, si se demuestra el efecto inhibidor hialuronidasa, se utilizaría como complemento para el tratamiento de enfermedades como la osteoartritis y los extractos de la fruta podrían ser usados como insumo para elaborar cremas cosméticas antienvjecimiento. Así como, en la preparación de bebidas nutracéuticas. Los resultados de la investigación, también, servirían a los gobiernos locales para impulsar el biocomercio, fomentar la agroindustria y el consumo para el desarrollo económico de la población y el beneficio saludable de prevenir procesos patológicos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos General

Evaluar los componentes bioactivos, la actividad inhibitoria hialuronidasa y la capacidad antioxidante de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius “uvilla amazónica”.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Determinar los componentes bioactivos (polifenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y antocianinas) y el perfil polifenólicos por HPLC del extracto de uvilla de la fruta de *P. cecropiifolia* C.
2. Evaluar la actividad inhibitoria y el comportamiento cinético inhibitorio sobre la hialuronidasa del extracto de uvilla de la fruta de *P. cecropiifolia* C.
3. Evaluar la capacidad antioxidante del extracto de uvilla de la fruta de *P. cecropiifolia* C. mediante captación de radicales libres ABTS, DPPH y el poder reductor.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Descripción de *Pourouma cecropiifolia*

Gonzalo Jiménez de Quesada, en la expedición de 1596 en Colombia, reportó la existencia de plantaciones frutales de *P. cecropiifolia*. Él describe que los árboles presentaban racimos grandes indica que la especie fue cultivada y probablemente domesticada desde el periodo precolombino (Patiño, 2002).

Pourouma cecropiifolia es un árbol frutal que se encuentra en la selva amazónica, desde el oeste hasta la Amazonía Central. Las especies se encuentran en condiciones silvestres en Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú y Brasil. En el Perú, es cultivado por los pobladores de los departamentos de Loreto, Ucayali, San Martín, Madre de Dios, Huánuco, Amazonas, Pasco y Junín (Gonzales, 2006; Brack, 1999). Se le conoce comúnmente como uvilla, uva de monte (Perú), uva caimaron, caimaron (Colombia), uva de mata, mapatí (Brasil), cocura o cucura (Venezuela) (González y Torres., 2010)

La familia Cecropiaceae es reconocida en el Perú por presentar tres géneros y 58 especies (Cáceres, (2006). El género *Pourouma* se distribuye en los bosques húmedos de América del Sur y Central, con una mayor diversidad en los bosques de tierra firme de la región

amazónica, preferiblemente a bajas altitudes. Este género se caracteriza por ser un grupo arbóreo y dioico. La posición sistemática de *Pourouma* en Urticaceae es discutida por algunos autores, argumentando la falta de análisis moleculares para el género. Debido a que tiene caracteres morfológicos intermedios entre Moraceae y Urticaceae (Gaglioti, 2018).

Pedrosa, Clemente y Schiatti (2018) describieron dos zonas según su abundancia de plantones de *P. cecropiifolia*: área húmeda y tierra firme, siendo este último con mayor número de plantones y mejores condiciones favorables de desarrollo de la uvilla en el Perú. También, describen dos zonas según su distribución: área cultivada y ecosistema inespecífico, tal como se observa en la figura 1.

Gaglioti y Neto (2014) reportaron que Perú y Ecuador representan un centro de diversidad para *Pourouma* y la riqueza de las especies es más alta en la zona húmeda de la Amazonía de baja altura. La excepción es *Pourouma montana* C.C. Berg. que se limita a una altura de 1800 a 2100 msnm. Además, los investigadores mencionan a *Pourouma bergii* como una nueva especie cuyo hábitat y distribución se encuentra en el noroeste del Perú, propiamente, en Loreto (provincia de Alto Amazonas) y en Pasco (provincia de Oxapampa) ubicado a una altura de 200 a 365 msnm. Por otro lado, Berg (1989) describe a *P. herrereensis* como una nueva especie, la cual se encuentra en Loreto (provincia de Requena distrito de Jenaro Herrera). Así mismo Berg, (2004) registra dos especies: *P. cordata* como una nueva especie encontrada en Perú (Amazonas, provincia de Bagua) y *P. montana* (Cajamarca, provincia de San Ignacio)

La producción media de cinco árboles proporciona 24.26 ± 12.3 Kg de frutos, que representa 26.02 ± 4.5 % de pulpa, lo que significa un promedio de 6.3 Kg de pulpa por árbol que es aprovechable. La uvilla florece en julio y agosto y los frutos maduran entre setiembre y noviembre (Falcao y Lleras 1980).

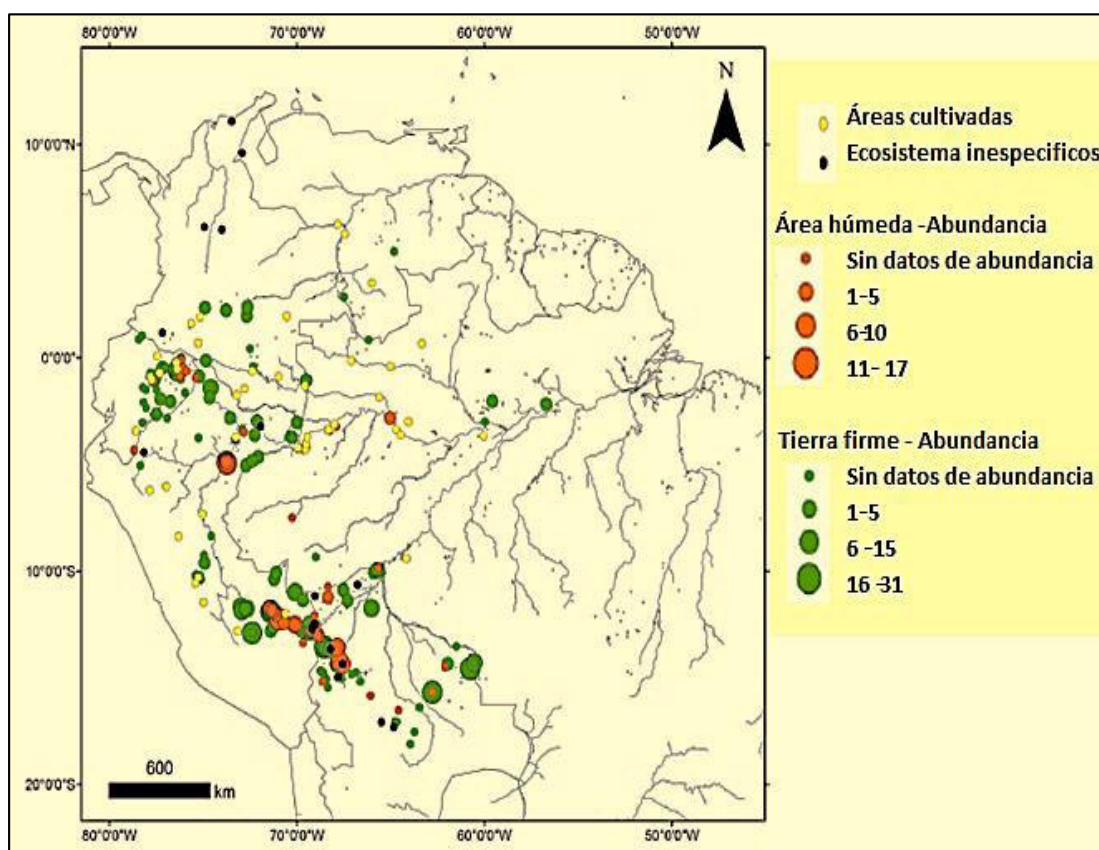


Figura 1. Distribución y abundancia de *Pourouma cecropiifolia* en la Gran Amazonía.

Fuente: Pedrosa et al., 2018

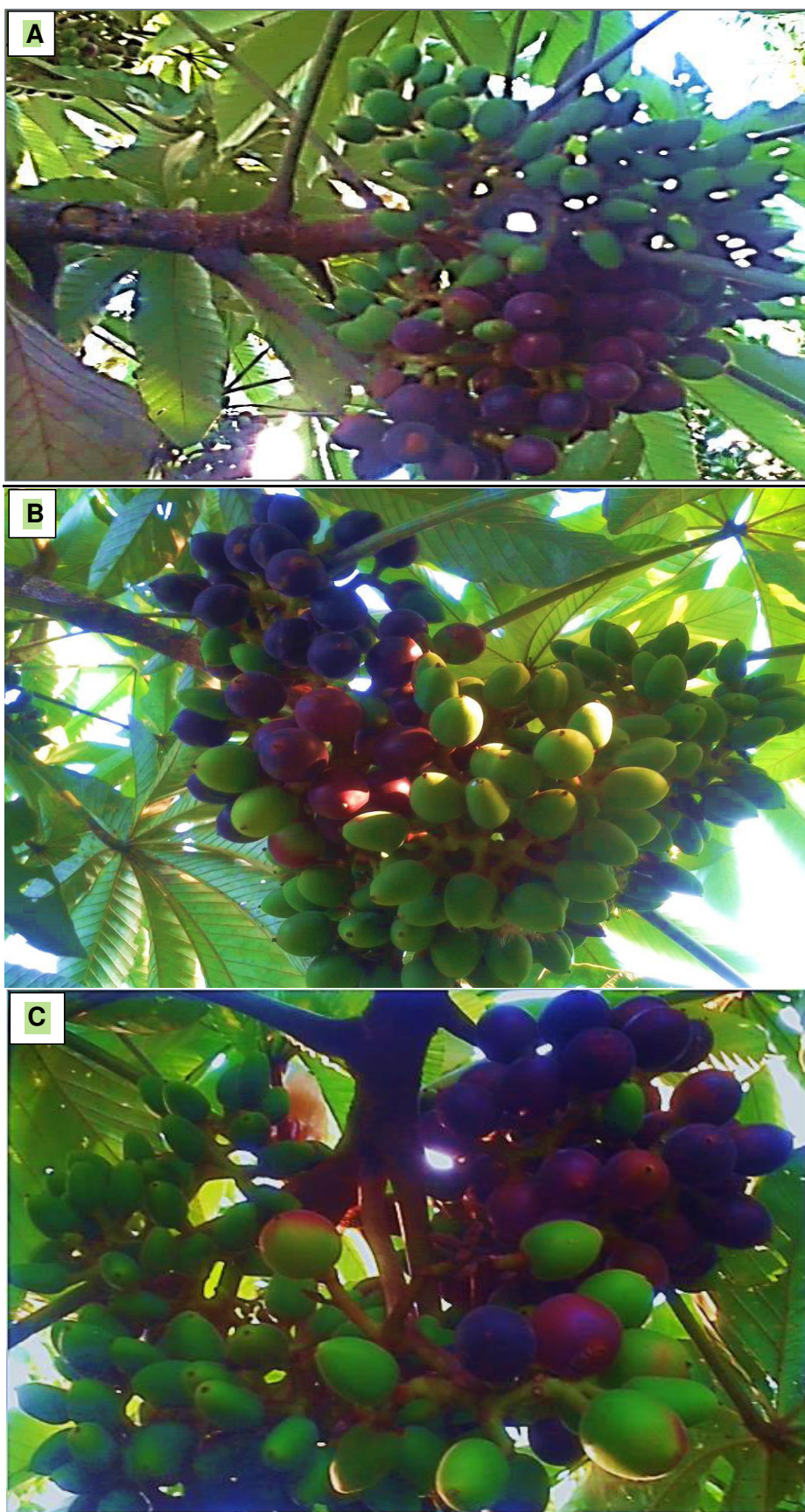


Figura 2. A, B y C. Ramas y racimos con frutos de *P. ceropiifolia*. Comunidad nativa El Infierno. Puerto Maldonado-Perú.

Fuente: Imagen propia

2.1.2. Características del fruto y uso tradicional de *P. cecropiifolia*

En la región de Iquitos, Perú, se consumen cerca de 193 especies de frutas. Casi 120 especies se extraen, exclusivamente, de forma silvestre. Las frutas silvestres cosechadas de 57 especies, pertenecientes a veinticuatro familias diferentes de plantas, se venden en el mercado de Iquitos y son muy importantes en la economía y en el consumo de la región (Vásquez y Gentry, 1989).



Figura 3. Racimo con frutos maduros de *P. cecropiifolia*

Fuente: Imagen propia

La uvilla amazónica es una de las especies catalogadas como frutales económicamente promisorios de la Amazonía, que ha sido recomendada para su cultivo (Villachica, 1996). La fruta es una drupa semejante a una uva, ovoide o esférica de 2 a 4 cm de largo y de 1 a 4 cm de diámetro, con una semilla de color pardo y de forma acorazonada. Los frutos son comestibles y cuando se fermentan produce vino (Falcao y Lleras, 1980). Las ramas y frutos jóvenes son utilizados en la fitomedicina como vermífugos. (Blind, Serudo, Mira, Silva y Noda. 2016).

En la especie *P. cecropiifolia* se han detectado varios compuestos del grupo de terpenos (eugenol, veratrol, indol, etc.), antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos en los frutos. (Pino et al., 2008), estos compuestos pueden ser usados como insumos en la industria farmacéutica y cosmética. En tanto que, Guio, León y Pérez (2010) han encontrado en la pulpa de *P. cecropiifolia* Mart. compuestos volátiles, como alcoholes alifáticos y terpénicos (linalol, 1,2-propanodiol y salicilato de metilo), que brindan sabores propios a la pulpa fresca. Los componentes volátiles mayoritarios liberados por hidrólisis de los glucósidos de la pulpa fueron ácido acético, ácido benzoico y vainillina. Karagiannis et al. (2000) reportaron que el linalol es un compuesto que se ha encontrado como producto de fermentación en la uva (*Vitis vinífera*) var moscatel.

Según Villachica, (1996) la uvilla contiene 52.8 % de pulpa; 8.8 % de mucilago; 10.6 % de semilla, y 17.8 % de cáscara. Asimismo, presenta mayor contenido de agua, carbohidratos y minerales como aporte nutricional. Brack (1996) reportó que la pulpa madura es agradable, de sabor dulce o acidulado, se consume directamente como fruta al estado natural o sirve para la preparación de bebidas refrescantes, néctares, jaleas, mermeladas y frutas en almíbar.

Las frutas de *Pourouma guianensis* también son comestibles, los frutos no maduros se usan para curar las heridas y la infusión de la corteza del tallo se utiliza para el tratamiento de disentería (Lopes, Koketsi, Carauta, de Olivera, y Kaplan, 1999).

Camargo, Velásquez y Acosta (1991) reporta el valor nutricional de la *P. cecropiifolia*, en el que se destaca su aporte de calcio, potasio y fósforo, niacina y riboflavina. Además, reporta investigación fitoquímica preliminar, donde se detectaron flavonoides, taninos, triterpenoides y cumarinas.

2.1.3. Investigaciones previas al estudio

Nile y Keum (2017) elaboraron extractos metanólico de diez plantas y analizaron propiedades antioxidantes, fitoquímica, antimicrobiana y antiinflamatoria, esta última propiedad fue evaluada con enzimas hialuronidasa, lipoxidasa y β -glucuronidasa. Los estudios destacan el contenido de taninos, flavonoides y saponinas. El porcentaje de inhibición hialuronidasa estuvo entre 26.7 a 73.6 %. En tanto que, Kolayli, Can, Yildiz y Apay (2016a) estudiaron 32 mieles recolectadas en la región del Mar Negro de Turquía. Se prepararon extractos metanólicos y ellos fueron evaluados para determinar la actividad antihialuronidasa, antiureasa, antioxidante, antimicrobiana y propiedades fisicoquímicas. También, se analizaron los compuestos fenólicos totales, flavonoides, taninos y la propiedad antioxidante que incluye el poder reductor, actividad captadora de radicales libres ABTS y DPPH. Concluyeron que existe una relación entre el contenido fenólico (ácido gálico, rutina, catequinas y flavonoides) y la actividad antihialuronidasa. Proponen que los flavonoides poseen actividad antihialuronidasa y que el consumo regular de miel puede contribuir a reducir la inflamación.

Daya, Prabhashini, Mendis y Dayendra. (2014) evaluaron cinco concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/mL de té negro *Camellia sinensis* L. (TN) y como sustancia de referencia utilizaron epicatequina (EGCG). La actividad antihialuronidasa de bovino testicular para TN y EGCG fueron $IC_{50} = 1.09 \pm 0.12$ mg/mL y $IC_{50} = 0.09 \pm 0$ mg/mL, respectivamente. La actividad antihialuronidasa se atribuyó a los fitoconstituyentes fenólicos. Sin embargo, los autores afirman que desconocen si la inhibición de Hiasa de TN es de tipo competitiva o no competitiva. Recomiendan realizar gráficos de Lineweaver-Burk para resolver el comportamiento cinético de inhibición.

Sunitha K. *et al.* (2013) manifestaron que los inhibidores de la hialuronidasa tienen inmensas aplicaciones en condiciones fisiopatológicas asociadas con el sistema hialuronato-hialuronidasa. El estudio demostró la eficacia inhibitoria del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) contra la hialuronidasa de suero, testículo, veneno de serpiente y veneno de abeja. Los resultados sugieren el comportamiento cinético tipo inhibición no competitiva y que los grupos tioles del NAC ejercerían la inhibición Hiasa.

En el Perú, Sotero, *et al.* (2011) determinaron actividad antioxidante y compuestos fenólicos de las pulpas de anona, castaña, chope, huasaí, huito y uvilla (*P. cecropiifolia*) mediante el secuestro de radicales libres de DPPH.

Ao, Higa, Ming, Ding y Tawata. (2010) aislaron e identificaron los antioxidantes y los inhibidores hialuronidasa de la corteza *Ficus microcarpa* y demostraron que los extractos metanólicos exhibieron fuerte actividad antihialuronidasa, en especial la fracción acetato de etilo y n-butanol. También, se determinó la capacidad antioxidante usando DPPH y ABTS. Los investigadores reportaron que existe una alta actividad antioxidante y elevada actividad inhibitoria hialuronidasa.

Sgariglia *et al.* (2007) demostraron la actividad inhibitoria Hiasa en extractos metanólico de la corteza *Caesalpinia paraguariensis*. Fraccionaron el extracto por Sephadex LH-20. Los resultados indicaron que los polifenoles y las antocianidinas serían responsables de la actividad inhibitoria Hiasa.

Moon. *et al.*, (2009) reportaron el efecto inhibitorio de la naringenina (flavonoide) sobre la Hiasa, señalaron que la enzima ejercía efectos como reacciones alérgicas, cáncer metástasis e inflamación y que este flavonoide podría tener actividad antialérgica y anticancerígena.

Ippushi, Yamaguchi, Itou, Azuma y Higashio (2000) evaluaron el efecto inhibidor de 46 vegetales sobre la Hiasa, debido al rol que cumple la enzima en la inflamación y al estar involucrada en la migración de células tumorales. El interés fue investigar la actividad inhibitoria hialuronidasa en vegetales consumidas diariamente en los alimentos. Los resultados mostraron que veintidós extractos presentaron actividad inhibitoria hialuronidasa. La mayor actividad fue encontrada en los extractos de *Melissa officinalis* (toronjil) y *Salvia officinalis* (salvia) reduciéndose hasta 1.0 ± 0.3 y 15.5 ± 10.6 % la actividad hialuronidasa, respectivamente.

Yeo, Kim y Paik. (2005) investigaron los efectos antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano del propóleo en el extracto etanólico al 80 % y en el extracto acuoso. Encontraron que ambos extractos tienen efectos inhibitorios hialuronidasa, pero, al parecer, el efecto es dos veces más superior en el extracto etanólico que en el extracto acuoso. Esto se debería a sus componentes polifenólicos y flavonoides.

Lopes et al., (1999), investigaron a *P. cecropiifolia* C. encontrando como principal componente en la pulpa de la fruta carbohidratos, los azúcares predominantes fueron la glucosa y la fructosa. La pulpa presentó un pH 4,87 y 10 °Brix, el contenido de riboflavina fue bastante reducido y las vitaminas B1, B6 y C no fueron detectadas.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Hialuronidasa

Las hialuronidasas son endoglucosidasas que degradan el AcH mediada a través de la actividad coordinada de tres enzimas diferentes. La actividad inicial de la endoglicosidasa en el AcH genera oligosacáridos de diferente longitud que se convierten en sustrato para dos enzimas exoglicosidasas, la β -glucuronidasa y la β -N-acetilhexosaminidasa (Frost, Tony y Stem, 1996).

Según Meyer (1971) la hialuronidasa testicular convierte el AcH y el sulfato de condroitin a oligosacáridos, los cuales tienen residuos de N-acetil-D-hexosamina en sus terminales reductor y residuos de ácido D-glucurónico en sus terminales no reductor.

En el cuerpo humano, la Hiasa se encuentra tanto en órganos (testículos, bazo, piel, ojo, hígado, riñón, útero y placenta) y líquidos corporales (líquido lagrimal, sangre y esperma) (Frost, Csoka, Wong, Stern, 1997).

La actividad Hiasa está modulada por varios activadores (adrenalina, histamina y fosfatasas ácidas formadas en la próstata, bazo, riñón, eritrocitos y plaquetas) e inhibidores (antihistamínicos, salicilato, heparina, vitamina C y flavonoides) (Menzel y Farr. 1998).

La Hiasa hace que el tejido sea más permeable a los fluidos inyectados. La velocidad de absorción de las drogas aumenta mediante inyección subcutánea o intramuscular, mejorando la permeabilidad capilar. La Hiasa y la AcH son ampliamente utilizadas terapéuticamente en muchos campos, por ejemplo, en oftalmología, cirugía y ginecología (Menzel et al., 1998; Schuize *et al.*, 2008).

Existen tres grupos principales de Hiasa con igual especificidad, pero con diferentes mecanismos de reacción, que se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Enzimas que hidrolizan el ácido hialurónico

<p>A. Hialuronato glicanohidrolasa (EC 3.2.1.35) Hialuronidasa de tipo testicular Endo-β-N-acetil-D-hexosaminidasas que degradan el AcH a un tetrasacárido (GlcUA-GlcNAc-GlcUA-GlcNAc)^a como producto principal; también actúa sobre el sulfato de condroitina. Presente en espermatozoides de mamíferos, lisosomas, venenos de himenópteros, serpientes, etc</p>
<hr/> <p>B. Hialuronato glicanohidrolasa (EC 3.2.1.36) Hialuronidasa de sanguijuela Endo-β-D-glucuronidasa que degrada principalmente al AcH a un tetrasacárido (GlcNAc-GlcUA-GlcNAc-GlcUA).</p>
<p>C. Hialuronato liasa (EC 4.2.99.1) Hiasas bacterianas que actúan como N-acetil-D-hexosaminidasas por β-eliminación produciendo disacáridos que contienen residuos de glucuronosilo con un doble enlace entre los carbonos 4 y 5.</p>

^aGlcUA= Ácido Glucurónico, GlcNAc= N-acetil glucosamina, AcH= ácido hialurónico

Fuente: Kreil, 1995

2.2.2. Ácido hialurónico

El AcH es un glucosaminoglucano lineal no sulfatado, constituido por disacáridos repetitivos de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Su PM oscila entre 105 a 107 Dalton y está conformado de 2000 a 25000 de unidades de disacáridos (Stern, 2003). Las propiedades funcionales son altamente dependientes de la longitud de la cadena (Aya y Stern 2014).

El AcH está presente en la piel y es uno de los más abundantes componentes de la MEC cutánea. Tiene una vida media de 2 a 5 minutos. Un individuo de 70 Kg tiene aproximadamente 15 g de AcH, un tercio se degrada diariamente (McCourt, 1999). Las moléculas de alto PM del AcH reducen la expresión de citoquinas antiinflamatorias, son antiangiogénicos y antiinflamatorios. Además, son responsables de la hidratación del tejido, lubricación, secuestro de radicales libres, distribución de proteínas plasmáticas y efecto viscoelástico (Noble, 2002; Aya, et al., 2014). Sin embargo, los fragmentos cortos generados por la actividad hialuronidasa son altamente angiogénicos (West y Kumar, 1989) inmunoestimulantes e inflamatorios (Jiang, Liang y Noble, 2011). Otros estudios informan, que el AcH, principalmente es despolimerizado por los grupos OH, producido por la descomposición de H_2O_2 catalizada por hierro libre o localmente unida al propio AcH (Saarii, Kontinen, Friman y Sorsa. 1993)

La escisión del AcH puede ocurrir por radicales libres bajo condiciones oxidativas, siendo promovido por cationes divalentes. Los radicales libres y las Hiasa pueden tener actividades coordinadas en determinadas situaciones patológicas. Diversos tipos de células responden de diferente manera de acuerdo con los diferentes tamaños de fragmento de AcH. Así, polímeros de hasta 500 unidades pueden inducir una inflamación en monocitos, mientras que, las células dendríticas de tipo Langerhans responden a fragmentos muy pequeños de 4 a 6 (Stern et al., 2006)

Los pequeños fragmentos actúan como moléculas de señal que intensifican el proceso inflamatorio mediante la sobre regulación de receptores CD44, la acción de citoquinas y metaloproteinasas de la matriz. (Bralley, Greenspan, Hargrove y Harle, 2007)

2.2.3. Inhibidores de hialuronidasa

Los inhibidores de la Hiasa están encargados de mantener el equilibrio entre el anabolismo y el catabolismo del AcH. Los inhibidores son de estructuras químicas diferentes tales como proteínas, glucosaminoglicanos, polisacáridos, ácidos grasos, antibióticos, antinematodos, compuestos orgánicos sintéticos y componentes bioactivos derivados de plantas (Girish, Kemparaju, Nagaraju y Vishwanath, 2009).

En concordancia con la literatura revisada el presente estudio agrupo los inhibidores Hiasa de acuerdo a su naturaleza química en

1. Los compuestos bioactivos y
2. Los fármacos antiinflamatorios.
3. Los que actúan sobre la piel como “anti-aging”

1. Compuestos bioactivos

Existe una rica tradición etnofarmacología de compuestos que funcionan bloqueando la actividad Hiasa. Mio y Stern (2002). Perera *et al.* (2018) analizaron los extractos etanólicos de diez plantas medicinales de Sri Lankan. Los resultados revelaron que la corteza de *Barathanthus nodiflorus* presentó 42.31 % a 250 µg/mL y la indometacina obtuvo 50 % a 500 µg/mL de actividad Hiasa. La actividad inhibitoria fue correlacionada con el contenido de polifenoles.

Citalingam, Zareen, Shaari y Ahmad (2013) reportaron que la Hiasa está asociada con la OA al participar en la degradación del cartílago. El tratamiento y prevención de OA está enfocado en la utilidad de productos naturales con la finalidad de limitar los efectos adversos de los fármacos antiinflamatorios. En este estudio la *Payena dasphylla* con 100 µg/mL presentó 91.62 % de inhibición Hiasa y una alta cantidad de fenólicos y flavonoides.

El veneno de serpiente contiene veinte enzimas diferentes incluyendo a las fosfolipasas, metaloproteasas y Hiasas (HVS: Hiasa de veneno de serpiente). A las HVS se le conoce como “factor de propagación” ya que facilita la difusión de toxinas sistémicas. Estudios recientes han divulgado el mecanismo de acción de ciertos fitoquímicos que quelan iones metálicos (Zn^{2+} y Ca^{2+}) de las toxinas. Asimismo, han inferido que los fitoquímicos podrían directamente interactuar con el sitio activo de aminoácidos de la enzima y neutralizar su toxicidad. La ventaja de los metabolitos de los vegetales es su fácil disponibilidad y estabilidad (Santhosh *et al.*, 2013).

Sumantran *et al.* (2007) investigaron en *Triphala guggulu* (TG) y *Triphala shodith guggulu* (TSG). Este último es un polvo de tres frutas *Phyllanthus emblica* (TA), *Terminalia chebula* (TB) y *T. belerica* (TC), utilizado en la medicina ayurvédica para el tratamiento de la artritis y reumatismo. Los resultados evidenciaron que el componente TB fue el más potente inhibidor que el TA y el TC; y el TG demostró ser 50 veces más potente que TGS. A partir de estas evidencias preclínicas los autores concluyeron que la TG podría ser utilizada como condroprotector en el manejo de artritis, debido a su actividad inhibitoria Hiasa.

Bralley *et al.*, (2007) analizaron los extractos etanólicos de la cáscara y semillas de *Vitis rotundifolia*. Los resultados mostraron que los extractos de semilla fueron tres veces más potentes que los extractos de cáscara demostrando que los compuestos bioactivos, principalmente, los polifenoles inhiben a la Hiasa. Se ha postulado que la Hiasa estimula la angiogénesis y facilita la invasión de tumores. La elevada capacidad antiinflamatoria, antioxidante y antihialuronidasa puede proporcionar utilidad en el desarrollo de productos nutraceúticos. Previamente al estudio, Pastrana, Akoh, Sellappan y Krewer (2003) reportaron que la cáscara contenía ácido elágico, miricetina, kaemferol y resveratrol y la semilla presentaba epicatequina, catequina y ácido gálico como principales fenólicos.

Girish y Kemparaju (2005) estudiaron la acción inhibitoria de alcaloides de plantas, como el ácido aristolóquico, ajmalina y reserpina contra la actividad de HVS de *N. naja*. Evidenciaron que el ácido aristolóquico inhibió la actividad a través de mecanismo no competitivo. Concluyendo que este ácido interactúa con los residuos de tirosina y triptófano de la Hiasa en lugar de unirse al sitio catalítico. Asimismo, reportaron la acción de antioxidantes (ácido ascórbico n-propil galato, butil hidroxitolueno ácido clorogénico y curcumina) flavonoides (flavona, ácido tánico y quercetina) sobre la Hiasa del veneno de *Naja naja*. Los resultados mostraron que la curcumina presentaba 91 % de máxima inhibición, entre los flavonoides, y la quercetina inhibía completamente a la Hiasa. Santhosh et al. (2013) y Mahadeswaraswamy, Manjula, Devaraja, Girish y Kemparaju. (2011) reportan que el mecanismo exacto de acción de inhibición de HVS no está claro. Se puede concluir que estos fitoquímicos pueden dar lugar a la formación de un complejo o puede unirse al sitio activo o los sitios distintos al sitio activo, manifestándose la inhibición efectiva de HVS.

Marquina, Corao, Araujo, Buitrago y Sosa (2002) prepararon un extracto metanólico de la fruta *Rubus fruticosus* (blackberry). El extracto fue fraccionado obteniendo siete fracciones. Las fracciones F3 y F7 inhibieron la actividad Hiasa y demostraron mejor acción antiinflamatoria. Estudios previos han detectado flavonoles, favononas catequinas y antocianidinas, lo cual estaría relacionado con la actividad antiinflamatoria detectado en el extracto.

Kuppusamy y Das (1991) evaluaron el efecto inhibidor de doce flavonas sobre las Hiasa de abejas, escorpiones, serpientes de cascabel y cobra. Encontrando que la apigenina, kaempferol, luteolina, miricetina, phloretina (chalcona) y la quercetina inhibían a la HVS. Concluyeron que el grupo de flavonas, flavonoles y chalconas poseen esta habilidad de inhibición. Kuppusamy, Khoo y Das. (1990) examinaron treinta y uno flavonoides sobre la actividad de Hiasa de testículo de bovino. Entre ellos el tanino condensado inhibio la actividad de la Hiasa al 100 % a una

concentración de 50 M, mientras que siete compuestos (kaempferol, silibina, apigenina, luteolina, morina, miricetina y quercetina) inhibieron entre 29 a 76 % a 250 M. Los autores explican que el doble enlace de la estructura del flavonoide entre la posición 2 y 3, el grupo ceto en la posición 4 fueron importantes para la inhibición. La introducción de grupos hidroxilos en posición 5,7 y 4' incrementaron la potencia inhibidora, mientras que la sustitución de glucósidos, revierte la inhibición de Hiasa de testículo de bovino.

2. Fármacos antiinflamatorios

Suleyman, Demircan, Karagoz, Oztasan y Suleman. (2004) examinaron los efectos antiinflamatorio y antihialuronidasa de inhibidores de COX-2 tales como el rofecoxib, celecoxib y nimesulida. La fase aguda y crónica fue evaluada utilizando la prueba edema de la pata inducida por carragenina y granuloma de bolitas de algodón, respectivamente. Los resultados revelaron que la indometacina, celecoxib, nimesulida reducían significativamente la permeabilidad vascular mediante la inhibición de la propiedad de propagación de los Hiasa, mientras que el efecto de rofecoxib fue insignificante.

Las drogas antiinflamatorias como los salicilatos, indometacina, fenoprofen, fenilbutazona, y dexametasona inhibieron Hiasa de testículo y de veneno de serpiente (Kakegawa, Matsumoto y Satoh, 1998; Mio y Stern, 2002). La indometacina resulto ser más potente que la dexametasona contra la HVS de *N. naja* (Girish et al., 2005).

3. Prueba de inhibidores contra el envejecimiento y en otras funciones biológicas

La radiación solar tiene un efecto negativo en la salud de la piel ya que implica la generación de las ERO. Las ERO inducen la angiogénesis, promoviendo la generación de nuevos vasos sanguíneos (Ushio y

Nakamura, 2008). Los vasos sanguíneos disminuyen en la piel humana dañada por los rayos UV, esta lesión produce cambios degenerativos marcados del tejido conectivo, con degradación de las fibras elásticas, las fibras de colágeno y el ácido hialurónico. (Fayad, Morin y Nehmé, 2017)

Bravo et al. (2016) estudiaron las propiedades antioxidantes y el efecto de enzimas relacionadas con la piel (colagenasa, elastasa y Hiasa) de los extractos metanólicos de frutas. Establecieron correlación entre el contenido de polifenoles y la inhibición de las enzimas. Concluyeron que las frutas inmaduras presentaban mayor capacidad antioxidante y actividad inhibitoria enzimática, sugieren que el tiempo de cosecha debería ser considerado a la hora de desarrollar compuestos bioactivos. Las especies frutales que contienen compuestos fenólicos ejercen efecto inhibitorio sobre las enzimas relacionadas al envejecimiento de la piel, los cuales pueden ser adecuados su uso en productos cosméticos antienvjecimiento.

Sahasrabudhe y Deodhar (2010) prepararon extracto metanólico de la cáscara de frutos secos de *Garcinia indica*, de este extracto se obtuvo dos fracciones. El extracto de acetato de etilo a 25 ug/mL produjo 83.33 %, mientras que, el extracto acuoso no produjo inhibición Hiasa, sugirieron que los polifenoles y flavonoides pueden ser usados como potentes antioxidantes en formulaciones antienvjecimiento y que pueden ser usados por ser menos tóxico a los fibroblastos dérmicos.

Li, Taylor, Kelly y Jedrzejjas, (2001) determinaron que la vitamina C es un potente inhibidor de Hiasa de *S. pneumoniae*, que la Hiasa de mamíferos, con valor de IC₅₀ de 6 mM y 32 mM respectivamente. Por otro lado, Hofinger *et al.*, (2007) evidenciaron que el tridecanoato de ácido L-ascórbico era el más efectivo inhibidor Hiasa con un IC₅₀ de 50 M comparable al ácido glicirrónico usado como inhibidor de referencia con un IC₅₀ de 26 M. Dedujeron que la asociación de una pequeña molécula hidrófila como la vitamina C y un residuo lipófilo (porción

hexadecanoico) parece ser una estrategia apropiada para actuar como inhibidor. Concluyeron que los derivados de vitamina C pueden servir como potente inhibidor de Hiasa.

Ihara et al. (2004) aumentaron la actividad inhibitoria Hiasa de la catequina monomérica al conjugarlo con un fragmento de poli (ϵ -lisina) denominado catequina conjugada (CACO) y al compararlo con la procianidina (catequina oligomérica), evidenciaron que la inhibición Hiasa seguía este orden: catequina conjugada > catequina oligomérica > catequina monomérica. La CACO puede tener propiedades terapéuticas en la prevención de diversas enfermedades relacionadas con la Hiasa.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

Descriptivo interpretativo y observacional.

3.2. Materiales

Material Biológico

Frutos de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius, conocido localmente como “uvilla” o “uvilla amazónica”

Recolección de la muestra

La muestra fue recolectada de la comunidad El Infierno ubicado a 20 Km de la ciudad de Puerto Maldonado, ubicado en el departamento de Madre de Dios, durante el mes de enero. Su ubicación geográfica es: Pendiente de 7°, con las coordenadas geográficas 12°56'17.02" Latitud Sur y 69°16'19.99" Longitud Oeste a 219 msnm).

Los frutos en racimos fueron conservados en refrigeración en envase de plástico y transportados hacia Lima por vía aérea.

Acondicionamiento de la muestra

En el laboratorio, las frutas fueron seleccionadas y lavadas con agua destilada y luego desinfectadas con hipoclorito de sodio 50 ppm durante 20 minutos. Posteriormente, enjuagadas dos veces con agua bidestilada y secadas con papel absorbente y almacenadas en congelación hasta su procesamiento.

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica fue realizada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM. La posición taxonómica fue hecha según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

3.3. Métodos

3.3.1. Análisis químico proximal de la fruta *Pourouma cecropiifolia*

La cáscara con la pulpa fue analizada según el método de la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) 1990.2001. Para cada análisis realizado se cita el “número de procedimiento” (NP) de la AOAC

Humedad: Se analizó usando estufa (NP. 930.15)

Proteína: Se analizó usando el método de Kjeldahl, midiendo la cantidad de nitrógeno que contiene la muestra (NP. 976.05)

Extracto etéreo: La muestra fue molida y se extrajo con éter etílico. La cantidad de grasa representa el aceite extraído con éter (NP. 954.02)

Fibra cruda: El cálculo se realizó obteniendo la diferencia entre el peso del residuo insoluble en ácido y en álcali con la cantidad de cenizas insolubles (NP. 962.09)

Cenizas: Se realizó por incineración a 550 °C en una mufla hasta la oxidación completa del material orgánico. (NP. 942.05)

Extracto no nitrogenado: Se determinó por diferencia, el peso de la muestra menos la suma de la humedad, grasa, proteína, fibra cruda y ceniza.

Las pruebas se realizaron por duplicado. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria.

3.3.2. Análisis de minerales en la fruta de *Pourouma cecropiifolia*

La determinación de zinc y cobre se realizó en la fruta de *P. cecropiifolia* aplicando el método descrito por Standard Methods 3111 Metals by Flame Atomic Absorption Spectrometry, 2005.

Se pesó 20 g de muestra y, después de llevar a sequedad, se calcinó a una temperatura de 550 °C. Seguidamente se hizo una digestión ácida con HNO₃ (cc)/4 mL a 200 °C y se llevó hasta sequedad, el residuo se diluyó con agua en una fiola de 50 mL. Posteriormente se realizaron lecturas de la muestra en el equipo de absorción atómica. Los análisis fueron realizados en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos de la Facultad de Química e Ingeniería Química.

3.3.3. Extracción de compuestos bioactivos

3.3.3.1. Separación y maceración de la cáscara con la pulpa

Para obtener el extracto de los frutos, se aplicó el método descrito por López, Dettmann, Nimalaratne y Schieber (2010) con algunas variaciones. Los frutos fueron seleccionados y pesados, seguidamente, se separó la cáscara con la pulpa de la semilla con un cuchillo de acero inoxidable. Se pesaron 170 g. los cuales fueron macerados en una solución fría de 350 mL de metanol 80 % en ácido fórmico 0.1 %. (solvente A) luego, fue mezclado y triturado en una licuadora (400 Watts) durante un minuto. Después, fue almacenado en refrigeración durante 70 horas, seguidamente fue filtrado sobre una tela fina y el residuo fue tratado por segunda vez con 170 mL de solvente A, se procesó por 40 s. Luego, se dejó en reposo por 6 horas y posteriormente se filtró. Los filtrados se juntaron y se centrifugaron a 7000 rpm durante 25 minutos en frío, obteniendo sobrenadantes. Este mismo proceso se repitió dos veces más con otra muestra. Ver figura 3

3.3.3.2. Obtención y rendimiento del extracto.

El sobrenadante fue sometido a rotavapor a 40 °C y 540 rpm de rotación. Lo obtenido fue liofilizado y, posteriormente, almacenado en un frasco ámbar. Este producto fue denominado extracto de uvilla (EU) de consistencia ligeramente viscosa, de color rojizo claro, soluble en agua y en solventes polares. El EU fue almacenada a – 20 °C en frascos de vidrio de color ámbar, cubierto con papel de aluminio.

El rendimiento del extracto se definió como la cantidad del extracto obtenido, en base a 100 g. de cáscara y pulpa. También, se determinó la humedad del EU en una balanza de humedad. La humedad del extracto fue determinada en una termobalanza MB45-OHAUS regulando el tiempo a 30 minutos, hasta obtener peso constante.

3.3.4. *Análisis fitoquímico del extracto de uvilla*

El análisis fitoquímico preliminar del EU se llevó a cabo para detectar carbohidratos, azúcares reductores, alcaloides, proteínas, aminoácidos, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos y esteroides. Para, ello se siguió lo descrito por Iqbal, Abu y Lim (2015), Chaitanya *et al.*, (2015), Lock de Ugaz (1994).

Procedimiento

Se preparó tres soluciones: Solución I compuesta por EU al 5 % en metanol 80 %; solución II constituida por EU al 5 % en agua y solución III compuesta por 10% de EU en cloroformo. Se utilizaron para las siguientes pruebas:

Con la solución I

Reacción con cloruro férrico. A 1 mL de la solución, se dejó caer 5 gotas de cloruro férrico al 1 % y se agitó la mezcla. La aparición de un color azul oscuro o verde marrón indica taninos y compuestos fenólicos en la muestra.

Reacción de Shinoda. Se adicionó 0.10 g de limaduras de magnesio sobre 1 mL de la solución y luego dos gotas de ácido clorhídrico concentrado. El desprendimiento de gas de hidrógeno y cambio de color de la mezcla a una coloración rojiza, amarilla o naranja, es característico de la presencia de flavonoides.

Reacción de Bertrand (Ácido silico-túngstico) Se adicionó 10 gotas de la muestra se evaporó el solvente en baño maría (BM), luego se adicionó cinco gotas de HCl 10 % más tres gotas de Bertrand. Un precipitado blanco muestra la presencia de alcaloides.

Reacción de Dragendorff (Yoduro de bismuto y potasio) Se inició evaporando en BM el solvente de 2 mL de la solución, luego se adicionó cinco gotas de HCl 10 % más cuatro gotas del reactivo, se agitó y se dejó reposar por 4 minutos. Un precipitado de coloración rojiza o naranja, indicó la presencia de alcaloides.

Reacción de Mayer (Yoduro mercurio y potasio). Se midió 2 mL de solución de EU y se evapora el solvente en BM, luego se agregó cinco gotas de HCl 10 % más cuatro gotas del reactivo, se agitó y se dejó en reposo por 4 a 5 minutos. Un precipitado blanco, evidenció reacción positiva para alcaloides.

Reacción de Sonnenschein (ácido fosfomolibdico) A 2 mL de la solución de EU se evaporó el solvente en BM, después se añadió cinco gotas de HCl 10 % más cuatro gotas del reactivo. La formación de precipitado amarillo verdoso fue positivo para alcaloides.

Reacción de Rosenheim (Solución yodo yodurada) A diez gotas de la muestra más tres gotas del reactivo de Rosenheim. La presencia de una coloración rojo oscura indica la presencia de antocianinas.

Reacción de Vainillina sulfúrica A 1 ml de la solución se le añadió cinco gotas de vainillina alcohólica y luego ocho gotas de ácido sulfúrico

concentrado. La presencia de un anillo rojo pardo en la interface evidenció a los terpenos.

Con la solución II

Reacción de Molish. A 2 mL de la solución se le adicionó dos gotas del reactivo de Molish, posteriormente, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo de color violeta denotó la presencia de carbohidratos.

Reacción de Fehling. A 3 mL de la solución se le adicionó 0.5 mL de la solución de Fehling A y 0.5 mL de la solución Fehling B y se llevó a baño de agua hirviente. La formación de precipitado de color rojo ladrillo indicó la presencia de azúcares reductores.

Reacción de Benedict. A 3 mL de la solución se añadió 1 mL del reactivo de Benedict y se llevó a baño de agua hirviente. La formación de un precipitado rojo anaranjado confirma la presencia de azúcares reductores.

Reacción de Trommer. Se midió 2 mL de la solución y se trató con el reactivo formado de 0.5 mL de hidróxido de sodio y 5 gotas de sulfato cúprico al 1%, luego se colocó en baño de agua hirviente. La formación de un precipitado rojo anaranjado indica la presencia de azúcares reductores.

Reacción de Ninhidrina. A 2 mL de la solución se dejó caer 2 mL del reactivo de Ninhidrina se colocó en un baño de agua caliente, la mezcla cambia a un color púrpura que mostró la presencia de aminoácidos.

Prueba de Taninos o Reacción con gelatina/ NaCl (1 g de gelatina más 10% de solución de NaCl) A 1 mL de la solución se añadió dos gotas del reactivo gelatina/NaCl. Se observó precipitado blanco que indicó la presencia de taninos.

Prueba de Espuma: Esta prueba se llevó a cabo para detectar la presencia de saponinas. Se colocó en un tubo de ensayo 0.5 g de EU y se añadió 10 mL de agua bidestilada, luego se agitó durante dos minutos, después se observa la formación de espuma (esta debe ser estable por lo menos 30 minutos para poder establecer la presencia de saponina).

Solución III

Reacción de Liberman Burchard 0.1 g del EU fue disuelto en 1 ml de cloroformo, seguidamente se mezcló con seis gotas de anhídrido acético y luego se añadió seis gotas de H₂SO₄ concentrado en zona. La formación de un anillo de color marrón rojizo distinguió la presencia de triterpenoides.

Los resultados fueron calificados como + presencia escasa, ++ presencia relativa, +++ presencia abundante y – no detectado.

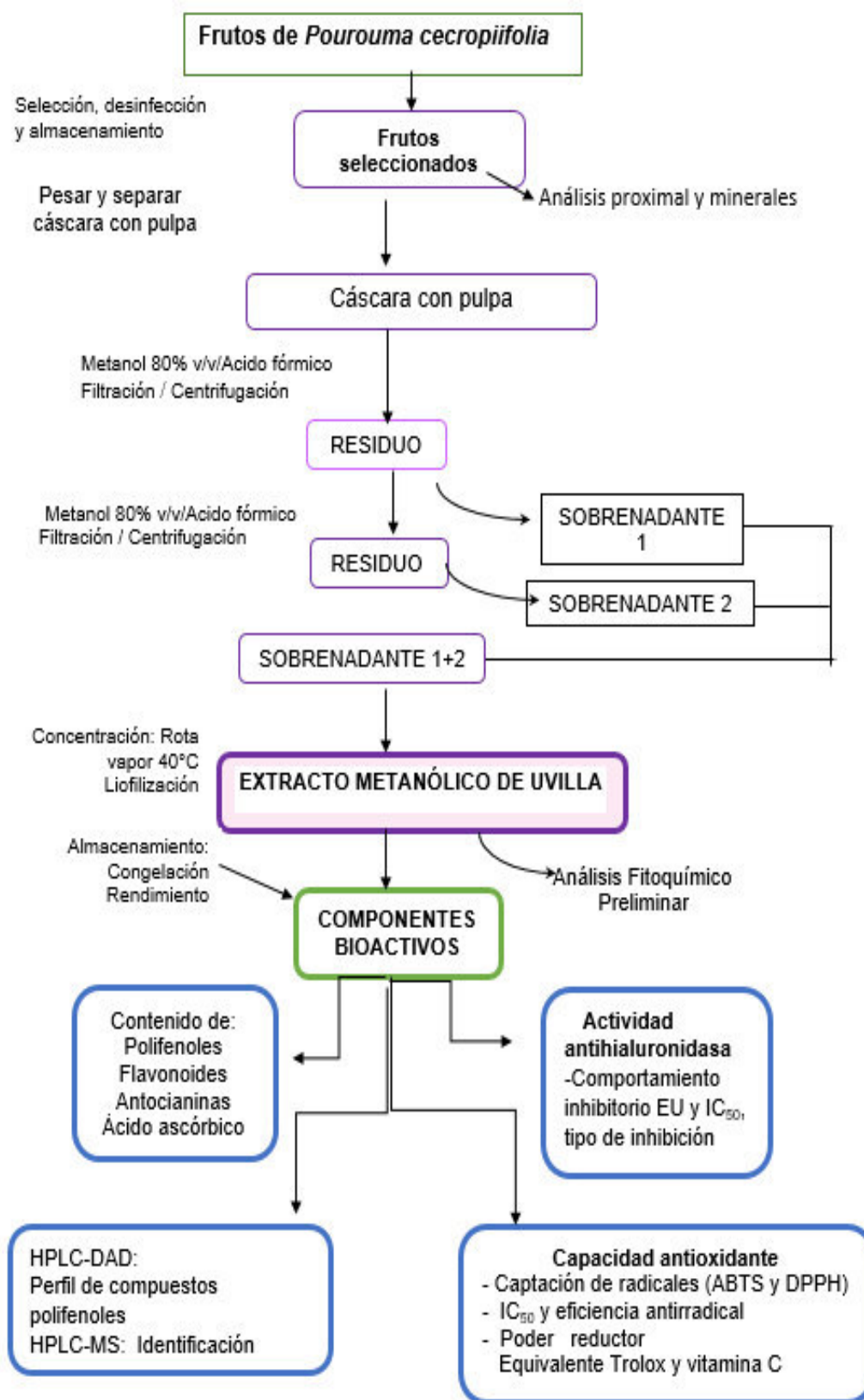


Figura 4. Diseño experimental de la investigación de EU de *P. cecropiifolia* C. Martius.

Fuente: Elaboración propia

3.3.5. Cuantificación de compuestos bioactivos

El EU constituyó la unidad experimental para la cuantificación de compuestos bioactivos.

3.3.5.1. Contenido de polifenoles totales (CPT)

El análisis se efectuó de acuerdo con la técnica descrita por Singleton *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. El reactivo de Folin Ciocalteu utilizado para determinar el CPT reacciona con los compuestos fenólicos, oxidando a los fenolatos resultando un complejo azul de tungsteno-molibdato.

Se pesó 80.7 mg de EU y se disolvió con 2.4 mL de agua bidestilada, de esta solución se midió 0.010 mL, luego se añadió 0.090 mL de agua bidestilada y 150 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:3); después de 5 minutos en reposo se adicionó 150 μ L de carbonato de sodio al 20 % y se completó con agua hasta 1 mL. Después de 30 minutos de reacción en la oscuridad, se leyó al espectrofotómetro a 760 nm. Se hizo un blanco de muestra y un blanco de reactivo. La prueba se realizó seis veces.

Los estándares utilizados fueron el ácido gálico (AG) y el ácido clorogénico (AClo) a concentraciones de 1.0, 3.0, 5.0 y 7.5 μ g/mL; y 2.0; 4.0, 6.0, 1.0, 12.0, 14.0 y 16.0 μ g/mL respectivamente. Se construyeron las curvas de calibración y sus ecuaciones lineales sirvieron para calcular el contenido de polifenoles.

3.3.5.2. Contenido de flavonoides totales (CFT)

El contenido de flavonoides totales fue determinado espectrofotométricamente, mediante la reacción con el nitrito de sodio y el tricloruro de aluminio, desarrollándose un complejo aluminio-

flavonoide de color rosado, que fue leído a 510 nm. Según lo describe Abu Bakar et al. (2009).

El CFT fue evaluado usando dos estándares de referencia catequina y quercetina

a. CFT como catequina

Se pesó 12.10 mg del EU y se disolvió en 1.10 mL en una solución metanólica al 80 %. A 100 µl de esta dilución se le añadió 60 µl de nitrito de sodio al 5%. Después de 5 minutos se midió 60 µL de tricloruro de aluminio hexahidratado 10% y luego de 5 minutos de reposo se agregó 800 µL de NaOH 1 M. Finalmente, la mezcla fue diluida hasta 2 mL con agua bidestilada y transcurrido 5 minutos se leyó la absorbancia a 510 nm. Se prepararon dos blancos, el de reactivo y el de muestra. Se elaboró la curva de calibración con catequina (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 y 30.0 µg/mL).

b. CFT como quercetina

Se preparó una disolución a 1.4 mg/mL de EU en metanol 80 % en agua. Se midió 100 µL de la disolución. Luego se siguió el mismo procedimiento para el caso de catequina. Se elaboró la curva de calibración con quercetina (30.0, 60.0, 90.0, 120.0 y 150.0 µg/mL).

La ecuación de la recta proveniente del procedimiento mencionado en a y b fue utilizada para la determinar el CFT en el EU

3.3.5.3. Cuantificación de antocianinas monoméricas (CAM)

Un método práctico para cuantificar las antocianinas es el método diferencial de pH que se fundamenta en las transformaciones estructurales del cromóforo de la antocianina como una función del pH, el cual puede ser medido usando espectrofotometría óptica a través de un procedimiento fácil y rápido para la cuantificación de antocianinas monoméricas (Giusti y Wrolstad, 2001).

Las antocianinas suelen asociarse con el color de los frutos, siendo particularmente responsables de los colores rosado, rojo, azul y morado en la planta (Ali, Fry y Abu. 2013).

Para estimar el contenido total de antocianinas monoméricas se siguió el método de Giusti y Wrolstad (2001). Primero se preparó la solución de cloruro de potasio 0.4 M y se ajustó a pH 1.0 con HCl (Solución A) y otra solución de acetato de sodio 0.025 M se ajustó a pH 4.5 con ácido acético (Solución B)

Antes de la CAM, previamente se seleccionaron las longitudes de onda y el tiempo en la cual se registra la más alta absorbancia para tomarlo como punto de referencia y aplicarlo en el presente estudio. A continuación, se describe los análisis previos.

a. Determinación de longitud de onda.

Procedimiento

En un matraz aforado de 5 mL se colocó 32.4 mg de EU y se disolvió con la solución A y en otro matraz de 5 mL se colocó igual peso de EU y se disolvió con la solución B y después de quince minutos se leyeron en el espectrofotómetro.

El método requiere dos longitudes de onda para aplicarlo al estudio. Una longitud de onda fue elegida entre 510 ± 20 nm (longitud de onda menor (Me) y la otra entre 700 ± 20 nm. (longitud de onda mayor (Ma) se registraron las absorbancias (Ab) de acuerdo con el siguiente cuadro frente a un blanco con agua destilada.

Con la Solución A pH=1

Long onda nm	490	500	510	520	530	680	690	700	710	720
Ab										

Con la solución B pH=4.5

Long onda nm	490	500	510	520	530	680	690	700	710	720
Ab										

b. Determinación del tiempo.

Luego de seleccionar la longitud de onda M_e y M_a , se siguió el procedimiento del ítem 3.3.5.3, registrando las absorbancias entre 10 a 30 minutos en un intervalo de 5 minutos. Las pruebas se realizaron por triplicado.

A. Con la solución A, pH= 1

	Tiempo (min)				
Long. Onda (nm)	10	15	20	25	30
Mayor					
Menor					

B. Con la solución B, pH=4.5

	Tiempo (min)				
Long. Onda (nm)	10	15	20	25	30
Mayor					
Menor					

3. Cuantificación de antocianinas del EU

Una vez seleccionado las longitudes de onda y el tiempo de acuerdo al ítem a y b se procedió a pesar 24.40, 32.40, 32.40, 43.70 y 48.70 mg. de EU, aplicando las condiciones antes mencionadas. Las absorbancias de las cinco cantidades de EU, tanto a pH 1 y a pH 4.5, se utilizaron para determinar la diferencia de absorbancia (ΔA) aplicando la ecuación 1.

Ecuación 1

$$\Delta A = (A_{Ma} - A_{Me})_{pH 1.0} - (A_{Ma} - A_{Me})_{pH 4.5}$$

ΔA = Diferencia de absorbancia

A_{Ma} = Absorbancia de la long. de onda mayor

A_{Me} = Absorbancia de la long. de onda menor

La ΔA es un factor que se usó para determinar la concentración de antocianinas monoméricas (CAM) mediante la ecuación 2

Ecuación 2

$$CAM = \frac{(\Delta A \times PM)}{\epsilon \times L}$$

Donde

ϵ = Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido ($26,900 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

PM = Peso molecular de cianidina-3-glucósido 449.2 g/mol

L = Longitud del paso de la luz de la celda.

Se realizó cinco pruebas y los resultados fueron la media \pm desviación estándar.

La cianidina-3-glucósido es la antocianina que predomina en *P. cecropiifolia*. (Lopes et al., 2010) por ello se usará su PM y su absortividad molar (Giusti y Wrolstad, 2001).

3.3.5.4. Determinación de ácido ascórbico (AA)

La cuantificación de ácido ascórbico en el EU se llevo a cabo según el método descrito por Barros, Ferreira, Queiros, Ferreira y Baptista (2007), con ligeras modificaciones.

A. Reactivos

1. Ácido oxálico 0.4%: (AOX)
2. Solución de extracto de uvilla (Sol. U): Se pesó 86.4 mg de EU y se disolvió en 1 mL de ácido oxálico 0.4 % y se agitó a 250 rpm durante 15 minutos a 20 °C.
3. 2,6-diclorofenolindofenol 0.005 % (DCI): Antes de usar, se diluyó con agua bidestilada hasta alcanzar 0.85 a 0.90 de absorbancia a 520 nm, el que fue usado para las siguientes pruebas.
4. Buffer acetato de sodio 0.2 M y pH= 4. Todos los reactivos fueron preparados en el día.

B. Procedimiento

Se dispuso de los siguientes tubos según el cuadro 1.

Cuadro 1. Cuantificación de ácido ascórbico en EU

Tubos Reactivos	Blanco	Tubo Sol.U	Tubo 1	Tubo 2
mL Sol U	--	0.1	-	0.1
mL AOX	0.1		0.1	
mL Buffer acetato	0.1	0.1	0.1	0.1
mL DCI	--	0.8	0.8	
mL H ₂ O	0.8			0.8
Agitación por 20 seg. Oscuridad por 1 minuto. Se midió absorbancia a 520 nm				
Abs	--	Abu	AbDCI	--

El tubo blanco sirvió para calibrar a cero la absorbancia del espectrofotómetro y el tubo 2 se usó para ajustar la absorbancia del tubo U.

Se utilizó la siguiente relación para obtener la absorbancia corregida de EU denominándola **Ab_{Uc}**

$$\mathbf{Ab_{Uc} = (Ab_{DCI}) - (Ab_U)}$$

Ab_{Uc} : Absorbancia del EU corregida

Ab_{DCI} : Absorbancia de DCI

Ab_U : Absorbancia del EU

Se obtuvieron cinco valores de **Ab_{Uc}** y cada uno de ellos fue sustituido en la ecuación de la recta de la curva de calibración de AA para determinar la concentración de ácido ascórbico

Curva de calibración de ácido ascórbico

Solución stock de ácido ascórbico: Se pesó 5.0 mg de ácido ascórbico y se disolvió hasta 10 mL con AOX .

A partir de ese stock se prepararon concentraciones de 40, 60, 80, 10, 120, 150 y 180 µg/mL disueltas en AOX, denominada Sol. AA.

El procedimiento se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Curva de calibración del ácido ascórbico

Tubos Reactivos	Blanco	Tubo Sol.AA	Tubo 1	Tubo 2
mL AA	--	0.1	-	0.1
mL AOX	0.1		0.1	-
mL Buffer acetato 0.2 M pH 4	0.1	0.1	0.1	0.1
mL DCI		0.8	0.8	-
mL H ₂ O	0.8			0.8
Agitación por 20 s en oscuridad por un minuto. Se midió la absorbancia a 520 nm				
Absorbancias	--	Ab _{AA}	Ab _{DCI}	-----

De la solución AA se prepararon siete tubos, cada uno contenía 0.1 ml de 40, 60, 80, 100, 120, 150 y 180 µg/mL

Se utilizó la siguiente relación para obtener la absorbancia corregida de cada solución de ácido ascórbico denominándola Ab_{AAC}

$$Ab_{AAC} = (Ab_{DCI}) - (Ab_{AA})$$

Ab_{Uc} : Absorbancia del ácido ascórbico corregido

Ab_{DCI} : Absorbancia de DCI

Ab_U : Absorbancia del ácido ascórbico

Se elaboró un gráfico curva de calibración con siete absorbancias (Ab_{AAC}) y la ecuación de la recta sirvió para determinar la concentración de AA en el EU. Se trabajó con cinco muestras de EU y los resultados se expresaron como las medias ± desviación estándar.

Ensayo con la muestra farmacéutica. Validación

Se utilizó una tableta de la casa comercial Bayer que contenía 1 g de L-Ácido ascórbico contenido en 4.5 g de peso de la tableta (descripción

del rotulado). Se pesó 60 mg de la tableta y se disolvió con 10 mL de AOX y luego, se diluyó hasta alcanzar 24 µg/ mL, utilizando el AOX. Posteriormente se procedió aplicando el cuadro 2.

3.3.6. Evaluación de la Capacidad Antioxidante

3.3.6.1. Poder reductor

El poder reductor se fundamenta en la capacidad de algunos compuestos fenólicos de causar la reducción de Fe^{3+} /complejo ferricianuro a la forma ferrosa. Por lo tanto, al medir la formación de este complejo, llamado Azul de Prusia a 700 nm puede monitorearse la concentración de Fe^{2+} (Ferreira, Baptista, Vilas-Boas y Barros. 2007).

La prueba del poder reductor del EU fue determinada por el método propuesto por Oyaizu (1986) con ligeras modificaciones.

A. Reactivos

1. Solución stock de extracto uvilla: 7.88 mg/mL
2. Buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 6.6.
3. Ferricianuro de potasio 1 %
4. Ácido tricloroacético 10%
5. Cloruro férrico 0.1 %

(En el cuadro 3 se indican los reactivos con el correspondiente número)

B. Procedimiento

Se preparó diez tubos conteniendo la solución acuosa de EU. La reacción se leyó a cabo a concentraciones entre 60 a 480 µg/mL de acuerdo con el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Poder Reductor del EU

Tubos Reactivos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(mL) 1	0.06	0.08	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28	0.32	0.40	0.48
(mL) Agua bidestilada	0.44	0.42	0.38	0.34	0.30	0.26	0.22	0.18	0.10	0.02
(mL) 2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
(mL) 3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
(mL) 4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Se agitó por 30 s y centrifugó a 2500 rpm. Luego de cada tubo (1-10) se retiró 1 mL. que contiene la mezcla A										

En otros diez tubos se colocaron lo siguiente:

(mL) Mezcla A	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
(mL) Agua bidestilada	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
(mL) 5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
$\mu\text{g/mL}$	60	80	120	160	200	240	280	320	400	480

Después de 45 minutos se registraron las absorbancias a 700 nm. Se hizo un control positivo con 0.25, 0.50, 1.00, 5.00 y 10.00 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico. El ensayo fue llevado a cabo por triplicado. Se expresó como IC_{50} en μg de EU/mL, tal como lo expresan los investigadores Lung y Chang. (2011), Barreira, Ferreira, Oliveira y Pereira. (2008)

El IC_{50} representa la concentración que proporciona 0.5 de absorbancia. (Belyagoubi, B, Belyagoubi, L, Bechlaghem, Ghembaza y Atik, 2017). El IC_{50} fue calculado por interpolación de acuerdo con la ecuación proporcionado por Barreira *et al.* (2008).

3.3.6.2. Capacidad Antioxidante: Método capacidad captación del radical ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* se realizó usando ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) como sal de amonio denominado ABTS (PM = 548.68 g/mol), según el informe de Re *et al.*, (1999) y Palomino, Garcia, Gil, y Durango (2009) con ligeras modificaciones.

Primero se generó el radical catión ABTS, para ello se preparó ABTS a 7 mM, luego se hizo reaccionar con persulfato de potasio a 2.45 mM después de mezclarse permaneció en la oscuridad a temperatura ambiente durante dieciseis horas.

El ensayo con el radical catiónico ABTS, se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical ABTS es un cromóforo que absorbe a 734 nm y que se generó mediante oxidación del ABTS con el persulfato de potasio (Rojano, Gaviria, Gil, Sáez y Schinella, 2008)

A. Procedimiento

Para el presente ensayo se mezcló 38.40 mg de ABTS y se disolvió con agua bidestilada, seguidamente se añadió 6.62 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y se completó con agua hasta 10 mL. Luego se siguió las condiciones antes mencionadas. Esta mezcla se diluyó con agua bidestilada hasta la absorbancia de 0.7 ± 0.05 a 734 nm.

Se preparó soluciones de EU en metanol 80%, cuyas concentraciones fueron 2.1, 4.2, 6.3, 8.4 y 10.5 mg/mL y de cada una se midió 20 μ L. Luego se mezcló con 980 μ L del reactivo ABTS⁺, seguidamente permaneció en la oscuridad por siete minutos. La absorbancia fue leída a 734 nm. Las concentraciones de lectura de las soluciones fueron 42, 84, 126, 168 y 210 μ g/mL. También, se prepararon tubo blanco con 20 μ L de EU disuelto en metanol 80 %, más 980 mL de agua bidestilada, que sirvió para ajustar la absorbancia de la solución del EU; y un tubo control con 980 μ L del reactivo ABTS⁺ más 20 μ L de solvente metanol 80 %.

B. *Sustancias de referencia con capacidad antioxidante:*

Se utilizaron las siguientes sustancias:

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico)
1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 μ g/mL (disuelto en etanol 50 %) (Fernández De O et al. 2012)
- Ácido ascórbico de 1.4, 2.1, 2.8, 3.5, y 4.9 μ g/mL (disuelto en agua)
- Quercetina de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ g/mL (la solución stock fue disuelta en etanol y las diluciones en etanol 80 %)

Para llevar a cabo la reacción entre el ABTS⁺ y las sustancias de referencias se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

C. Formas y unidades de expresión de la capacidad antioxidante:

La capacidad antioxidante se expresó de tres maneras:

C.1. Porcentaje de captación del radical ABTS

El PC-ABTS⁺ se obtuvo aplicando la ecuación 3 (Fernández de O. et al, 2012).

Ecuación 3

$$\text{PC- ABTS} = \frac{(\text{Abc} - \text{AbU} - \text{Abst}) \times 100}{(\text{Abc})}$$

Donde:

- Abc = Absorbancia del tubo control
- AbU = Absorbancia del tubo de EU en solución, ó
- Abst = Absorbancia de referencia

C.2. Mediante el coeficiente de inhibición al 50 % (IC₅₀)

Para calcular los IC₅₀ del EU disuelto en metanol 80 % y de las sustancias de referencias se aplicó la ecuación de regresión del gráfico obtenido en base al porcentaje de captación del radical ABTS⁺ (PCR-ABTS⁺) vs concentración EU. Similar, procedimiento se hizo con las sustancias de referencias para calcular el IC₅₀ del trolox, de la vitamina C y quercetina, las cuales se expresaron como µg/mL

C.3. Mediante la capacidad antioxidante equivalente

1. Equivalente Trolox (CAET)
2. Equivalente a Vitamina C (CAEVC)

CAET se calculó aplicando la relación siguiente:

Ecuación 4

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ EU}}$$

Donde:

- IC_{50} trolox en $\mu\text{moles /L}$
- IC_{50} EU en mg /L
- TEAC $\mu\text{moles trolox /g de EU}$

(Márquez, Otero, Rojano y Osorio, 2014; Shimamura et al., 2014; Re et al., (1999)

CAEVC se determinó de manera similar al CAET

Las unidades de expresión fueron

1. CAET en $\mu\text{moles CAET /100 g de fruta fresca de uvilla}^*$
2. CAEVC en $\text{mg CAEVC /100 g de fruta fresca de uvilla}^*$

* Fruta fresca: cascáa y pulpa

CAET se define como la concentración de Trolox con la misma capacidad antioxidante que la concentración 1 mM del compuesto antioxidante bajo investigación (Belkheiri et al., 2010; Re et al., 1999)

CAEVC expresa la capacidad antioxidante de alimentos de manera comprensible y fácil de los radicales estables ABTS y DPPH, usado para medir la actividad antioxidante (Kim, Won, Joo y Yong, 2002).

3.3.6.3. Capacidad antioxidante: Método capacidad de captación del radical DPPH

El DPPH es usualmente usado como un reactivo para evaluar la actividad antioxidante captadora de radical libre. El método se basa en la reducción de una solución alcohólica de DPPH ante la presencia de un antioxidante donante de hidrógeno debido a la formación de un

compuesto no radical de DPPH-H en la reacción. El DPPH es un radical estable y acepta un electrón o radical de hidrógeno para dar una molécula diamagnética estable (Beyhan, Elmastas y Gedikli, 2010)

El estudio aplicó el método descrito por Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995; Mathew y Abraham. 2006). Se utilizó el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) el cual se reduce en presencia de antioxidantes, manifestándose un cambio de color en la solución. (Molina, Medina, González y Robles, 2010)

A. Procedimiento

Se preparó una solución metanólica stock del radical 0,1 Mm. Luego se diluyó con metanol hasta que la absorbancia estuviera entre 0.85 ± 0.90 , y leída a 517 nm Esta solución constituyó el reactivo DPPH para la prueba. La muestra EU fue disuelta con metanol 80%. Se trabajó con cinco concentraciones de EU (las concentraciones del EU de reacción a 1 mL fueron 42, 84, 126, 168, y 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada tubo con una concentración diferente se añadió 400 μL de esta solución y 800 μL del reactivo de DPPH (las concentraciones del EU de reacción a 1 mL fueron 42, 84, 126, 168, 210 y 252 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EU). Se agitó por 20 segundos y luego se dejó en reposo, a oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se monitoreó en el espectrofotómetro a 517 nm, cuyas lecturas fueron anotadas como AbU. Paralelamente, se preparó un tubo que contenía 0.8 mL de solución metanólica DPPH con 0.4 mL de metanol 80% cuya lectura fue la del tubo control, y otro tubo blanco muestra que sirvió para corregir las absorbancias de los tubos muestra.

B. Sustancias de referencia

Fueron disueltas como indica el ítem 3.3.6.2, sección B pero usando las siguientes concentraciones:

- Trolox 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 y 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Ácido ascórbico 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 3.2 y 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Quercetina 0.42, 0.83, 1.25, 1.67 y 2.50 $\mu\text{g/mL}$

Las formas y las unidades de expresión fueron hechas según el ítem 3.3.6.2 secciones C1, C2 y C3. Al respecto, Barreira *et al.* (2008), y Belscak, Komes, Horzic, Kovacevic y Karlovic., (2009) reportaron la capacidad antioxidante usando el radical DPPH como equivalente Trolox, mientras que, Kim et al. (2002) expresaron como equivalente al ácido ascórbico.

3.3.6.4. Comportamiento cinético: Eficiencia antirradical (EA)

La eficiencia antirradical (EA) fue propuesta por Sánchez-Moreno, Larrauri y Saura-Calixto. (1998a) el cual se calcula aplicando dos términos EC_{50} y T_{EC50} . También, se indica que es una forma de expresar la actividad antioxidante.

Cabe precisar que otro estudio lo calcula de manera diferente como lo efectuado por Petrovic et al. (2014) quienes obtienen el valor de EA mediante la inversa de IC_{50} ($1/IC_{50}$).

A continuación, se describen los términos EC_{50} y T_{EC50} utilizados para calcular EA.

1. Concentración eficiente: EC_{50}

El parámetro EC_{50} es denominado concentración eficiente o actividad antirradical. Es definido como la cantidad de antioxidante que se necesita para decrecer la concentración inicial del radical DPPH en un 50% (Villaño et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 1998; Brand-Willians, Cuvelier y Berset, 1995).

La EC_{50} se calcula a partir de la ecuación de regresión lineal del gráfico de porcentaje remanente de DPPH versus concentración de

la muestra o del antioxidante (Villaño et al., 2007; Padilla et al., 2008; y Sánchez-Moreno et al., 1998a).

En ese sentido, en el presente estudio, el EC_{50} fue determinado según Villaño et al. (2007). Primero, se obtuvo el porcentaje remanente del radical DPPH, al dividir la absorbancia del radical DPPH en el estado estacionario entre la absorbancia del radical DPPH en el tiempo inicial (ecuación 5)

2. Tiempo para alcanzar el estado estacionario: T_{EC50}

El T_{EC50} se expresa en minutos y corresponde al tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario o es el tiempo de reacción a la que se desarrolla la concentración eficiente (EC_{50}). Se determina gráficamente y permite conocer el comportamiento cinético del EU con el radical DPPH (Villaño et al. 2007).

Se procedió a determinar los valores de T_{EC50} y EC_{50} . Luego se calculó el valor de EA.

A. Determinación de T_{EC50} y EC_{50}

A1. Procedimiento para determinar EC_{50}

1. La prueba se inicia midiendo el tubo control (solución del radical DPPH más metanol al 80 %) el cual correspondió a la absorbancia inicial (Ab_{s0}). Se realizó por duplicado
2. En una celda de cuarzo se midió 800 mL de DPPH en metanol y luego se adicionó 400 μ L de EU disuelto en metanol 80 %, se hizo cinco concentraciones 42, 84, 126, 168, 210 μ g/ mL, se mezcló y se realizó lecturas a 517 nm.

3. Se registraron las absorbancias cada minuto hasta que estas sean constantes, denominándolas **Abs_f**, es decir, hasta que alcance el estado estacionario (EE) o estado estable de cada concentración.
4. Luego, las absorbancias fueron analizadas y se eligieron valores muy cercanos o con un mínimo de diferencia y se seleccionaron tres tiempos (T1, T2 y T3) de un tramo de cinco minutos. Estas absorbancias fueron las **Abs_f** y organizadas según el cuadro 4. Los valores de **Abs₀** fueron las absorbancias del tubo control.

Cuadro 4. **Absorbancias en el estado estacionario: Abs_f**

EU µg/mL	Tiempo					
	T1		T2		T3	
42						
84						
126						
168						
210						

T1= 24 minutos T2 =26 minutos T3= 28 minutos

5. Conociendo los valores de **Abs₀** y **Abs_f** se procedió a determinar el porcentaje remanente DPPH, aplicando la ecuación 5.

Ecuación 5

$$\% \text{ Remanente DPPH} = \frac{[Abs_f]}{[Abs_0]} \times 100$$

Donde

Abso = Absorbancia a 517 nm en tiempo cero.

Absf = Absorbancias del radical a 517 nm en el estado estacionario.

Los valores de porcentaje remanente de DPPH mediante la ecuación 5, se registraron en el cuadro 5.

Cuadro 5. **Porcentaje remanente de DPPH de tres tiempos en el EE**

EU en metanol 80 % µg/mL	% remanente de DPPH		% remanente de DPPH		% remanente de DPPH	
	T1		T3		T5	
42						
84						
126						
168						
210						

EE= Estado estacionario. Se registró por duplicado el cuadro 5

6. Se graficó los porcentajes remanente de DPPH versus la concentración del EU, resultando dos graficos de T1, de T2 y de T3. La ecuación lineal del gráfico sirvió para calcular el EC_{50} (µg/mL)

Los parámetros EC_{50} y $T_{EC_{50}}$ fueron reportados como la media y su desviación estándar.

A2. Procedimiento para determinar de $T_{EC_{50}}$

Se obtuvieron los datos del procedimiento A1. El $T_{EC_{50}}$ (min) se determina en el estado estacionario. Se evaluó cinco concentraciones de EU a 42, 84, 126, 168, 210 µg/mL. Se leyeron de menor a mayor concentración leyendo las absorbancias a 517 nm. hasta alcanzar el estado estacionario. Se hizo un gráfico y se trazó los valores de las absorbancias con su respectivo tiempo de reacción en minutos, y en este gráfico se determinó el $T_{EC_{50}}$.

C. Determinación de la Eficiencia antirradical (EA)

Para calcular la eficiencia antirradical se aplicó la ecuación 6

Ecuación 6

$$EA \text{ (mL/min} \times \mu\text{g)} = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}}$$

3.3.7. Análisis cromatográfico del extracto de uvilla

3.3.7.1. Análisis preliminar de compuestos fenólicos del EU por HPLC-DAD.

El análisis se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. El análisis consistió en determinar el perfil de compuestos fenólicos del EU por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se aplicó la técnica de Oh, Y. S. et al. (2008) y Kerio, Wachira, Wanyoko, Rotich. (2012), con algunas modificaciones.

A. Procedimiento

A1. Preparación de la muestra.

El EU de *Pourouma cecropiifolia* fue disuelto en agua preparando una concentración de 13.15 mg/mL.

A2. Instrumentación

El EU fue analizado en un equipo de HPLC Agilent 1200 acoplado a un detector de arreglos de diodos (DAD) y la separación cromatográfica se desarrolló con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250 mm, con tamaño de partícula 5 μm y la pre-columna Eclipse XDB-C18 6.6 x 12.5 mm x 5 μm . La separación se llevó a cabo a 40 °C.

A3. Método

El volumen de inyección fue de 20 µL, con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min por 30 min. Además, se utilizó dos sistemas de solventes constituidos por el solvente A: Ácido fórmico al 1 % y el solvente B: Acetonitrilo con 1 % de Ácido fórmico y se aplicó la gradiente de elución: 0 % de B a 0 min; 100 % de B a los 30 min. El DAD registró longitudes máximas a 254, 370 y 520 nm.

A4. Identificación de los componentes

La identificación de los componentes fenólicos principales del EU fue realizada a través de los gráficos de las curvas espectrales UV y visible, los cromatogramas de HPLC y los tiempos de retención de los picos.

Estos cromatogramas de HPLC fueron comparados con espectros y curvas cromatográficas obtenidas en iguales condiciones con el equipo de HPLC-DAD Agilent 1200. Además, se consideró los resultados de las investigaciones de Oh, Y. S. et al. (2008); Kerio L.C et al. (2012) y Giomaro et al. (2014), para identificar los polifenoles.

3.3.7.2 *Análisis cromatográfico de compuestos fenólicos del EU por HPLC-DAD-EM/EM*

La espectrometría de masa proporciona las masas del ión molecular y de los principales fragmentos del compuesto analizado cada sustancia presenta una masa determinada y unas fragmentaciones dependientes de su estructura asimilables a una huella dactilar del compuesto; por tanto, si los espectros son obtenidos bajo condiciones determinadas, las “huellas dactilares” pueden ser comparadas y ello permite la identificación de sustancias por comparación de su espectro de masas con aquellos contenidos en banco de datos (Rebolo Lopez, 2006).

Se aplicó la espectrometría de masas en tandem, lo que quiere decir que se hizo fragmentación de los iones para su caracterización. Al respecto

Fernández, Vela e Ibarra (2009) explicaron que con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de un grupo de compuestos. Además, se logra información estructural a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para conocer compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación.

Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentómica Centro Superior de Investigación realizado en Madrid-España. El estudio se efectuó conociendo los resultados llevados a cabo en el ítem 3.3.7.1

A. Procedimiento

A1. Preparación de la muestra.

Para el análisis del extracto de *Pourouma cecropiifolia* por HPLC-MS se preparó una solución de 50 mg/mL en agua con dimetilsulfóxido 78:22 (v/v). Posteriormente, fue filtrada con un filtro de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.

A2. Instrumentación

La muestra se analizó utilizando un cromatografo de líquidos Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) equipado con un detector de haz de diodos acoplado a un espectrómetro de masas (EM).

Detector de masas del espectrómetro fue el analizador de trampa de iones (Agilent ion trap 6320)

A3. Método

La separación se llevó a cabo en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Las fases móviles empleadas fueron:

- A) Agua (Ácido fórmico al 0.1%) y
- B) Acetonitrilo (ácido fórmico al 0.1 %)

La separación se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C utilizando el siguiente gradiente: 2 % de B a 0 min; 30 % de B a los 15 min; 80 % de B a los 30 min; y 100 % de B a los 40 min, empleando una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL

Los espectros ultravioleta y visible fueron registrados en el intervalo de 190 a 550 nm con una velocidad de adquisición de datos de 20 Hz, seleccionando 280, 254, 370 y 520 nm como longitud de onda para visualizar los cromatogramas durante el análisis.

El detector de EM se operó en modo de ionización positivo y negativo para analizar los compuestos fenólicos, fijando los siguientes parámetros:

Temperatura de secado, 350 °C; con intervalo de masas, m/z 90-2200 Da; flujo de gas de secado, 12 L/min; presión de nebulización, 40 psi.

La identificación tentativa de los compuestos fenólicos del EU se llevó a cabo considerando el tiempo de retención (TR), los registros espectrales UV-Vis, así como las fragmentaciones del analizador de espectro de masa, de cada uno de los compuestos, haciendo coincidir los fragmentos de iones moleculares (m/z) obtenidos y comparándolo con aquellos datos encontrados en la literatura, como una librería de espectros.

La pureza de los picos fue chequeada por el detector DAD acoplada con HPLC, comparando los espectros UV de cada pico con aquellas muestras de referencias auténticas o examinadas del espectro EM (Giomaro et al., 2014)

3.3.8. Análisis cinético del extracto de uvilla sobre la actividad hialuronidasa.

Se realizó el análisis con el objetivo de investigar si el EU posee inhibición hialuronidasa. La actividad hialuronidasa se determinó turbidimétricamente, basado en la formación de complejos entre el hialuronidato y el bromuro de cetiltrimetilamonio, descrito por Ferrante (1956). El complejo ofrece una absorbancia estable que es proporcional a la cantidad de hialuronidato no digerido remanente en solución, leído a 400 nm (Bralley, Greenspan, Hargrove y Hartle (2008)).

3.3.8.1 Proceso enzimático hialuronidasa del extracto de uvilla.

Reactivos:

1. Buffer acetato de sodio 0.2 M pH 5.4 en NaCl 0.15 M (BA)
2. Hialuronidasa (testículo de bovino, tipo I-S liofilizado (H3506) Sigma-Aldrich) con 400-1000 units/mg (Hiasa)
3. Sustrato: Sal sódica de ácido hialurónico de humor vítreo de bovino (AcH)
4. Extracto liofilizado de uvilla (EU)
5. Inhibidor de referencia: Quercetina y fosfato de dexametasona "dexametasona"
6. Bromurocetiltrimetilamonio 2.5 % disuelto en NaOH al 2% (CETAB)

1. Determinación de los parámetros cinéticos: El procedimiento se dividió en dos etapas

Primera etapa: Evaluación de la turbidez del sustrato no digerido

Consistió en determinar espectrofotométricamente la turbidez del sustrato no digerido (AcH), equivalente al 100 % (Bralley et al., 2008) del ácido hialurónico (Concentración inicial).

Se prepararon cinco tubos cada uno con diferentes concentraciones de sustrato disuelto en buffer acetato de sodio (BA) el cual se distribuyó de acuerdo con el siguiente esquema:

Reactivos	Tubos				
	1	2	3	4	5
BA (μL)	90	90	90	90	90
AcH (μL)	20	40	60	80	100
Agua (μL)	140	120	100	80	60
[AcH ug/mL]	16	32	48	64	80

Se agitaron y se incubaron a 37 °C por 22 min.

Se retiraron del baño de incubación y se añadió la solución de CETAB.

CETAB (μL)	1000	1000	1000	1000	1000
------------	------	------	------	------	------

Luego se mezclaron por quince segundos y después de diez minutos en reposo se leyeron las absorbancias del sustrato (AbS) a 400 nm. Se preparó un blanco de cada tubo, conteniendo todo el sistema menos el sustrato el cual fue reemplazado por BA.

Las AbS fueron corregidas de sus respectivos blancos, estos valores equivalen a las absorbancias del sustrato no digerido (AbSND).

Segunda etapa: Determinación de la actividad hialuronidasa

Esta etapa consistió en determinar la actividad hialuronidasa por desaparición de sustrato. Se estudió la actividad de la enzima con y sin presencia de EU. Se preparó 16 μg/mL de hialuronidasa (Hiasa) preincubada a 37 °C durante ocho minutos y, paralelamente, en otros tubos se inició la preincubación del sustrato de acuerdo con el siguiente esquema:

Preincubación de los sustratos:

Tubos Reactivos	1	2	3	4	5
BA (μL)	90	90	90	90	90
AcH (μL)	20	40	60	80	100
Agua (μL)	120	100	80	60	40

Se agitaron y se incubaron a 37 °C por 22 min

Después, se añadió 20 μL de Hiasa preincubada, correspondiendo a la concentración final de 16 ug/mL, a cada tubo como sigue:

Hiasa (μL)	20	20	20	20	20
------------	----	----	----	----	----

Incubación por 4 minutos. Luego se añadió CETAB

CETAB (μL)	1000	1000	1000	1000	1000
------------	------	------	------	------	------

Se mezcló por 30 segundos y después de 10 minutos en reposo, se leyeron las absorbancias (**AbE**) a 400 nm.

Se preparó un blanco para cada tubo, conteniendo todo el sistema menos el sustrato y la enzima, los cuales fueron reemplazados por BA.

Las (**AbE**) fueron corregidos con sus respectivos blancos, los valores corregidos correspondieron a las absorbancias que equivalen al sustrato no digerido.

La actividad enzimática hialuronidasa (**AcEnz**) fue expresada en μg/mL/min y se calculó mediante la siguiente ecuación 7 (Sumantran *et al.* 2007; Sunitha *et al.* 2013; Belfeki, Mejri y Hassouna, 2016)

Ecuación 7

$$\text{AcEnz} = \text{AbSND} - \text{AbE}$$

AbSND = Absorbancia corregida del sustrato no digerido

AbE = Absorbancia equivalente al sustrato digerido

Posteriormente, se trazo el gráfico de las inversas de las AcEnz y concentración de sustrato (Lineweaver-Burk) para determinar los

parámetros cinéticos: La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de Michaelis-Menten (K_m).

3.3.8.2. Evaluación del comportamiento cinético de inhibición del extracto de uvilla sobre la hialuronidasa.

Se investigó el efecto inhibitorio del EU en base a la actividad hialuronidasa bajo condiciones efectuadas en la segunda etapa. Se preparó primero, un sistema sustrato-EU, de acuerdo con el siguiente esquema:

A. Actividad hialuronidasa con dos concentraciones de EU

Preincubación de los sustratos con EU

Tubos		1	2	3	4	5
Reactivos						
BA	(μL)	90	90	90	90	90
AcH	(μL)	20	40	60	80	100
Agua	(μL)	100	80	60	40	20
EU *	(μL)	20	20	20	20	20

Se agitaron y se incubaron a 37 °C por 22 min

Seguidamente, se añadió 20 μL de Hiasa pre-incubada a cada tubo como sigue:

Hiasa (μL)	20	20	20	20	20
-------------------------	----	----	----	----	----

Se incubaron por cuatro minutos. Luego se añadió CETAB:

CETAB (μL)	1000	1000	1000	1000	1000
-------------------------	------	------	------	------	------

Nota: El esquema se repitió con dos concentraciones de *EU (131.2 y 262.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en BA por separado

Se mezcló y después de 10 minutos en reposo se leyeron las absorbancias de los tubos que contenían 131.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. a 400 nm. Igualmente, se leyeron las absorbancias del EU a 262.4 $\mu\text{g}/\text{m}$. Se prepararon tubos blanco-extracto de uvilla para obtener las absorbancias corregidas. El resultado de estas absorbancias se les denominó **Ab_{EU[131.2]}** y **Ab_{EU[262.4]}**. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. La actividad hialuronidasa en presencia de EU fue calculada utilizando las ecuaciones 8 y 9

Ecuación 8

$$\mathbf{AcEnz}_{EU[131.2]} = \mathbf{AbSND} - (\mathbf{Ab}_{EU[131.2]})$$

AbSND = Absorbancia corregida del sustrato no digerido
 Ab_{EU [131.2]} = Absorbancia corregida del EU a 131.2 µg/mL

Ecuación 9

$$\mathbf{AcEnz}_{EU[262.4]} = \mathbf{AbSND} - ([\mathbf{Ab}_{EU262.4}])$$

AbSND = Absorbancia corregida del sustrato no digerido
 Ab_{EU [262.4]} = Absorbancia corregida del EU a 262.4 µg/mL

Posteriormente, se aplicó la gráfica de las inversas de la AcEnz y de la concentración del ácido hialurónico (Lineweaver-Burk), utilizado para determinar la V_{máx} y la K_m. La disposición de las líneas en la gráfica permitirá si el EU tiene actividad inhibitoria, además revelaría el modo de inhibición frente a la hialuronidasa.

*3.3.8.3. Efecto inhibitorio de la quercetina sobre la hialuronidasa.**Ensayo de Validación*

El ensayo de la actividad hialuronidasa fue validado al reproducir la acción que ejerce la quercetina, conocida como inhibidor enzimático de la Hiasa. En ese sentido, se aplicó el método descrito por Kuppusamy et al. (1990), con algunas modificaciones.

Procedimiento

Se preparó un stock de 2 mg/mL de quercetina en etanol al 96°. de este stock se obtuvo una dilución de 12.8 µg/mL en etanol al 80 %. Este flavonoide fue usado como control positivo para validar el ensayo.

El ensayo de validación se realizó en condiciones similares mencionado en la sección 3.3.8.2 reemplazando el EU por quercetina. Las lecturas fueron registradas como **Ab_{Quer}**. Además, se realizó un sistema blanco con etanol al 80 % (sin quercetina) registrando las lecturas como **Ab_{Eta}**.

También se preparó blanco de quercetina para cada tubo. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Las absorbancias de **Ab_{Quer}** fueron restadas con los blancos de quercetina y **Ab_{EtA}**, para obtener las absorbancias corregidas (**Ab_Q**). Para calcular la actividad hialuronidasa frente a quercetina (**AcEnz_Q**) se usó la siguiente ecuación 10.

Ecuación 10: Actividad hialuronidasa con quercetina

$$\text{AcEnz}_Q = \text{AbSND} - \text{Ab}_Q$$

Ab_Q = Absorbancia corregida de quercetina

AbSND = Absorbancia corregida de sustrato no digerido

Posteriormente, se aplicó la gráfica de las inversas, aplicando los parámetros AcEnz y concentración de sustrato (Lineweaver-Burk), y luego, se extrapoló para calcular la V_{máx} y la K_m. Luego, se determinó el modo de inhibición de la quercetina, de acuerdo a la sección. 3.3.8.2.

3.3.8.4. *Evaluación de la concentración inhibitoria del EU (IC₅₀) frente a la hialuronidasa.*

Se siguió el método reportado por Bralley et al. (2007), Sumantran *et al.* (2007) y Daya *et al.* (2014) con ligeras modificaciones.

El valor de IC₅₀ fue determinado analizando la actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de la muestra en estudio, tal como lo recomienda Sunitha *et al.* (2013). Una medida comúnmente usada para medir la potencia de un inhibidor enzimático es su IC₅₀, que es definido como la concentración del inhibidor requerida para inhibir el 50% de la actividad enzimática. (Wang *et al.*, 2016)

1. Determinación del IC₅₀ del EU.

Procedimiento

1. Los reactivos fueron los mismos indicados en ítem 3.3.8.1.
2. Se determinó dos valores de IC₅₀ de la uvilla, uno disuelto en BA y el otro disuelto en etanol al 80 % v/v. La concentración del EU fue de 0 a 2.62 mg/mL se mantuvo la concentración de sustrato 60 µg/mL ± 0.2.

Reactivos (µL)	Blco	Control	Extracto de Uvilla (mg/mL)				
			1	2	3	4	5
BA	90	90	90	90	90	90	90
AcH	60	60	60	60	60	60	60
Agua	100	80	60	60	60	60	60
0.34 mg/ mL	--	--	20	--	--	--	--
0.68 mg/ mL	---	--	--	20	--	--	--
1.34 mg/ mL	--	--	--	--	20	--	--
2.04 mg/ mL	--	--	--	--	--	20	--
2.72 mg/ mL	--	--	--	--	--	--	20

Se agitaron y se incubaron a 37 °C por 22 min

Se añadió 20 µL de enzima preincubada a cada tubo como sigue

Hiasa (µL)	--	20	20	20	20	20	20
------------	----	----	----	----	----	----	----

Incubación por cuatro minutos Luego, se retiraron del baño de incubación y se añadió CETAB.

CETAB (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
------------	------	------	------	------	------	------	------

Se mezcló por veinte segundos y después de diez minutos en reposo se leyeron las absorbancias a 400 nm. Las lecturas obtenidas fueron tratadas de acuerdo a las ecuaciones 11 y 12.

Ecuación 11: Porcentaje de la actividad enzimática

$$\text{AcEnz \%} = 100 - \frac{\text{Ab(S+E)}}{\text{AbNS}} \times 100$$

Ecuación 12. Porcentaje de la actividad enzimática con EU

$$(AcEnz_{EU}) \% = 100 - \frac{Ab(S+E+U)}{AbNS} \times 100$$

Términos de la ecuación 11 y 12

Ab(S+E) : Absorbancia del tubo control con sustrato, enzima sin EU.

AbSND : Absorbancia del tubo blanco con sustrato no digerido y sin enzima,

Ab(S+E+U) : Absorbancias de los tubos del 1 al 5, con sustrato, enzima y EU

Porcentaje de inhibición del extracto de uvilla. Para el cálculo del porcentaje de inhibición de cada concentración de EU, se aplicó la siguiente ecuación 13.

Ecuación 13: Porcentaje de inhibición del EU

$$(Inhibición_{EU}) \% = AcEnz\% - (AcEnz_{EU})\%$$

AcEnz% = Porcentaje de la actividad enzimática
 (AcEnz_{EU})% = Porcentaje de la actividad enzimática del EU

Se obtuvieron cinco porcentajes de inhibición para el EU, tanto en etanol y en BA y con ello se construyeron las curvas. La regresión lineal de cada gráfico sirvió para calcular el valor de IC₅₀ de EU en BA y otro EU en etanol 80 %.

2. Determinación del IC₅₀ de las sustancias de referencia.

Para validar el ensayo y comparar con el EU se empleó dos sustancias de referencia o control positivo: la quercetina y la dexametasona, siguiendo el método propuesto por Sumantran *et al.* (2007) y Bralley *et al.* (2007)

A. Para quercetina (Q)

A1. Procedimiento

1. Se preparó una solución stock de quercetina de 2 mg/mL en etanol 98°. A partir de ese stock, se obtuvieron cinco concentraciones 6.4, 12.8, 25.6, 32.0, y 44.8 µg/mL disueltas en etanol al 80 % v/v, que fueron utilizadas para determinar el IC₅₀
2. Se siguió el mismo procedimiento del ítem 3.3.8.4 sección A
3. Las absorbancias fueron registradas como Ab(S+E+Q)
4. Para calcular el porcentaje de inhibición de la quercetina se usaron previamente las ecuaciones 11 y 12. Seguidamente se aplicó la ecuación descrita a continuación:

Ecuación 14: Porcentaje de inhibición de la quercetina

$$\text{(Inhibición}_Q\text{)} \% = \text{AcEnz}\% - (\text{AcEnz}_Q)\%$$

AcEnz% = Porcentaje de la actividad enzimática
 (AcEnz_Q%) = Porcentaje de la actividad enzimática de la quercetina

5. Se trazó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta. Esta ecuación sirvió para calcular el IC₅₀, de acuerdo con el informe de Wang et al. (2016).

2. Para dexametasona (Dex)

A2. Procedimiento

1. Se preparó una solución stock de dexametasona de 5.0 mg/mL en BA. A partir de ese stock, se obtuvo cinco concentraciones 40, 80, 160, 240 y 320 µg/mL usados para determinar el IC₅₀
2. Se siguió el procedimiento de la sección 3.3.8.4. sección A

3. Las absorbancias de la dexametasona fueron registradas como $Ab(S+E+Dex)$
4. Para calcular el porcentaje de inhibición de la dexametasona se determinó el porcentaje de la actividad enzimática, es decir, sin y con dexametasona (ecuación 11 y 12) y luego se aplicó la ecuación del porcentaje de inhibición de la dexametasona (ecuación 15). Con los datos obtenidos se construyó una curva para obtener el IC_{50} de la dexametasona.

Las absorbancias de la dexametasona fueron registradas como $Ab(S+E+Dex)$. Seguidamente se empleó la ecuación 15

Ecuación 15: Porcentaje de inhibición de la dexametasona

$$(\text{Inhibición}_{Dex}) \% = AcEnz\% - (AcEnz_{Dex})\%$$

$AcEnz\%$ = Porcentaje de la actividad enzimática

$AcEnz_{DEX}$ = Porcentaje actividad enzimática de la dexametasona

3.3.9 Tratamiento de los datos estadísticos

Los resultados se expresaron como la media y su desviación estándar. ($n=3$). Los valores de IC_{50} fueron obtenidos mediante la ecuación lineal de los gráficos usando Microsoft Excel (2013 versión para Windows) Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante la prueba de t-student. Las diferencias fueron consideradas significativamente a $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Clasificación taxonómica

La muestra fue clasificada como sigue:

Familia: Cecropiaceae

Género: Pourouma

Especie: ***Pourouma cecropiifolia*** C. Martius

Nombre vulgar: “Uvilla amazónica” (detalles en el anexo 1)

4.1.2 Análisis químico proximal y contenido de minerales de la fruta de *Pourouma cecropiifolia*

En la tabla 2 se muestra los nutrientes mayoritarios de la cáscara y pulpa de la fruta *P. cecropiifolia*. El extracto no nitrogenado (ENN) correspondió a los carbohidratos solubles. Todo ello se determinó siguiendo las pruebas descritas en el ítem 3.3.1 (ver anexo 2). Los resultados son mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis proximal y contenido de minerales zinc y cobre en la fruta de *Pourouma cecropiifolia*

Componente	Base seca	
	(%)	(ppm)
Proteínas	4.57	
Extracto etéreo	2.04	
Fibra cruda	6.35	
Cenizas	3.33	
ENN	83.71	
Cobre		3.96
Zinc		2.18

Fuente: Datos propios

La humedad promedio de la fruta fue 82.43 %

4.1.3. Extracción de compuestos bioactivos

Los extractos obtenidos según lo descrito en ítem 3.3.3 de la metodología, fueron de consistencia ligeramente viscosa, de color rojizo claro y soluble en solventes polares, constituyendo la unidad experimental para realizar la evaluación de los compuestos bioactivos y estudiar su actividad antihialuronidasa.

En la tabla 3, se observa el rendimiento por extracto de uvilla (EU) en base al peso total de la cáscara con pulpa de fruta fresca (% rendimiento) y la humedad. El porcentaje de rendimiento (% rendimiento) se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 16

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto obtenido} \times 100}{\text{Peso (cáscara+pulpa)}}$$

Tabla 3. Rendimiento y humedad del EU de la fruta de *Pourouma cecropiifolia*

Muestra	Rendimiento extracto (%)	Rendimiento Fruta (%)	Humedad EU (%)
Extracto liofilizado de uvilla	9.59 ± 2.12	6.94 ± 1.80	16 ± 1.53

Fuente: Datos propios

4.1.4. Análisis fitoquímico preliminar del extracto de uvilla

Los metabolitos más abundantes detectados fueron compuestos polifenólicos, flavonoides, azúcares reductores, luego en menor proporción estuvieron los taninos y triterpenos. Los compuestos de presencia escasa correspondieron a los alcaloides y las proteínas; y en los compuestos no detectados estuvieron las saponinas y los aminoácidos. Se prepararon tres soluciones (I, II y III) según el ítem 3.3.4 de metodología.

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos con las tres soluciones.

Tabla 4. Análisis fitoquímico preliminar del extracto liofilizado de *P. cecropiifolia*.

Solución	Compuesto	Reacción	Resultado
I	Polifenoles	Cloruro férrico	+++
	Flavonoides	Shinoda	+++
	Antocianinas	Rosenheim	++
	Terpenos	Vainillina sulfúrica	++
	Alcaloides	Bertrand	+
		Dragendorf	+
		Mayer	+
Sonnenschein		-	
II	Carbohidratos Totales	Molish	+++
	Azúcares reductores	Fehling	+++
		Benedict	+++
		Trommer	+++
	Aminoácidos	Ninhidrina	--
	Saponinas	Agitación/agua	--
Taninos	Gelatina/NaCl	++	
III	Triterpenos	Lieberman Burchard	++

Calificación:

- + Presencia escasa
- ++ Presencia relativa,
- +++ Presencia abundante,
- No detectado.

Fuente: Datos propios

4.1.5. Cuantificación de compuestos bioactivos del extracto de uvilla

4.1.5.1. Contenido de polifenoles totales (CPT)

La tabla 5 muestra el CPT que varía en función al tipo de ácido fenólico utilizado, siendo mayor el contenido de EAClo que EAG en el extracto. Los anexos 3 y 4 presentan la curva de calibración de los estándares: ácido gálico y ácido clorogénico

Tabla 5. Contenido de polifenólicos totales en el EU de *P. cecropiifolia*.

Polifenoles totales			
mg EAG/g	mg EAG/100g	mg EAClo/g	mg EAClo/100g
I	II	I	II
14.91 ± 0.66	528.47 ± 23.23*	22.46 ± 0.51	796.17 ± 17.88*
	96.90 ± 4.26**		142.25 ± 3.19**

EAG/g: Equivalente de ácido gálico en 1 g. de EU

EAClo/g: Equivalente de ácido clorogénico en 1 g de EU

I : Extracto en base seca (b.s)

II : 100 g de fruta (b.s)* (f.f)**

(b.s) base seca, (f.f) fruta fresca

Fuente. Datos propios

4.1.5.2. Contenido de flavonoides totales.

La tabla 6 exhibe los resultados obtenidos tanto en el extracto como en la fruta de *P. cecropiifolia*, según el método descrito en el ítem 3.3.5.2 de metodología. Los anexos 5 y 6 presentan la ecuación de la recta obtenida con los estándares.

Se observa que el CFT como EQ es ligeramente menor al contenido de ECA de EU, en ambos casos fue disuelto en metanol 80 %.

Tabla 6. Contenido de flavonoides totales en EU de *P. cecropiifolia*

Flavonoides totales			
mg ECA/g*	mg ECA/100g	mg EQ/g	mg EQ/100g
I	II	I	II
12.83 ± 0.46	70.15 ± 2.99*	9.74 ± 2.68	61.72 ± 17.00*

ECA: Equivalente de catequina
 EQ: Equivalente de quercetina.
 I : Extracto (b.s)
 II : 100 g de fruta (f.f)*
 Fuente. Datos propios

4.1.5.3. Cuantificación de antocianinas monoméricas (CAM)

Los pigmentos de antocianinas monoméricas cambian de color de forma reversible cuando varía el pH. Una de las formas coloreadas de la antocianina es bajo la forma de oxónio que se manifiesta a pH 1,0 mientras que la forma incolora de hemiacetal predomina a pH 4,5. La diferencia en la absorbancia de los pigmentos en 520 nm o a 510 nm es proporcional a la concentración de antocianina. Las antocianinas degradadas presentan forma polimérica, son resistentes al cambio sin importar el pH y no presentan diferencias en las lecturas espectrofotométricas en los pH 4.5 y 1.0 (Lee, Durst y Wrolstad, 2005; Guisti y Wrosltad, 2001).

Al hacer el barrido espectrofotométrico descrito en ítem 3.3.5.3 de metodología, se observó la absorbancia más alta a 510 nm (Me) y a 700 nm (Ma) respectivamente, para ambas soluciones. Estas longitudes de onda se eligieron para CAM.

Al estudiar el tiempo óptimo para la medición de antocianinas, se observó que a los 15 minutos se alcanzaba el equilibrio de las absorbancias tanto en la solución A (KCl 0.4 M, se ajustó a pH 1

con HCl) como en la solución B (CH₃COONa 0.025 M se ajustó a pH 4.5 con CH₃COOH).

La figura 5 muestra el CAM, estos valores fluctuaron entre 2.44 a 4.63 mgECi/L de EU, cuyos tenores fueron dependientes de la cantidad de EU utilizados (24.40 a 43.70 mg). La tabla 7 muestra los resultados de CAM

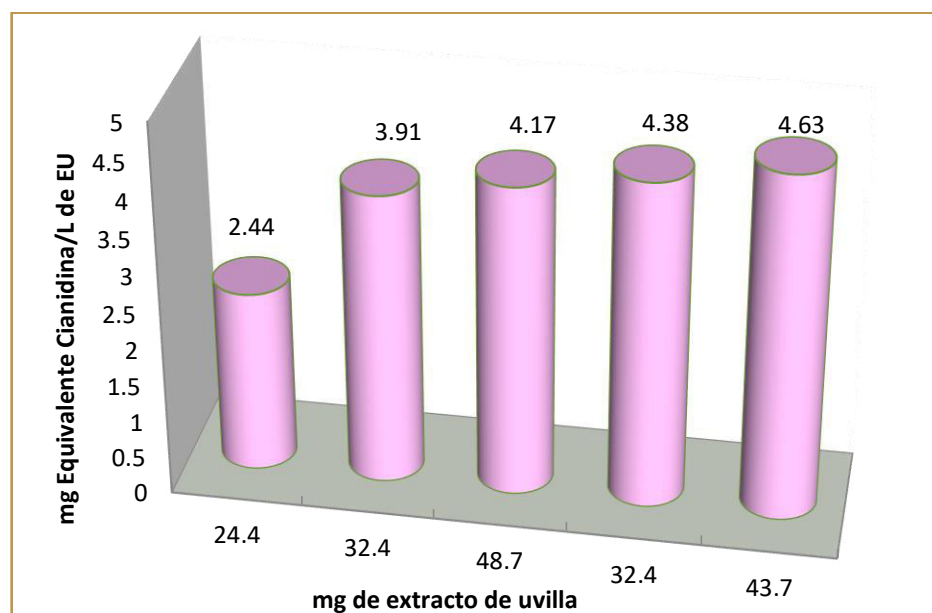


Figura 5. Contenido de antocianinas monoméricas del EU de la fruta de *P. cecropiifolia*
EU de 24.4 a 43.7 mg.
Fuente. Datos propios

4.1.5.4. Determinación de ácido ascórbico (AA).

Para determinar el contenido de AA en el EU, se hizo un previo ensayo con un producto farmacéutico que contenía AA entre 96 a 110 % de AA. Se detectaron valores de acuerdo a esta variación mencionada.

La concentración de AA del EU se exhibe en la tabla 7 y este se reporta en mg de extracto y en 100 g de fruta. La determinación se

describió en el ítem 3.3.5.4 de metodología. En el anexo 7 presenta la ecuación de la recta obtenida con el estándar, la cual fue utilizada para determinar el contenido de AA.

Tabla 7. Contenido de antocianinas monoméricas y ácido ascórbico de EU de *P. cecropiifolia*.

Antocianinas monoméricas			Ácido ascórbico	
mg ECi/g	mg ECi/ L	mg ECi/Kg	mg/g	mg /100 g
I	I	II	I	II
0.55 ± 0.12	3.90 ± 0.86	34.82 ± 6.03	0.30 ± 0.02	1.86 ± 0.05

ECi: Equivalente de cianidina -3-glucósido

I: mg ECi/g EU

II: mg ECi/Kg de F.F

AA: Ácido ascórbico

I: mg AA/g EU

II: mg AA/100 g de F.F

Fuente. Datos propios

4.1.6. Evaluación de la capacidad antioxidante

4.1.6.1 Determinación del poder reductor del extracto de uvilla.

Considerando el fundamento del método mencionado en el ítem 3.3.6.1, el EU produjo la transformación de Fe³⁺ a Fe²⁺, observándose un cambio de color amarillo de la reacción a varios matices de verde a azul, dependiendo del contenido de sustancias reductores en el EU.

La Fig. 6 registra el comportamiento reductor del EU el cual se incrementa con la cantidad del EU, similar comportamiento ocurre con el ácido ascórbico. Las formas de expresar los resultados están de acuerdo con lo reportado por Farhan y Charanjit. (2017) y Beyhan et al., (2010). Los IC₅₀ para el EU y el ácido ascórbico fueron 169.12 ± 1.29 y 4.96 ± 0.10 µg/mL, respectivamente.

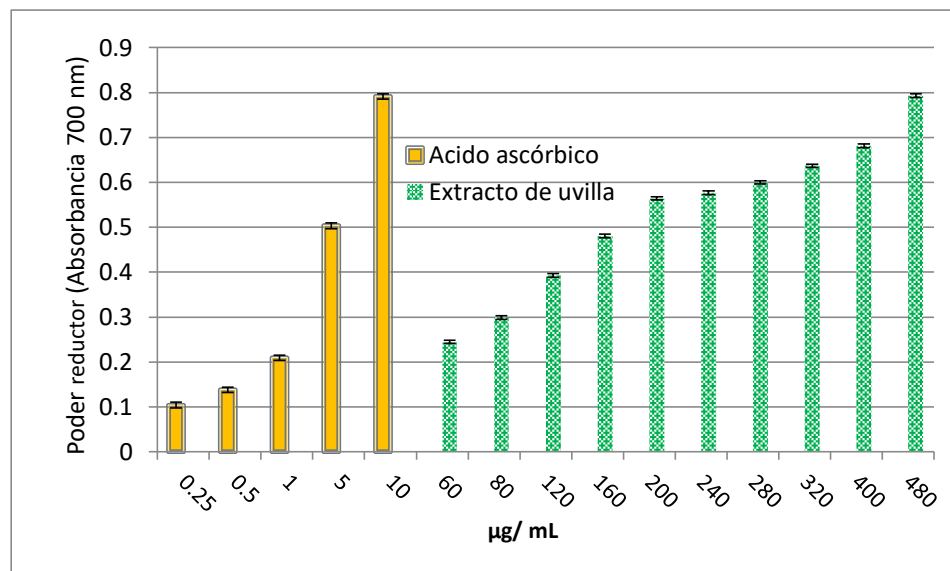


Figura 6. Poder reductor del EU *P. cecropiifolia* y ácido ascórbico
Fuente. Datos propios

4.1.6.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS y DPPH

A. Porcentaje de captación de los radicales ABTS

La actividad captadora del EU sobre el radical ABTS, se muestra en la figura 7. Se exhibe el incremento proporcional con el aumento de la concentración del EU desde 42 a 210 µg/mL, en metanol 80 %. Los porcentajes de captación variaron entre 20.76 ± 0.41 % a 83.86 ± 0.47 % para el EU. Se observó un ligero incremento de la capacidad de captación a 84 y 126 µg/mL de EU que las otras concentraciones de EU.

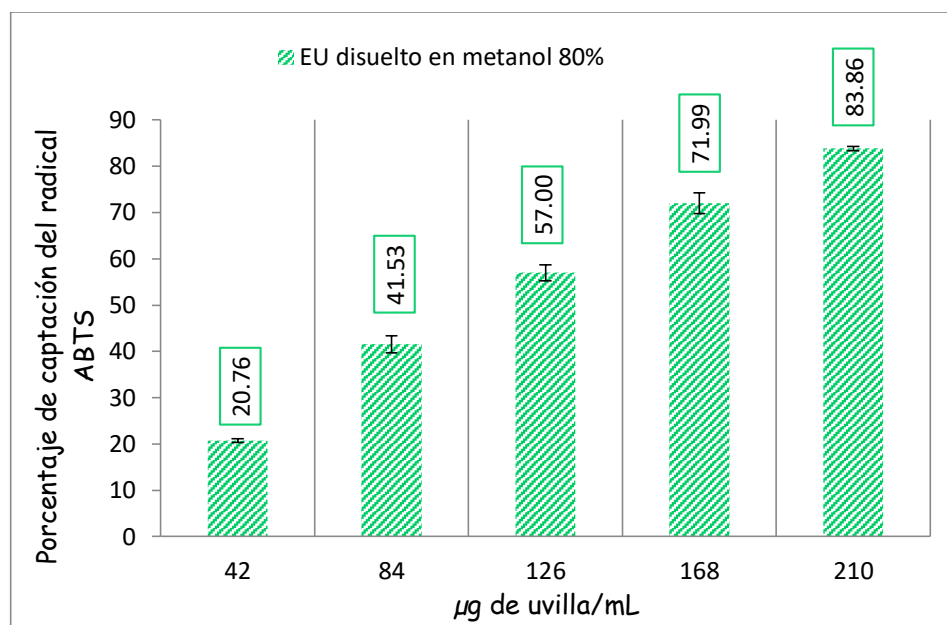


Figura 7. Capacidad antioxidante del EU por radical ABTS
Fuente. Datos propios

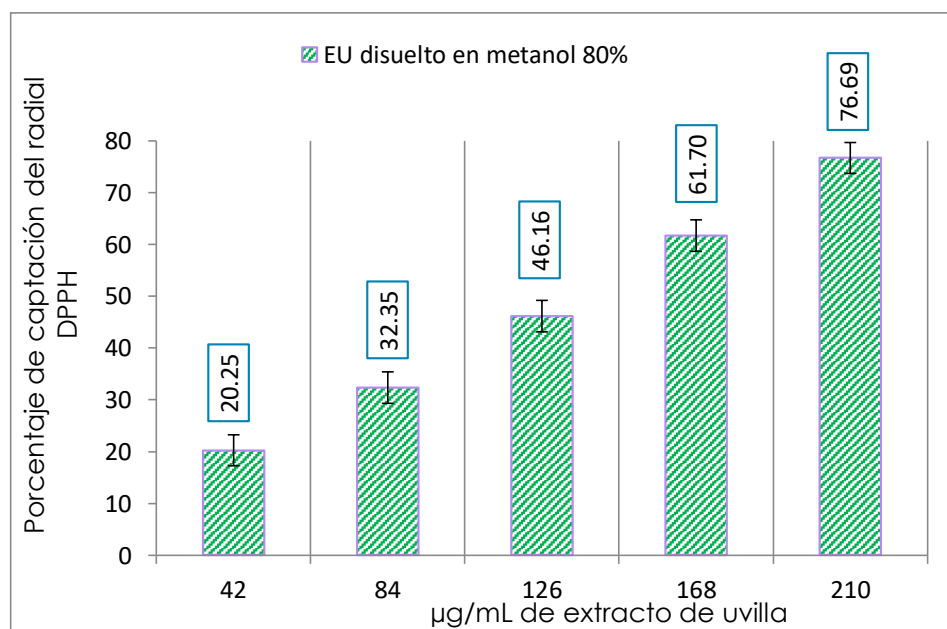


Figura 8. Capacidad antioxidante del EU mediante el radical DPPH
Fuente: Datos propios

B. Porcentaje de captación de los radicales DPPH

La figura 8 ilustra la actividad captadora del EU sobre el radical DPPH, se evidencia aumento progresivo de la captación del radical de acuerdo con las concentraciones de EU (42, 84, 126, 168 y 210 $\mu\text{g/mL}$).

C. IC₅₀ del EU mediante ensayos de los radicales ABTS y DPPH

En la tabla 8 se aprecia los IC₅₀ del EU tanto del ensayo con los radicales ABTS y DPPH. Además, se observan valores de los IC₅₀ de las sustancias de referencias (Trolox, ácido ascórbico y quercetina) frente a los radicales DPPH y ABTS: Los IC₅₀ se calcularon de acuerdo con las ecuaciones lineales de los gráficos que se aprecian en los anexos 8, 9, 10, 11 y 12.

Tabla 8. IC₅₀ del EU y de las referencias mediante el ensayo de captación del radical DPPH y ABTS

Parámetros	ABTS IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$	DPPH IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
Muestras EU en MEOH 80 %	115.07 \pm 1.30	134.44 \pm 1.62
Trolox*	2.43 \pm 0.02	2.84 \pm 0.01
Ácido Ascórbico*	2.58 \pm 0.02	2.72 \pm 0.05
Quercetina*	1.06 \pm 0.01	n.d**

Muestras de estudio: Extracto de uvilla (EU) y
muestras de referencia*

Fuente. Datos propios

D. Capacidad antioxidante expresada como equivalentes de antioxidantes de referencias.

La capacidad antioxidante de EU, también fue expresada como CAET (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y CAEVC (capacidad antioxidante equivalente a vitamina C) de los radicales ABTS y DPPH (Ver tabla 10)

Tabla 9. Capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH del EU *P. cecropiifolia*

¹ CAET	
ABTS	DPPH
537.05 ± 6.00	529.64 ± 6.24
² CAEVC	
ABTS	DPPH
143.80 ± 1.60	128.78 ± 1.52

¹Capacidad antioxidante equivalente Trolox en $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de fruta fresca (FF)

²Capacidad antioxidante equivalente a vitamina C en $\text{mg}/100\text{ g}$ de F.F. Fuente: Datos propios

En la tabla 9, el valor de CAET de EU para ABTS fue superior respecto al radical DPPH. De manera similar, sucedió con los resultados de CAEVC.

4.1.6.3. Comportamiento cinético. Eficiencia antirradical (EA) mediante el ensayo DPPH.

A. Comportamiento cinético y determinación de T_{EC50}

En la figura 9 se observa cinco curvas de la cinética de reacción del DPPH de cinco concentraciones (42 a 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del EU en metanol/agua al 80 %. Las absorbancias fueron monitoreadas cada

minuto, desde el tiempo 0 hasta 35 minutos de cada concentración. Las curvas fueron descendiendo, es decir, los valores de las absorbancias disminuyeron en función al tiempo, en cada una de las concentraciones, hasta que se alcanzó un estado estable entre los 24 a 35 minutos.

Se eligió tres tiempos 24, 26 y 28 minutos en el fragmento del estado estable, cuyas absorbancias presentaron mínimas variaciones. El T_{EC50} fue determinado de acuerdo con el gráfico de la figura 9, encontrándose 26.0 ± 2.0 min.

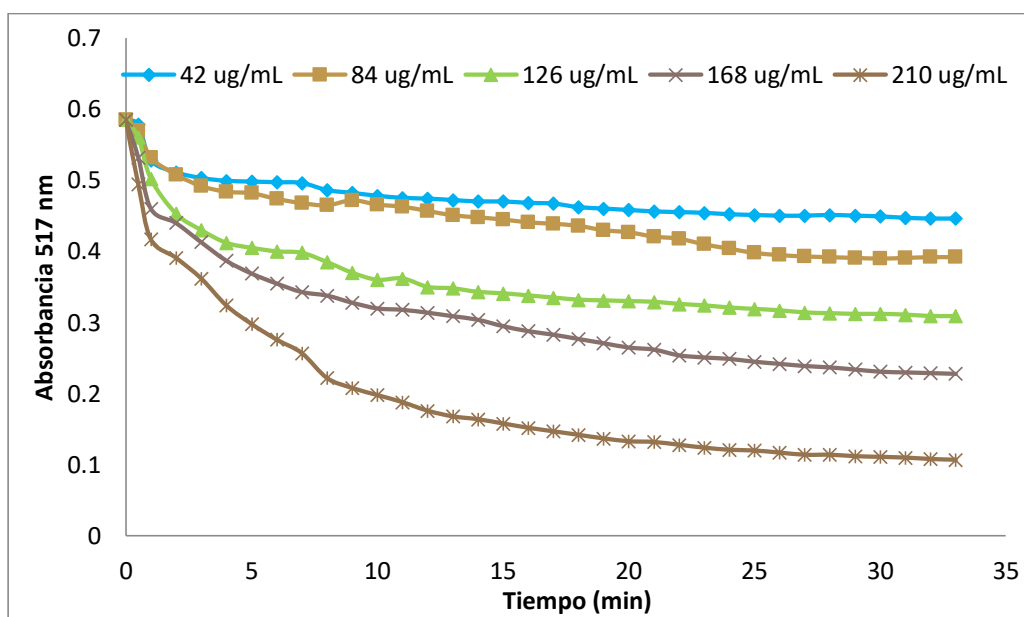


Figura 9. Comportamiento cinético de reacción del radical DPPH frente al extracto de uvilla

Fuente. Datos propios

B. EC_{50} del EU

La EA se determinó aplicando la ecuación 6 (ítem 3.3.6.4.), previamente se calculó el promedio de EC_{50} . Este valor se obtuvo de la ecuación lineal del gráfico de la figura 10. En esta figura se muestran 3 curvas que correspondieron a 24, 26 y 28 minutos. La

EA resultó del producto de las inversas de EC_{50} y el $T_{EC_{50}}$ (Rojano *et al.*, 2008; Villaño *et al.*, 2007).

En la figura 10 se aprecia que el origen de las curvas empezó desde el eje y. Luego el sentido de la curva desciende, es decir los porcentajes remanente del radical DPPH disminuyeron en función del aumento de la concentración del EU (42 a 210 $\mu\text{g/mL}$).

El promedio de EC_{50} fue $132.11 \pm 1.30 \mu\text{g/mL}$ (ver tabla 11)

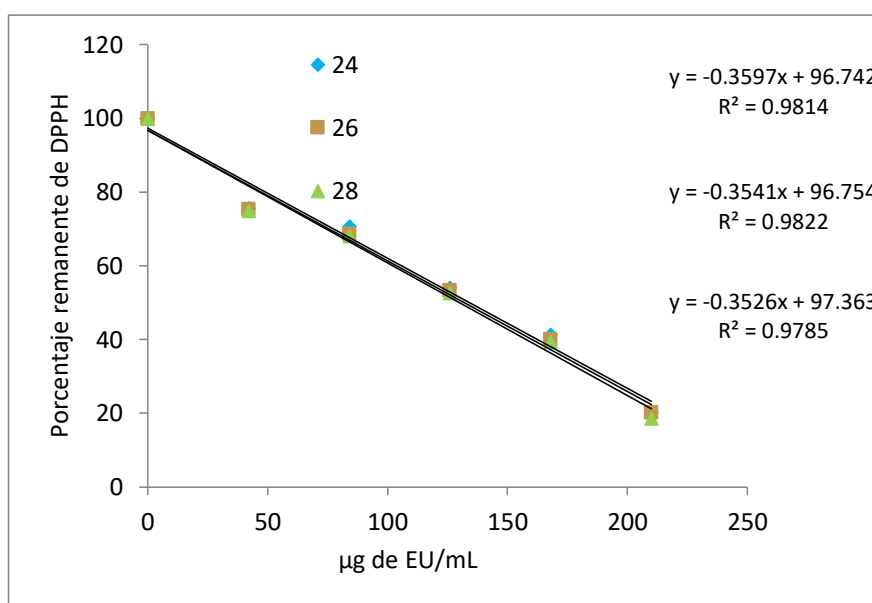


Figura 10. Evaluación de EC_{50} mediante el porcentaje remanente de DPPH

Fuente. Datos propios

También, se obtuvo el EA usando los términos IC_{50} y $T_{IC_{50}}$. Para calcular el primer término se utilizó las mismas absorbancias para calcular el EC_{50} y con ello se aplicó la ecuación 3 del ítem 3.3.6.2. y los procedimientos C.1 y C.2. El valor de $T_{IC_{50}}$ fue igual a $T_{EC_{50}}$. Los resultados de este procedimiento fueron muy cercanos al mencionado en ítem 4.1.6.3. El valor de EA fue igual aplicando tanto el IC_{50} y EC_{50} , tal como se muestra en la tabla 10.

La tabla 10 exhibe el resumen de la eficiencia antirradical y el comportamiento cinético obtenido mediante dos procedimientos.

Tabla 10. Eficiencia antirradical y comportamiento cinético

Muestra	% remanente DPPH			% de captación de DPPH	
	TEC ₅₀	EC ₅₀	EA x 10 ⁻³	IC ₅₀	EA x 10 ⁻³
EU	26 ± 2.0	132.11 ± 1.30	0.30 ± 0.01	132.10 ± 2.19	0.30 ± 0.02

EU: Extracto de uvilla en metanol 80%

T_{EC50}: min

EC₅₀ e IC₅₀: µg/mL

EA: Eficiencia antirradical, mL/µg.min)

Fuente: Datos propios

4.1.7. Análisis cromatográfico del extracto de uvilla.

4.1.7.1. Análisis preliminar de compuestos fenólicos del extracto de uvilla por HPLC-DAD

La figura 11 representa el perfil del EU con 11 picos registrados en un lapso de veinte minutos mediante HPLC-DAD. Se puede visualizar que la detección se realizó a una longitud de onda de 254.4 nm, que caracteriza a los ácidos fenólicos se usó el detector de arreglo de diodos.

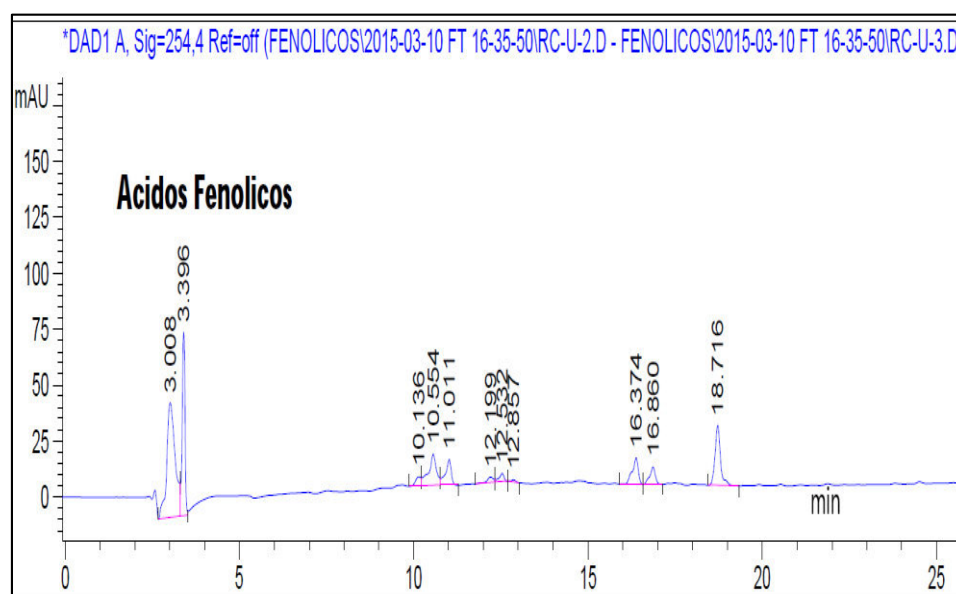


Figura 11. Perfil cromatográfico (I) HPLC-DAD de ácidos fenólicos del EU

Fuente. Datos propios

La tabla 11 describe los tiempos de retención (RT), desde 3.008 hasta 18.716 minutos, la anchura de retención y el porcentaje de área de 11 picos. Los picos 1 y 2 presentaron mayor área que los demás picos.

Tabla 11. Características de los picos del grupo de ácidos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD

Muestra: Extracto de Uvilla

Signal 0: Sig =254,4

Pico	RT (min)	Ancho (min)	Àrea (mAuxs)	Àrea %
1	3.008	0.261	871.154	37.098
2	3.396	0.09	466.056	19.847
3	10.136	0.165	46.026	1.96
4	10.554	0.213	225.711	9.612
5	11.011	0.167	134.592	5.732
6	12.199	0.2	33.338	1.42
7	12.532	0.146	37.699	1.605
8	12.857	0.124	8.232	0.351
9	16.374	0.169	143.799	6.124
10	16.86	0.163	87.495	3.726
11	18.716	0.163	294.122	12.525

RT: Tiempo de retención. Fuente. Datos propios

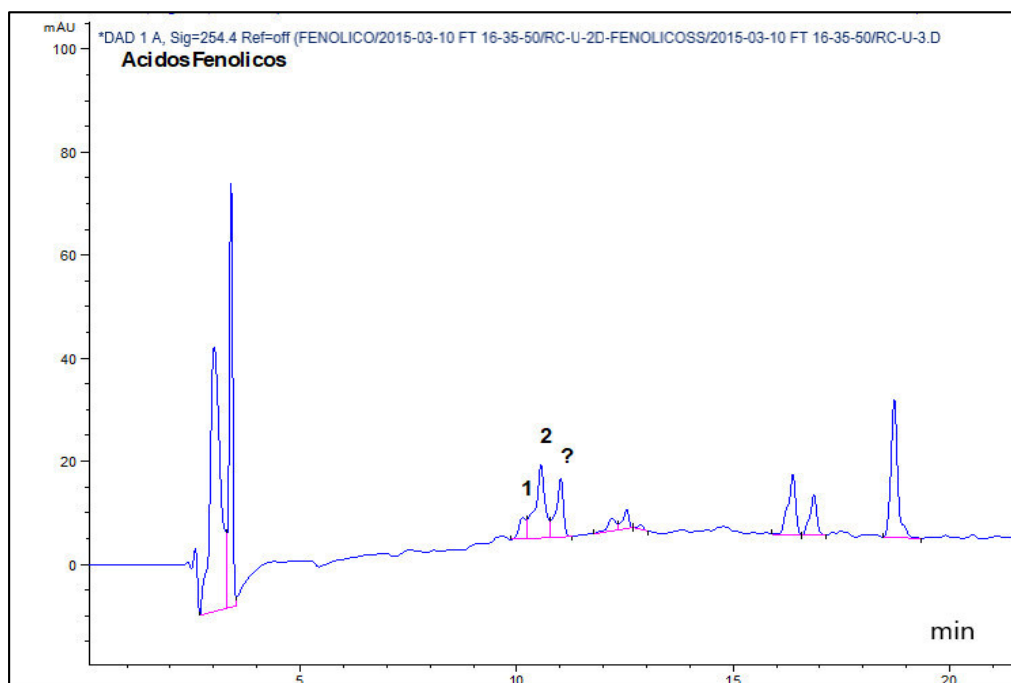


Figura 12. Perfil cromatográfico (II) por HPLC-DAD de ácidos fenólicos del EU.

Fuente. Datos propios

Después de obtener el perfil cromatográfico (Fig. 11) se realizó el análisis de dos, de los once picos, mediante barrido en la región espectral UV-Vis, debido a que estos metabolitos presentan curvas espectrales típicas que caracterizan a los ácidos fenólicos. Estos resultados se muestran en la figura **12**, que comprende el perfil cromatográfico de dos picos de los ácidos fenólicos y un tercero no identificado del EU, evaluado durante un tiempo de veinte minutos.

La figura **13** comprende 13A y 13B. Las figuras son espectros de absorción ultravioleta de los picos 1 y 2 de la figura 13. Estos espectros fueron obtenidos por barrido desde 240 a 450 nm. Los perfiles **13A** y **13B** se caracterizaron por la presencia de dos bandas con dos longitudes de onda máxima cercanas a 250 y 330 nm. El pico del perfil **13B** fue el más alto con 27.7 mAU respecto al perfil **13A** con 9.9 mAU. Sin embargo, entre ellos se mantiene una similitud en su perfil espectral.

La figura **14** muestra el cromatograma del EU con siete picos mediante HPLC-DAD. La detección se realizó a una longitud de onda **370.4** nm que caracteriza al grupo de flavonoides (FLA).

Luego, se hizo el análisis de tres picos mediante barrido en la región UV-Vis. Los resultados se observan en la figura **15**. Este cromatograma del EU (mAU vs tiempo) con 3 tres picos más prominentes en orden ascendente fueron los picos 3, 1 y 2, los cuales corresponden a las características de los picos 7, 5 y 6 registrados en la tabla 13.

La figura **16** comprende 16A, 16B y 16C se distinguen las curvas espectrales de los picos 1, 2 y 3 visualizado en la figura 15. El barrido muestra λ max desde 240 a 450 nm. Se aprecia el desarrollo de dos bandas I y II en el rango espectral de la zona ultravioleta.

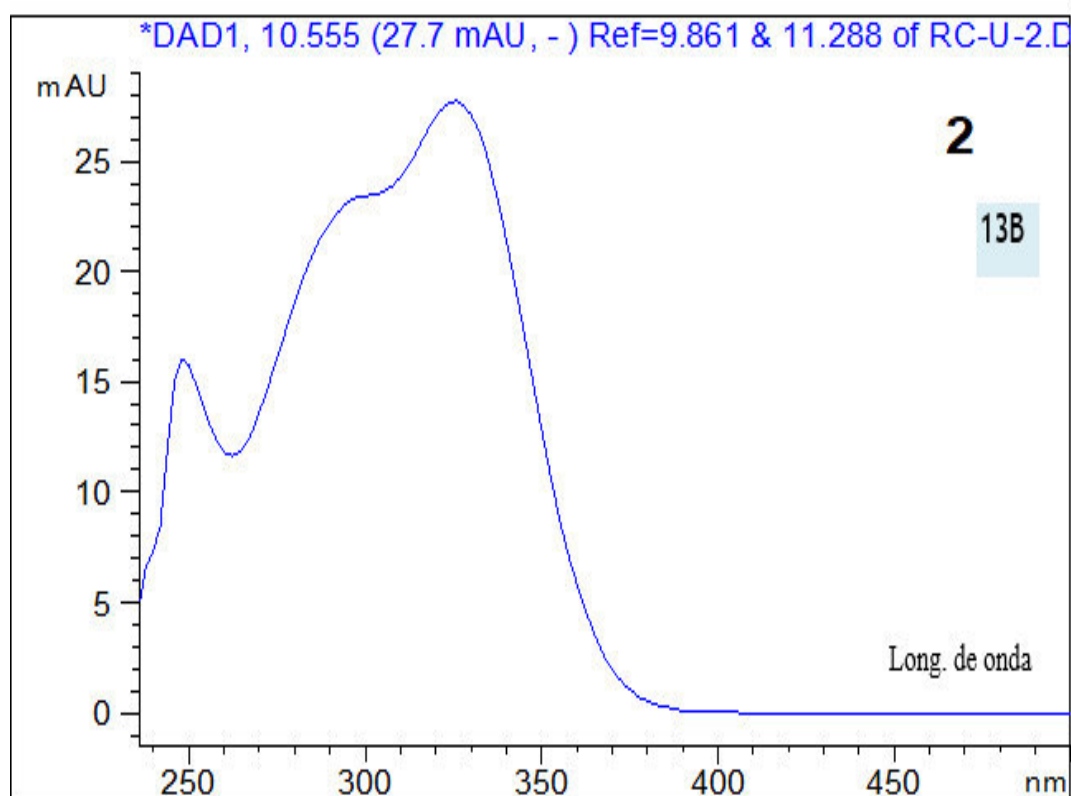
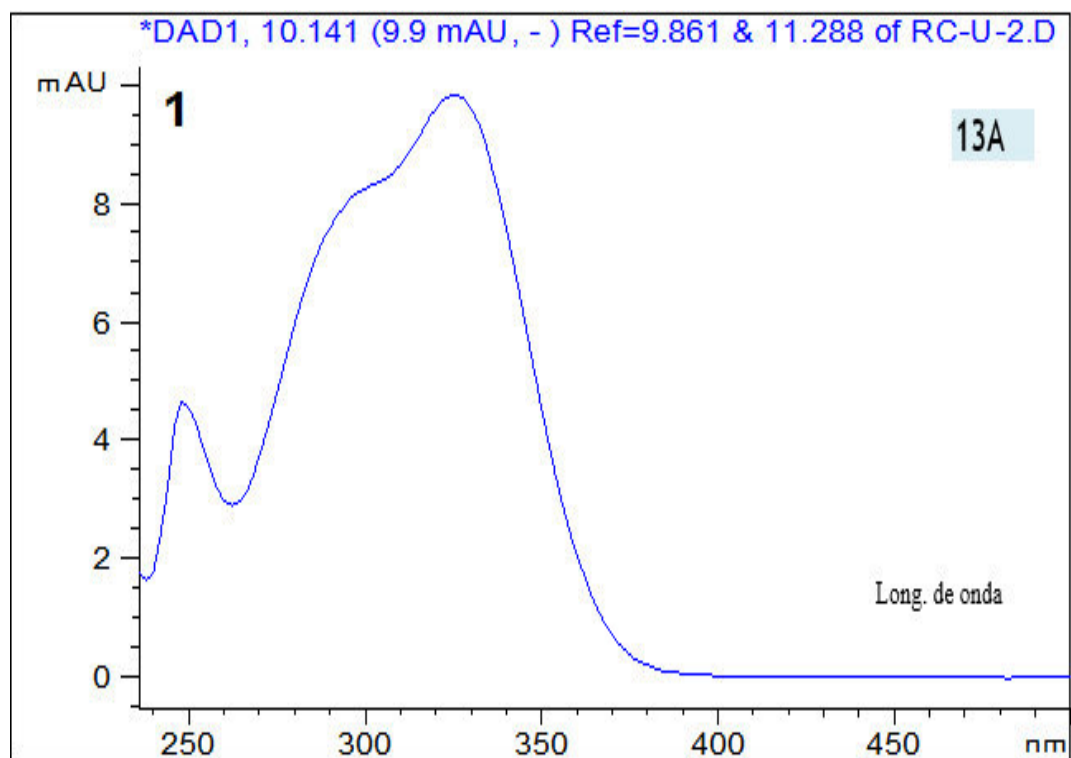


Figura 13. Curvas espectrales por HPLC-DAD de los ácidos fenólicos del EU

Las curvas 13A y 13B corresponden al pico 1 y 2 de la Fig. 12

Fuente. Datos propios

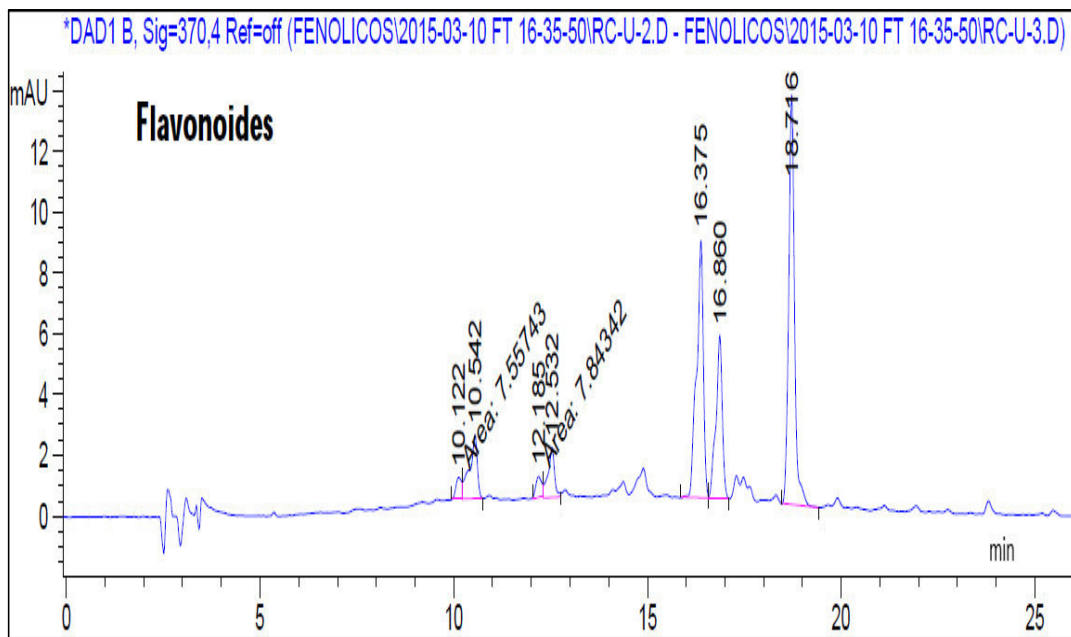


Figura 14. Perfil cromatográfico (I) de flavonoides del EU
Fuente. Datos propios

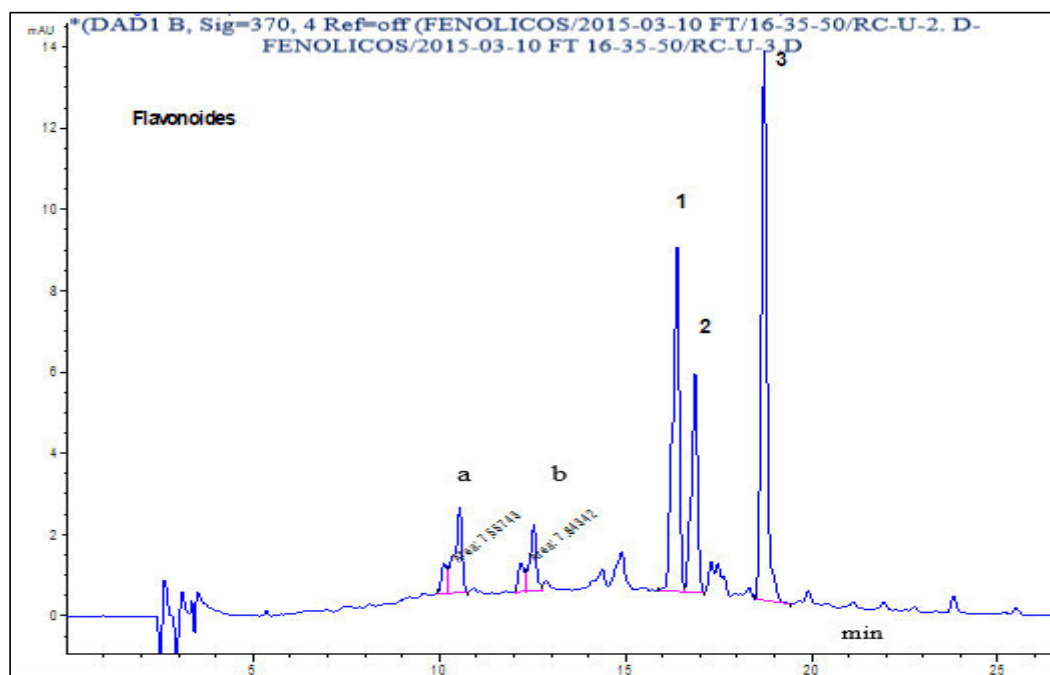


Figura 15. Perfil cromatográfico (II) de flavonoides del EU.
a=Área= 7.55743, b=Área=7.84342
Fuente. Datos propios

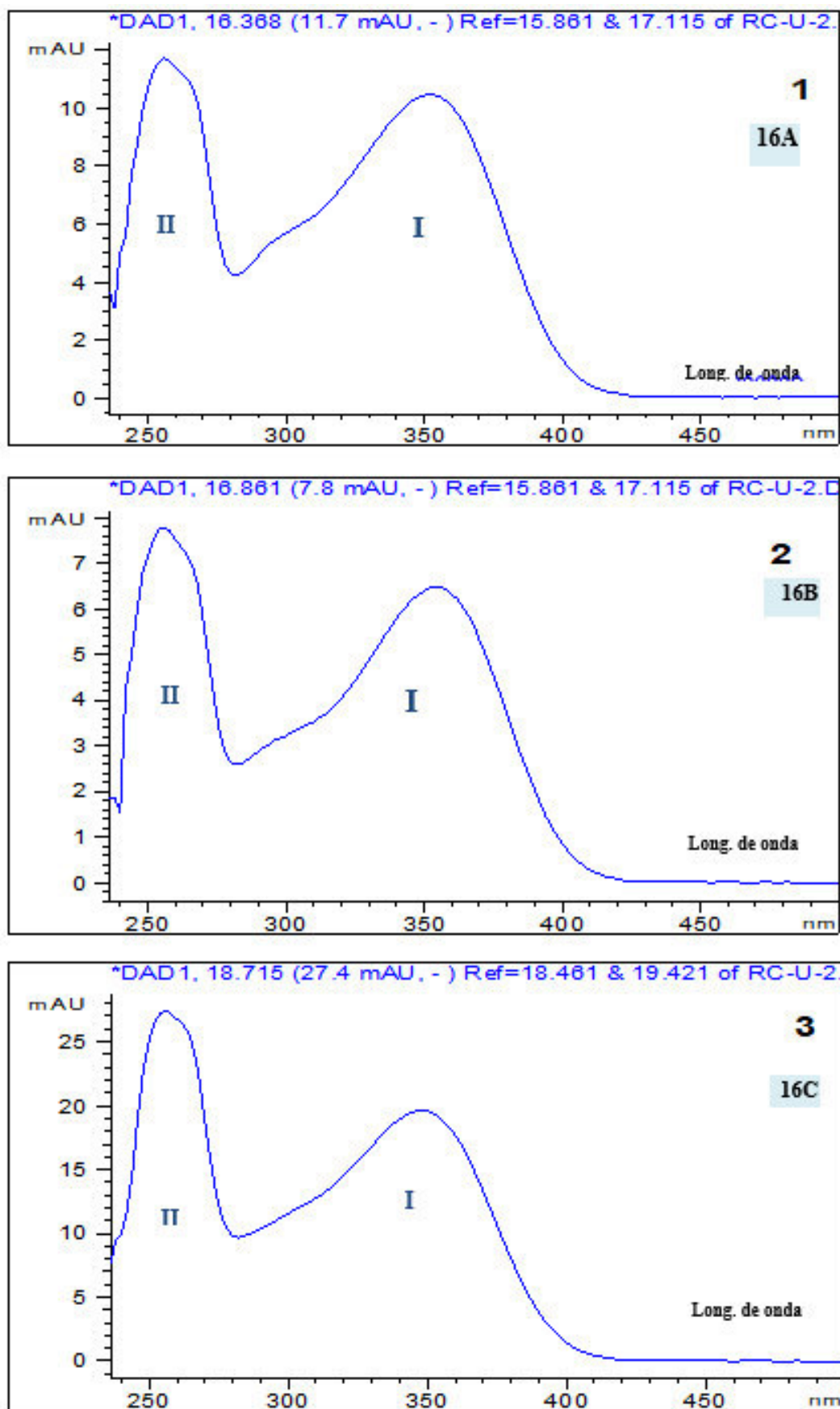


Figura 16. Curvas espectrales de flavonoides del EU.
 Las curvas 16A, 16B y 16C corresponden a los picos 1, 2 y 3
 visto en la Fig. 15. Fuente: Datos propios

Tabla 12. Características de los picos del grupo de flavonoides obtenidos por HPLC-DAD

Muestra Extracto de Uvilla				
Signa 0:	Sig =370,4	Ref=off		
Pico	RT (min)	Ancho (min)	Área (mAUxs)	Área %
1	10.122	0.173	7.557	2.046
2	10.542	0.197	29.758	8.057
3	12.185	0.184	7.843	2.124
4	12.532	0.165	19.479	5.274
5	16.375	0.169	102.849	27.848
6	16.86	0.164	60.927	16.497
7	18.716	0.158	140.91	38.153

RT: Tiempo de retención *Fuente*. Datos propios

La tabla **12** describe los tiempos de retención (RT) del grupo de los FLA desde **10.122** hasta **18.716** minutos, la anchura de retención, del área (min) y el porcentaje de área de siete picos. Resultando los picos 5 y 6 y 7 con mayores áreas que los demás picos, del grupo de los FLA, tal como se visualiza en la figura **16**.

La figura **17** representa el cromatograma mediante HPLC-DAD del EU con 3 picos. Se puede visualizar que la detección se realizó a una longitud de onda **520.4** nm que caracteriza a las antocianinas (ANT). Luego, se hizo el análisis de cada pico mediante barrido en la región UV-Vis, debido a que este metabolito presenta espectro de absorción típico que caracterizan al grupo de las antocianinas.

La tabla **13** describe los tiempos de retención (RT) desde **12.181** a **15.057** minutos, anchura de retención (min) el área y su respectivo porcentaje de área de tres picos del grupo de ANT, correspondiendo a los de mayor área los picos 1 y 2.

La figura 18 comprende las curvas espectrales 18A, 18B, y 18C obtenido por barrido desde 240 a 650 nm de los picos 1, 2 y 3 de la figura 17.

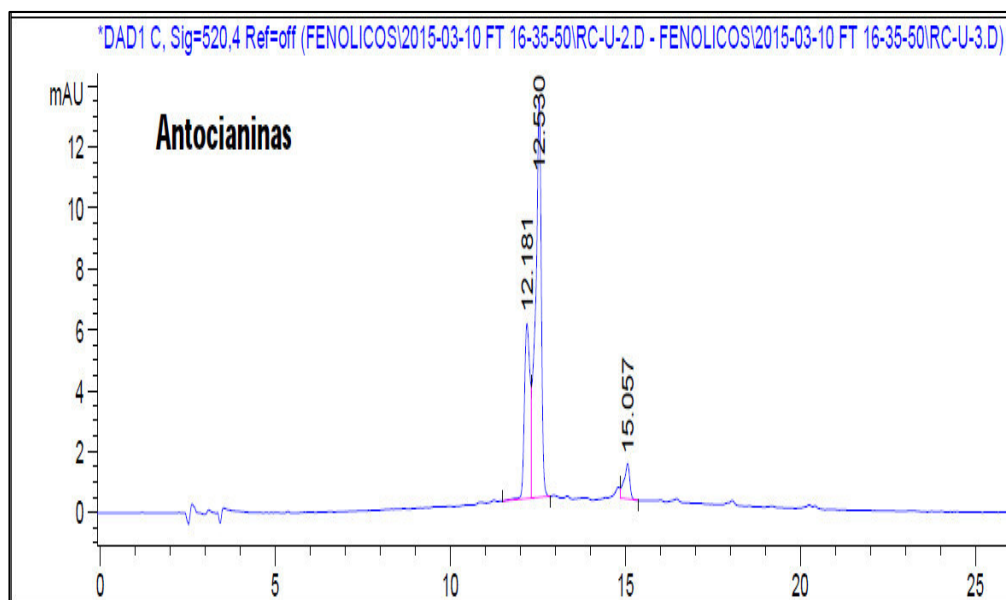


Figura 17. Perfil cromatográfico del grupo de las antocianinas del EU

Fuente. Datos propios

Tabla 13. Características de los picos del grupo de antocianinas obtenidas por HPLC-DAD

Muestra: Extracto de Uvilla

Signal 0: Sig =520,4

Pico	(min) (min)	Ancho (min)	Área mAuxs	Área %
1	12.181	0.171	64.792	28.47
2	12.53	0.164	149.254	65.584
3	15.057	0.162	13.531	5.946

RT: Tiempo de retención Fuente. Datos propios

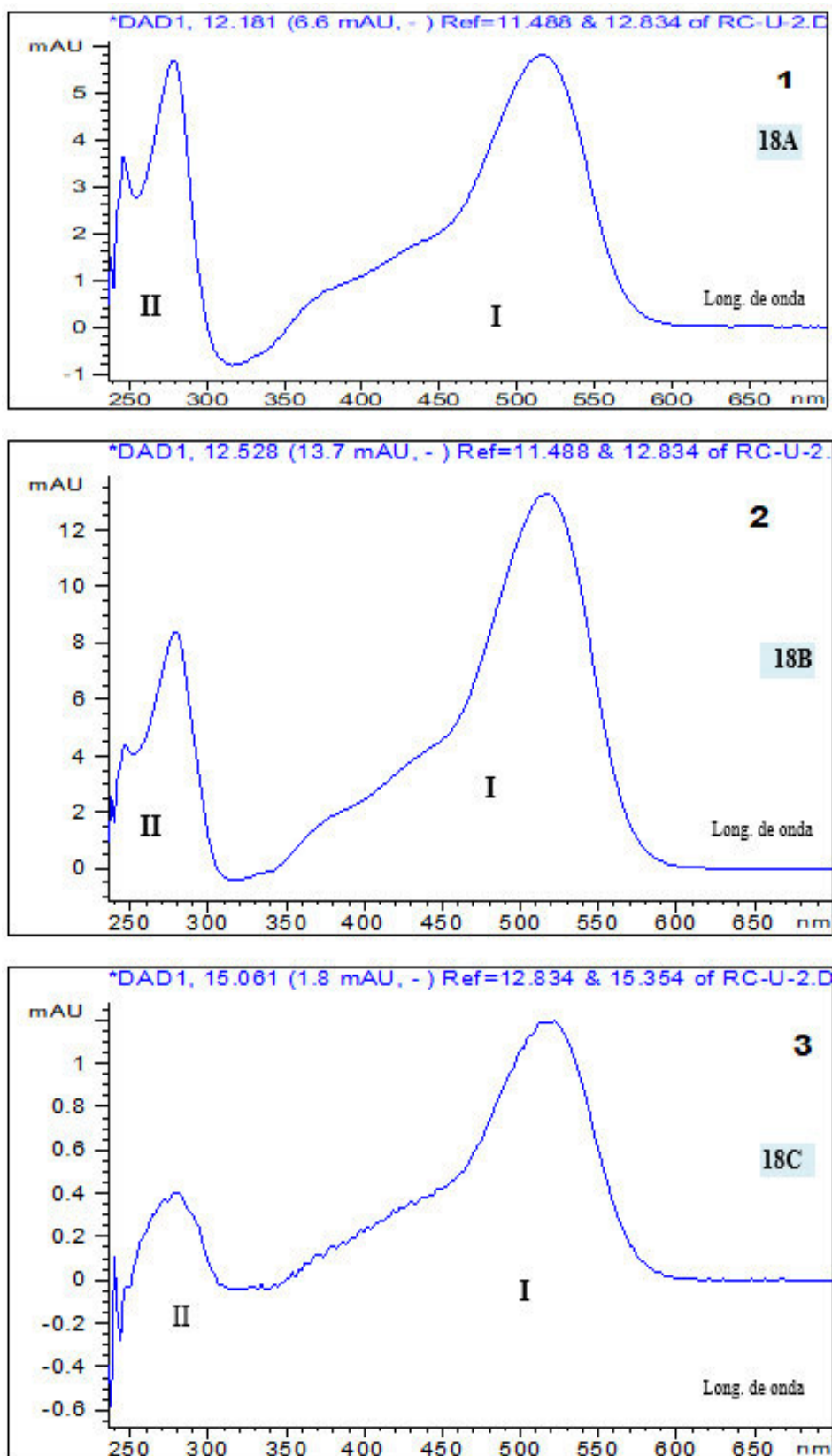


Figura 18. Perfil de curvas espectral de antocianinas del EU

El perfil de curvas de 18A, 18B y 18C corresponden al pico

1, 2 y 3 de la figura 17. Fuente. Datos propios

4.1.7.2. Análisis de compuestos fenólicos del extracto de uvilla por HPLC-DAD-EM

Los compuestos fenólicos del extracto del EU fueron caracterizados usando HPLC y la señal de los picos fue confirmada por el espectrómetro de masa.

La figura 19 muestra el perfil cromatográfico por HPLC-DAD-MS del EU con diecinueve picos. La tabla 14 muestra las características del análisis del espectrómetro de masa.

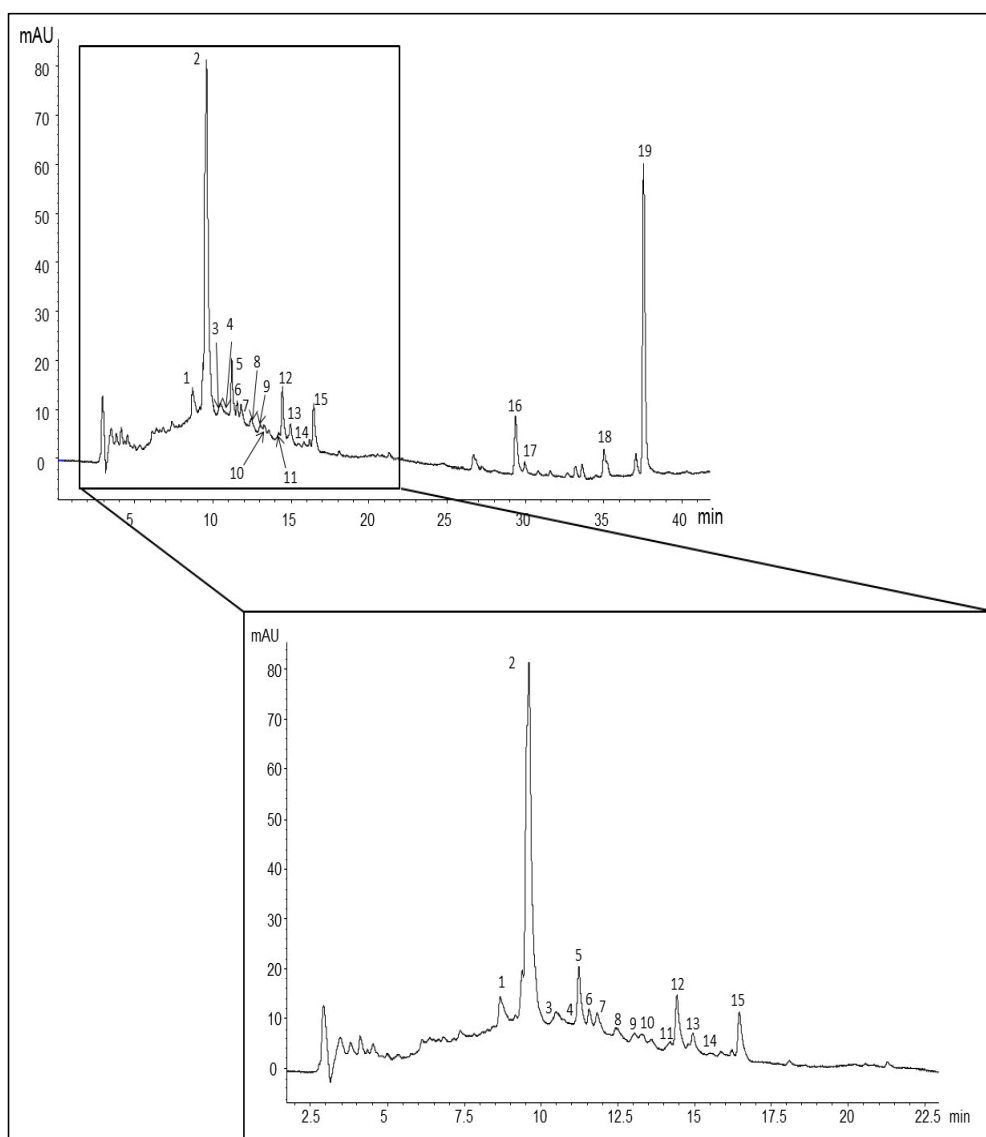


Figura 19. Perfil cromatográfico HPLC-EM/EM de compuestos fenólicos del EU de *Pourouma cecropiifolia*

Fuente: Resultados propios

Tabla 14. Análisis de HPLC-DAD-EM/EM: Componentes bioactivos EU de *P. cecropifolia*

Pico	Tiempo de retención (min)	λ max (nm)	M+H] ⁺ ión molecular m/z	Principal fragmento m/z	[M-H] ⁻ ión molecular	Principal fragmento m/z	Compuesto Identificación tentativa
1	9.342	290, 330	579.3	427, 291,			Dímero de procianidina
2	9.485	296, 325			707.7*	545, 515, 353	Ácido clorogénico
3	10.455	278	867.2		865.8	577, , 287	Trímero de procianidinas
4	10.740	280			515.7	353, 323, 191	Ácido dicafeoil quínico
5	11.148	280, 520	449.3	287			Cianidina-3-glucósido
6	11.494	315	483.2	465, 363, 321			Ampelopsina glucósido
7	11.725	278	505.6	505, 490, 429, 373, 284			NI
8	12.354	260, 360	425.7	423, 407, 389, 363, 293, 162			NI
9	12.980	330	565.6	547, 529, 427			Apigenina arabinosil-glucosido ò Apigenina xiloxil-glucósido ó Apigenina glucosil-arabinosido ó (Apigenina pentosa-hexosa)
10	13.236	275, 520	535.9	287			Cianidina 3-(6" malonil) glucósido
11	14.2	280	579.2	425, 287			Dímero de procianidina
12	14.351	260, 360	611.4	465, 449, 303			Quercetina rutósido Quercetina rhamnosilgalactósido
13	14.871	260, 360	467.8	449, 358, 340, 304,			NI
14	15.52	258, 365	551.8	303			Delfinidina 3-(malonil) glucósido, o Quercetin hexósido malonato
15	16.409	260, 340			449.8	303, 179, 152	Dihidroquercetina-O-rhamnósido
16	29.387	278	295.9	277, 165			NI
17	29.94	272	334.6	277			NI
18	34.982	280	270.6 352.9	133 329, 145			NI
19	37.538	276, 283	270.6 406.6	365 613.9			NI
20	46.869	280	543.1	365			NI
21	50.155	280	509.7	490, 423, 342, 204			NI

NI: No identificado, *Ion detectado como [2M-H]. Fuente. Resultados propios

4.1.8. Análisis cinético del extracto de uvilla sobre la actividad hialuronidasa.

4.1.8.1. Proceso enzimático hialuronidasa. Parámetros cinéticos

La primera etapa consistió en formar una gradiente de turbidez, propia del AcH, e indica sustrato no digerido. La turbidez generará absorbancias crecientes según el aumento de las concentraciones de AcH a 16, 32, 48, 64, y 80 $\mu\text{g/mL}$.

La segunda etapa intervino la acción de la hialuronidasa, es decir, hubo actividad enzimática al hidrolizarse el AcH, produciéndose la reducción de la turbidez del AcH.

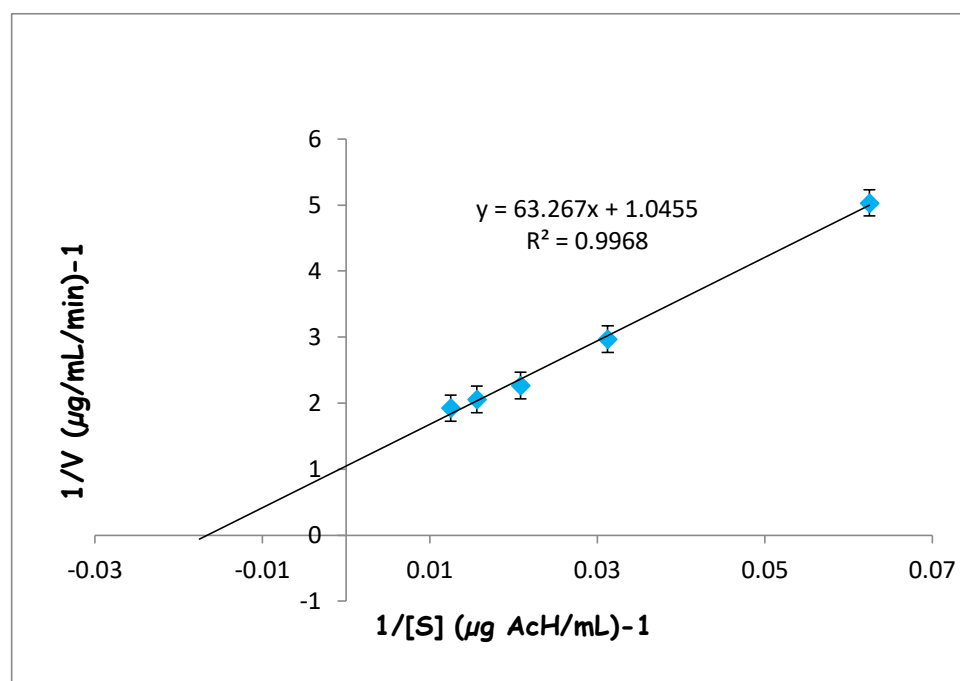


Figura 20. Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad hialuronidasa

$1/[S]$: Concentración de sustrato (AcH: 0.013, 0.016, 0.021, 0.031, 0.063 $\mu\text{g mL}^{-1}$) V : Velocidad de la reacción de AcH.

Fuente. Datos propios

Los datos obtenidos de ambas etapas fueron procesados, obteniendo los parámetros cinéticos: K_m : Constante de Michaelis Menten y $V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima, provenientes del gráfico de Lineawear-BurK (Fig.20).

$$K_m = 60.73 \pm 6.48 \mu\text{g/mL}$$

$$V_{max} = 0.96 \pm 0.08 \mu\text{g/mL/min}$$

4.1.8.2. Evaluación del comportamiento cinético de inhibición del extracto de uvilla sobre la hialuronidasa

Los resultados de la evaluación efecto inhibitorio del EU sobre la actividad de la hialuronidasa se muestra en la figura 21. Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 15.

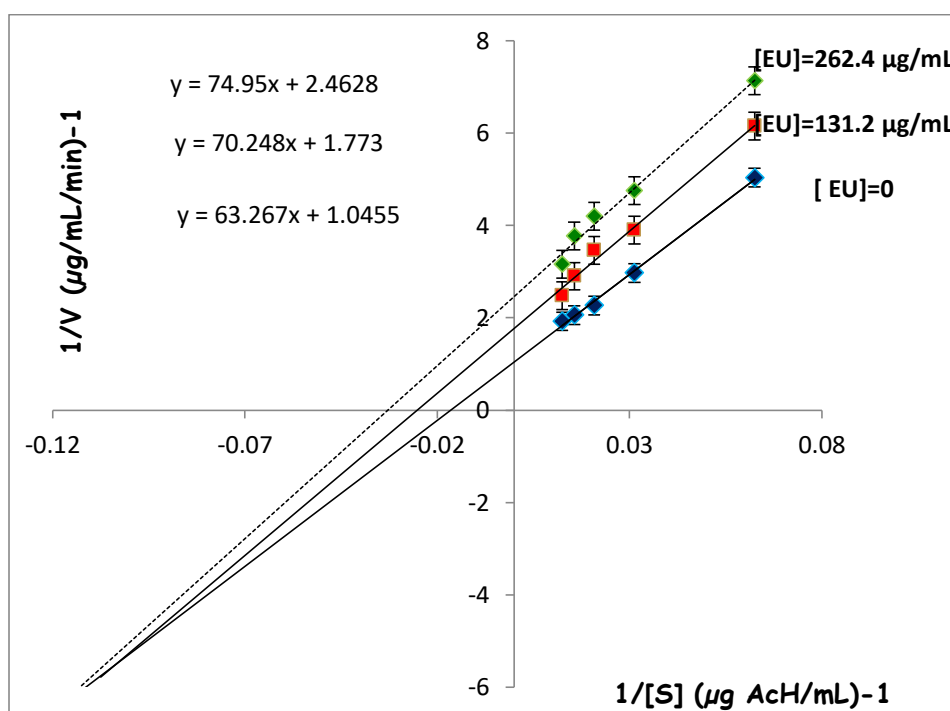


Figura 21. Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad hialuronidasa con EU (262.4 y 131.2 µg/mL) del fruto *P. cepropiifolia*

Fuente. Datos propios

Tabla 15. Resumen de los parámetros cinéticos de la hialuronidasa con dos concentraciones de EU de *P. cecropiifolia*

Parámetro	s/ EU 0 ug/mL	EU 131.2 µg/mL	EU 262.4 µg/mL
V _{máx} (µg/mL/min)	0.96 ± 0.08	0.57 ± 0.03	0.41 ± 0.02
K _m (µg/mL)	60.73 ± 6.48	39.93 ± 4.56*	30.62 ± 3.29*
Pendiente	63.24 ± 1.95	70.43 ± 4.30	75.03 ± 3.93
Valor R ²	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.01

EU: Extracto de uvilla; * Km aparente.

Fuente. Datos propios

4.1.8.3. Efecto inhibitorio de la quercetina sobre la hialuronidasa. Ensayo de Validación

La figura 22 muestra la actividad enzimática Hiasa con quercetina (12.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y sin quercetina.

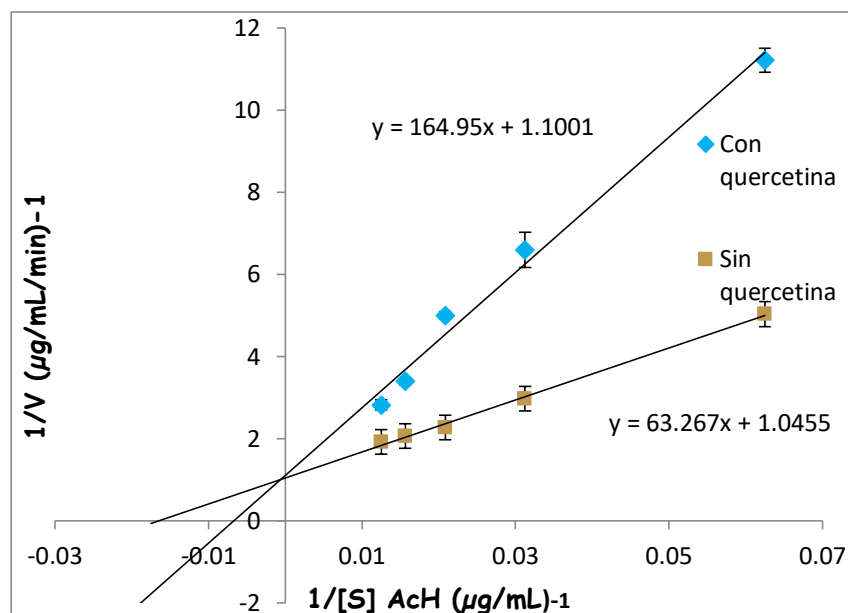


Figura 22. Gráfico de Lineawear-Burk de la actividad de hialuronidasa con quercetina y sin quercetina

Fuente: Datos propios

Los parámetros cinéticos con presencia de quercetina fueron:

$$\begin{aligned}
 K_m &= 149.50 \pm 9.54 \mu\text{g}/\text{mL} \\
 V_{\text{máx}} &= 0.91 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}/\text{min} \\
 \text{Pendiente} &= 164.50 \pm 2.30
 \end{aligned}$$

Los parámetros cinéticos sin quercetina se muestran en la tabla 16

4.1.9. Evaluación de la concentración inhibitoria sobre la hialuronidasa. Determinación del IC_{50}

4.1.9.1. Determinación del IC_{50} del EU

Se presenta dos resultados de IC_{50} de acuerdo con el solvente utilizado. El EU disuelto en etanol al 80 % y otro en buffer acetato de sodio (BA).

La tabla 16 registra el porcentaje de la actividad antihialuronidasa por efecto del EU disuelto en etanol 80 %. El porcentaje de la actividad enzimática en presencia de EU (% Act.Enz_{EU}) se inicio con 75.51 ± 2.26 , reduciéndose hasta 9.95 ± 2.98 . Sin embargo, el porcentaje de inhibición fue aumentando de 13.83 ± 0.64 a 79.63 ± 1.18 , usando 0.34 a 2.72 mg/mL de EU. La actividad enzimática sin EU fue 89.62 ± 2.63 % en cada uno de los cinco tubos.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del EU en etanol 80% sobre la actividad hiasa

EU (mg/mL)	% Act.Enz _{EU}	% Inhibición
0.34	75.51 ± 2.26	13.83 ± 0.64
0.68	62.22 ± 3.35	27.17 ± 3.56
1.36	41.78 ± 2.25	47.8 ± 1.37
2.04	21.60 ± 1.95	68.01 ± 1.21
2.72	9.95 ± 2.98	79.63 ± 1.18

% Act. Enz-EU: Porcentaje de actividad enzimática con extracto de uvilla. *Fuente.* Datos propios

La tabla 17 exhibe el % Act.Enz_{EU}, en buffer acetato, se inició con 80.01 ± 1.02 y fue disminuyendo hasta 12.10 ± 3.30 %, mientras que,

el porcentaje de inhibición hialuronidasa se fue incrementando a 8.70 ± 1.39 hasta 76.60 ± 3.81 %. En este caso la actividad hialuronidasa sin EU, se inicio con 89.90 ± 0.80 %.

Tabla 17. Porcentaje de inhibición del EU en buffer acetato sobre la actividad hiasa

EU (mg/mL)	% Act. EnzEU	% Inhibición
0.34	80.01 ± 1.02	8.70 ± 1.39
0.68	72.67 ± 1.90	15.85 ± 1.77
1.36	42.90 ± 2.17	46.00 ± 1.93
2.04	28.57 ± 0.68	58.00 ± 1.60
2.72	12.10 ± 3.30	76.60 ± 3.81

% Act. Enz-EU: Porcentaje de actividad enzimática con extracto de uvilla. *Fuente:* Datos propios

La figura 23 muestra los porcentajes de la actividad antihialuronidasa de la quercetina y la dexametasona. Podemos ver que varió de 12.14 ± 0.92 a 88.66 ± 0.74 % para la dexametasona y 11.16 ± 0.19 a 79.04 ± 1.13 % para quercetina, a concentraciones de 40 a 320 y 6.4 a 44.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

4.1.9.2. Determinación del IC_{50} de las sustancias de referencia

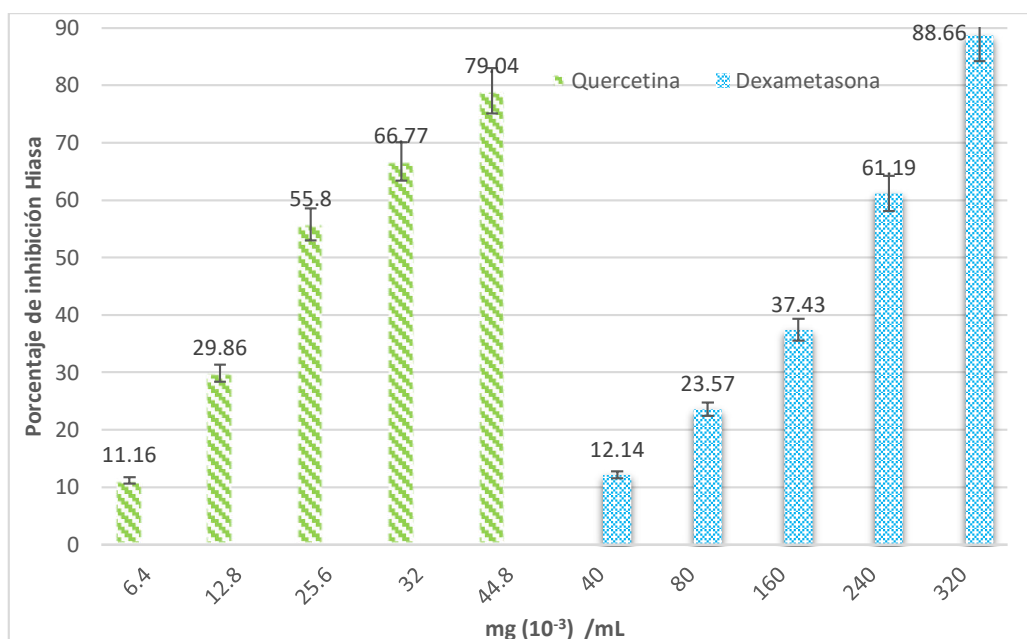


Figura 23. Porcentaje de inhibición de la actividad hialuronidasa por efecto de la dexametasona y la quercetina.

Fuente. Datos propios

Tabla 18. IC_{50} del EU, dexametasona y la quercetina

Muestras	Ecuación de la recta	IC_{50} (mg/mL)
EU con etanol 80%	$y = 29.542 + 4.219$	1.55 ± 0.06
EU con BA	$y = 29.334x - 0.2912$	1.72 ± 0.10
Quercetina	$y = 1775.6x + 5.2195$	0.03 ± 0.01
Dexametasona	$y = 266.45x - 0.2262$	0.19 ± 0.02

EU: Extracto de uvilla, BA: Buffer acetato sódico. (Concentraciones de quercetina y dexametasona ver tabla 19)

Fuente. Datos propios.

El promedio de IC_{50} de los grupos EU con etanol 80% y con BA, se obtuvo de tres repeticiones. Se aplicó la prueba de t-student resultando $t = 2.5248$ y $p = 0.065$. Como $p = 0.065 > 0.05$, no existe estadísticamente diferencias de medias entre los grupos.

4.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

Pourouma cecropiifolia C Martius es un árbol frutal nativo de la Amazonia peruana, perteneciente a la familia de Cecropiaceae cuyos frutos son de consumo extendido por la población rural (González, 2007 y Brack, 1999).

En el año 1975, *National Academy of Science* destaca la importancia de la uvilla, manifiestan que existe desconocimiento de su potencial industrial, su procesamiento, preservación, su uso como saborizante y su valor nutricional. Por otro lado, Villachica (1996) reportó que los árboles son de rápido crecimiento representando los frutos, materia prima para la agroindustria.

Los resultados del análisis proximal de la fruta *P. cecropiifolia* recolectado en Puerto Maldonado fue registrado en la tabla 2 revelando ligeras diferencias con el reporte de Arias (2011). Así también, existe diferencias con los estudios de Villachica (1996), Sotero *et al.* (2011) y Lopes *et al.* (1990). Fundamentalmente la explicación se debería a la técnica de análisis y a los factores medioambientales de la especie. Al respecto, Brack (1999) manifiesta que la fruta presenta diversidad genética y variación en la madurez del fruto. Para realizar el presente análisis se usó la cáscara con pulpa, mientras que los autores mencionados analizaron la pulpa de la uvilla.

Los resultados del contenido de zinc y cobre fueron más elevados que lo reportado por Lopes *et al.* (1990). El conocimiento del potencial nutricional de las frutas tropicales es una de las áreas de investigación prioritaria para nuestro país. Con el fin de lograr incrementar su consumo, cultivo, comercialización y puede ser usado como insumo en la industria alimentaria y farmacéutica.

Respecto al rendimiento del extracto, se obtuvo 9.59 ± 2.12 g/100 de la fruta de uvilla, este valor es comparable a lo reportado por otras frutas tropicales en las especies *Oenocarpus bataua* (ungurahui) y *Euterpe oleracea* (acai) cuyos rendimientos fueron 10.5 ± 2.0 y 10.5 ± 0.3 g/100 g

de pulpa, respectivamente (Rezaire *et al.*, 2010) siendo estos valores cercanos al presente estudio.

En la tabla 4 se aprecia los resultados del análisis fitoquímico preliminar del EU. Se logró detectar diez compuestos, destacando los metabolitos secundarios tales como flavonoides, triterpenoides, antocianinas, polifenoles, alcaloides y terpenos. La presencia de estos metabolitos es comparable con lo encontrado por Arias (2011) quien, detectó flavonoides, fenólicos, taninos, alcaloides y esteroides. También, Camargo *et al.* (1991) encontraron flavonoides, taninos, triterpenoides y cumarinas. Por otro lado, Guio *et al.* (2010) estudiaron la pulpa de *Pourouma cecropiifolia* y determinaron dioles monoterpénicos como compuestos volátiles, sugiriendo que sean precursores del linalol, compuesto importante en el aroma de la pulpa de esta fruta. Por tanto, la presencia de terpenos en el presente estudio estaría relacionada con los compuestos aromáticos de la pulpa. Respecto a la presencia de triterpenos, Lopes, Koketsi, Carauta, de Olivera y Kaplan (1999) analizaron el aceite esencial de las hojas, corteza de tallo y flores de *P. guianensis*. Esta especie crece en las zonas de Rio de Janeiro y en ella encontraron monoterpénicos oxigenados, sesquiterpenos, y derivados aromáticos como salicilato de metilo. En tanto que, Torres-Santos *et al.*, (2004) aislaron, de las hojas de *P. guianensis* compuestos tales como triterpenoides (ácido ursólico y ácido oleanólico) con actividad antileishmanía.

Los compuestos bioactivos de vegetales son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas que generalmente les confieren un sabor único y propiedades que promueven la salud (De la Cerda, López, Nuñez, Peña y Obregue, 2015). El extracto fenólico de especies vegetales esta constituido de una mezcla de grupos fenólicos que difiere en el número y arreglo, tanto de grupos metóxilos e hidroxilos en el anillo aromático de ácidos fenólicos, flavonoides y otros compuestos relacionados (Naczki, M., Amarowicz, Zadernowsk, Pegg y Shahidi, 2003).

El CPT fue 96.90 ± 4.26 mg/EAG/100g y 142.25 ± 3.19 mg EAClo/100g de fruto fresco (tabla 5). Según el análisis de HPLC y HPLC-DAD-MS

efectuado al EU (tabla 14) el ácido fenólico predominante en el EU fue el ácido clorogénico, el cual pertenece al grupo de los ácidos hidroxicinámicos detectado por HPLC (figura 13). Mientras que, el ácido gálico no fue detectado. En la actualidad, no hay reportes anteriores de CPT de la cáscara con pulpa de la uvilla en base a estos ácidos fenólicos. Sin embargo, existe investigación en frutos de *P. cecropiifolia* recolectados en Manaos, Amazonas, Brasil, realizado por Lopes et al. (2010) cuyos resultados fueron 84.66 ± 1.22 mg EAG en 100 g de cáscara y 8.85 ± 3.74 mg EAG en 100 g de pulpa, mientras que nuestra muestra consistió de cáscara con pulpa.

Sotero *et al.* (2011) analizaron CPT de frutos de uvilla recolectado en Iquitos, resultando la cáscara y la pulpa con 12.72 ± 0.52 y 35.35 ± 0.26 mg equivalente de catequina/100g, respectivamente. La catequina difiere de los ácidos gálico y clorogénico usados como referencia en el presente estudio, por ello no fue posible compararlo. El CPT de la uvilla fue comparado con la especie *Vitis vinifera* "uva" debido a la analogía física con el fruto de *P. cecropiifolia*. El estudio fue reportado por Marinova, Ribarova y Atanossova (2005), detectaron 213.3 mg EAG/100g de fruta fresca de uva. Los autores realizaron la extracción con nitrógeno líquido, usando metanol acuoso 80 %, y con ultrasonido. Mientras que, para la obtención de EU no se aplicó estas condiciones durante el proceso de extracción, que posiblemente incrementaría el contenido de polifenoles. Entonces los resultados del EU fueron 96.90 ± 4.26 mgEAG y 142.25 ± 3.19 mg EAClo en 100 g de fruta fresca en ambos casos y estos valores se incrementaron cuando se represento en base seca de la fruta. (tabla 5).

Los flavonoides forman parte de los polifenoles, y poseen variaciones estructurales a medida que surgen diferentes sustituciones. Se encuentran predominantemente en forma glicosilada que como aglicona; estos cambios impactan en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. (González, Ballester, López y Suárez, 2011). El contenido de fenoles y flavonoides son parámetros importantes que establecen tanto la calidad del fruto como el potencial biológico Marinova *et al.* (2005).

Los valores del CFT del EU fueron 70.15 ± 2.99 mgECA/100g y 61.72 ± 17.00 mgEQ/100 g de fruto (tabla 6). El hallazgo de flavonoides coincide con los resultados por HPLC registrados en las figuras 14, 15 y 16 (ítem 4.1.7.1) que manifestaron presentar varios flavonoides en el EU.

En la actualidad, la literatura no registra del CFT de la uvilla. No obstante, se comparó con otras frutas, tales como la uva (*Vitis vinífera*), pera (*Pyrus communis*), fresa (*Fragaria vesca*), manzana (*Malus pumil*) e higo (*Ficus carica*), se encontró en cada uno 77.1, 69.9, 69.7, 48.6 y 20.2 mg ECA/100 g, respectivamente. (Marinova *et al.*, 2005).

Varios estudios han demostrado que existen muchas variaciones en el contenido de flavonoides en una misma especie de diferentes regiones (Gobbo-Neto *et al.*, 2007) y la concentración puede aumentar en respuesta al estrés del medio ambiente, que puede ser causado por enfermedades, altitud, contaminación atmosférica, nutrientes, clima y radiación ultravioleta (Macedo *et al.*, 2013).

Moo *et al.*, (2015) informaron que el metanol al 80 % asegura una extracción máxima de fenoles solubles y flavonoides de frutas tropicales. Asimismo, Hasbay, Celin y Hayindin (2007) reportaron que los solventes orgánicos acuosos como el extracto metanólico al 80 % proporciona eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos que los solventes monocomponente. Por esta razón se eligió este tipo de solvente para el presente estudio.

Garzón, Narvaés, Riedl y Schwart (2010) argumentaron que las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos pueden ser explicadas parcialmente debido a las diferencias en las condiciones de cultivo (temperatura y lluvia, factores estacionales, genéticos y agronómicos). En tanto que, Tomás-Barberan y Espin (2001) justifican la variación al estado de maduración de los frutos.

En la tabla 7 se muestra el contenido de antocianinas, así tenemos que el EU tuvo 34.82 ± 6.03 mg E_{Ci}/Kg de fruta fresca. Este dato es comparable con los reportes de Kayesh et al., (2013), cuyos valores de antocianinas para la uva roja fue de 30 a 750 mg/Kg, de la fresa 19 a 55 mg/Kg y frambuesa 20 a 687 mg/Kg. En otro trabajo, Abe, Da Mota, Lajolo y Genovese (2007) evaluaron seis variedades de *Vitis vinífera* encontrando 12.8 ± 0.1 a 248 ± 2.4 mg/100 g. En ambos estudios las variaciones son notables. En otro estudio realizado por Barrios *et al.* (2010b) analizaron tres fracciones de un extracto metanol/ácido acético (19:1 v/v) de la cáscara de la fruta de *P. cecropiifolia*. Los contenidos de antocianinas de las fracciones fluctuaron entre 2.6 ± 0.8 a 95.3 ± 5.6 mg de E_{Ci}/100 mg de extracto de la cáscara y resulto tener efecto citotóxico hacia diferentes líneas celulares de cáncer. En tanto, Lopes *et al.* (2010) analizaron por HPLC-DAD-EM y determinaron el contenido de antocianinas en la cáscara de la uvilla, obteniendo 420.26 ± 3.07 mg/kg de peso fresco de cáscara. Este valor es elevado por que los autores usaron como muestra única la cáscara, en nuestro caso el contenido de ANT es de un extracto que provino de la cáscara y la pulpa.

El contenido de vitamina C fue 1.86 ± 0.10 mg AA/100 g de fruta (tabla 7), este resultado fue superior a los reportes de Lopes et al., (1999) y Villachica (1996) quienes evaluaron la fruta *P. cecropiifolia* encontrando 0 y 0.6, respectivamente. Sin embargo, los resultados de Arias (2011) y Sotero *et al.* (2011) muestran valores muy superiores (4.89 y 2.45 ± 0.20 mg de AA/100 g de fruta) a nuestro estudio. Esta diferencia probablemente se deba a la metodología y al solvente (metanol/ acuoso 80:20 v/v en ácido fórmico usados en la extracción de los compuestos bioactivos, considerando que la vitamina C es soluble en sistemas acuosos. Otra explicación fue proporcionada por Aymoto, Genovese y Lajolo, (2005) al señalar que las frutas congeladas muestran bajo contenido de vitamina C cuando son comparadas con frutas frescas. Similar efecto podría haber sucedido en la fruta de uvilla y en el EU, el almacenamiento en frío podría haber ocasionado bajo contenido de vitamina C. En ese sentido, Lesem (1988) manifestó que la vitamina C se oxida en condiciones de pérdida de

agua o estrés hídrico, alterando el sistema de captación de radicales libres en el tejido del vegetal. Esta oxidación del AA, explica Rufino *et al.*, (2010), promueve el comportamiento prooxidante del AA, al parecer, se debería a la formación de radicales de ascorbilo durante el proceso de oxidación.

La capacidad antioxidante del EU de la fruta *P. cecropiifolia* fue evaluada, aplicando los métodos de poder reductor y la capacidad de captación de los radicales ABTS y DPPH. La razón de aplicar varios métodos fue fundamentada por Prior, Wu y Schaich, (2005) y Pérez-Jiménez *et al.* (2008), quienes señalan que los antioxidantes actúan por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaría y el oxidante.

Los resultados del poder reductor del EU fueron registrados en la figura 6 usando como control positivo al ácido ascórbico (AA). En la figura se aprecia las concentraciones de EU de 60 a 480 $\mu\text{g/mL}$ y sus correspondientes absorbancias de 0.25 ± 0.01 hasta 0.79 ± 0.02 . Los valores de IC_{50} con $169.12 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ para el EU y $4.96 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$, para el AA, es decir, el AA tendría 34 veces más capacidad reductora que el EU.

Al respecto, Barreira *et al.*, (2008) estudiaron la actividad antioxidante de las flores de castaña por los métodos PR y del radical DPPH; obteniendo valores de IC_{50} muy diferentes de 87.3 y 74.9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el caso de EU los IC_{50} tuvieron también variaciones similares de 169.12 ± 1.29 (ítem 4.1.6) y $134.44 \pm 1.62 \mu\text{g/mL}$ (tabla 8) para PR y el radical DPPH respectivamente (tabla 8). Esta diferencia se debería al hecho que el EU fue disuelto en agua por qué el sistema de reacción del PR trabaja de esta manera. Este hecho ocasionó posiblemente la disminución de la expresión de moléculas reductoras de naturaleza apolar del EU, manifestándose solamente las moléculas polares con propiedades reductoras.

Mientras que con el método DPPH, el EU estuvo disuelto en metanol acuosos, haciendo propicio la expresión de moléculas reductoras polares y no polares por lo tanto aumento el potencial antioxidante.

La figura 6 muestra el perfil del PR del EU. Se aprecia que las absorbancias ascienden en función al incremento de la concentración de EU. Similar perfil se aprecia en el reporte de Beyhan *et al.* (2010) de la fruta *Acca sellowiana*. Actualmente, no existen trabajos previos sobre el poder reductor de la fruta de uvilla, razón por la cual no fue posible compararlo.

Los resultados del poder reductor del EU de la fruta *P. cecropiifolia* demostraron su capacidad antioxidante. Varios investigadores fundamentan esta acción, así Kondo, Kurihara, y Fukuhara (2001). exponen que la capacidad se debe a la presencia de compuestos fenólicos con múltiples grupos hidroxilos de flavonoides y antocianinas, los cuales donan átomos de hidrógeno, quelan metales y tienen la habilidad de captar radicales libres. También, Ferreira *et al.*, (2007) explican que la presencia de sustancias reductoras ejercería acción antioxidante al destruir la cadena del radical libre al donar un átomo de hidrógeno.

La figura 7 y 8 exhibieron la actividad antioxidante del EU mediante el método de captación de radicales ABTS y el DPPH. Se observa que los porcentajes de capacidad de captación de ABTS y DPPH aumentaron progresivamente según se incrementaba la concentración de EU. En el caso del radical ABTS, el EU en algunos puntos de 42, 84 y 126 $\mu\text{g/mL}$ se observaron notorio incremento, mientras que con el método del radical DPPH, se aprecia en los puntos 42, 84 y 168 $\mu\text{g/mL}$. Se evidenció que los compuestos fenólicos del EU reaccionaron más efectivamente con el radical ABTS que con el radical DPPH. el cual estaría relacionado directamente con los componentes antioxidantes presentes en el EU.

La tabla 8 muestra los resultados de los IC_{50} de las referencias y del EU mediante los ensayos de ABTS y DPPH. Los valores de IC_{50} de las referencias presentaron el orden siguiente: ácido ascórbico > trolox >

quercetina. Este orden fue inverso a su potencial antioxidante. Por ejemplo, la quercetina con $1.06 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ tuvo la posibilidad de captar o eliminar el 50 % de radical ABTS y de DPPH que las demás sustancias. Resultado comparable con el informe de Majewska, Skrzcki, Podsiad y Czczot (2011) indicando el efectivo potencial antioxidante que tiene la quercetina frente a los radicales libres.

Al comparar los valores IC_{50} de las referencias con el EU, se observan valores muy distantes. Los IC_{50} de trolox, AA y quercetina tendrían 47, 44 y 108 veces más capacidad de captación o eliminación del 50 % de los radicales ABTS que el .EU.

El IC_{50} del EU por ABTS (Tabla 8) presento menor valor ($115.07 \pm 1.30 \mu\text{g/mL}$) demostrando tener mayor capacidad de captación de radicales ABTS que el valor IC_{50} del EU por DPPH. Estos resultados fueron explicados por Beserra *et al.*, (2011), menciona que el radical ABTS puede solubilizarse en sistemas acuosos y en medios orgánicos, permitiendo que la actividad antioxidante pueda ser medida debido a la naturaleza hidrófila y lipófila de estos compuestos. Mientras que el DPPH se aplica para extractos acuosos-orgánicos.

Los IC_{50} obtenidos por el método de DPPH son frecuentemente categorizados en niveles de antioxidante. Por ejemplo, Mau, Chang, Huang y Chen (2004) informan que valores bajos de IC_{50} de extractos vegetales presentarán mayor eficiencia en las propiedades antioxidantes cuando los valores de IC_{50} están por debajo de 10 mg/mL. En el caso del EU se obtuvo $134.44 \pm 1.62 \mu\text{g/mL}$ por lo tanto sería de buena actividad antioxidante. Mientras que Muñoz, Atha, Ma y Kennelly (2002), agruparon los IC_{50} en 4 niveles de antioxidante (baja, media, alta y muy alta) de acuerdo a sus valores de IC_{50} . Entonces, se puede inferir que el EU tendría baja capacidad antioxidante. ($\text{IC}_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ a $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$). Actualmente, no existe un consenso de categorizar los valores de antioxidantes mediante estudios de las técnicas de ABTS y DPPH como lo evidencian las referencias consultadas.

Investigaciones previas sobre la actividad antioxidante de la fruta de uvilla fue reportado por Sotero *et al.* (2011), el estudio se realizó en extractos metanólicos de la pulpa y de la cáscara de la uvilla en muestras secas. Reportaron que la pulpa de uvilla a 1000 µg/mL de extracto secuestra 21.55 % de radicales DPPH, sin embargo, la cáscara a esa misma cantidad de extracto alcanzó 96.37% de secuestro de radicales DPPH. Mientras que el EU tuvo 76.69 % de inhibición a 210 µg/mL, resultando ser muy superior la capacidad antioxidante del EU.

En la tabla 9 se exhiben los valores de capacidad antioxidante como equivalente Trolox (CAET) y equivalente a vitamina C (CAEVC). El valor de CAET fue 537.05 ± 6.00 µmoles/100 g de fruta fresca mediante el ensayo ABTS, significativamente, elevado con respecto a 529.64 ± 6.24 para DPPH. Por otra parte, Shimamura *et al.* (2014) manifiestan que valores altos de CAET significan mayor actividad de captación del radical DPPH. Por lo tanto, el EU tendría mayor capacidad antioxidante en base al método de ABTS. Esto se debería a la baja selectividad del ABTS que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilo, independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky y Lissi, 2005).

El valor de CAET-EU por DPPH fue comparado con las variedades de uva *Vitis labrusca* y *Vitis vinífera*, reportado por Tiemi Abe *et al.*, (2007) quienes obtuvieron entre 2.7 ± 0.1 a 13.8 ± 0.9 µmoles de CAET/g valores muy cercanos al EU con 5.29 ± 0.06 y 4.96 ± 0.11 µmoles/g de fruta fresca (FF) a pesar de las diferencias metodológicas entre ambas investigaciones.

Otra investigación desarrollada por Quirós-Sauceda *et al.* (2014) extrajeron con metanol 80 %, los compuestos fenólicos de la piña (*Ananas comosus* L), el mango (*Mangifera indica* L.), la papaya (*Carica papaya* L.) y la guava (*Psidium guajava* L.), cuyos valores de CAET-ABTS fueron 189.5, 224.4, 325.7 y 959.1 µmoles Equivalente trolox/100 g de FF, respectivamente, mientras que el EU tuvo 537.05 ± 6.00 µmol/100 g de FF. También se informan los valores de CAET-DPPH de las frutas con 7.20, 10.80, 9.68 y

14.30 μmol de ET/100 g de FF. Sin embargo, el EU presento un valor muy superior demostrando tener mayor capacidad antioxidante que la piña, mango y papaya.

En la tabla 9 se muestra el valor de CAEVC-ABTS con 143.80 ± 1.60 mg/100 g de FF, este resultado fue superior a 125.8 ± 3.2 y 120.0 ± 4.5 2 mg/ 100 g de pulpa fresca de mora y guayaba; pero ligeramente inferior a 161.5 ± 3.3 de la pulpa de uva (Kuskoski, García, Morales y Fett. 2006). En el caso CAEVC-DPPH del EU presento 128.78 ± 1.52 mg/100 g de FF este valor fue superior a 105.9 ± 0.4 ; 82.6 ± 2.6 ; y 100.7 ± 2.2 mg/ 100 g de pulpa fresca. correspondientes para las mismas frutas mencionadas.

Hasta la fecha no hay estudios previos sobre CAET y CAEVC ni de valores de IC_{50} de la fruta *P. cecropiifolia* para fines de comparación con el presente estudio.

Los resultados sobre la capacidad antioxidante demostraron que el EU de la cáscara con pulpa de la fruta *P. cecropiifolia* tuvo significativa capacidad antioxidante debido probablemente a una variedad de compuestos bioactivos (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y vitamina C). Similar explicación fue dada por Beserra *et al.*, (2011) al resumir que la actividad antioxidante de las frutas se atribuiría a los compuestos fenólicos, antocianinas y vitamina C. Asimismo, Aymoto *et al.* (2005) consideraron que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de varios factores como el sistema de oxidación y el grado de glicosilación de los flavonoides.

Los resultados del comportamiento cinético y la eficiencia antirradical se muestran en la figura 9 y en la tabla 10. La cinética de reacción del DPPH frente al EU presentó un tipo reacción bifásica a partir de $126 \mu\text{g/mL}$ con un rápido decaimiento en la absorbancia en los primeros minutos, seguida de una etapa más lenta en el que están implicados los productos de degradación. Similar observación fue registrada por Villaño *et al.*, (2007).

Para explicar el comportamiento cinético del EU se eligió el reporte de Sánchez-Moreno, Larrauri y Saura-Calixto, (1998b), quienes clasificaron a los polifenoles en tres categorías de acuerdo con su comportamiento cinético en base al T_{EC50} como sigue: rápido (menor de 5 min), intermedio (5 a 30 min) y lento (mayor 30 min). Además, clasificaron los valores de EA en tres niveles. Los valores de EA menores a 1×10^{-3} tienen comportamiento cinético lento; entre 1×10^{-3} a 5×10^{-3} presentan nivel intermedio y entre 5×10^{-3} a 10×10^{-3} nivel alto y superiores a 10×10^{-3} como muy alto. En el caso del EU la eficiencia antirradical del EU de *P. cecropiifolia* sería lento y de acuerdo con su valor T_{EC50} se ubicaría en la categoría intermedia (< 30 minutos).

Es importante mencionar, que, si es elevado el EA, el antioxidante ejercerá su acción con menor concentración y en menor tiempo, lo que interesa en sistemas biológicos. No obstante, si los antioxidantes actúan con una cinética lenta o intermedia, como el caso del EU, se usarían como aditivos alimentarios. El propósito puede ser mantener su acción durante un tiempo prolongado (Padilla et al., 2008).

El análisis preliminar de compuestos fenólicos del EU fue realizado por HPLC acoplado a un arreglo de diodos (DAD). Este detector es particularmente útil para confirmar los picos eluidos de sus espectros característico, así como, también verificar la pureza de los picos. El DAD puede, simultáneamente, medir la absorbancia de todas las longitudes de onda al adicionar un solo dato de longitud de onda (Siouffi, 2000).

Los resultados de las figuras 11, 12, 13A y 13B, conjuntamente con los datos de la tabla 11, demostraron que el EU de la fruta de *P. cecropiifolia* contiene ácidos fenólicos del grupo de los hidroxicinámicos. La interpretación de estos hallazgos concuerda con los reportes de Bengoechea *et al.* (1995) quienes encontraron que los espectros UV para los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados se caracterizan por presentar cuatro bandas de absorción. Las primeras dos bandas absorben a longitud de onda entre 230 a 240 nm. Las dos bandas restantes aparecen entre 300

a 330 nm. Estas bandas corresponden a los anillos aromáticos y su grado de sustitución. Mientras que las demás bandas corresponden al doble enlace (-C=C-) en la cadena lateral conjugado con el anillo aromático y al grupo carboxilo conjugado (-COOH) unido al anillo por el lado de la cadena, conteniendo un doble enlace.

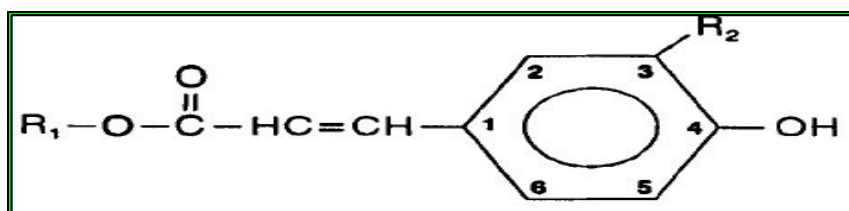


Figura 24. Estructura del ácido hidroxicinámico

Fuente. Bengoechea et al., 1995

Resultados similares al perfil espectral de las figuras 13A y 13B de los ácidos fenólicos del EU fue presentado por Kowalski y Woski (2003), al detectar para el ácido clorogénico dos bandas con longitudes de onda (λ) máxima 240.4 nm y 324.7 nm. Mientras, que Cuellar, Ariza, Anzole y Restrepo (2013) exponen la $\lambda_{\text{máx}}$ de los estándares de ácido clorogénico y ácido cafeico a 320 nm.

Mientras que el otro grupo de ácidos fenólicos llamado ácidos hidroxibenzóicos se detectan a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 260 nm, y los ácidos hidroxicinámicos (figura 24) se distinguen a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 320 nm (Collado, 2011). Los resultados demuestran que el EU contiene ácidos fenólicos, posiblemente con once componentes, según la figura 11 y la tabla 11; y las bandas de la figura 13A y 13B corresponden al grupo hidroxicinámicos tal como el ácido clorogénico.

Los flavonoides en el EU fueron evidenciados mediante los resultados de la figura 14, 15 y la tabla 12. Además, resultó importante las figuras 16A, 16B y 16C, ya que en ellas se definen las características estructurales de los FLA. Podemos apreciar el desarrollo de dos bandas I y II en el rango espectral de la zona ultravioleta. Las bandas II fueron las más pronunciadas que las bandas I. La banda II presento un $\lambda_{\text{máximo}}$ entre 250 a 280 nm y la banda I con $\lambda_{\text{máximo}}$ entre 340 a 380 nm. En este mismo gráfico, se

distinguen las alturas de las bandas II de 16A, 16B y 16C cuyos valores fueron 11.7, 7.8, y 27.4 mAU respectivamente que corroboran mayor elevación con respecto a la banda I. Estas características del EU coinciden con lo reportado por Abad-García, Berrueta, Garmón-Lobato, Gallo y Vicente. (2009), describiendo una banda II que corresponde a la absorción del anillo A del sistema benzoilo y la banda I la cual está asociada a la absorción del anillo B del sistema cinamoilo. Asimismo, Mabry, Markham y Thomas (1970) detectaron dos bandas de absorciones UV máximas a 232-270 y 316-346 nm propias de los flavonoides. En otro estudio, el patrón de quercetina exhibió dos bandas con λ a 254.5 nm y 369.5 nm. En tanto que, Lock (1994) registró en una tabla los rangos de valores de absorción para las bandas I y II de ocho tipos de flavonoides. Al comparar los resultados de las dos bandas de la curva espectral del EU con la tabla presentaría flavonoles (3-OH libre) flavonoles (3-OH sustituido).

Los resultados de la figura 17, 18 y la tabla 13 demostrarían que EU presentaría características estructurales de las antocianinas. Las curvas 18A, 18B y 18C muestran dos bandas I y II en la zona ultravioleta y visible, en el rango de long. de onda de 250-300 nm para la banda II y entre 500 a 550 para la banda I. Además, se distingue que la banda II es menos elevada (0.4 a 5.3 mAU) que la banda I (1.5 a 13.5 mUA). Las longitudes de onda máxima registradas fueron 280 y 515; 280 y 525; 278 y 525 nm para las figuras 18A, 18B y 18C respectivamente. Estos resultados fueron comparables con reportes de Yee, Eng, Amin, Azrina y Yuon (2012) al investigar la fruta de *C. odontophyllum*, identificaron seis compuestos de antocianinas con λ max. entre 275 a 531 nm., coincidiendo con el presente estudio como se aprecia en la figura 18. Asimismo, Abad-García et al., (2009) confirma que las antocianinas exhiben dos bandas principales en la región UV 275 a 285 nm (banda II) y en la región visible 520 a 545 nm (banda I) similares resultados se exhiben en las figuras 18.

Entonces, los análisis preliminares de la técnica de HPLC-DAD permitió distinguir tres grupos fenólicos, los cuales son ácidos fenólicos, flavonoides

y antocianinas en el extracto del fruto de *P. cecropiifolia*. En el grupo de FLAV se destaca el subgrupo de flavonoles.

Los análisis de compuestos fenólicos del EU por HPLC-DAD-EM/EM se aprecia en la figura 19 y en la tabla 14. Se observa que los componentes del EU fueron detectados en modo ionización negativa $[M-H]^-$ y en modo ionización positiva $[M+H]^+$. También, se distingue más respuesta en modo positivo para los flavonoides, antocianinas y dímeros de procianidina y en el modo negativo se observó la presencia derivados del ácido hidroxicinámico y trímero de procianidina.

El perfil cromatográfico a 280 nm de la figura 19 reveló diecinueve picos siendo tentativamente identificados once compuestos. La interpretación se realizó en base a las características comunes (fragmentos principales, $[M+H]^+$ $M+H^-$ y λ_{max}), se logro la interpretación de los compuestos, formando cuatro grupos que a continuación se describe:

Grupo de las procianidinas

Las procianidinas pertenecen al grupo de los flavonoides, están constituidos de monómeros y oligómeros de flavan-3-ol unidos por enlaces 4→6 y 4→8 (figura 25). Son polímeros de la unidad catequina o su isómero de epicatequina (Hammerstone, Lazarus y Schmitz, 2000)

En el extracto de *Pourouma cecropiifolia* se detectaron dímeros y trímeros de procianidinas. Este grupo exhibió tres máximos de absorción en la región UV (280, 290 y 330 nm). El grupo fue observado en los picos en **1, 3 y 11**.

En los picos 1 y 11 se aprecia un ion principal $[M+H]^+$ a m/z 579.3 que es común entre las procianidinas. Este ion principal se dividió dando pequeños fragmentos típicos de m/z 291 y 287, correspondiendo a los picos 1 y 11, respectivamente. Estos valores próximos de m/z se generaron posiblemente por la pérdida de una unidad de catequina, cuya masa es 289

uma (unidad de masa atómica) y la presencia del m/z 427 en el pico 1 se formo debido a que el ión principal pierde 152 uma, producido por una ruptura retro Diels-Alder, originado el fragmento de $C_8H_8O_3$ y se forma el ion $[M+H-152]^+$, tal como lo manifestaron Fraige *et al*, (2018) y Amandeep *et al*. (2010). Ambos iones fueron detectados en modo ionización positiva. Según estas características, tentativamente, fueron designados como dímeros de procianidinas.

El pico 3 con un ion principal $[M+H]^+$ m/z 865.8 (modo negativo), fue caracterizado en ambos modos de ionización, pero la fragmentación en modo negativo se vio favorecida. Los iones m/z 287 y 577 surgieron debido a que el ion principal fue perdiendo sucesivamente uno y luego dos moléculas de (epi) catequina (289 uma), formándose los fragmentos $[M-H-289]^-$ y el $[M-H-2(289)]^-$, respectivamente. El pico correspondería a trímeros de procianidina.

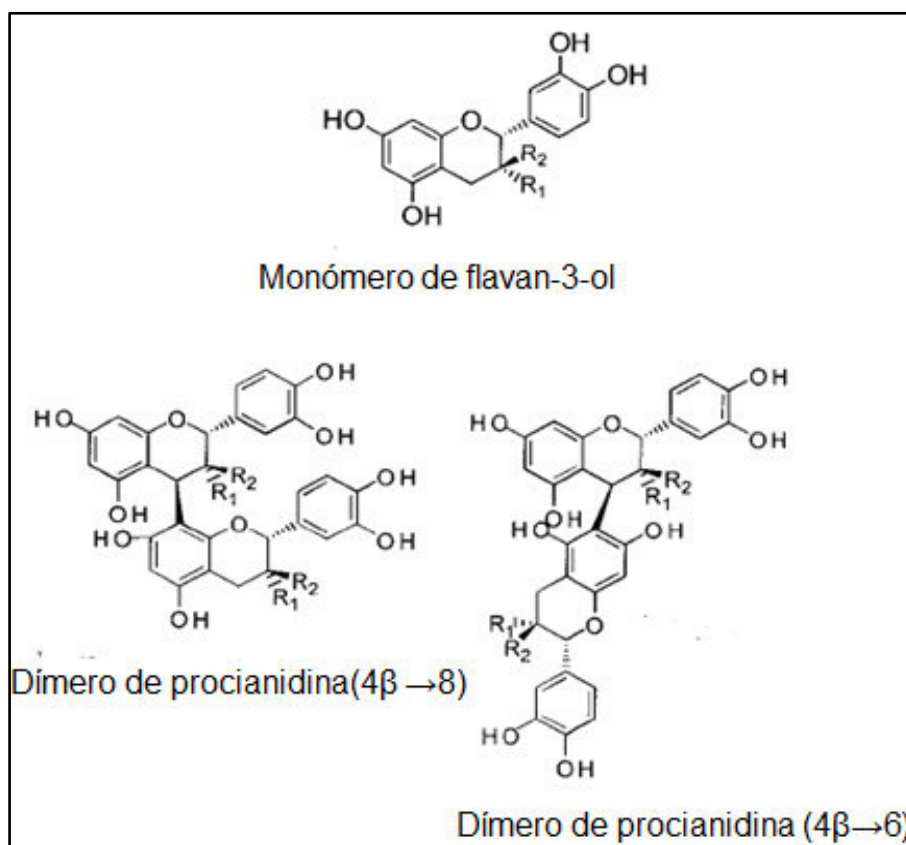


Figura 25. Dímeros de procianidinas (Picos 1, 3 y 11)
Fuente. Hammerstone *et al.*, 2000

Estos resultados concuerdan con los reportes de Giomaro et al. (2014) al describir el perfil de polifenoles de la piel y pulpa de la manzana, encontrando cinco picos de dímeros y trímeros de procianidinas. Por otro lado, Ariga y Hamano (1990), Arteel y Sies (1999) y Hagerman *et al.* (1998) manifiestan que los oligómeros de procianidinas han llamado la atención debido a su uso en la nutrición y en medicina. Se ha demostrado que posee potente actividad antioxidante y tiene la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Grupo de los derivados del ácido hidroxicinámico (AHC)

El pico 2 reveló dos máximos de absorción a 296 y 325 nm, característicos de los compuestos derivados del ácido hidroxicinámico. En relación, con esto, Bengoechea *et al.* (1995) detectaron ácidos hidroxicinámicos en los extractos de *Vitis vinífera* (uva), *Malus pumila* var. verde (manzana) y *Prunus pérsica* var. Calanda usando HPLC con DAD.

El compuesto del pico 2 se ionizó en modo negativo, cuyo ion principal fue m/z 707.7. Este ion dió lugar a tres fragmentos $[M-H]^-$. El ion m/z 545 resultaría de la pérdida de un residuo de cafeoil del ion principal. El ion m/z 353 representaría al $[2M-H-354]^-$ este se liberó debido a la pérdida de un residuo ácido cafeoilquínico (354 uma), generando un residuo ácido 5-O-cafeoilquínico. El tercer ión m/z 515 correspondería al ácido dicafeoilquínico, se generó debido a la pérdida de un residuo de ácido quínico, Por lo tanto, se puede inferir que el pico 2 corresponda al ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoil quinico) (figura 26). Estos resultados fueron comparados con el trabajo de Rezaire *et al.* (2014) quienes informaron que la fruta *Oenocarpus bataua* “ungurahui” mediante EM contenía compuestos derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido clorogénico, coincidiendo algunos iones m/z con el EU de *P. cecropiifolia*.

Al respecto, los investigadores Adisakwattana, Pongsuwan, Wungcharoen y Yibchok-Anun (2013) y Muthusamy *et al.* (2010) reportaron que el ácido clorogénico de las hojas de *Cichorium intybus* (achicoria) actuarían inhibiendo a la tirosina fosfatasa 1B, la enzima es reguladora negativa de

las vías de señalización de la insulina. Al inhibir esta enzima es posible su uso para el tratamiento de la diabetes mellitus.

El ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico, ver figura 26) contribuiría a suprimir las citoquinas proinflamatorias en un modelo inducido en rata con inflamación de la articulación de la rodilla. Este efecto fue similar al administrar ibuprofeno 100 mg/Kg. Asimismo, actuaría contra la peroxidación lipídica de la LDL (Liang y Kitts, 2006).

Los AHC de EU podrían eliminar los radicales libres de las células de la piel. En ese sentido, Nema y Sarkar (2011) manifiestan que los AHC previenen la pérdida de agua a través de la epidermis y actúa como factor de protección solar que contribuiría a proteger la piel de las arrugas.

El pico 4 (TR= 10.740 min) exhibió un máximo de absorbancia a 280 nm. Este compuesto mostró un $[M-H]^-$ a m/z 515.7. Su patrón de fragmentación evidenció tres productos iónicos. Un ion a m/z 191 $[M-H-324]^-$ que resultó de la pérdida de dos grupos cafeoilos, (162 uma, residuo cafeilo) sugiriendo ser el ion ácido quínico (PM = 192). La presencia del ion m/z 323 se interpretaría como la pérdida neutra del grupo quínico $[M-H-191]^-$ y el tercer ion m/z 352, que se genero es común con un ión del pico 2.

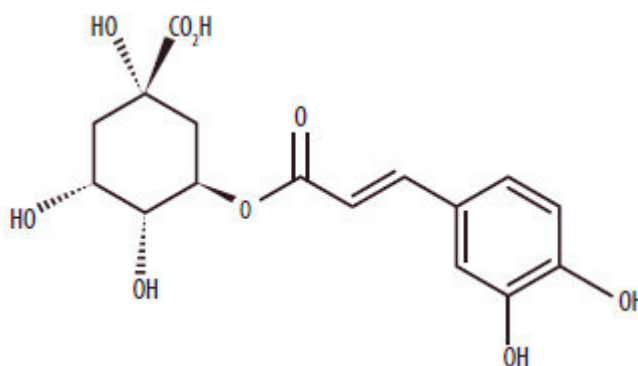


Figura 26. Ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) (Pico 2)

Fuente: Cuellar et al,2013

Este pico fue tentativamente asignado como ácido dicafeoilquínico. Estos hallazgos fueron comparables con el informe de Lopes-Lutz et al. (2010) al detectar la presencia del ácido 3,4-dicafeoilquínico y ácido clorogénico en la fruta de *P. cecropiifolia* recolectado en Brasil y analizado con HPLC-EM. Otro trabajo realizado por Mendoza, Parra y Loza (2014) con HPLC-EM registraron al ácido quínico y ácido dicafeoilquínico en *Smallanthus sonchifolius*, resultado similar a lo detectado en el pico 4.

El grupo de las antocianinas

La presencia de antocianinas en el extracto de *Pourouma cecropiifolia* fue evidenciada a través de los picos 5 y 10 con un máximo de absorción en UV 275, 280 y 520 nm. La ionización de estos compuestos fue favorecida en modo positivo. Esta característica fue explicada por Amandeep y Liwei (2010) al analizar la *V. rotunfolia* “uva” por HPLC-DAD-EM y reportaron que las antocianinas tienen carga positiva inherente, por lo que tienen la máxima sensibilidad en el modo positivo.

El pico 5 muestra un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 449.3, produciendo un fragmento en m/z 287, el cual correspondería a la cianidina y se formaría debido a la pérdida neutra de 162 uma, equivalente a una unidad glicosídica (figura 27A).

El pico 10 presentó un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 535.9, al fragmentarse este ión sufre la pérdida de un fragmento molecular de 249 uma, según la secuencia $[M+H - 162 - 87]^+$, 162 y 87 uma, correspondientes a la pérdida de la unidad glicosídica y un resto de malonil, respectivamente (figura 27-B). Al fragmentarse se formó el ion m/z 287, este es común con el fragmento del pico 5.

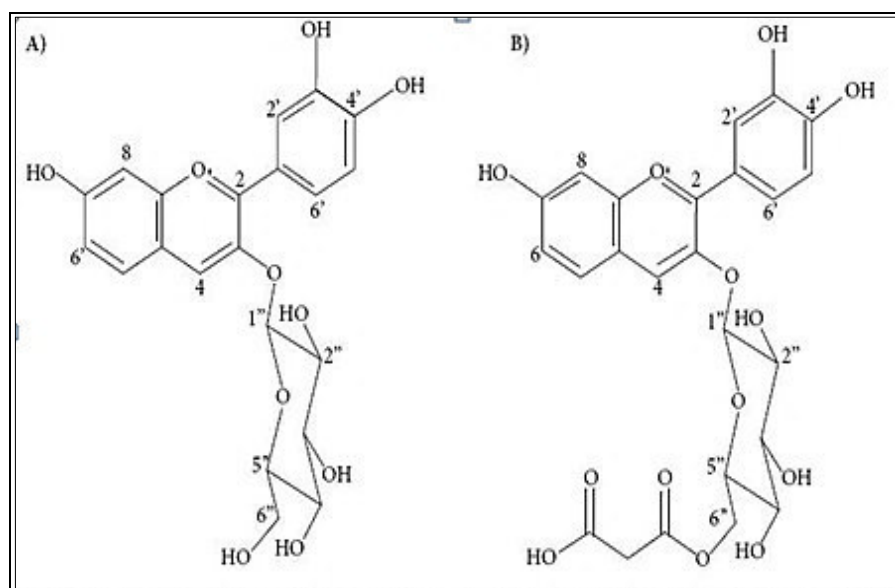


Figura 27. **A: Cianidin-3-glucósido B: Cianidina-3-(6''malonil) glucósido.** (Picos 5 y 10)
Fuente. Salinas *et al.*, (2013)

Los picos 5 y 10 corresponderían a cianidina 3-glucósido y cianidina 3-(6''malonil) glucósido, respectivamente. La presente explicación se desprende de los trabajos de Lopes-Lutz *et al.*, (2010) y de Barrios *et al.* (2010b). Ellos analizaron las antocianinas de la fruta de *P. cecropiifolia* proveniente de Manaus-Brasil y de Caquetá-Colombia respectivamente.

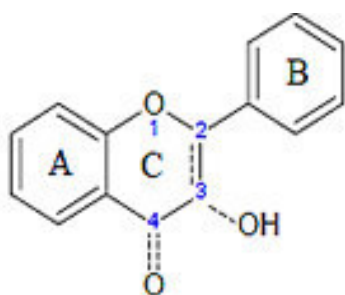
Grupo de los flavonoides

La propiedad antioxidante de los flavonoides está relacionada principalmente con la sustitución de los hidroxilos en los anillos aromáticos A y B; y la sustitución del anillo C (figura 28-A). De acuerdo con la estructura del anillo C, se distinguen cinco subgrupos principales: flavonoles, flavonas, flavanonoles, flavanonas y flavanoles. Los flavonoides sustituidos con grupos polihidroxilos presentan la mayor actividad antioxidante.

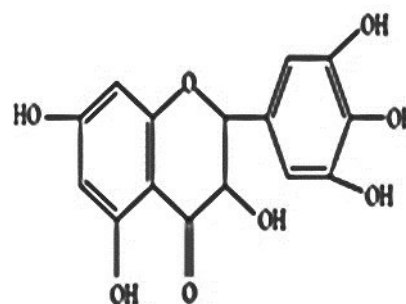
Los flavonoides pueden presentarse como agliconas y como flavonoides O-glucósidos, el enlace se realiza a través de grupos hidroxilos en el cual uno o más grupos hidroxilos de la aglicona se une al azúcar con formación del enlace O-C-glicosídico (Stalikas y Uppu, 2010). También, la unión se

realiza a través del azúcar con el núcleo básico del flavonoide para formar flavonoide C-glicosídicos (Abad-Garcia, 2009).

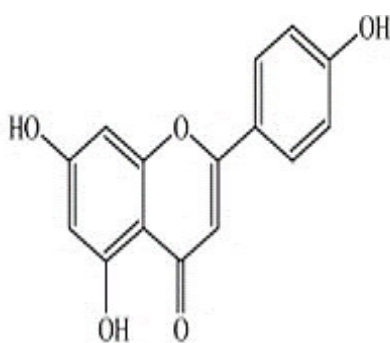
En espectrometría de masa, los C-glucósido de flavonas experimentan ruptura de residuos de azúcar a través del anillo rindiendo iones, la ruptura genera pérdida de moléculas con 60, 90 y 120 uma, mientras que la ruptura de O-glucósido de flavonas genera fragmentos con residuos de 162 uma para hexosa, 146 uma para ramnosa y 132 uma para pentosa (Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann, Bórquez y Kennelly, 2013). Estas diferencias hacen posible su interpretación. En la tabla 15 se distinguen flavonoides glucósidos en los picos 6, 9, 12, 14 y 15 en modo de ionización positivo, a excepción del pico 15 que se ionizó en modo negativo.



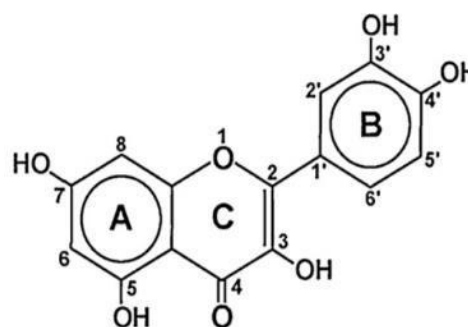
A. Núcleo flavonoide



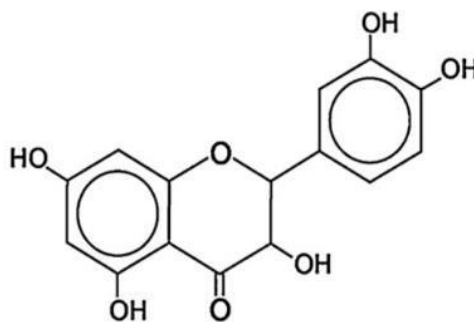
B. Ampelopsina (Pico 6)



C. Apigenina (Pico 9)



D. Quercetina (Pico 12)



E. Dihydroquercetina (Pico 15)

Figura 28. Algunas estructuras de flavonoides en el EU de *P. cecropiifolia*

Fuente: **A, C:** Tsimogiannis et al. (2007) **B:** Singh et al. (2012) y **D, E:** Chen y Deuster (2009)

El pico 6 exhibió un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 483.2. La fragmentación por EM dio tres iones principales. El primero a m/z 465 $[M+H-18]^+$, el cual correspondería a un ion deshidratado. El segundo ion m/z 363 $[M+H-120]^+$ se originaría por la pérdida de un residuo C-glucósido de flavononol (120 uma) y el tercer ion 321 $[M+H-162]^+$ resultaría ser un residuo de aglicona de ampelopsina (Fig. 28-B), debido a que el ion molecular pierde una unidad de hexosa. Probablemente la ampelopsina posea ambas señales características al presentar enlaces glucosídicos unido al C y O. Esta característica fue mencionada por Simirgiotis *et al.*, (2013), al detectar por HPLC EM/EM C-glucósidos y O-glucósidos de flavonoides en la *Passiflora tripartita*. Las señales espectrales del estudio fueron comparables con el estudio de Tsimogiannis, Samiotaki, Panayotou y Oreopoulou (2007) que describe la caracterización de flavonoides y los sustituyentes hidroxilos. Por otro lado, Singh, Sarkar y Kumar (2012) informa que este flavonoide presenta varias actividades tales como, antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiana y efectos antihipertensivos, hepatoprotector y anticancerígeno. Sin embargo, tiene reducida la solubilidad en agua (0.2mg / mL a 25 ° C). Según la bibliografía consultada, hasta la fecha, la ampelopsina no ha sido detectada en *P. cecropiifolia*.

El pico 9 exhibió un ion molecular $[M+H]^+$ con m/z 565.6 y mediante el espectro de fragmentación surgieron tres fragmentos, el primero a 547

$[M+H-H_2O]^+$, que correspondería a un ion deshidratado. Luego, este mismo fragmento, sufre otra deshidratación originando el segundo m/z **529** $[M+H-2H_2O]^+$. El tercer ion a m/z 427 $[M+H-120-18]^+$, se originaría debido a la pérdida de patrones característicos de C-glucósidos de flavonas en el C-6/C-8. Las explicaciones de estos patrones de fragmentación fueron consistentes con el trabajo de Boué, Carter, Shih y Cleveland (2003), al identificar agliconas y glicósidos de flavonas en la semilla de soya por HPLC-EM.

El compuesto detectado en el pico 9 fue identificado tentativamente como apigenina con una cadena glicosídica formada por una pentosa y una hexosa, sin embargo, con el análisis EM no se pudo establecer el residuo glicosídica, por lo que este compuesto podría corresponder a apigenina arabinosil-glucosido o apigenina xiloxil-glucósido o apigenina glucosil-arabinósido (ver estructura de la apigenina, figura 28-C).

El hallazgo de este compuesto no ha sido reportado hasta la fecha en la fruta de la uvilla recolectada en Puerto Maldonado-Perú. Sin embargo, Torres-Santos *et al.*, (2004) detectaron este flavonoide en las hojas de *Pourouma guianensis*.

El pico 12 presentó el ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 611.4 y mostró tres fragmentos, el primero m/z 449 $[M+H-162]^+$, que resulto de la pérdida de una unidad de hexosa, el segundo m/z 465 $[M+H-146]^+$ que es equivalente a la pérdida de un resto de deoxihexosa y el último fragmento a m/z 303 $[M+H-308]^+$, correspondiente a la aglicona de quercetina como resultado de la pérdida de un diglucósido de ramosil galactósido o rutinósido cuya masa fue 308, por lo que este compuesto fue identificado como quercetina rutósido o quercetina rhamnosil galactósido. Al respecto, Lopes-Lutz *et al.*, (2010) analizó la fruta *P. cecropiifolia* mediante HPLC-DAD-EM, mientras que Barrios *et al.*, (2010), además de la técnica anterior, utilizó RMN. Ambos investigadores encontraron rutina ó quercetin-3-rutinósido. La rutina es un flavonoide que puede metabolizarse a quercetina (figura 28-D). El grupo rutin / quercetina puede disminuir las reacciones alérgicas e inflamatorias en diferentes partes del cuerpo, que afectan el patrón de

citoquinas, disminuyendo la inflamación. También, puede inhibir la oxidación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el colesterol (Fратиани, Pepe y Nazzaro, 2014).

El pico 14 presentó un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 551.8 en modo positivo. El fragmento característico fue m/z 303 $[M-H-162-87]^+$, la presencia se debería a la pérdida de un resto de hexosa (162 uma) y uno de malonil (87 uma), equivalente a la pérdida secuencial de hexósido-malonato. Este fragmento correspondería a la aglicona de delphinidina. El pico fue tentativamente identificado como delphinidina -3(malonil) glucósido. Este resultado coincide con lo reportado por Lopez-Lutz *et al.*, (2010) en la fruta *P. cecropiifolia* proveniente de Manaus-Brasil. Mientras que, Barrios *et al.*, (2010) investigaron en un extracto rico de antocianinas de *P. cecropiifolia* por HPLC-EM y señalan que m/z 303 podría corresponder a un monómero de delphinidina o a la forma protonada de la quercetina. Este reporte coincide con las señales espectrales del pico 14.

El pico 15 presentó el ion molecular $[M-H]^-$ m/z a 449.8 en modo de ionización negativo y con tres fragmentos principales, dos iones a m/z a 179, y 152 se generaron por la ruptura del anillo A y B del flavonoide. El tercer ion m/z 303 correspondería a la quercetina, fragmento igual al pico 14. Las características de estos fragmentos de EM, representaría al flavonoide dihidroquercetina O-rhamnósido (figura 28-E, estructura de dihidroquercetina) La interpretación mencionada tiene relación con la investigación de Tsimogiannis *et al.* (2007) al obtener fragmentación típica de los anillos A, B y C de flavonoides que fueron utilizados para clasificar a los compuestos. Por otro lado, Moreno, Sánchez, Quevedo, Pabón y Caralla (2008) reportaron resultados similares, al identificar a la hidroxiquercetina y quercetina 3-O-ramnósido de las hojas de *Calliandra calothyrsus*, coincidiendo con la señal de mayor intensidad y el peso molecular. La técnica que utilizaron fue HPLC-EM con electrospray en modo negativo.

Las hialuronidasas son un grupo de enzimas hialuronolíticas que ejercen su acción al degradar el AcH. (Sunitha *et al.*, 2013). Los productos de la degradación tienen propiedades angiogénicas, estimulan las citoquinas pro-inflamatorias e inducen la expresión de genes relacionados con la inflamación. En la inflamación, la hialuronidasa incrementa la permeabilidad del tejido y favorece la propagación de la respuesta inflamatoria a través del tejido afectado (El-Safory, Fazary y Lee, 2010). Adicionalmente, Michel *et al.* (2014, 2017) señalaron que la inflamación es parte de la respuesta del sistema inmune a estímulos dañinos controlados por varios enzimas celulares (lipoxigenasas y hialuronidasas). Por lo tanto, la inhibición de la hialuronidasa es clave en el tratamiento de procesos inflamatorios.

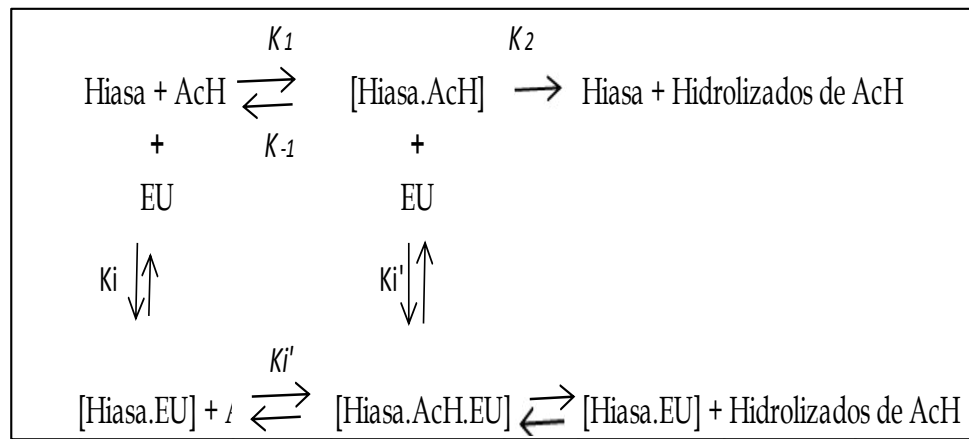
El análisis cinético del extracto de uvilla sobre la actividad hialuronidasa se realizó, midiendo, la actividad de la enzima hialuronidasa en ausencia y en presencia del EU. La medición de la actividad enzimática se realizó mediante el método turbidimétrico. La turbidez expresó la presencia de sustrato o AcH y al disminuir la turbidez se interpretó como incremento de la actividad Hiasa, la cual se expresó por desaparición de sustrato. La $V_{m\acute{a}x}$ y el K_m se calcularon mediante el gráfico de la figura 20, en un sistema sin EU. Para evaluar el comportamiento inhibitorio del EU, se utilizó dos concentraciones 131.2 y 262.4 $\mu\text{g/mL}$, cuyos datos fueron registrados en la gráfica de Lineawear-Burk, observándose que las rectas convergían y se cortaban debajo del eje de abscisa en el tercer cuadrante (figura 21). En el sistema Hiasa sin EU los valores cinéticos fueron K_m (60.73 ± 6.48) y la $V_{m\acute{a}x}$ (0.96 ± 0.08), luego, estos valores disminuyeron en presencia de EU resultando K_m aparente (39.93 ± 4.56 y 30.62 ± 3.29 $\mu\text{g/mL}$) y la $V_{m\acute{a}x}$ aparente (0.57 ± 0.03 y 0.41 ± 0.02 $\mu\text{g/mL/min}$). Además, los valores de las pendientes con EU se incrementaron (tabla 15). Estos resultados indicarían que el EU muestra actividad inhibitoria sobre la Hiasa, ejerciendo inhibición de tipo no competitiva mixto. La inhibición no competitiva ocurre cuando el inhibidor se puede unir al azar y reversiblemente tanto a la enzima libre [*Hiasa*] como al complejo enzima-sustrato [*Hiasa.AcH*], para dar enzima-

inhibidor llamado [*Hiasa.EU*] y enzima-sustrato-inhibidor [*Hiasa.Ach.EU*] (Ver esquema 1).

La actividad inhibitoria se debería a que los compuestos bioactivos, presentes en el EU, podrían unirse con la enzima libre [E] y con el complejo enzima-sustrato (ES).

Cárdenas, Vega, Fernández, Galván y Márquez (1988) manifiestan que en el estudio cinético es importante conocer la K_i , que representa la concentración del inhibidor que reduce a la mitad la velocidad de la enzima y su valor nos daría una idea de la afinidad de la enzima por el inhibidor. La inhibición no competitiva puede ser de dos tipos: simple donde la $K_i = K_i'$, es decir, el inhibidor muestra la misma afinidad por la enzima libre que por el complejo ES y de tipo mixta donde la $K_i \neq K_i'$. Esta última diferencia de K_i presenta dos casos de acuerdo con la representación de Lineweaver-Burk. Así tenemos, si las rectas obtenidas no se cortan en el eje de abscisa sino por encima de este eje entonces la $K_i < K_i'$, pero, si las rectas se cortan por debajo del eje, entonces la $K_i > K_i'$.

Por lo tanto, el EU presentó inhibición no competitiva tipo mixta y que posiblemente las constantes de inhibición se manifestaron siguiendo esta relación $K_i > K_i'$. De acuerdo a lo mencionado se infiere que el EU mostró mayor afinidad por la enzima libre [Hiasa] para dar el complejo [Hiasa.EU] que por el complejo enzima sustrato [*Hiasa.Ach*]. A continuación, se propone (esquema 1) el análisis cinético inhibitorio de tipo mixta del EU el cual seguiría los siguientes equilibrios:



Esquema 1. Análisis Cinético Inhibitorio del EU
 Adaptado de Yin et al., (2011)

Abreviaturas del esquema

Enzima = Hiasa = Hialuronidasa

Sustrato = AcH = Ácido hialurónico

Inhibidor = EU

Complejo ES = [Hiasa.AcH]

Complejo EI = [Hiasa.EU]

Complejo ESI = [Hiasa.AcH.EU]

K_1 y K_2 = constante de velocidad

K_i = constante de inhibición del complejo [Hiasa.EU]

K_i' = Constante de inhibición del complejo [Hiasa.EU.AcH]

Hasta la fecha, no se ha reportado estudio alguno del modo de inhibición del EU sobre la Hiasa, sin embargo, hay investigaciones que muestran sustancias de diferentes estructuras química que ejercen efecto inhibitorio sobre la Hiasa. Por ejemplo, Moon *et al.*, (2009), demostraron el efecto inhibidor del flavonoide naringenina y sus derivados sobre la Hiasa, evidenciando ser de tipo acompetitivo. Sunitha *et al.* (2013) reportaron la acción inhibitoria de N-acetil glucosamina sobre la Hiasa, resultando ser dependiente de la dosis y presento un tipo de inhibición no competitivo de tipo simple. Kuppusamy, Khoo, Das (1990) determinaron el comportamiento inhibitorio de los flavonoides monoméricos resultando ser de tipo competitivo. Así, la quercetina exhibió 39 % de inhibición, los taninos condensados (flavan-3-ols), luteoilina, apigenina, kaemferol y silbina mostraron 100, 67, 56 y 48 % de inhibición de tipo competitivo. La explicación de inhibición por los flavonoides se debe, principalmente, a que estos compuestos contienen sustituyentes hidroxilos en posición 5, 7 y 4 de la estructura del fenólico, los cuales se pueden apreciar en las figuras 28 B, C, D y D siendo efectivo la inhibición para los flavonoides luteolina, apigenina, kaemferol, miricetina, quercetina y morina. Por otro lado, la forma aglicona es dos veces más potente en su efecto inhibitorio que sus correspondientes glucósidos y la presencia de doble enlace entre la posición 2 y 3 se favorecería la inhibición. Asimismo, el grupo ceto en la posición 4 participaría en ejercer actividad antihialuronidasa.

Por lo tanto, existe diversos comportamientos de inhibición (competitivo, no competitivo y acompetitivo) sobre la Hiasa y al parecer dependiera de la estructura química del inhibidor. La inhibición que ejerce el EU se debería al contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas), su diversidad de moléculas bioactivas: apigenina quercetina, ampelopsina y antocianinas (tabla 15), posiblemente influyan en el tipode unión con la Hiasa, generando una inhibición no competitiva mixta.

La actividad antihialuronidasa por acción del EU fue validado usando 12.6 µg/mL de quercetina (ítem 4.1.8.3). El ensayo dio como modelo inhibición de tipo competitiva (figura 22) y los valores de Km variaron con y sin

quercetina (149.50 ± 9.54 y 60.73 ± 6.48 $\mu\text{g}/\text{m}$) y los valores de $V_{\text{máx}}$ fueron muy cercanos (figura 23, ítem 4.1.8.3). Similares resultados al tipo de inhibición con quercetina fueron mostrados por Kuppusamy et al. (1990); Girish, Kemparaju, Nagaraju, Vishwanat. (2009).

Los resultados de la determinación de la concentración inhibitoria del EU frente a la Hiasa se muestran en la tabla 18. Los IC_{50} fueron 1.55 ± 0.06 mg/mL y 1.70 ± 0.1 mg/mL ., para el EU disuelto en etanol 80% y EU disuelto en buffer acetato, respectivamente. Esta ligera diferencia, se debería probablemente a que el etanol no influye significativamente en la inhibición de la enzima. Similar interpretación lo manifiesta Kuppusamy (1990) al investigar estructura-actividad de flavonoides como inhibidores de hialuronidasa. En este estudio, la quercetina es un inhibidor conocido de Hiasa y fue disuelta en etanol 80 %, ya que no es soluble en agua. Es por ello, que el EU fue tratado con los disolventes por separado para observar si ocurría cambios en la actividad enzimática.

El porcentaje de inhibición de la actividad hialuronidasa se manifestó en todas las concentraciones de EU, de manera dependiente a la dosis utilizada en el ensayo (tabla 16 y17).

La figura 23 y la tabla 18 nos muestra que la quercetina ejerció mayor potencial inhibitorio que la dexametasona sobre la actividad Hiasa frente a la hialuronidasa. Luego el IC_{50} del EU con etanol 80 % y EU con BA variaron muy ligeramente. Los valores de IC_{50} del EU mostraron 62 y 8.3 veces menos potencial inhibitorio Hiasa que la quercetina y la dexametasona, respectivamente, lo cual indicaría mayor efecto inhibitorio de las sustancias usadas como control sobre la Hiasa.

Los resultados del presente estudio fueron contrastados con los estudios de Girish *et al.* (2005), encontrando 27 ± 2 ; 40 ± 3 y 61 ± 4 % para dexametasona y 73 ± 4 ; 100 ± 0 y 100 ± 0 % de inhibición Hiasa para quercetina con 50, 100 y 200 μM de inhibición para ambas sustancias de referencias. También, realizaron el porcentaje de inhibición Hiasa de otros

compuestos, ácido tánico, flavonas, indometacina, ácido clorogénico y ácido ascórbico, los cuales fueron 94 ± 6 , 89 ± 5 ; 90 ± 6 ; 20 ± 2 y 9 ± 1 respectivamente; usando $200 \mu\text{M}$ de cada compuesto (Girish *et al.*, 2005).

Doce flavonoides fueron investigados y tres de ellos, la apigenina, diosmetina y luteolina (70 ± 1.3 ; 71 ± 1.5 y 75 ± 1.7 % de inhibición a $100 \mu\text{g}$) mostraron significativa inhibición Hiasa, la cual estaría comprometida con el mecanismo antiinflamatorio (Hariram, Soo. Shivraj, Jalde y Patel, 2017).

Torres *et al.* (2016) mencionan que los fármacos antiinflamatorios son inhibidores de las enzimas inducibles que producen una gran cantidad de mediadores proinflamatorios como las enzimas de la ruta del ácido araquidónico (fosfolipasas, ciclooxigenasas y lipooxigenasas) y hialuronidasas. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos ejercen su acción inhibiendo a estas enzimas a través de diferentes mecanismos.

Otro estudio de Olech *et al.* (2017) reportaron resultados de inhibición Hiasa cuyos valores de IC_{50} (mg/mL) de la infusión de la raíz de *Rosa rugosa* fue 1.79 ± 0.07 valor muy cercano a 1.28 ± 0.29 correspondiendo al flavonoide naringerina. También, hicieron con la infusión de flores, tintura de flores y de raíz y de la escina (saponina con función antivaricoso) los IC_{50} obtenidos mostraron efectividad inhibitoria.

A continuación, se presenta valores de IC_{50} reportados, para inhibir a la Hiasa. Los investigadores Kolayli, Sahin, Can, Yildiz y Sahin (2016b) evaluaron 17 variedades de miel recolectada en Turquía y sus valores de IC_{50} fluctuaron de 0.011 a 0.363 g/mL. En tanto que, Ferreira *et al.* (2015) demostraron que los extractos etanólicos de propóleos con concentraciones de 75 mg/mL presentaban 43.06 ± 3.06 % de inhibición Hiasa.

Respecto al porcentaje de inhibición del EU en etanol 80 % varió de 13.83 a 79.63 % con 0.34 a 2.72 mg/mL de EU (tabla 16) mientras que con BA flúctuo entre 8.70 ± 1.39 s $76.60 \pm 3.81\%$ (tabla 17). Estos valores fueron cercanos al informe de Daya *et al.* (2014) al evaluar concentraciones de 0.125 a 2 mg/mL del liofilizado de la bebida de *Camellia sinensis* encontraron 4.42 a 82.75 % de inhibición con el $IC_{50} = 1.09 \pm 0.12$ mg/mL. Indicando una moderada actividad antihialuronidasa atribuyéndole al contenido de catequinas, quercetina, kaemferol y teaflavina. Dicha actividad puede mediar el envejecimiento de la piel, ya que la Hiasa está presente en la dermis de la piel depolimerizando al Ach.

El extracto metanólico del fruto *Garcinia indica* de la India con 2.4 % de antocianinas, utilizó 250 a 1000 μ g/mL de extracto presentó 26 a 90 % de inhibición respectivamente (Sahasrahudhe *et al.*, 2010). En las fracciones metanólica de la fresa, mora y pomelo detectaron acción inhibitoria Hiasa, sugiriendo la presencia de compuestos fenólicos con propiedades antiinflamatorias (Arauco, Buitrago, Méndez y Pernia 2002). Veintinueve extractos metanólicos de treinta y cinco frutas de plantas andinas mostraron más del 50 % de inhibición hiasa a 500 μ g/mL., sugiriendo que es importante examinar el potencial de estas frutas como una fuente de productos cosméticos antienvjecimiento (Bravo *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se ha estudiado a la fruta de *P. cecropiifolia*, sin embargo, no existen estudios si otras partes botánicas de la planta pueden ejercer efecto inhibitorio sobre la hiasa.

Los resultados del presente estudio han mostrado que el extracto metanólico de la fruta de *P. cecropiifolia* presentó moderada actividad inhibitoria Hiasa, cuya acción se debería a la presencia de diferentes compuestos fenólicos y de iones de zinc, ambos con función antioxidantes, que, actuarían de manera sinérgica durante el proceso inhibitorio.

CONCLUSIONES

1. El extracto del fruto *P. cecropiifolia* “uvilla” recolectado de la región de Madre Dios, presenta compuestos bioactivos constituidos principalmente de polifenoles, flavonoides, ácido ascórbico y antocianinas.
2. El extracto de uvilla a 131.2 y 262.4 µg/mL mostró moderada actividad inhibitoria hialuronidasa de tipo no competitiva mixto. El IC₅₀ del EU contra la hialuronidasa fue 1.55 ± 0.10 mg/mL, con posibilidad de ser usado como antiinflamatorio
3. El extracto de uvilla mediante las pruebas de poder reductor y los radicales ABTS y DPPH exhibió moderada capacidad antioxidante. Además, manifestó un comportamiento cinético bifásico y la eficiencia antirradical evidenció ser de carácter lento.
4. El EU fue caracterizado por HPLC-DAD lográndose identificar tres clases de polifenoles: Ácidos fenólicos del grupo de hidroxicinámicos, flavonoides del grupo de flavonoles, y antocianinas y al ser analizado por HPLC-DAD-EM/EM fue identificado tentativamente el ácido clorogénico, dímero de procianidinas, trímero de procianidinas, ácido dicafeoilquinico, cianidina-3-glucósido, ampelopsina glucósido, apigenína glucósido, quercetina rutinósido, quercetina hexósido-malonato, dihidroquercetina-O-rhamnósido.

RECOMENDACIONES

1. Investigar los compuestos bioactivos de otras especies frutales de la amazonia con actividad biológica.
2. Realizar estudios de la actividad inhibitoria ciclooxigenasa-2, fosfolipasa A₂ y lipoxigenasa del extracto de *P. cecropiifolia*, ya que ha demostrado poseer una variedad de polifenoles que actuarían inhibiendo a las enzimas que están comprometidas en el proceso inflamatorio.
3. Evaluar el diseño experimental en un sistema in vivo para comparar con los resultados de inhibición EU in vitro.
4. Promover el consumo y la comercialización sostenida de las frutas de *P. cecropiifolia* debido a su contenido de componentes bioactivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B. & Vicente, F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruits juices by high-performance liquid chromatography with diodo array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5398-5415.
2. Abe, L. T., Da Mota, R.V., Lajolo, F. M. & Genovese, M. I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivare de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. *Ciênc.Tecnol. Aliment.* 27(2), 394-400.
3. Abu Bakar, F., Mohamed, M., Rahmat, A. & Fry Jeffrey, M. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different part of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*) *Food Chem.* 113, 479-483.
4. Adisakwattana, S., Pongsuwan, J., Wungcharoen, C. & Yibchok-Anun, S. (2013). *In vitro* effects of cinnamic acid derivatives on protein tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(5), 1067-1072.
5. Ali, H. S., Fry, J. R. & Abu, B. M. F. (2013). Antioxidative phytochemicals and anti-cholinesterase activity of Native Kembayau (*Canarium Odontophyllum*) fruit of Sabah, Malasysian Borneo. *J. Nutr Food Sci.*, 4(1), 249.
6. Amandeep, K. S. & Liwei, G. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content, adn profiling of phenolic compounds in the sedes, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4681-4692.
7. AOAC. Official Method of Analysis (1990). Method 976.05. Protein (Crude) Method. 930.15. Humidity in animal feed. Method 962.09, Fiber / Crude Fiber Editor Kenneth Helrich Arlington, Virginia p. 445447. p.1000-1050

8. AOAC Official Methods of Analysis (1998) Method 942.05, Ash. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 17th Edition, USA, 2000.
9. AOAC Official Method of Analysis, (2005) Method 954.02, Fat (crude) or ether extract in pet food. 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD (2005)
10. Ao, C., Higa T., Ming, H., Ding, Y. & Tawata, S. (2010). Isolation and identification of antioxidant and hyaluronidase inhibitory compounds from *Ficus microcarpa* L. fil. Bark. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem*, 25(3), 406-413.
11. Arauco, L., Buitrago, D., Méndez C. G. & Pernia, T. (2002). Comparación de la actividad anti-inflamatoria de los polifenoles presentes en las frutas; Mora (*Rubusfruticosus* B.), fresa (*Fragaria vesca*L.) y Grapefruit (*Citrus paradasi*M). *Rev. Fac Farmacia*, 44, 64-69.
12. Arias, A. G. (2011). Estudio químico bromatológico de *Pourouma cecropiifolia*. *Martius Ciencia e Investigación*, 14(2), 9-11.
13. Ariga, T. & Hamano, M. (1990). Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agric. Biol.Chem.*, 54, 2499–2504.
14. Arteel, G. E. & Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett*, 462(1-2), 167–170.
15. Aya, K. L. & Stern, R. M. D. (2014). Hyaluronan in wound healing rediscovering a major player. *Wound Repair Regen*. 22(5),579-593.
16. Aymoto, H., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and comercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
17. Barreira, J.C.M., Ferreira, I. C.F. R., Oliveira, B. P. P. & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*. 107, 1106-1113.
18. Barrios, J., Sinuco, D. & Morales, A. L. (2010a). Compuestos volatiles libres y enlazados glicosídicamente en la pulpa de la uva caimaronona (*P. cecropiifolia* M). *Acta Amazónica*, 4(1), 189-198.
19. Barrios, J., Cordero C. P., Aristizabal F., Heredia F. J., Morales A. L. & Osorio C. (2010b). Chemical analysis and screening as anticancer agent of

- anthocyanin-rich extract from *Uva caimarona* (*Pourouma cecropiifolia* Mart.) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, *58*, 2100-2110.
20. Barros, L., Ferreira, M. J., Queiròs, B., Ferreira, I. & Baptista, P. (2007). Total phenol, ascorbic acid β -carotene lycopene in Portuguese wild edible. *Food Chem.*, *103*, 413-419.
 21. Belfeki H., Mejri M. & Hassouna M. (2016). Antioxidant and α -amylase inhibitory activities of some tunisian aromatic plants. *Journal of new Sciences*, *31*(6), 1775-1782.
 22. Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran H., Bernis, C., Salvayre, A. & Balta, M. (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European Journal of Medicinal Chemistry*. *45*: 3019-3026.
 23. Belscak, A., Komes, D., Horzic, D., Kovacevic, K. & Karlovic, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, *42*, 707-716.
 24. Belyagoubi, B. N., Belyagoubi, L., Bechlaghem, N., Ghembaza, N. & Atik, B. F. (2017) Assessment of antioxidant potential and phytochemical analysis of *Pituranthos scoparius* crude extract and its fractions. *Orient Pharm Exp Med*. (Publicado 04 Mayo 2017) DOI 10.1007/s13596-016-0253-7
 25. Bengoechea, L., Hernández, T., Quesada, C., Bartolomé, B., Estrela, I. & Gómez, C. C. (1995). Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*, *41*(4), 94-98.
 26. Berg, C. C. (1989) *Pourouma herrerensis* C.C. Berg, a new species of Cecropiaceae from Amazonian Peru. Contribution to the study of the flora and vegetation of Peruvian Amazonia XV. *Candollea*, *44*(2), 513–516.
 27. Berg, C. C. (2004) Two new species of *Pourouma* (Cecropiaceae) from South America. *Brittoni*, *56*(3), 255–259.
 28. Beserra, A. M. N., Machadode, S. P. H., Campos A. A. M., Matias do Prado, G., Carvalho, M. C. E. & Arraes, M. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, *44*(7), 2155-2159.

29. Beyhan, O., Elmastaş, M. & Gedikli, F (2010). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). *J. Med. Plant. Res.*, 4(11), 1065-1072.
30. Blind, A. D., Serudo, R. N., Mira, C., Silva, F. & Noda (2016). Biometria em frutos semestres de Mapati (*Pourouma cecropiifolia*). *Nucleous*, 13 (1), 223-228.
31. Boletín estadístico mensual (2019). *El agro en cifras*. Lima, Perú: Ministerio de agricultura y riego. Recuperado de <https://www.minagri.gob.pe/portal/boletin-estadistico-mensual-el-agro-en-cifras>
32. Brack, A. E. (1999). Diccionario enciclopédico de Plantas útiles en el Perú. Programa de la Naciones Unidas para el Desarrollo. Cusco: Centro de Estudios Regionales Andinos - Bartholome de las Casas.
33. Brand-Williams, Cuvelier M. E. & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology LWT- F Science and Technology*, 28(1), 25-30.
34. Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. & Hartle D (2008) Inhibition of hyaluronidase activity by select Sorghum brans. *J. Med.Food.*, 11(2): 307-312.
35. Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. & Hartle, D. (2007) Inhibition of Hyaluronidase Activity by *Vitis rotundifolia* (Muscadine) Berry Seeds and Skins. *Pharmaceutical Biolog.*, 45(9), 667-673.
36. Bravo, K, Alzate, F. & Osorio, E. (2016). Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Industrial Crops and Products*, 85, 341-352.
37. Boué, M.S., Carter-Wientjes, H. C., Shih, Y. B. & Cleveland, E. T. (2003). Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*991, 61-68.
38. Bustamante, D. S. E., Torres, C. R. & Morales S. M. (2009). Fitofármacos en la insuficiencia venosa crónica. *Revista de Fitoterapia*, 9 (1), 35 - 51.
39. Cáceres, P. (2006). Cecropiaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 13(2), 253-254

40. Camargo, H.C., Velásquez, M. A. & Acosta, M. R. (1991). Caracterización de la uva Caimarona (*Pourouma cecropiifolia*). *Colombia Amazónica*, 5, 9-26.
41. Cárdenas, J., Vega, J. M., Fernández, E., Gálván, F. & Márquez, A. J. (1998) *Problemas de bioquímica*. Madrid, España: Alhambra.
42. Chaitanya, K. K., Rao, K. K., Sastry, Y. N., Padal, S. B., Rajya, L. A. & Rao, D. G. (2015). Anti-Inflammatory, antioxidant and phytochemical analysis of *Mesua Ferrea* bark extracts. *International Journal of Current Trends in Pharmaceutical*. 3(3), 891-902.
43. Chen, Y. & Deuster, P. A. (2009). Comparison of quercetin and dihydroquercetin: antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chemico-biological interactions*, 182(1), 7-12
44. Citalingam, K., Zareen, S., Shaari, K. & Ahmad, S. (2013). Effects of *Payena dasyphylla* (Miq.) on hyaluronidase enzyme activity and metalloproteinases protein expressions in interleukin-1 β stimulated human chondrocytes cells. *BMC Complementary Altern. Med.*, 13, 213.
45. Collado, G. (2011). *Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas*. (Tesis de Maestría). Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia.
46. Cuellar, F., Ariza, E., Anzola, C. & Restrepo, P. (2013). Estudio de la capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* MC Vaugh) durante la maduración. *Revista Colombiana de Química*. 42(2), 21-28.
47. Daya, R. W., Prabhashini, K. W., Mendis, A. W. P. & Dayendra, R. C. T. (2014). In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox Orange pekoe grade black tea (*Camellia sinensis* L.). *Asian Pac. J. Trop Biomed.*, 4(12), 959-963.
48. Dirección de Investigación y Desarrollo Social. (2009) *Hábitos alimenticios de la población amazónica*. Lima, Perú: Ministerio de la Mujer y Desarrollo Social. Recuperado de <https://www.mimp.gob.pe/webs/mimp/sispod/pdf/63.pdf>
49. De la Cerda, C. A., López, S. R., Nuñez, K. H., Peña, N. A. & Obregue, S.E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J Sci Food Agric*. 95(7), 1521-1527.

50. El-Safory, N.S., Fazary, A. E. & Lee, C. K. (2010) Hyaluronidases, a group of glycosidases: current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. 81,165-181.
51. Falcao, M. de A. & Lleras, E. (1980) Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do Mapati (*Pourouma cecropiifolia* Mart). *Acta Amazonica*. 20(4), 711-724.
52. Fraige, K., Dametto, A. C., Zeraik, M. L., de Freitas, L., Saraiva, A. C., Medeiros, A. I., ...Bolzani, V. S. (2018). Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Phytochem. Anal*, 29(2), 196-204.
53. Farhan, B., & Charanjit, S. R. (2017). Extraction, identification and assessment of antioxidative compounds of bran extracts of traditional rice cultivars: An analytical approach. *Food Chemistry*. 237, 264-274.
54. Fayad, S., Morin, P. & Nehmé, R. (2017) Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. *Journal of Chromatography*, 1529, 1–28.
55. Fernández de O, A. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of some malvaceae family species. *Antioxidants*, 1, 33-43.
56. Fernández LC, Vela AM, Ibarra GI. (2009) Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex*. 30(5),258-63.
57. Ferrante, N. (1959). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidas activity. *J. Biol. Chem.*, 220, 303-306.
58. Ferreira, I., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stirpe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.
59. Ferreira, C, J., Das Santos, U. P., dos Santos, d. R. P., Damião, M. J., Balestieri, P. J. B., Cardoso, L. C. A., ... Santos, L. E. (2015). Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). *Evidence-Based. Complementary and Alternative Medicine*. 2015, 1-11.

60. Fratianni, F., Pepe, R. & Nazzaro, F. (2014) Polyphenol composition, antioxidant, antimicrobial and Quorum quenching activity of the “Carciofo di Montoro” (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) global artichoke of the Campania region, southern Italy. *Food and Nutrition Sciences*. 5(21), 2053-2062.
61. Frost, G. I., Tony, C. & Stern, R. (1996). The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosc. Glycotechnol.*, 8, 419-434.
62. Frost, G. I., Csoka, T. B., Wong, T. & Stern, R. (1997). Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 10–15.
63. Gaglioti, A. L. & Neto, E. R. (2014). *Pourouma bergii* (Urticaceae), a new species from South America. *Phytotaxa*, 172(2), 168-172
64. Gaglioti, A. L. (2018) Flora do Brasil. Pourouma. Recuperado de AuAubl.<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTax>. DOI: 10.1590/2175-7860201566411
65. Garzón, G. A., Narvaéz, C. E., Riedl, K. M. & Schwartz, S. J. (2010). Chemical composition anthocyanins, non anthocyanins phenolics and antioxidants activity of wild bilberry from (*Vaccinium meridionale* Swartz) Colombia. *Food Chemistry*, 122, 980-986.
66. Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A. R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D., ... Fraternali, D. (2014). Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal*. 8, 45-55.
67. Girish, K. S. & Kemparaju, K. (2005) Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry (Moscow)*, 70(8), 1145-1150.
68. Girish, K. S., Kemparaju, K., Nagaraju, S., & Vishwanath, B.S. (2009) Hyaluronidase inhibitors: A Biological and therapeutic perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 2261-2288.
69. Giusti, M. & Wrolstad, R. E. (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.

70. Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. (2007). Plantas Medicinais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova.*, 30(2), 374-381.
71. Gonzáles, C. A. (2006). Aportes a la caracterización y evaluación agronómica de *Pourouma cecropiifolia*. Martius "Uvilla" en la Amazonia peruana. *Folia Amazónica*, 13(1-2), 1-23.
72. Gonzáles, A. (2007). Frutales Nativos Amazónicos Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana. (pp. 55-57.). Iquitos.
73. Gonzáles, C. A., Torres, R. G. M. (2010). Manual Cultivo Uvilla. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana IIAP.
74. Gonzáles, R., Ballester, I., López-Posada, R. & Suárez, M. D. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 331-362.
75. Guio, B. C. J., Leoni, D. C. S. & Pérez, A. L. M. (2010). Compuestos volátiles libres y enlazados glicosídicamente en la pulpa de la uva Caimarona (*Pourouma cecropiifolia* Mart.) *Acta Amazônica*, 40(1), 189-198.
76. Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, A., Sovik, J. K.N., Richard, N. T. Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1887–1892.
77. Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A. & Schmitz, H. H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *Journal of Nutrition*, 8S suppl., 2086S–2092S.
78. Hasbay, A. I., Celin, H. I. & Hayindin, A. (2007). Subcritical /carbón dioxide and etanol) extraction of polyphenolic from apple and peach pomaces ans determination of antioxidants activities of extracts. *The journal of Supercritical Fluids*, 43, 56-63.
79. Hariram, S., Soo, Y., Shivraj, A., Jalde, S. S. & Patel R. V. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *J. Biochem Mol Toxicol.* 32, 1-8.
80. Hofinger, E. S. A., Spickenreither, M., Oschmann, J., Bernhardt, G., Rudolph, R. & Buschauer, A. (2007). Recombinant human hyaluronidase

- Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. *Glycobiology*, 17, 444-453.
81. Ihara, N., Schmitz, S., Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H. & Kobayashi, S. (2004). Amplification of inhibitory activity of catechin against disease-related enzymes by conjugation on poly (-lysine). *Biomacromolecules*, 5, 1633-1636.
 82. Isoyama, T., Thwaites, D., Selzer, M., Carey, R., Barbucci, R. & Lokeshwar, V. (2006). Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidase. *Glycobiology*, 16(1), 11-21.
 83. Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Itou, H., Azuma, K., & Higashio H. (2000) Evaluation of inhibitory effects of vegetables and herbs on hyaluronidase and identification of rosmarinic acid as a hyaluronidase inhibitory in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L). *Food Sci Technol*, 6(1), 74-77.
 84. Iqbal, E., Abu Salim, K. & Lim, L. B. L. (2015). Phytochemical screening total phenolic and antioxidants activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *J. King Saud University Science*, 27,224-232.
 85. Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación (2018). Carga de Enfermedad asociada a la Artrosis en la población atendida en el Seguro Social de Salud del Perú durante el 2016. Lima: ESSALUD. Recuperado de: http://www.essalud.gob.pe/ietsi/pdfs/direcc_invest_salud/1Carga_de_enfermedad_asociada_a_la_artrosis.pdf.
 86. Jiang, D, Liang J. & Noble, P. W. (2011). Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 9, 221–264.
 87. Kakegawa, H., Matsumoto, H. & Satoh, T. (1988). Inhibitory effects of hydrangenol derivatives on the activation of hyaluronidase and their antiallergic activities. *Planta Med.*, 54, 385–389.
 88. Karagiannis, S., Economou, A. & Lanaridis, P. (2000). Phenolic and volatile composition of wines made from *Vitis vinifera* cv. Muscat lefko grapes from the island of Samos. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5369- 5375.
 89. Kayesh, E., Shangguan, L., Kibert, K. N., Sun, X., Bilkish, n., Zhang, Y., ...Fang, J. (2013). Fruit skin color and role of anthocyanins. *Acta Physiol Plant*, 35, 2879–2890.

90. Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K. & Rotich, M.K. (2012). Characterization of anthocyanins in Kenyan teas extraction and identification. *Food Chemistry*, 131(1), 31–38.
91. Kim, D. W., Won, L. K., Joo, L. H. & Yong, L. C. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 3713-3717.
92. Kolayli, S., Can, Z., Yildiz, O. & Alpay, K. (2016a). A comparative study of the antihyaluronidase, antiureasa, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (*Castanea sativa* Mill) honeys. *J. Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(53), 96-104.
93. Kolayli, S., Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O. & Sahin, K. (2016b). Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 599-602.
94. Kondo, K., Kurihara, M. & Fukuhara, K. (2001). Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Methods in Enzymology*, 335, 203-217.
95. Kowalski, R. & Wolski, T. (2003). Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* l. leaves, inflorescences and rhizomes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6(1). Disponible en línea <http://www.ejpau.media.pl>
96. Kreil, G. (1995). Hyaluronidases-A group of neglected enzymes. *Protein science*, 4(9), 1666-1669.
97. Kuppusamy, U.R. & Das, N. P. (1991) Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*, 47,1196-2000.
98. Kuppusamy, U. R., Khoo, H. E. & Das, N. P. (1990). Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol.*, 40(2), 397-401.
99. Kuskoski E. M., Garcia A. A., Morales, A. T. & Fett, R. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural, Santa Maria*. 36(4), 1283-1287.
100. Lee J., Durst, R. W. & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 88(5), 1269-1278.

101. Lesem, Y. Y. (1988). Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 5(1), 39-49.
102. Liang, N. & Kitts, D. D. (2016). Role of chlorogenic acids en controllinf oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(16) 1-20.
103. Li, S., Taylor, K. B., Kelly, S. J. & Jedrzejjas, M. J. (2001) Vitamin C inhibits the enzymatic activity of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem*, 276, 15125-15130.
104. Lock de Ugaz, O (1994). Investigación Fitoquímica, Método en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú. Segunda edición, 161-163, 183-213.
105. Lopes, D., Antoniassi, R., Souza, M. L. M., Castro, I. M. Souza, N. R., Carauta, J. P. y Kaplan, M. A. C. (1990). Caracterização química dos frutos do Mapati (*Pourouma cecropiifolia* Martius - Moraceae). *Braz. J. Food Technol*, 2(1,2) 45-50.
106. Lopes-Lutz. D., Dettmann, J., Nimalaratne, Ch. & Schieber, A. (2010). Characterization and quantification of polyphenols in amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius). *Molecules*, 15, 8543-8552.
107. Lopes, D., Koketsi, M., Carauta, J. P. P., de Olivera, R. R. & Kaplan, M. A. C. (1999). Chemical composition of *Pourouma guianensis* Aublet essential oils. *Flavour and fragrance Journal*. 14(4), 23-236.
108. Lung, M. Y., & Chang, Y. C. (2011). Antioxidant properties of the edible basydiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int J. Mol. Sci.* 12, 6367-6384.
109. Mabry, T. J., Markham, K. R. & Thomas, M. B, (1970), *The ultraviolet spectra of flavones and flavonols, isoflavones, dihydroxyflavonols*. In *The Systematics Identification of Flavonoids*, New York, USA, Springer-Verlag
110. Macedo, J. M., Souza, L. G. P., Valenzuela, V. C. T., Oliveira, A. B., Castilho, R. O & Jácome, R. L. R. P. (2013). Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 34(4), 585-590.
111. Mahadeswaraswamy, Y. H., Manjula, B., Devaraja, S., Girish, K. S. & Kemparaju, K. (2011). *Daboia russelli* venom hyaluronidase: purification, characterization and inhibition by -3-(3-hydroxy-4-oxopyridyl) amino-propionic Acid. *Curr. Top Med. Chem.*, 11(20), 2556-2560.

112. Majewska, M., Skrzycki, M., Podsiad, M. & Czczot, H. (2011), Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an *in vitro* study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 68, (4), 611-615.
113. Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40, 255–260.
114. Márquez, C., Otero, C., Rojano, B. & Osorio, J. (2014). Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos de tomate de árbol (*Cyphomandra batatea* S.) en poscosecha. *Temas Agrarios*, 19(2),173-184.
115. Marquina, M.A., Corao, G.M., Araujo, L., Buitrago, D. & Sosa, M. (2002) Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Fitoterapia*, 73, 727-729.
116. Martínez, N. N., Camacho, V. M. & Martínez, L. J. (2008) Revisiones Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*. 2, 64-68.
117. Mathew, S. & Abraham, E. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 198-206.
118. Mau, J. L., Chang, C. N., Huang, S. J. & Chen, C. C. (2004) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87(1), 11-118.
119. McCourt P. A. (1999). How does the hyaluronan scrap-yard operate? *Matrix Biol*. 18, 427–432.
120. Mendoza, D. L, Parra, L. & Loza S. (2014). Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial y extractos etanólicos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) H. Robinson, cultivado en Colombia. *Biosalud*. 13(2), 9-23.
121. Menzel, E. J. & Farr, C. (1998). Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry biological activities and therapeutic uses. *Cáncer Letters*. 131, 3-11.
122. Meyer, K. (1971). Hyaluronidases, *In the Enzymes*. 3rd edition. Edited by Boyer PD New York, Academic Press, 307–320.
123. Michel, P., Owczarek, A., Matczak, M., Kosno, M., Szymariski, P., Mikiciuk-Olasik, E.,Olszewska, M. (2017). Metabolite profiling of eastern teaberry

- (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxygenase inhibitory activity. *Molecules*, *22*, 412-428.
124. Michel, P., Dobrowolska, A., Kicel, A., Owczarek, A., Bazytko, A., Granica, S., ... Olszewska, M. A. (2014). Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. *Molecules*, *19*, 20498-20520.
125. Mio, K., & Stern, R. (2002). Mini review. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biology*, *21*, 31-37.
126. Molina, Q. D., Medina, L. A., González, A. G. A. & Robles, S. R. M. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *Journal of Food*, *8* (1), 57-63.
127. Moon, Sun-Hee., Kim, Kee-T., Lee, Na-K., Han, Ye-S., Nah, Seung-Y., Cho, Ssang-G., ... Paik, Hyun-D. (2009). Inhibitory effects of naringenin and its novel derivatives on hyaluronidase. *Food Sci Biotechnol*, *18*(1), 267-270.
128. Moreno, M. B., Sánchez, A., Quevedo, R., Pabón, M. L. & Carulla, J. E. (2008). 3-O- α -L-Rhamnopyranosilflavonoides y otros derivados fenólicos de hojas de *Calliandra calothyrsus*. Meissner (Mimosaceae). *Rev. Colombiana Quim.*, *37*(3), 287-2953.
129. Moo, H. V. M., Moo, H. M. I., Estrada, L. R. J., Cuevas, G. L., Estrada, M. A., Ortiz, V. E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruit from Yucatan, México. *Food Chemistry*, *166*, 17-22.
130. Muñoz, A. U., Atha, D. E., Ma, J., Nee, M. & Kennelly, E. (2002). Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytotherapy Research*, *16*, 63-65.
131. Muthusamy, V. S., Saravanababu, C., Ramanathan, M., Bharathi, R., Sudhagar, S. Anand, S., Lakshmi, B. S. (2010). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and regulation of insulin signalling markers by caffeoyl derivatives of chicory (*Cichorium intybus*) salad leaves. *British Journal of Nutrition*, *104*(06), 813-823.
132. Naczki M., Amarowicz, R., Zadernowski, R., Pegg, R. B. & Shahidi, F. (2003) Antioxidant activity of crude phenolic extracts from wild blueberry leaves. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. *12*(53), 166-169.

133. Nema, K. & Sarkar, B. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19(1), 64-73.
134. Nile, S. H. & Keum, Y. S. (2017) Antioxidant, anti-inflammatory and enzyme inhibitory activities of 10 selected Unani herbs. *Bangladesh J. Pharmacol.*, 12, 162-64.
135. Noble, P. W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 21, 25–29.
136. Oh, Y. S., Lee, J. H., Yoon, S. H., Oh, C. H., Choi, D. S., Choe, E., ...Jung, M. Y. (2008). Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *J. Food Science*. 73(5), 378-388.
137. Olech, M., Nowak, R., Zaluski, D., Kapusta, I., Amarowicz, R. & Oleszek, W. (2017) Hyaluronidase, acetylcholinesterase inhibiting potential, antioxidant activity, and LC-ESI-MS/MS analysis of polyphenolics of rose (*Rosa rugosa* Thunb.) teas and tinctures. *International J. Food properties*, 20(51), 516-525.
138. Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44(6),307-315.
139. Padilla, F. C., Rincón, A. M. & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Arch. Latin de Nutr.*, 58(3), 3003-308.
140. Palomino, L., Garcia, C., Gil J. & Durango, D. (2009). Determinación del contenido de polifenoles y evaluación de la actividad antioxidante de Propóleos. *Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(3), 388-395.
141. Pastrana, B. E., Akoh, C. C., Sellappan, S. & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5497–5503.
142. Patiño, V. M. (2002). Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Neotrópico. Calico, CA: CIAT.
143. Pedrosa, H., Clemente, C. R. & Schietti, J. (2018). The Domestication of the Amazon Tree Grape (*Pourouma cecropiifolia*) Under an Ecological Lens. *Frontiers in Plant Science*, 9, 203-215.
144. Perera, H. D. S. M., Samarasekera, J. K. R. R., Handunnetti, S. M., Weerasena, O. V. D. S. J., Weeratunga, H. D., Jabeen, A., ... Choudhary,

- M. I. (2018). In vitro pro-inflammatory enzyme inhibition and anti-oxidant potential of selected Sri Lankan medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 271-282.
145. Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz, R. E., Serrano, J., Goñi, I., ... Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.
146. Petrovic, J., Papandreou, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Baskakis, C., Proestos, C., ... Sokovic, M. (2014). Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Royal Society Chemistry. Food and Function*. Recuperado el 25 setiembre de 2018. DOI: 10.1039/c4fo00727a
147. Pino, J. A. & Quijano, C. E. (2008). Volatile compounds of *Pourouma cecropiifolia* Mart, fruit from Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 242-244.
148. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
149. Quirós-Sauceda, A. E., Ayala, Z. J. F., Sáyago, A. S. G., Vélez, de R. R., Sañudo, B. J. A. & González, A. G. A. (2014) Added dietary fiber affects antioxidant capacity and phenolic compounds, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 227 – 233.
150. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice, E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biology y Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
151. Reboló, L. S. (2007). *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O., Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra* (tesis doctoral) Universidad de Santiago de Compostela, España, Lugo, España.
152. Rezaire, A., Robinson, J. C., Bereau, D., Verbaere, A., Sommerer, N., Khan, M. K., ... Fils, L. B. (20014). Amazonina palm *Oenocarpus bataua* ("patawa"): Chemical and biological antioxidant activity-Phytochemical composition. *Food Chemistry*, 149, 62-70.

153. Roginsky, V. & Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92 (2), 235-254.
154. Rojano, B. A., Gaviria, C. A., Gil., M. A., Saez, J. A., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*. 15(1), 173-181.
155. Rufino, M. S., Alves, R. E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto. F. & Mancinifilho, J. (2010) Bioactive compounds and antioxidante capacities 18 no traditional tropical fruit from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.
156. Saarii, H., Konttinen, Y. T., Friman, C., & Sorsa, T. (1993). Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation*, 14(4), 403-416.
157. Salinas, M. Y., García, S. C., Coutiño, E. B. & Vidal. M. V. A. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36, 285-294.
158. Sahasrabudhe, A., Deodha, M. (2010). Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of garcinia indica. *International Journal of Botany*, 6(3), 299-303.
159. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998a). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juice and reloaded polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407–412.
160. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998b). Procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science Food Agriculture*. 78, 270-276.
161. Schenck, P., Schneider, S., Miehke, R. & Prehm, P. (1995). Synthesis and degradation of hyaluronate by synovia from patients with rheumatoid arthritis, *Journal Rheumatol.*, 22, 400–405.
162. Schuize, C., Bittorf, T., Walzel, H., Kundt, G., Bader, R. & Mittelmeier, W. (2008). Experimental evaluation of hyaluornidase activity in combination with specific drugs applied in clinical techniques of interventional pain management and local anaesthesia. *Pain Physician*. 11, 877-883.
163. Santhosh, S. M., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K. & Girish, K. S. (2013). Snake Venom

- Induced Local Toxicities: Plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13,106-123.
164. Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., Sampietro, D. A., Quiroga, E. N. & Vattuone, M. A. (2007). Actividad inhibitoria de hialuronidasa en extractos de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. (Fabaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6(5), 274-275.
 165. Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., ... Ukeda, H. (2014). Aplicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of Food additives – Inter-laboratory Evaluation study. *Analytical Sciences*. 30, 714-721.
 166. Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., Bórquez, J. & Kennelly, E.J. (2013). The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of bioactive flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules*, 18, 1672-1692.
 167. Singleton, V. I. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144–158.
 168. Singh, S. S., Sarkar, B., & Kumar, D. R. (2012). Microemulsion Drug Delivery System: For bioavailability enhancement of Ampelopsin. *ISRN Pharmaceutics*, 12. doi:10.5402/2012/108164.
 169. Siouffi, A. M. (2000) "HPLC". En Leo M. L. Nollet (Ed.). *Food Analysis by HPLC*. (pp. 36-37). New York: Marcel Dekker, INC.
 170. Stalikas, C. D. & Uppu, R. M. (2010) "Phenolic acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods" En R. Uppu, S. Murthy, W. Pryor, N. Parinandi (Ed.). *Free radicals and antioxidant protocols*. (pp.65–90). New York, USA. Humane Press.
 171. Stern, R. (2008). Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 18, 275–280.
 172. Stern, R., Asari, A. A. & Sugahra, K. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European J. Cell Biology*, 85(8), 699–715.
 173. Stern R. (2003). Devising a pathway for hyaluronan catabolism. Are we there yet? *Glycobiology*, 13,105–115.

174. Sotero, S. V. E., Silva, L., Merino, Z. C., Maco, M., Dávila, E., Ramírez, W., ... García, d. S. D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante de seis frutales amazónicos: Anona, Castaña, Choque, Huasai, Huito y Uvilla. *Folia Amazónica*, 20(1-2), 53-58.
175. Suleyman, H., Demircan, B., Karagoz, Y., Oztasan, N. & Suleyman, B. (2004). Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Polish J. Pharmacol.*, 56, 775-780.
176. Sumantran, V. N., Kulkarni, A. A., Harsulkar, A., Wele, A., Koppokar, S. J., Chandwaskar, R., ...Wagh, U. V. (2007) Hyaluronidase and collagenase inhibitory of the herbal formulation *Trophala guggulu*. *Journal of Biosciences*. 32(4), 755-761.
177. Sunitha, K., Suresh, P., Sebastin, S. M., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Marathe, G. P., ... Girish, K. (2013). Inhibition of hyaluronidase by N-acetyl cysteine and glutathione: Role of thiol group in hyaluronan protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 39-46.
178. Termeer, C., Sleeman, J. & Simon, J. C. (2003). Hyaluronan-magic glue for the regulation of the immune response? *Trends in Immunology*, 24(3), 112-114.
179. Tiemi Abe, L., Vieira Da Mota, R., Lalolo, F., & Genovese, M. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27 (2), 394-400.
180. Tomás-Barberan, F. A. & Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Science of Food Agriculture*, 81, 853-856.
181. Torres, C. R., D'Almeida, R. E., Isla, M. I. & Alberto, M. R. (2016) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Frankenia triandra* (J. Rémy) extracts, *South African Journal of Botany*, 104, 208-214.
182. Torres-Santos, E. C., Lopes, D., Olivera. R.R., Carauta, J. P., Falcao, C. A., Kaplan, M. A. & Rossi-Bergmann.B. (2004). Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11, (2-3), 114-120.

183. Tsimogiannis, D., Samiotaki, T., Panayotou, G. & Oreopoulou, V. (2007) Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593-606.
184. Ushio, F. M. & Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 266(1), 37–52.
185. Vásquez, R. & Gentry, A. H. (1989). Use and Misuse of Forest-harvested Fruits in the Iquitos Área. *Conservation Biology*, 3(4), 350-361.
186. Villachica, H. U. (1996) *Pourouma cecropiifolia* Mart. In frutales y hortalizas promisorias de la Amazonía. (pp. 19-24). SPT-TCA Lima, Perú.
187. Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moya, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrila, M. C. (2007). Radical scavenging of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71(1), 230-235.
188. Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F. & Gao, Y. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L). Inflorescence residues. *J Food Sci Technol*, 53(6), 2614–2624.
189. West, D. C. & Kumar, S. (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp. Cell Res*. 183, 179–196.
190. Yee, C. L., Eng, K. H., Amin, I., Azrina, A. & Yuon, L. C. (2012). Analysis of phenolic compounds of Dabai (*Canarium odontophyllum* Miq.) Fruit by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal. Methods*. 5, 126-137.
191. Yeo, E. J., Kim, K. T. & Paik, H. D. (2005). Antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects of water and ethanol-extracted Brazilian propolis. *Food Sci Biotechnol.*, 14(4), 474-478.
192. Yin, S. J., Si, Y. X. & Qian, G. Y. (2011). Inhibitory effect of phthalic acid on Tyrosinase: The Mixed-Type Inhibition and Docking Simulations. *Enzyme Research*. Recuperado el 8 de setiembre de 2018 de <http://dx.doi.org/10.4061/2011/294724>.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación botánica de *Pourouma cecropiifolia*

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL

**"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"****CONSTANCIA N° 138-USM-2013**

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 (Fruto), recibida de **María Rosario CALIXTO COTOS**; de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Pourouma cecropiifolia* C. Martius**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**CLASE: MAGNOLIOPSIDA****SUB CLASE: HAMAMELIDAE****ORDEN: URTICALES****FAMILIA: CECROPIACEAE****GENERO: Pourouma****ESPECIE: *Pourouma cecropiifolia* C. Martius**



Nombre vulgar: "Uvilla amazónica".
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 04 de junio de 2013



Anexo 2. Análisis de minerales de la fruta *P. cecropiifolia*

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA</p> <p style="text-align: center;">UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS</p>	
---	--	---

INFORME DE ENSAYO
N° 335-2015

Ciente : UNMSM – FQIQ
Atención : Prof. Rosario Calixto
Dirección : Germán Amézaga 375 - Lima
Referencia USAQ : 261-01
Muestras : UVILLA AMAZÓNICA
Cotización : 286-2015/USAQ-FQIQ
Fecha de Recepción : 07/09/2015
Fecha de Emisión : 10/09/2015


RESULTADO DE ANÁLISIS DETERMINACIÓN DE METALES

No. De Muestra USAQ	REFERENCIA Y CODIFICACIÓN DEL CLIENTE	DETERMINACIONES	RESULTADOS
261-01	UVILLA AMAZÓNICA	SELENIO ZINC COBRE	N.D. 2.18 ppm 3.96 ppm

Muestra Proporcionada por el Cliente.
N.D. = NO DETECTABLE

Límite de Detección:
Selenio = 10 ppm

Método: Determinación de Metales por Absorción Atómica Metales FAAS USAQ-ME-04

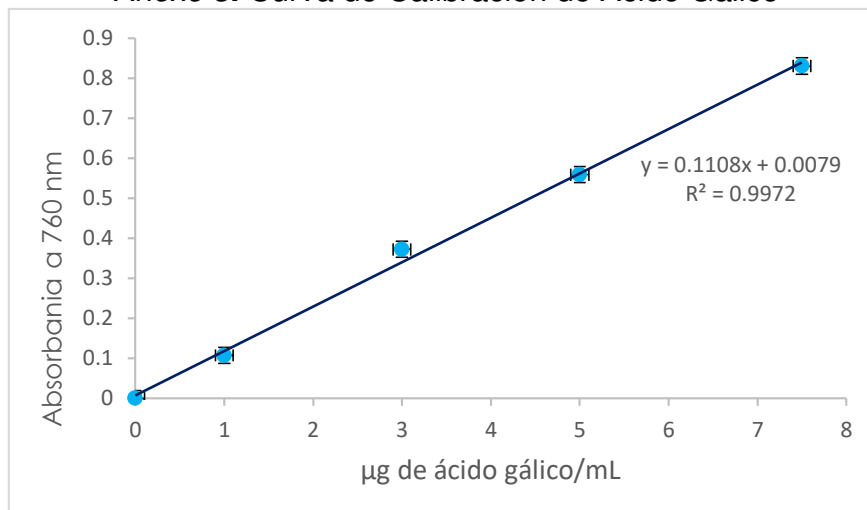

 Quím. María Angélica Rodríguez Best
 Directora de la USAQ
 COP: 597

Nota: El presente informe sólo es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada, cualquier corrección o enmienda en el contenido del presente informe lo anula automáticamente.
 Observ.: La muestra podrá ser devuelta después del plazo de 15 días calendarios de entregado el Informe de Ensayo, pasado el tiempo indicado no se aceptarán reclamos ni devoluciones.

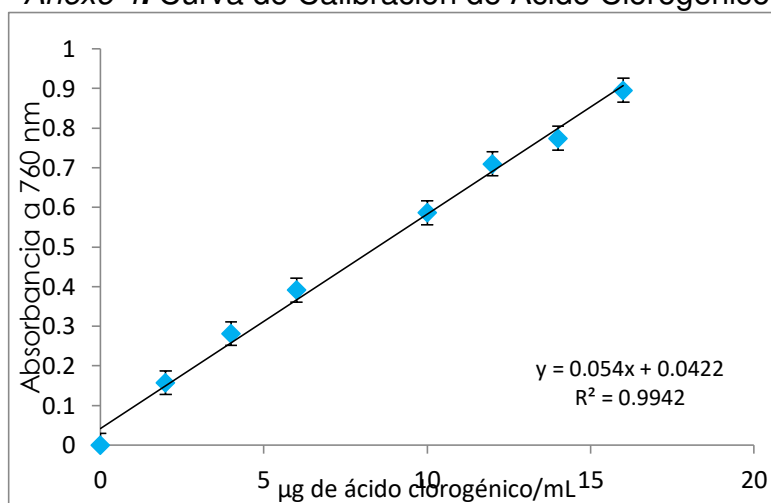
IE-335-2015 UNMSM-FQIQ (Rosario Calixto)(Página 1 de 1)

Av. Venezuela cdra. 34 - Ciudad Universitaria - Pabellón B Química, Central Telefónica: 619-7000 anexo 1203, Fax 1218
 E-mails: usaq@fqiq.unmsm.pe usaq.unmsm@yahoo.es

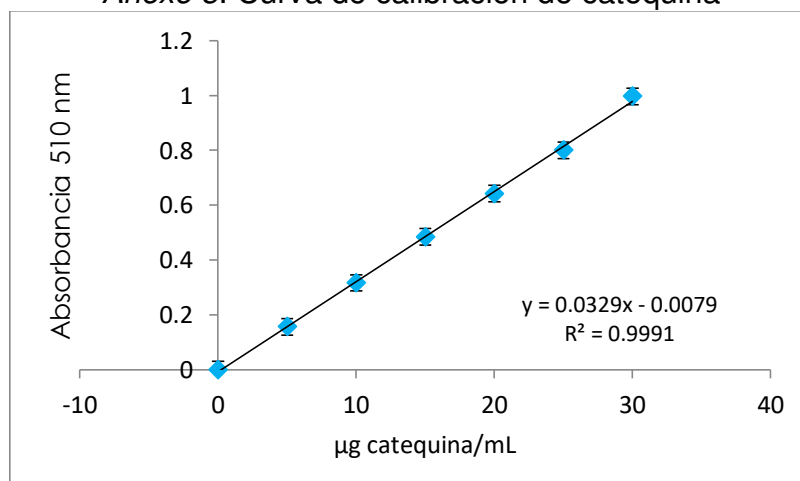
Anexo 3. Curva de Calibración de Ácido Gálico



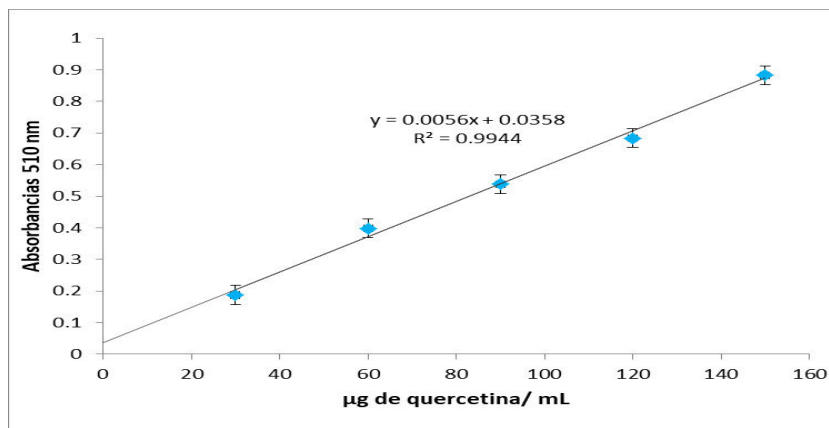
Anexo 4. Curva de Calibración de Ácido Clorogénico



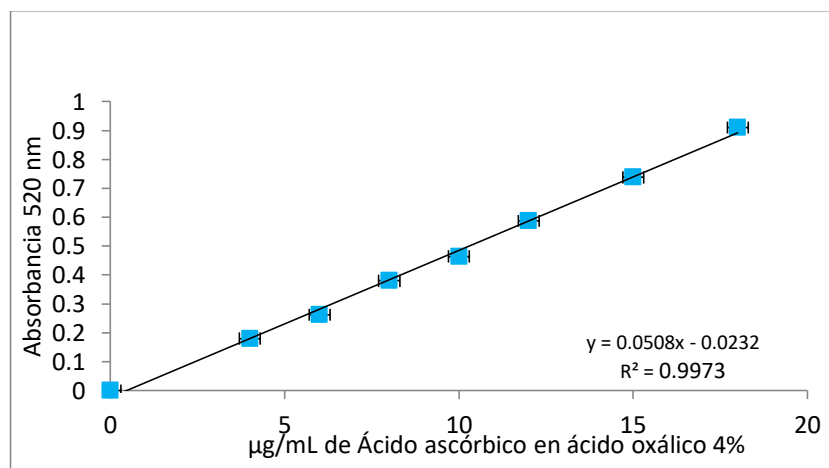
Anexo 5. Curva de calibración de catequina



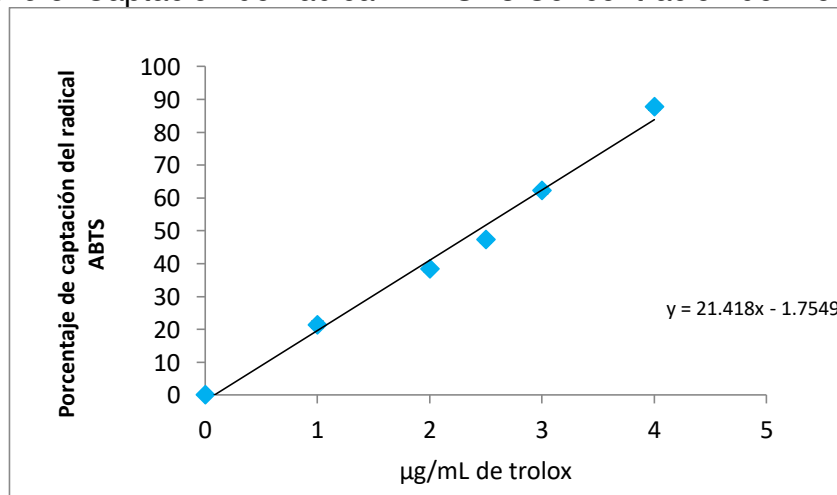
Anexo 6. Curva calibración de quercetina



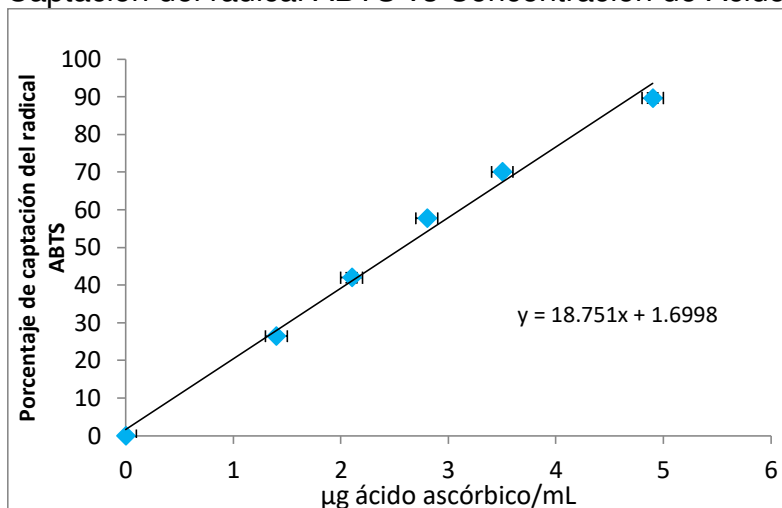
Anexo 7. Curva de calibración de L-Ácido ascórbico



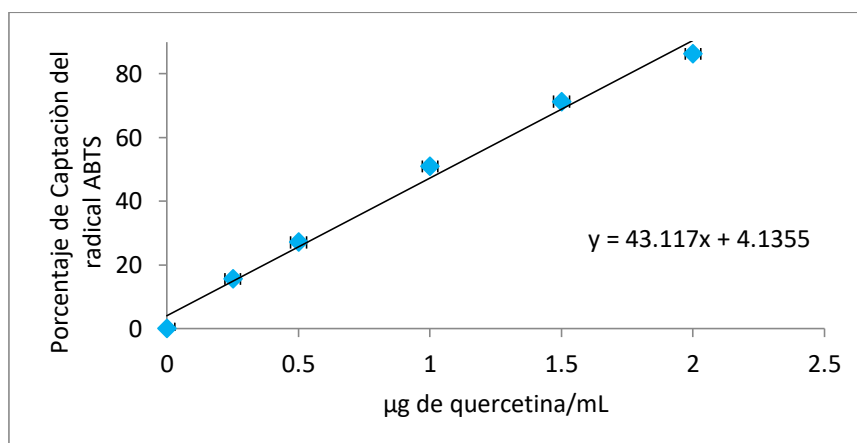
Anexo 8. Captación del radical ABTS vs Concentración de Trolox.



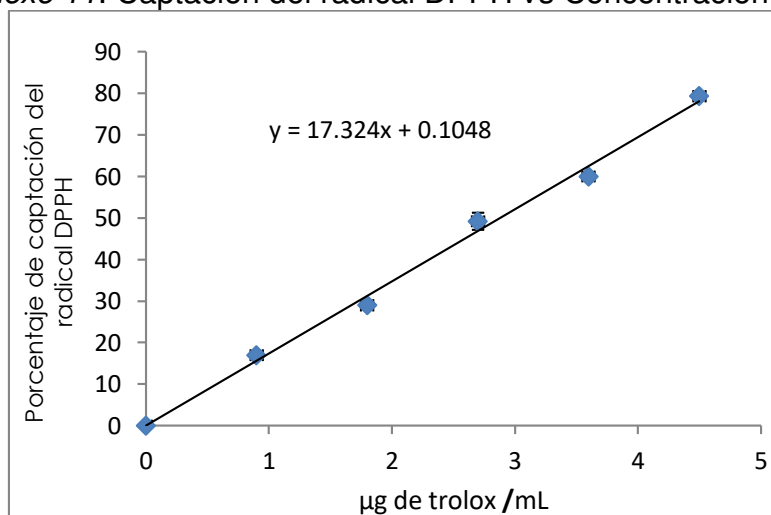
Anexo 9. Captación del radical ABTS vs Concentración de Ácido ascórbico



Anexo 10. Captación del radical ABTS vs concentración de Quercetina



Anexo 11. Captación del radical DPPH vs Concentración Trolox



Anexo 12. Captación del radical DPPH vs Concentración de Ácido ascórbico

