



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante del
extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen*
(Molina) A. Gray “Arrayan”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Katherine Yuliana CADILLO ESPINOZA

ASESOR

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA

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

Cadillo K. Polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayan” [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	-
DNI o pasaporte del autor	46588125
Código ORCID del asesor	0000-0001-8012-967X
DNI o pasaporte del asesor	25455526
Grupo de investigación	-
Agencia financiadora	-
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Provincia de Angaraes ,Departamento de Huancavelica:: -74.6914 12° 54' 47" S, 74° 41' 29" O Universidad Nacional Mayor de San Marcos: 12°03'00"S, 77°02'00"O.
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018
Disciplinas OCDE	Química orgánica http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**Polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de
*Luma chequen (Molina) A. Gray "Arrayan"***

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

KATHERINE YULIANA CADILLO ESPINOZA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE (17) DIECISIETE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 19 de noviembre de 2020

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Presidente

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 619-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

N° BR233265



DEDICATORIA

A Dios:

Gracias por haberme permitido llegar hasta este momento tan especial en mi formación académica. Gracias por dame la fortaleza que necesite para no desfallecer ante las adversidades que se presentaron.

Los seres que me dieron la vida:

Epifanio Cadillo y Yanne Espinoza gracias por sus consejos de perseverancia y constancia, por brindarme su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por fomentaren mi un deseo de triunfo y superación frente a todas las dificultades que se me presenten.

A mí querida hermana

Lisbeth María Cadillo Espinoza por la confianza, su apoyo incondicional, cariño y alegría que siempre me ha sabido brindar.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud principalmente está dirigida a nuestros profesores por brindarnos todos los conocimientos necesarios para nuestra formación profesional. De manera muy particular agradecer a mi asesor de tesis Dr. Américo Castro L. por sus conocimientos, orientaciones, paciencia y apoyo en la realización de este proyecto que enmarca el último escalón hacia un futuro en donde sea participe en el mejoramiento del proceso de enseñanza-aprendizaje.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1.1. Formulación del problema	2
	1.2. Objetivo general	2
	1.3. Objetivos específicos	2
	1.4. Hipótesis	2
II.	GENERALIDADES	3
	2.1. Antecedentes	3
	2.2. Familia Myrtaceae	7
	2.3. <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayan”	7
	2.3.1. Clasificación taxonómica	7
	2.3.2. Distribución geográfica	8
	2.3.3. Descripción botánica	8
	2.3.4. Propiedades medicinales	9
	2.3.5. Aspectos fitoquímicos y bioquímicos	9
III.	MARCO TEÓRICO	10
	3.1. Compuestos polifenólicos	10
	3.2. Flavonoides	13
	3.3. Actividad antioxidante	16
	3.3.1. Estrés oxidativo	16
	3.3.2 Radicales libres	17
	3.3.3. Antioxidantes	19
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	21
	4.1. Materiales, Equipos y Reactivos	21
	4.1.1. Material biológico	21
	4.1.2. Materiales	21
	4.1.3. Equipos	21
	4.1.4. Reactivos	22
	4.2. Lugar donde se desarrolló la investigación	22
	4.3. Tipo de investigación	23
	4.4. Flujograma del trabajo experimental	23

4.5. Recolección y clasificación taxonómica	23
4.6. Procesamiento de la muestra	24
4.7. Elaboración de extracto hidroalcohólico	24
4.8. Análisis fitoquímico	24
4.9. Fenoles totales-Método de Folin-Ciocalteu.	24
4.9.1. Fundamento	24
4.9.2. Procedimiento	25
4.10. Flavonoides totales - Método de $AlCl_3$	26
4.10.1. Fundamento	26
4.10.2. Procedimiento	27
4.11. Actividad antioxidante	28
4.11.1. Método de Captación del Radical DPPH	28
4.11.1.1. Fundamento	28
4.11.1.2. Procedimiento	29
4.11.2. Método de captación del Radical $ABTS^{\cdot+}$	30
4.11.2.1. Fundamento	30
4.11.2.2. Procedimiento	31
V. RESULTADOS	32
5.1. Análisis fitoquímico	32
5.2. Compuestos fenólicos totales	34
5.3. Flavonoides totales	35
5.4. Actividad antioxidante	37
5.4.1. Método del 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	37
5.4.2. Método 2,2-Azino-Bis-(3-Etilbenzotiazolin-6-Ácido Sulfónico) ($ABTS^{\cdot+}$)	39
5.4.2.1. Extracto hidroalcohólico	39
5.4.2.2. Patrón trolox	41
VI. DISCUSIÓN	42
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. RECOMENDACIONES	46
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
X. ANEXOS	54

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

ABTS⁺: 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico).

CI₅₀: Concentración media inhibitoria máxima.

TEAC: Actividad equivalente a trolox en µg/mg extracto.

%CSRL: Porcentaje de captación de radicales libres.

CSP: Concentración suficiente para llevar a volumen.

DE: Desviación estándar.

ANOVA: Analysis of Variance (Análisis de varianza)

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

EQ: Equivalentes de quercetina.

AG: Ácido gálico.

Q: Quercetina.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ES: Extracto Seco.

CF: Compuestos fenólicos.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución; familia Myrtaceae.

Figura 2: Hojas de *Luma chequen*.

Figura 3. *Especie vegetal L.chequen*

Figura 4. Esquema que muestra las rutas de biosíntesis de los compuestos fenólicos.

Figura 5. Compuestos fenólicos:(1) Fenol, (2) Acido gálico.

Figura 6. Estructuras y clasificación de polifenoles.

Figura 7. Estructura básica de los flavonoides.

Figura 8. Estructuras químicas y clasificación de flavonoides.

Figura 9. Representación de los grupos funcionales presentes en la estructura de la quercetina.

Figura 10. Diagrama esquemático que muestra el mecanismo del estrés oxidativo en el desarrollo de diversas enfermedades.

Figura 11. Diagrama del trabajo experimental.

Figura 12. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

Figura 13. Estructura del complejo $AlCl_3$ -flavonoide

Figura 14. Reacción de reducción de DPPH• por antioxidantes.

Figura 15. Reacción de reducción de ABTS^{•+} por antioxidantes.

Figura 16. Representación gráfica concentración-absorbancia del ácido gálico

Figura 17. Representación gráfica concentración-absorbancia del estándar de quercetina.

Figura 18. Representación gráfica concentración ($\mu\text{g/mL}$) vs % CSRL del extracto hidroalcohólico – Ensayo DPPH.

Figura 19. Representación gráfica concentración ($\mu\text{g/mL}$) vs % CSRL del patrón trolox -Ensayo DPPH

Figura 20. Representación gráfica concentración ($\mu\text{g/mL}$) vs % CSRL del extracto hidroalcohólico - Ensayo ABTS

Figura 21. Representación gráfica concentración ($\mu\text{g/mL}$) vs % CSRL del patrón trolox – Ensayo ABTS.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diluciones; estándar de ácido gálico.

Tabla 2. Dilución; solución estándar de quercetina.

Tabla 3. Dilución del extracto hidroalcohólico –Ensayo DPPH.

Tabla 4. Dilución del patrón Trolox -Ensayo DPPH.

Tabla 5. Dilución del extracto hidroalcohólico – Ensayo ABTS^{•+}.

Tabla 6. Dilución del patrón trolox- Ensayo ABTS^{•+}.

Tabla 7. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico *L.chequen*.

Tabla 8. Absorbancias del estándar de ácido gálico a 765 nm.

Tabla 9 . Absorbancias promedio y contenido de compuestos fenólicos totales del extracto hidroalcohólico

Tabla 10. Promedio de las lecturas del estándar de quercetina a 420 nm.

Tabla 11. Promedio de las absorbancias y contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico.

Tabla 12. Resultados del extracto hidroalcohólico de las hojas *Luma chequen* -Ensayo DPPH.

Tabla 13. Promedio de las lecturas de la solución del patrón Trolox a 517nm y su Cl_{50} .

Tabla 14. Resultados expresados en Cl_{50} y TEAC por el ensayo DPPH.

Tabla 15. Resultados del extracto hidroalcohólico de las hojas *Luma chequene*-Ensayo ABTS^{•+}.

Tabla 16. Promedio de las lecturas de la solución de patrón Trolox a 734nm y su Cl_{50} .

Tabla 17. Resultados expresados en Cl_{50} y TEAC por el método ABTS^{•+}.

RESUMEN

Luma chequen fue recolectada en la provincia de Angaraes departamento de Huáncavelica, el trabajo de investigación se llevó a cabo en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. **Objetivos:** Determinar el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen*. **Métodos:** Los compuestos fenólicos se determinaron según el método espectrofotométrico de Folin- Ciocalteu, empleando el ácido gálico como estándar, los flavonoides se determinaron espectrofotométricamente empleando a la quercetina como estándar de referencia y los métodos de ABTS y DPPH, utilizando al Trolox como patrón. **Resultados:** El contenido de los Compuestos fenólicos fue 13,83 mg EAG/g de extracto seco, flavonoides fue 15,94 mg EQ/g extracto seco, la capacidad antioxidante, por el método de DPPH^{*} presentó CI_{50} 22,87 $\mu\text{g/mL}$, por el ABTS presentó CI_{50} 415,07 $\mu\text{g/mL}$. Presentaron como valor de TEAC: 314,39 $\mu\text{g Trolox/mg extracto}$ y 351,31 $\mu\text{g Trolox/mg extracto}$ por DPPH y ABTS. **Conclusiones:** La determinación de los compuestos fenólicos es menor en comparación al resultado obtenido en la cuantificación de flavonoides, asimismo; en la determinación de la actividad antioxidante se obtuvieron resultados de TEAC muy cercanos, expresando una confiabilidad del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen* con capacidad antioxidante como donador de hidrógenos.

Palabras clave: *Luma chequen*, compuestos fenólicos, flavonoides, antioxidante.

ABSTRACT

Luma chequen was collected in the province of Angaraes department of Huancavelica; the research work was carried out at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the UNMSM. **Objectives:** to determine the content of the phenolic compounds, flavonoids and the antioxidant activity in vitro of the hydroalcoholic extract of *Luma chequen*. **Methods:** The phenolic compounds were determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu, using gallic acid as standard, the flavonoids were determined spectrophotometrically using quercetin as a reference standard, while the antioxidant activity was determined by the ABTS and DPPH methods using Trolox as standard. **Results:** The content of phenolic compounds of 13,83 mg EAG/g dry extract, flavonoids of 15,94 mg EQ/g dry extract, the antioxidant capacity, by the DPPH method - presented IC_{50} 22,87 μ g/mL, by ABTS presented IC_{50} 415,07 μ g/mL. They presented as TEAC value: 314, 39 μ g Trolox/mg extract and 351, 31 μ g Trolox/mg extract by DPPH and ABTS. **Conclusions:** The determination of phenolic compounds is lower compared to the result obtained in the quantification of flavonoids, likewise; In the determination of antioxidant activity, very close TEAC results were obtained, expressing a reliability of the hydroalcoholic extract of *Luma chequen* with antioxidant capacity as a hydrogen donor.

Keywords: *Luma chequen*, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú está situado dentro de las áreas geográficas consideradas centros de biodiversidad mundial, siendo un país megadiverso en lo que respecta a la existencia de recursos de flora y fauna. Destaca significativamente la presencia de plantas útiles para el hombre, en particular las alimenticias y medicinales, que vienen siendo utilizadas desde los pobladores pre-Incas e Incas¹.

Las plantas medicinales han significado a través de la historia una de las principales alternativas para el cuidado del bienestar humano, según la OMS su empleo es considerado como la medicina más natural, inocua, efectiva, además de tener un costo racional, ser asequible y aceptada por la población. También señala que el uso extensivo de antioxidantes sintéticos y su ingesta prolongada pueden estar asociados con la aparición de enfermedades².

Estudios científicos justifican la presencia de principios activos, los cuales son responsables de las propiedades, medicinales que se les atribuyen a las plantas, son productos no vitales elaborados por la planta como parte de su metabolismo normal³.

Los compuestos fenólicos que contienen las plantas presentan estructuras variadas, como los ácidos fenólicos, derivados de la cumarina, los taninos y los flavonoides, que pueden actuar como agentes reductores, eliminadores de radicales libres, quelantes de metales o desactivadores de oxígeno singlete⁴. Dichos compuestos forman parte de la mayor cantidad de los productos naturales que el hombre consume y en investigaciones actuales se ha evidenciado que la actividad antioxidante tiene un efecto beneficioso para la salud. La importancia del consumo exógeno de antioxidantes por medio de la dieta, incrementan la protección del cuerpo y ayudan a prevenir diversas enfermedades como el cáncer, ahí radica el interés por la búsqueda de nuevas fuentes naturales con contenido de polifenoles⁵.

Por lo expuesto, estudiar las especies vegetales es de suma importancia para encontrar metabolitos bioactivos con potencial actividad antioxidante. El estudio

tuvo como propósito determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen*.

1.1. Formulación del problema

¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* contiene fenoles totales y flavonoides con potencial actividad antioxidante?

1.2. Objetivo general

- Determinar el contenido de los polifenoles y flavonoides de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayan” con actividad antioxidante.

1.3. Objetivos específicos

- Evidenciar fitoquímicamente los principios activos en el extracto hidroalcohólico de hojas de *L. chequen*.
- Determinar el contenido de fenoles totales.
- Determinar el contenido de flavonoides.
- Determinar la capacidad antioxidante.

1.4. Hipótesis

El extracto de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayan” presenta compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

A NIVEL INTERNACIONAL

Rosa C. *et al.* (2016). En su artículo titulado “Chemical characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia Florida DC* (Myrtaceae) leaves”. **Objetivo:** Caracterizar, cuantificar los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en el extracto etanólico (70% (v / v) de las hojas de *E. florida DC* y evaluar la actividad antimicrobiana. **Tipo de investigación:** Experimental y prospectivo. **Método:** La caracterización química se realizó por espectrometría de masas, la determinación de los compuestos fenólicos totales con el método Folin-Ciocalteu, los flavonoides fueron cuantificados basándose en la formación de complejos de flavonoides y aluminio, el contenido de taninos a través el método de Hagerman y la evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de microdilución. **Resultado:** Los metabolitos secundarios encontrados coincidieron con lo descrito en la literatura: flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y saponinas. El extracto mostró niveles de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos iguales a 25,82 mg EAG / g, 8,42 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (EQ / g) y 7,30 mg de ácido tánico /g de extracto (AT / g), respectivamente. En el análisis de la actividad antimicrobiana, el extracto fue más activo contra las levaduras. **Conclusión:** Se concluyó que *E. florida DC* tiene potencial antimicrobiano, debido a la presencia de metabolitos secundarios bioactivos⁶.

Panawala P. *et al.* (2016). En su artículo titulado “Phytochemical Distribution and Bioactivity of Different Parts and Leaf Positions of *Pimenta Dioica* (L.) Merr (Myrtaceae)”. **Objetivo:** Comparar la capacidad antioxidante total (TAC), el contenido fenólico total (TPC), el contenido total de flavonoides (TFC), en diferentes partes de la planta (hojas inmaduras, hojas maduras y corteza). **Tipo de investigación:** Experimental, comparativo y prospectivo. **Método:** Los TAC, TPC y TFC se determinaron utilizando el ensayo de potencia antioxidante reductora férrica (FRAP), el método modificado de Folin-Ciocalteu y el método colorimétrico, respectivamente. **Resultado:** Se observó un TAC significativamente mayor $562,38 \pm 9,42$ (mg equivalentes de trolox / g muestra), TPC $279.53 \pm 7,02$ (mg de ácido

gálico / g muestra) en el extracto de hoja obtenido de la primera posición de la hoja. Sin embargo, el TFC más alto $303,48 \pm 8,87$ (mg equivalentes de rutina/ g muestra) se observó en la posición de la quinta hoja. De acuerdo con el patrón de distribución fitoquímica, TAC significativamente más alto [$619,84 \pm 11,98$ mg equivalentes de trolox / g muestra], TPC [$267,53 \pm 5,03$ (mg equivalentes de ácido gálico / g muestra)], TFC [$305,48 \pm 8,87$ mg equivalentes de rutina / g muestra)] fueron observado en extractos obtenidos de la región del brote. **Conclusión:** Las hojas inmaduras contienen mayor cantidad de metabolitos secundarios por lo que el autor sugiere una cosecha de estas para obtener mejores beneficios terapéuticos⁷.

Lillio A. et al. (2016). En su artículo titulado “Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América” **Objetivo:** Determinar el contenido de fenoles en los distintos tipos berries nativos del Cono Sur por métodos espectrofotométricos y su relación con la actividad antioxidante. **Tipo de investigación:** Experimental y prospectivo. **Método:** Se realizó la cuantificación de fenoles totales, flavonas y flavonoles totales, proantocianidinas totales, antocianinas totales, ácidos fenólicos totales, taninos totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) de *Ugni molinae*, *Aristotelia chilensis*, *Berberis darwinii*, *Luma apiculata* y *Vaccinium corymbosum*. **Resultado:** El berrie que obtuvo una mayor concentración de fenoles totales, antocianinas totales y proantocianidinas totales fue *A. chilensis*, además, fue el de mayor poder antioxidante, *L. apiculata* fue la segunda especie que contiene mayor cantidad de polifenoles y se obtuvo la concentración media inhibitoria por DPPH (CI₅₀:8,08 mg/mL) y ABTS (CI₅₀: 24 mg/mL). **Conclusión:** Presentan una gran variedad de compuestos y en diferentes concentraciones, cada tipo de berries, esto facilita una caracterización química temprana que permite comparaciones cuantitativas, en forma rápida y a bajo costo⁸.

Kabra S. et al. (2018). En su artículo titulado “Total Phenolics and flavonoid content of the leaves of *Carica papaya* and *Syzygium cumini*”. **Objetivos:** Determinar el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos acuosos de *Carica Papaya* (papaya) y *Syzygium Cumini* (ciruela negra). **Método:** Los polifenoles se determinaron por el Folin-Ciocalteu y los flavonoides por el método colorimétrico con cloruro de aluminio. **Resultado:** En la cuantificación de polifenoles en las hojas de las especies *Syzygium cumini* y *Carica papaya* se obtuvo respectivamente 16,511

mg AG/g muestra y 14,532 mg AG/g muestra, en el contenido de flavonoides 8,746 mg Q/ g muestra y 5,469 mg Q/ g muestra. **Conclusión:** En los extractos acuosos de ambas hojas se obtuvo un contenido significativo de fenoles y flavonoides, este resultado se relaciona con sus propiedades medicinales⁹.

Nesrine M. *et al.* (2019). En su artículo titulado "Characterization of phenolic compounds from *Eugenia supraaxillaris* leaf extract using HPLCPDA- MS/MS and its antioxidant, anti-inflammatory, antipyretic and pain killing activities *in vivo*" **Objetivo:** Caracterizar los metabolitos fenólicos de las hojas de *Eugenia supraaxillaris*, evaluar la actividad antioxidante del extracto *in vitro* e *in vivo* e investigar las actividades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas en modelos de rata y ratón. **Tipo de investigación:** Experimental, prospectivo y longitudinal. **Método:** Se utilizó un espectrómetro de masas para separar los analitos, aislamiento e identificación de los metabolitos fenólicos de acuerdo con sus datos espectrales UV, evaluación antioxidante *in vitro* por DPPH y FRAP, determinación del contenido fenólico total utilizando el método Folin-Ciocalteu. **Resultado:** Se aislaron e identificaron cinco compuestos fenólicos basándose en su comportamiento cromatográfico y los datos espectrales UV, mostró actividades antioxidantes sustanciales *in vitro* en DPPH (EC₅₀ 9,17 µg /mL) y FRAP (17,12 Mm FeSO₄ equivalentes /mg extracto), ambos ensayos fueron comparados con controles positivos de ácido ascórbico y quercetina, respectivamente. El contenido fenólico total ascendió a 335 mg EAG / g de muestra. Además, la capacidad antioxidante total (TAC) de la muestra fue 1,5 veces mayor que el del compuesto antioxidante sólido, ácido ascórbico. **Conclusión:** El estudio sugiere que *E. supraaxillaris* podría ejercer propiedades protectoras contra la oxidación y la liberación de radicales asociado con diversos trastornos patológicos¹⁰.

Bastos R. *et al.* (2019). En su artículo titulado "Phytochemical composition, antioxidant and *in vivo* antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves". **Objetivos:** Identificar los compuestos químicos presentes en el extracto hidroetanólico de hojas de *Eugenia florida* DC. por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas e investigar los efectos antioxidantes y antidiabéticos en ratas diabéticas tipo 1 inducidas por aloxano. **Tipo de investigación:** Experimental, prospectivo y transversal **Método:** La caracterización química en el extracto se realizó utilizando un cromatógrafo líquido acoplado al espectrómetro de masas, utilizando

el modo de ionización negativa. La evaluación antioxidante de los extractos se realizó mediante el método DPPH y se evaluó los parámetros bioquímicos de ratas diabéticas tratadas con el extracto. **Resultados:** Se identificaron compuestos fenólicos y flavonoides a través del método de caracterización química. y se obtuvo resultados de DPPH 64,41 µg/mL y EC₅₀ 12,77 µg/mL. **Conclusión:** Las hojas de la especie *E.florida* DC. muestra una excelente actividad antioxidante en los experimentos *in vitro* e *in vivo* y en ambos resultados se evidencia una correlación¹¹.

A NIVEL NACIONAL

Linares D. (2019). En su tesis titulada “Efecto Antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray”. **Objetivos:** Identificar los metabolitos primarios, secundarios y comprobar el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen*. **Tipo de investigación:** Experimental, prospectivo y descriptivo. **Método:** La identificación cualitativa de los metabolitos se realizó a través de reacciones de coloración y precipitación, se comprobó la actividad antiinflamatoria por el método modificado de edema subplantar con solución de albúmina 1%. **Resultados:** En el análisis cualitativo de la hojas de *Luma chequen* se identificó flavonoides , fenoles, taninos, alcaloides , cumarinas , esteroides y/o triterpenoides y la actividad antiinflamatoria demuestra que a una dosis de 200 mg/kg se evidencia la inhibición de la inflamación del 82,3% comparable al diclofenaco y la dexametasona. **Conclusión:** La especie vegetal en estudio contiene varios metabolitos tanto primarios como secundarios y presenta una actividad antiinflamatoria similar a los medicamentos utilizados como estándar¹².

2.2. Familia Myrtaceae

Las especies vegetales pertenecientes a esta familia son angiospermas que están conformadas por 133 géneros y más de 3800 especies aproximadamente. Su centro de diversidad está en Australia, sureste asiático y las regiones tropicales y subtropicales de América, teniendo una representación pequeña en África. Los dos grandes centros de dispersión geográfica están representados por la sub familia *Leptospermoideae*, distribuida principalmente en Australia , la Polinesia, y la subfamilia *Myrtoideae*, distribuida principalmente en las regiones tropicales y subtropicales americanas y zonas templadas¹³.

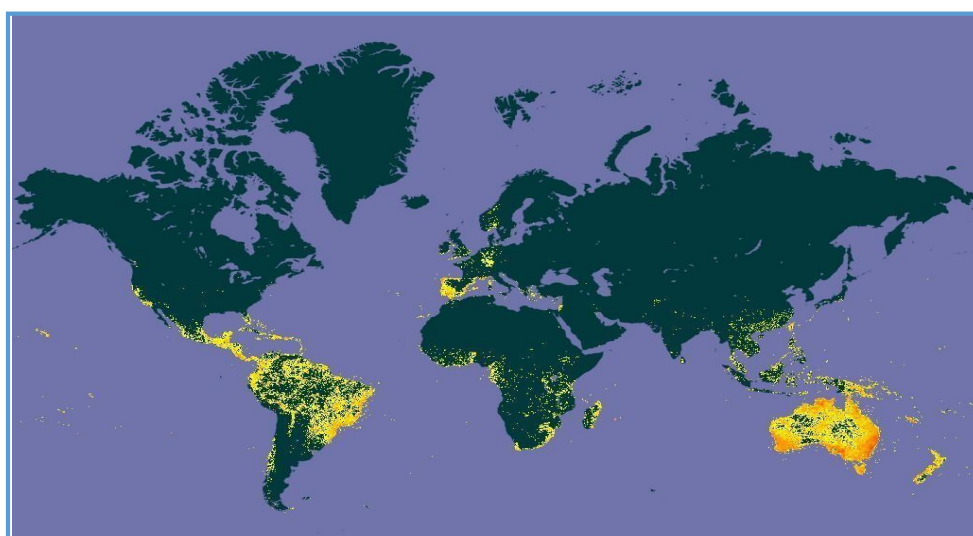


Figura 1. Distribución de la familia Myrtaceae¹³.

*Las zonas amarillas, naranjas y rojas corresponden a la distribución de la familia Myrtaceae

2.3. *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayan”

2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: PLANTAE.

División: MAGNOLIOPHYTA.

Clase: MAGNOLIOPSIDA.

Subclase: ROSIDAE.

Orden: MYRTALES.

Familia: MYRTACEAE.

Género: *Luma*.

Especie: *Luma chequen* (Molina) A. Gray.

Nombre vulgar: “Arrayan”.



Figura 2: Hojas de *Luma chequen*
Fuente: Propia

2.3.2. Distribución geográfica

Es una especie endémica de los bosques centrales andinos entre Perú, Bolivia y Chile se desarrolla a una altitud de 2500-4000 m.s.n.m. En el Perú se distribuye en la sierra central y sur, ubicándose en los departamentos de Ancash, Pasco, Lima, Junín, Ayacucho y Cusco, extendiéndose hacia el sur. Su hábitat son las orillas de los ríos y los suelos húmedos¹⁴.

2.3.3. Descripción botánica

Arbusto que alcanza una longitud de 6 metros de alto, con un diámetro aproximadamente de cinco metros presenta abundante follaje de color verde, con un tallo empinado y ramificado de color pardo grisáceo, desprende un aroma *sui generis* suave. Las hojas son simples, opuestas, decusadas de forma elíptica de borde entero, lustroso, glabro y fragante. Sus flores son de color blanco se distribuye en posiciones axilares, solitarias, hermafroditas, multilaterales y tetrámeras, bisexual formada por un cáliz persistente de cuatro cortos sépalos y cuatro pétalos glabros, tienen numerosos estambres blancos muy largos rodeando a un único pistilo rojizo, de ovario epigina con placentación axilar. El fruto es una baya con escasa semillas y escaso endosperma¹⁵.



(1) Fuente: Propia, (2) Fuente: Herbarium Field Museum¹⁶.

2.3.4. Propiedades medicinales

Dentro de las propiedades medicinales, se utilizan para el tratamiento de tos, alteraciones digestivas e infecciones puerperales (hojas y tallos). En diversos estudios etnobotánicos, se hacen mención de sus propiedades antireumáticas, antidiarreicas, antisépticas, astringentes, hemostáticas, vasoconstrictoras, antiinflamatorias y analgésicas. Asimismo, se le confiere actividad fungistática contra *Cándida albicans*, efecto hipoglucemiante en la cual disminuye significativamente la glucosa, posee efecto hipolipemiante disminuyendo valores de LDL y VDL y antiterogénico.

Las hojas son empleadas en la preparación de infusiones para el alivio de los síntomas de flatulencia. Se usa también para conservar los tejidos post mortem, en Ayacucho, usan el follaje para conferirle sabor y olor a las comidas, además de ser una especia para condimentar los embutidos¹⁷.

2.3.5. Aspectos fitoquímicos y bioquímicos

En diversos estudios se resalta la presencia de varios metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, derivados de flavonoles (hiperósido., Isotrifolina ,quercetina, rutina, miricitina y isorhamentina), ácidos fenólicos (ácido 3-O- feruloil-D-quínico, clorogenato y ácido neoclorogenico) y antocianinas (delfinidina, cianidol, petunidina, peonidina y malvidina) y taninos o sus monómeros. En los análisis bioquímicos la actividad antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* está relacionada con el contenido de compuestos de naturaleza fenólica¹⁸.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Compuestos polifenólicos

En el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos, las plantas que sintetizan miles de compuestos fenólicos (CF) diferentes. El contenido de polifenoles (PF) en las plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica. Además de participar en la función fisiológica de los vegetales, también son componentes importantes de la dieta humana¹⁹.

Los metabolitos secundarios se clasifican en fenilpropanoides, acetogeninas, terpenoides y alcaloides de acuerdo a su ruta biosintética. Los fenilpropanoides derivan de la fenilalanina, la cual se forma por la vía del ácido shikímico. Los fenilpropanos pueden formar moléculas fenólicas simples (ácidos gálico, tánico, benzoico y protocatéquico). Los ácidos fenólicos y algunos azúcares pueden dar origen a taninos los cuales son polifenoles solubles en agua y tienen la capacidad de precipitar proteínas²⁰.

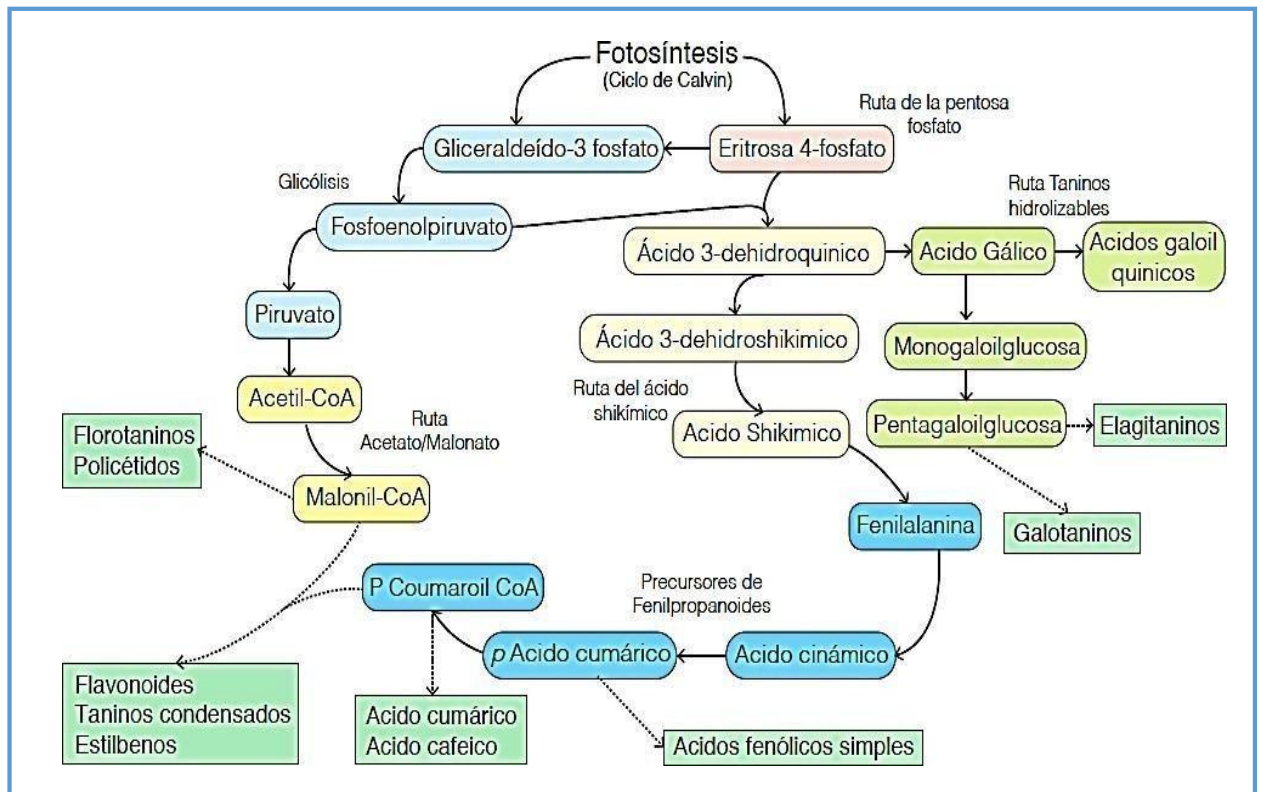


Figura 4. Esquema que muestra las rutas de biosíntesis de los compuestos fenólicos²⁰.

Los antioxidantes polifenólicos son los compuestos naturales más empleados para proteger a los componentes celulares del daño oxidativo causado por ROS y metales de transición, debido a sus propiedades antioxidantes bien reconocidas y a sus efectos beneficiosos en el control de envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Operan previniendo o ralentizando la progresión del daño oxidativo al minimizar la oxidación de biomoléculas cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con los sustratos oxidables. Suelen ser compuestos multifuncionales que ejercen sus efectos por diferentes mecanismos incluyendo la neutralización de radicales (actividad de barrido), secuestrando iones de metales de transición (actividad de quelación) e inhibiendo las enzimas involucradas en la sobreproducción de especies reactivas²¹.

Está conformado por un grupo heterogéneo de moléculas que comprenden estructuras simples como el ácido gálico (ácido fenólico) y estructuras complejas como los taninos, presentan anillo(s) aromáticos junto con grupo(s) hidroxilos²².

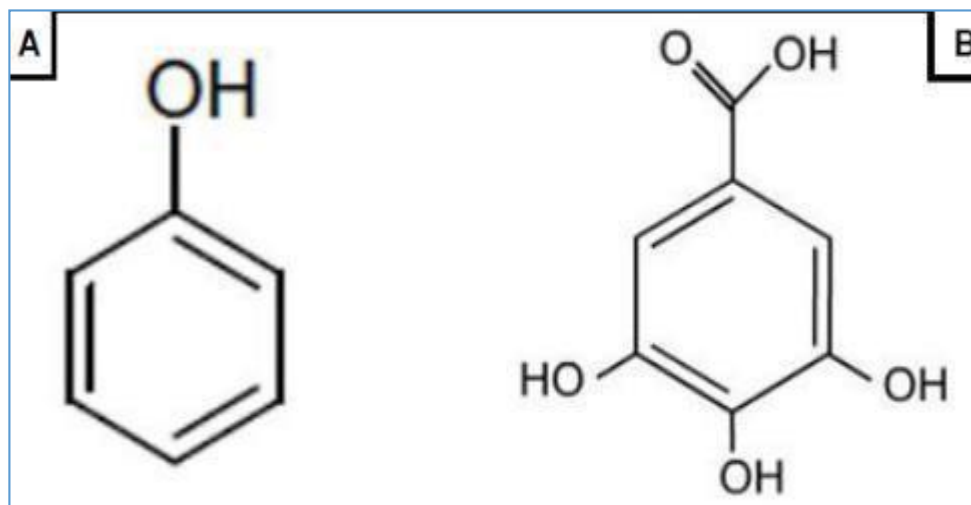


Figura 5. Compuestos fenólicos: 1 Fenol, 2 Acido gálico²³.

Los polifenoles son sintetizados en gran cantidad y son producto del metabolismo secundario de las plantas. Se clasifican en: estilbenos, ácidos fenólicos y derivados simples, lignanos, taninos, y flavonoides (Fig3)²².

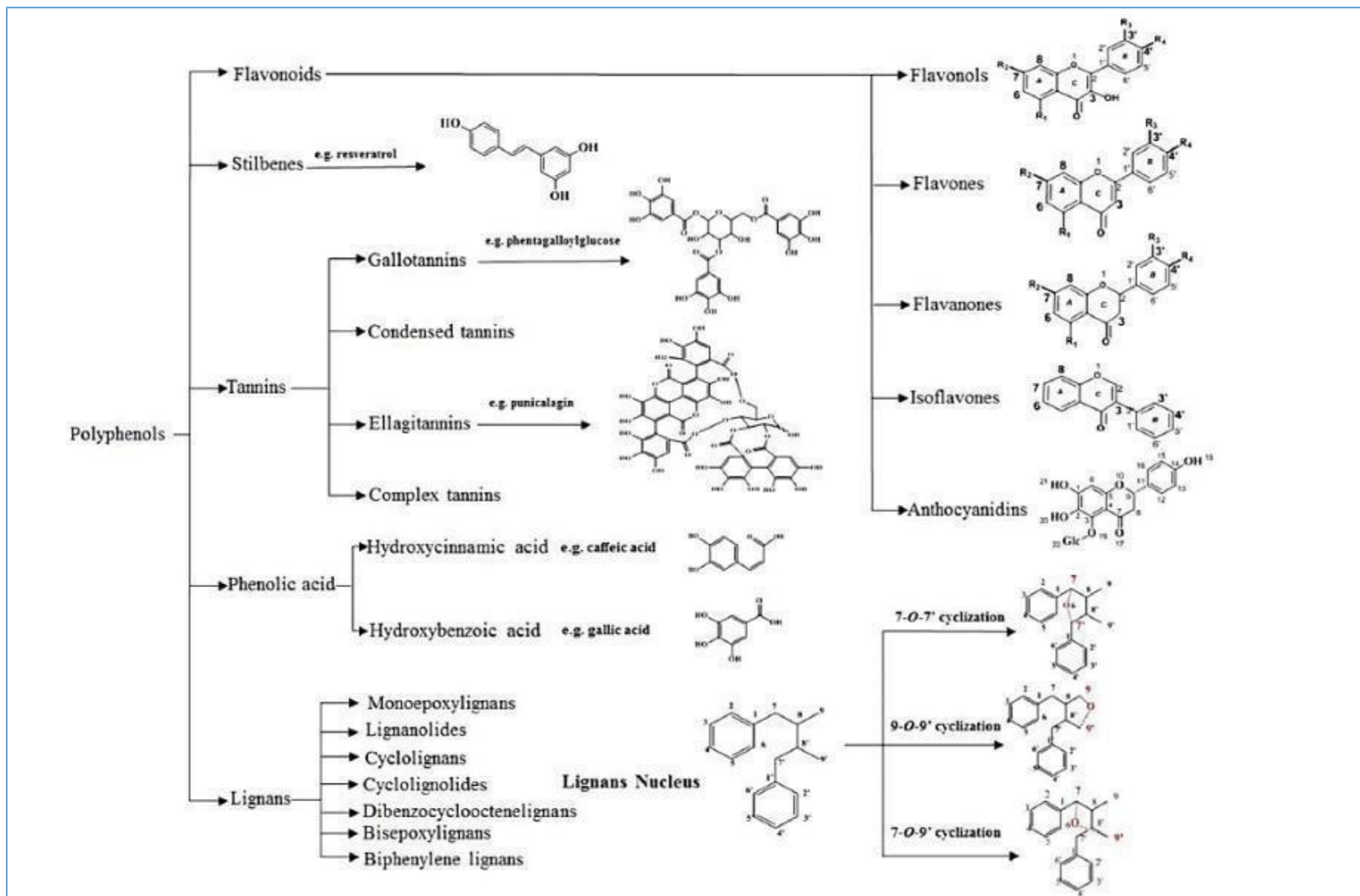


Figura 6. Estructuras y clasificación de polifenoles²⁴

3.2. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos, caracterizados por su núcleo 2-fenil-bencil- γ -pirona. La estructura base de los flavonoides puede sufrir varias modificaciones dando lugar a una diversidad estructural como la formación de auronas, flavanones, isoflavonas, flavonas, flavonoles y antocianinas. Son el resultado de la adición o reducción de diversos sustituyentes. Por ejemplo, los flavonoides pueden sufrir metilación por metiltransferasas y glicosilación por glicosiltransferasas específicas²⁵.

Los flavonoides se encuentran frecuentemente en sus formas glicosiladas o esterificadas, son compuestos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno²⁶.

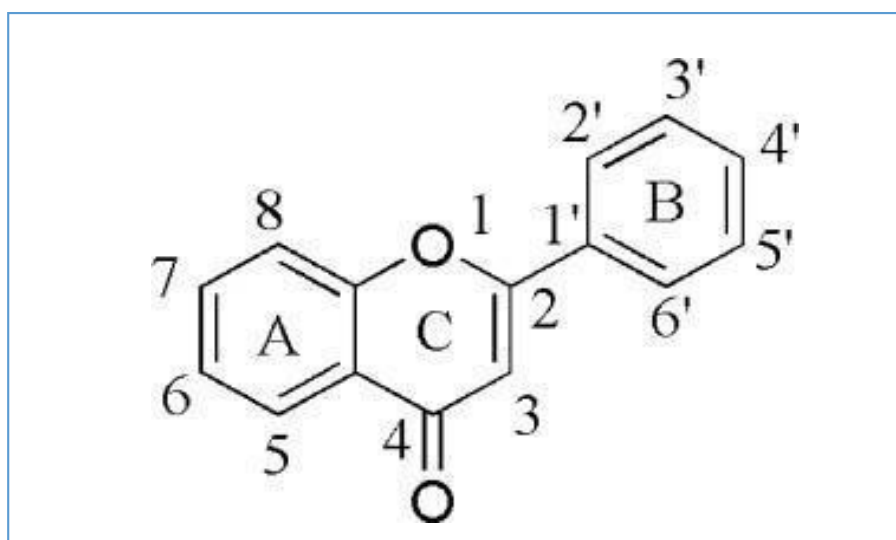


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides²⁶.

Las flavonas y flavonoles están presentes en muchos vegetales y son los flavonoides más comunes, se encuentran ampliamente distribuidos. Las flavanonas y los flavanones poseen enlaces saturados C₂ = C₃, y a menudo coexisten con flavonas y flavonoles relevantes en plantas. Las isoflavonas, como la daidzeína, son 3-fenil-cromonas, sustancias precursoras de la biosíntesis de flavonoides. Los chalcones son isómeros de dihidroflavonas de apertura en anillo C, responsables de la apariencia del color en las plantas. Falta típica de la estructura de flavonoides, se evidencia en las auronas con un anillo C de benzofurano de cinco miembros

derivados. Las antocianidinas son un grupo de importantes pigmentos de cromeno para el color característico de las plantas, existentes en forma de iones. Los flavanoles son productos de reducción de dihidroflavonoles, especialmente con distribución amplia de flavan-3-ols en el reino vegetal, también conocido como catequinas. Sin embargo, existen otros flavonoides sin esqueleto C6-C3- C6, por ejemplo, biflavonas, furanos, cromonas y xantonas; glucósidos con diferente categoría, número y patrón de conexión. Predominan las formas existentes de flavonoides. Privilegiando los sitios de glicosilación que estén asociados con la estructura de aglicones²⁶.

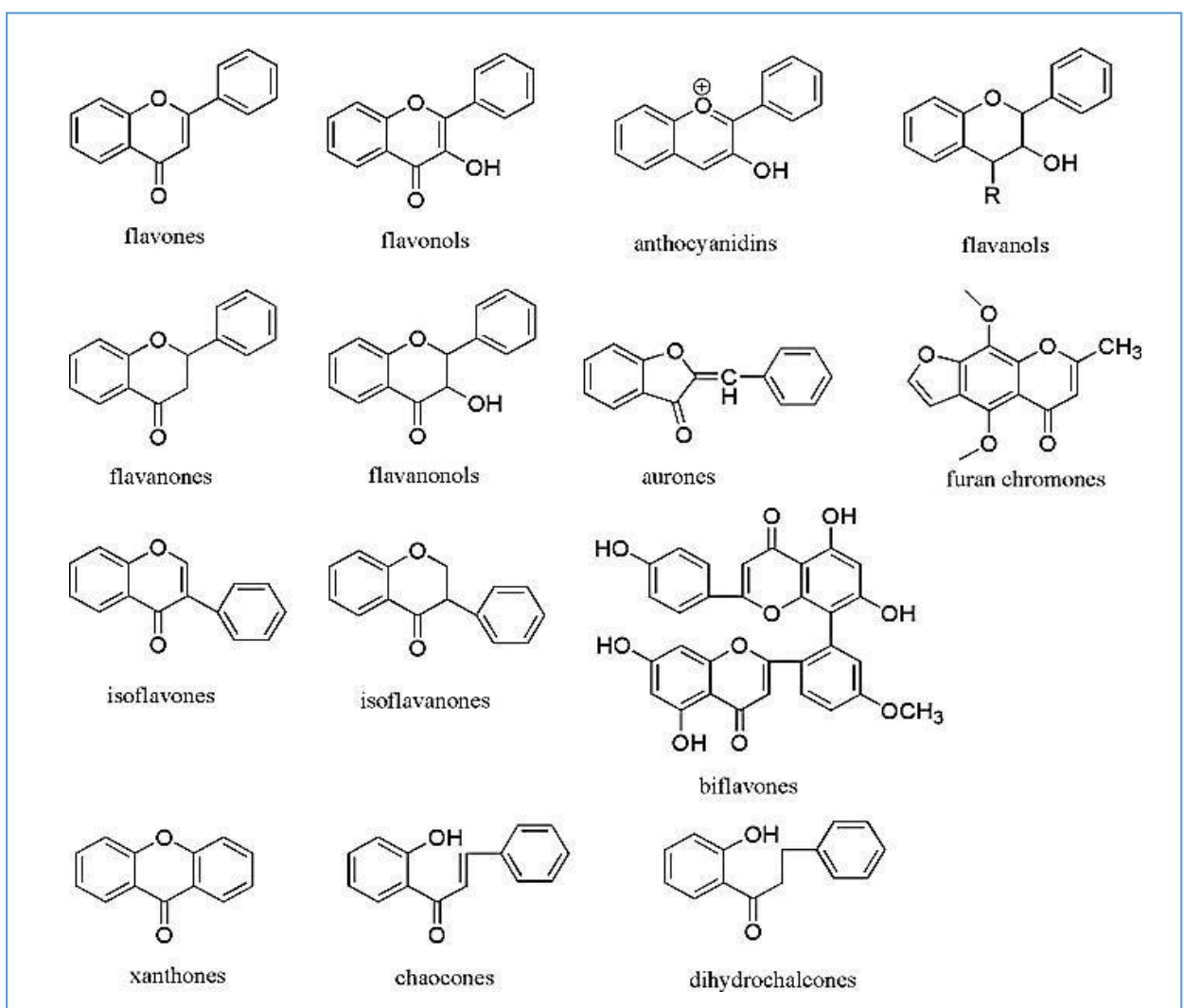


Figura 8. Estructuras químicas y clasificación de flavonoides²⁶.

Estos metabolitos evitan las lesiones producidas por los radicales libres a través de diversos mecanismos como: captación directa de especies reactivas de oxígeno, propiedades quelantes con metales, aminoran la presencia de radicales α - tocoferol, inhiben a las oxidasas, estimulan a las enzimas antioxidantes, atenúan la posibilidad de producirse estrés oxidativo por óxido nítrico, incrementan la acción de los antioxidantes de bajo peso molecular ²⁷.

El efecto anti lipoperoxidativo es mayor en las agliconas que en sus respectivos glicósidos. De acuerdo con lo mencionado, la quercetina pertenece a este grupo de compuestos, por lo cual presenta características estructurales que le permiten desempeñar una efectiva función antioxidante, además tiene una actividad alrededor de cinco veces más que las vitaminas C y E, también muestra una hidrosolubilidad igual a esta última²⁸.

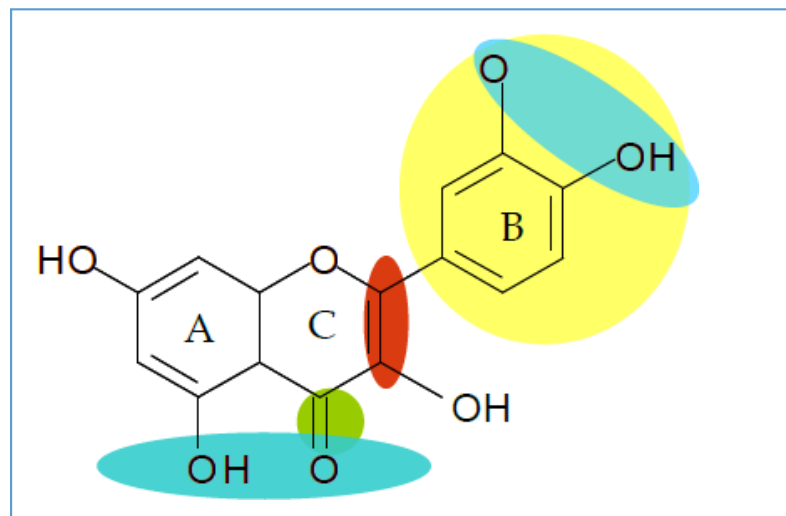


Figura 9. Representación de los grupos funcionales presentes en la estructura de la quercetina, los cuales son responsables de la propiedad antioxidante que presenta. En el anillo B se observa el grupo catecol (amarillo), enlace insaturado presente en el anillo C (Rojo); y la función 4-oxo, en el anillo C (azul) son puntos con capacidad de formar complejos con metales²⁹.

3.3. Actividad antioxidante

3.3.1. Estrés oxidativo

Se define como un desequilibrio a nivel celular en la síntesis de especies reactivas de oxígeno y la contrapuesta de mecanismos antioxidantes, se origina por el incremento de la producción de especies reactivas o por déficit de las defensas antioxidantes³⁰. Genera varias consecuencias nocivas para una célula o incluso todo el tejido.

Las principales causas son las siguientes:

- Disminuir el nivel de ATP en una célula; inactiva eficientemente la glucólisis por inhibición del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa(NADP⁺)
- Elevación del Ca²⁺ citosólico a través de la bomba de calcio(Inactivación)
- Daño en el ADN por radicales hidroxilo o por sobreactivación de nucleasa dependiente de calcio.
- Un daño nucleico masivo provoca la activación. de NAD (+) ADP-ribosiltransferasa y posteriormente el grupo celular de NAD⁺ y adenina de los nucleótidos están disminuidos.
- Mayor permeabilidad de la bicapa lipídica causada por despolarización de membrana inducida por la inhibición de la bomba de potasio;
- Disminución del nivel intracelular de glutatión. y cambios en las proporciones de la forma reducida a la oxidada (GSH / GSSG). Como resultado final de una exposición prolongada al estrés oxidativo, la célula sufre apoptosis o necrosis.

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer, es por ello que se evidencia la función que desempeñan los antioxidantes a través de su mitigación²⁴.

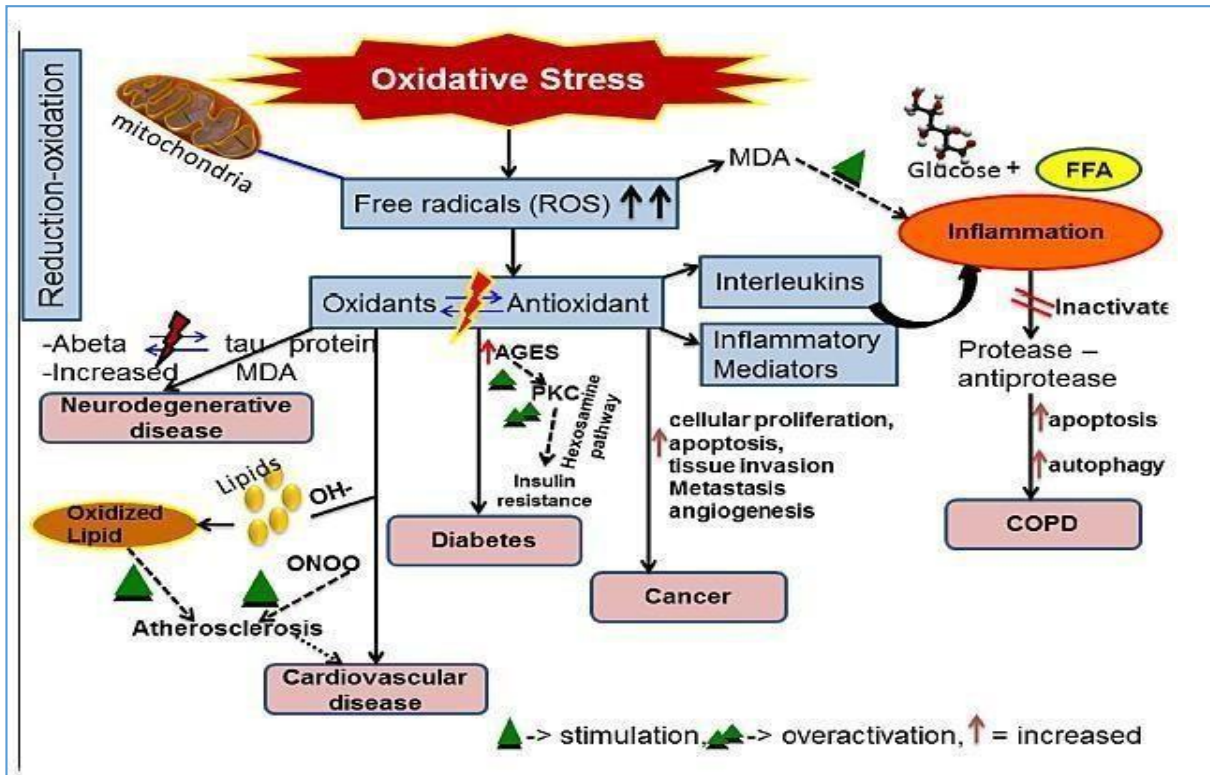


Figura 10. Diagrama esquemático que muestra el mecanismo del estrés oxidativo en el desarrollo de diversas enfermedades³¹.

3.3.2 Radicales libres

Son moléculas que contienen electrones no apareados en los orbitales externos, y son altamente reactivos en el cuerpo al oxidarse (eliminar un electrón), o a veces reducirse (donando su electrón) con otros átomos²⁴.

Existen dos diferentes clasificaciones de radicales libres: ERO y ERN. Estos son formados a través de tres mecanismos:

1. Transferencia de electrones, en la que se produce transmisión de un electrón desde una molécula a otra.
2. Cuando una molécula se oxida.
3. Ruptura homolítica del enlace covalente cuando cada átomo de la molécula se separa y retiene un electrón de los dos enlaces que constituían dicho enlace

Las formas reactivas de oxígeno incluyen superóxido, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno e radical hidroxilo. Producción excesiva de ROS puede conducir al estrés oxidativo que desencadena el daño en las estructuras celulares, incluidos los lípidos, proteínas y ADN³⁰.

La formación de radicales libres ocurre continuamente en el células como consecuencia de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Reacciones enzimáticas, que sirven como fuentes de radicales libres, incluyen a aquellos involucrados en el cadena respiratoria, fagocitosis, síntesis de prostaglandinas y el sistema citocromo P-450. También estos se producen en reacciones no enzimáticas de oxígeno con compuestos orgánicos así como los iniciados por reacciones ionizantes³³.

Algunas fuentes de radicales libres generadas internamente son:

- Mitocondrias
- Xantina oxidasa
- Peroxisomas
- Inflamación
- Fagocitosis
- Rutas de araquidonato
- Ejercicio
- Isquemia / lesión por reperfusión

Algunas fuentes de radicales libres generadas externamente son:

- Humo de cigarrillo
- Contaminantes ambientales
- La radiación
- Ciertas drogas, pesticidas
- Solventes industriales
- Ozono
- Medicamentos (tacrolimus y ciclosporina)

3.3.4. Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia, que a una concentración menor con relación al sustrato oxidable en un medio, inhibe la oxidación del sustrato. Bajo esta clasificación, los compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios que forman parte de la especie vegetal y protegen a diversos órganos de la oxidación, por lo tanto, deben ser considerados como antioxidantes naturales³⁴.

Los mecanismos de defensa antioxidante son:

- 1) Bloqueo de la producción de radicales libres.
- 2) Eliminadores de oxidantes.
- 3) La conversión de radicales libres tóxicos en sustancias menos tóxicas.
- 4) Bloqueo de la producción secundaria metabolitos tóxicos y mediadores de la inflamación.
- 5) Bloqueo de la propagación en cadena de los oxidantes secundarios.
- 6) Reparación de las moléculas afectadas por los radicales.
- 7) Iniciación y mejora del sistema de defensa de los antioxidantes endógenos.

Los antioxidantes naturales fortalecen las defensas de los antioxidantes endógenos y restablecen el equilibrio óptimo neutralizando las especies reactivas. Las actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos están relacionadas con un número de diferentes mecanismos, tales como eliminación de radicales libres, hidrogenación, enfriamiento de oxígeno singlete, quelación de iones metálicos y funcionan como sustrato para los radicales, como el superóxido e hidroxilo³⁵.

3.3.4.1. Clasificación

Existen distintos tipos de antioxidantes endógenos que dependen según el tejido en que se encuentren y también hay antioxidantes exógenos, que de igual manera se oxidan al neutralizar al radical libre, conociéndose como moléculas suicidas, por lo que su reposición, mediante alimentos, debe de ser constante. Como se mencionaba, las sustancias antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos:

3.3.4.1.1. Endógenos

Generalmente suceden en colaboración de iones metálicos de transición ³⁶. Los antioxidantes endógenos pueden ser enzimático o no enzimático. Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran 3 enzimas que son fundamentales en esta actividad; la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa, mientras que los antioxidantes no enzimáticos están conformados por moléculas como: el ácido úrico, ácido lipoico, bilirrubina, glutatión y metatonina³⁷.

- **Catalasa:** Presenta dos funciones importantes: catalítica y peroxidativa, y forma parte del sistema catalasa/superóxido dismutasa, el cual actúa cuando existen altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.
- **Superóxido dismutasa:** Tienen como cofactores el cobre, zinc, hierro y manganeso. Estas enzimas dismutan el oxígeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido.
- **Glutatión peroxidasa:** Es una enzima dependiente de selenio, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a lipoperóxido. Estos antioxidantes pueden disminuir los efectos nocivos de los radicales libres, de manera directa o indirecta, actuando propiamente sobre ellos. Por lo tanto, ya sea mediante actividad endógena o exógena, las células pueden contrarrestar los niveles bajos de radicales libres para evitar efectos nocivos.

3.3.4.1.2. Exógenos

En este grupo de antioxidantes están presente los carotenoides, vitamina E, A y C, flavonoides naturales u otros compuestos diferentes³⁷.

- **Alfa tocoferol (vitamina E):** Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres del hidroxilo, captura O₂, neutraliza peróxidos.
- **Beta carotenos:** Neutraliza el oxígeno singlete.
- **Ascórbico (vitamina C):** Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres del hidroxilo, captura O₂, regenera la forma oxidada de la vitamina E³⁶.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales, Equipos y Reactivos

4.1.1. Material biológico

Hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayan”

4.1.2. Materiales

- Embudos
- Baguetas
- Papel filtro whatman # 1
- Cápsula de porcelana.
- Beaker.
- Matraz aforado
- Pipeta Pasteur.
- Propipeta.
- Gradilla.
- Probetas.
- Celda de cuarzo.
- Embudo Buchner.

4.1.3. Equipos

- Balanza analítica (modelo Ohaus Pioneer Chaus Corporation).
- Molino de cuchillas (Thomas Wiley Mill).
- Estufa (Memmert).
- Espectrofotómetro UV- VIS (GENESYS 10S UV-Visible-Thermo Scientific).
- Equipo de filtración con bomba al vacío.
- Rotavapor.
- Vortex.

4.1.4. Reactivos

- Alcohol 96°.
- Agua destilada.
- Metanol absoluto
- Ácido gálico
- Quercetina.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (RFC)
- Tricloruro férrico ACS
- Reactivo DPPH
- Patrón Trolox
- Reactivo ABTS
- Reactivo de Shinoda.
- Reactivo de cloruro férrico.
- Reactivo de gelatina.
- Reactivo de Bertrand.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Wagner.
- Reactivo de Liebermann/Burchard.
- Reactivo de Salkowsky.
- Reactivo de Bornträger.
- Reactivo de Popoff.
- Reactivo de Baljet.
- Reactivo de vainillina /H₂SO₄.
- Carbonato de sodio 7,5 %.

4.2. Lugar donde se desarrolló la investigación

El estudio se realizó en el laboratorio de Química Orgánica en la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

4.3. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental se realiza una acción para observar una consecuencia, en este diseño se manipulan las variables, además de poder controlar las condiciones en las que se produce y prospectivo puesto que los resultados se obtuvieron acorde con el desarrollo del estudio³⁸.

4.4. Flujograma del trabajo experimental

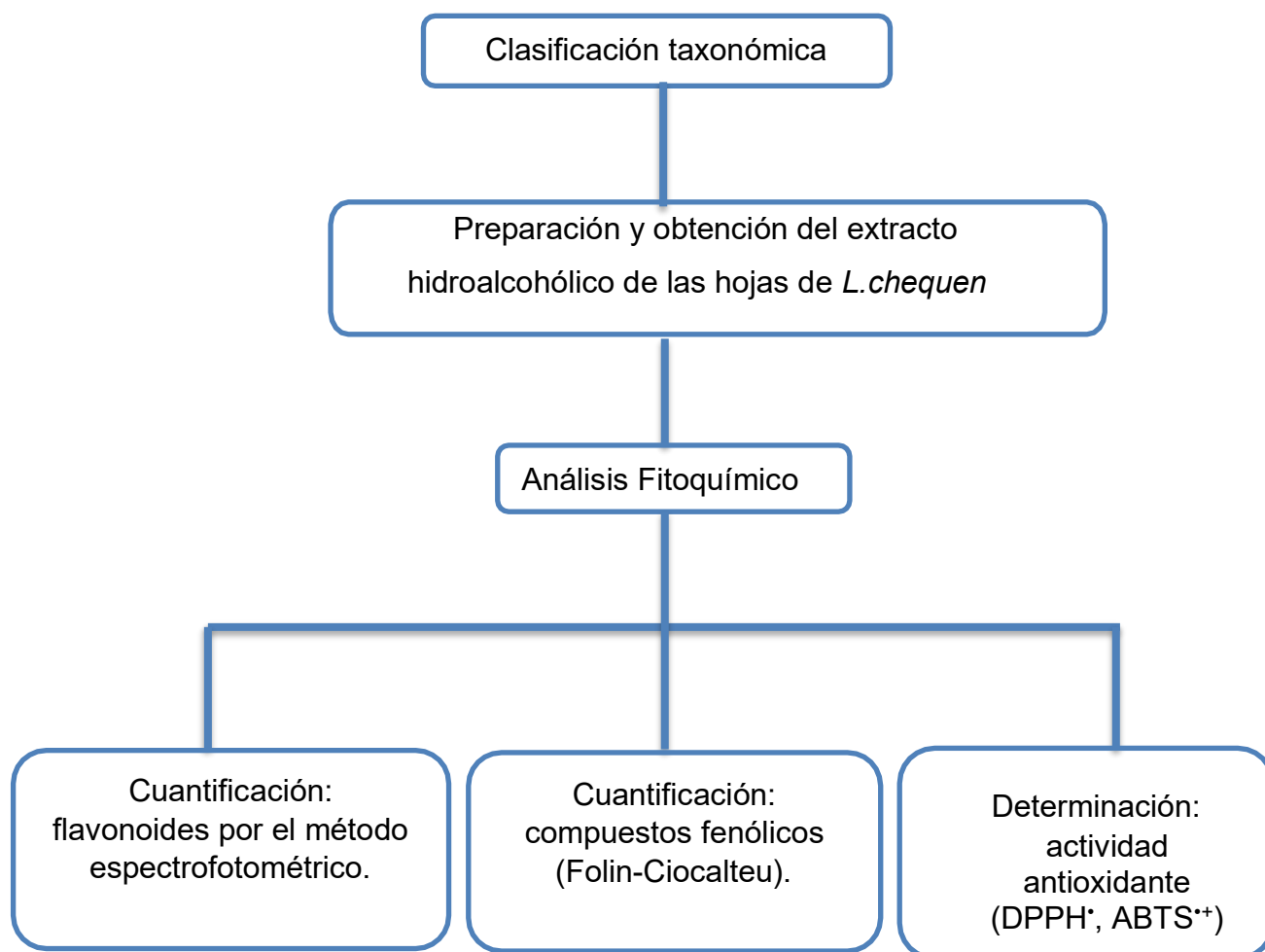


Figura 11. Diagrama del trabajo experimental.

4.5. Colecta y Clasificación taxonómica

Fue colectada en la provincia Angaraes, ubicada en el departamento de Huancavelica a una altitud de 3,278 msnm. La certificación y clasificación taxonómica de la especie vegetal fue realizada por el Mg. Asunción A. Cano Echevarría Herbario de la UNMSM. Clasificación: *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayan". (Anexo N°1)

4.6. Procesamiento de la muestra

El material recolectado será lavado a chorro de agua constante y desinfectado con alcohol, un aproximado de 5 Kg. de hojas de *Luma chequen* se colocó en la estufa a 40° hasta sequedad. Posteriormente se realizó la disminución del tamaño de partícula utilizando un molino de discos manual hasta obtener material pulverizado.

4.7. Elaboración de extracto hidroalcohólico

Se trabajó con 500 g. del polvo fino, el cual fue sometido a maceración hidroalcohólica por 7 días con agua y alcohol 96° en una proporción de 3:7, con agitación constante, se filtró con papel Whatman N°1 y se concentró en el evaporador rotatorio, posteriormente se llevó a la estufa a 40°C hasta sequedad. (Anexo N°2)

4.8. Análisis fitoquímico

El presente ensayo se realizó empleando la metodología de Olga Lock de Ugaz, para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios que contiene la muestra vegetal en estudio, mediante reacciones de coloración o formación de precipitados, etc³⁹.

4.9. Fenoles totales-Método de Folin-Ciocalteu.

4.9.1. Fundamento

Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin- Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul la cual es determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotungstico (formado por las dos sales en medio ácido), presenta una coloración amarilla, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles^{40,41}.

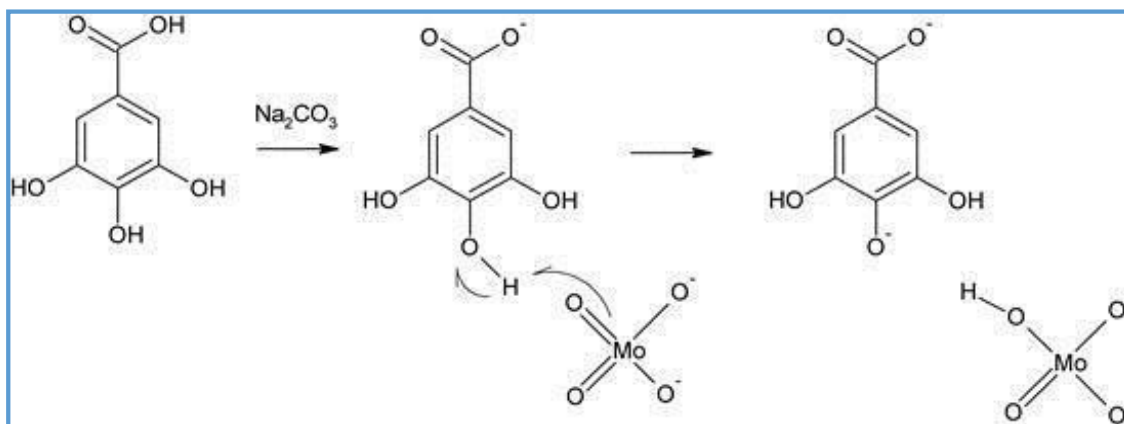


Figura 12. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu⁴⁰.

4.9.2. Procedimiento

4.9.2.1. Elaboración de la curva de calibración

Se realizó la preparación de la solución stock de ácido gálico anhidro (estándar) a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, se realizó las diluciones del estándar para el desarrollo de la curva de calibración (10, 60, 90 y 120 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 1. Dilución del estándar de ácido gálico.

Tubos	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Ácido gálico (1000 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL C ₄	3 mL C ₄	3 mL C ₄	3 mL
Solución hidroalcohólica (3:7) C.S.P.	12 mL	6 mL	4 mL	25 mL
Concentración	10 $\mu\text{g/mL}$	60 $\mu\text{g/mL}$	90 $\mu\text{g/mL}$	120 $\mu\text{g/mL}$

4.9.2.2. Elaboración de la muestra

Se pesó 0,2g \pm 0,001g (peso neto: 0,1614g) de muestra en un tubo de ensayo y se diluyó con 7mL de metanol al 70%, se colocó en Baño María a 70°C, se agito por 10 minutos, se dejó enfriar, posteriormente fueron centrifugados 3500 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante, se llevó aún volumen de 10 mL con diluyente. , de la dilución obtenida se extrajo un volumen de 4mL, aforamos a 100mL con agua destilada (Cf=645,6 $\mu\text{g/mL}$)⁴².

4.9.2.3. Adición del reactivo Folin-Ciocalteu

Se trató 100 μL de muestra con 100 μL de sustancia de referencia, agua destilada (100 μL) y 500 μL del reactivo para fenoles. Se esperó 5 minutos y se trató con 400 μL de solución de carbonato de sodio al 7.5%, agitando y dejando en reposo por 60 min. En oscuridad. El ensayo se realizó por tres veces y se hizo la lectura de absorbancias a 765 nm espectrofotométricamente⁴².

4.9.2.4. Análisis de datos

Se expresaron por unidades de ácido gálico equivalente por gramo de extracto seco y la concentración de ácido gálico.

4.10. Flavonoides totales - Método de AlCl_3

4.10.1. Fundamento

La reacción de cloruro de aluminio, se la utiliza para la determinación de los flavonoides totales, se fundamenta en la formación de complejos estables en el carbono 4 y el los hidroxilos del carbono 3 y 5 de flavonas y flavonoles. Este método permite determinar la cantidad de flavonoides en la muestra, se utiliza como estándar la quercetina, esta reacción se mide en longitudes de ondas y absorbancia altas, impidiendo la interferencias de otras sustancias fenólicas, el método es exacto lo que proporciona pequeñas desviaciones, a diferencias de otras pruebas⁴³.

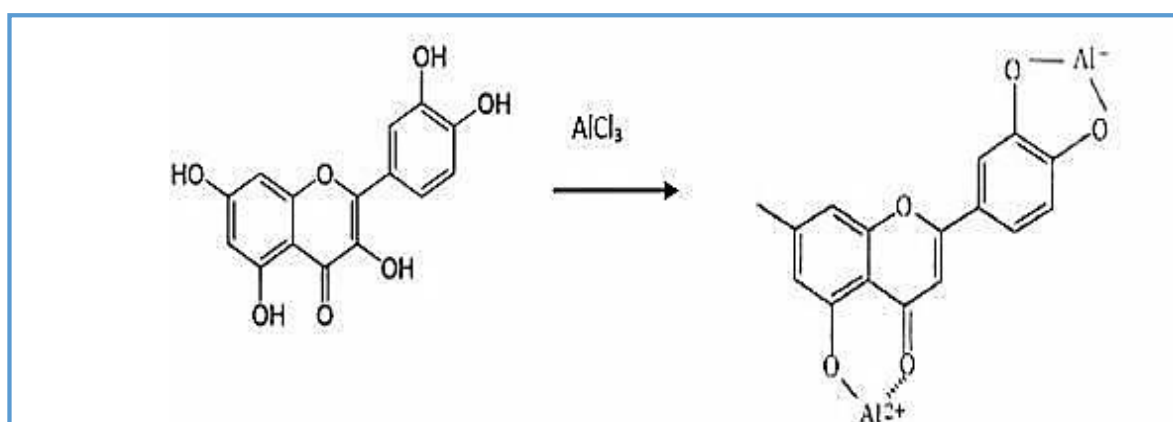


Figura 13. Estructura del complejo AlCl_3 -flavonoide⁴⁴.

4.10.2. Procedimiento

4.10.2.1. Elaboración de la curva de calibración

Se realizó la preparación de la solución stock de quercetina (estándar): 100 µg/mL de concentración, luego se realizó diversas diluciones del estándar para el desarrollo de la curva de calibración (3, 6, 12, 24 y 30 µg/mL).

Tabla 2. Dilución estándar de quercetina

Tubos	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Quercetina (100µg/mL)	1 mL C ₅	1 mL C ₅	2 mL C ₄	4 mL C ₅	3 mL
Metanol C.S.P	10 mL	5 mL	4 mL	5 mL	10 mL
Concentración	3 µg/mL	6 µg/mL	12 µg/mL	24 µg/mL	30 µg/mL

4.10.2.2. Elaboración

Se pesó 0,2g ± 0,001g (peso neto=0,1614g) de muestra en un tubo de ensayo y diluyó con 7mL de metanol al 70% se colocó en Baño María a 70°C, se agito por 10 minutos, se dejó enfriar, posteriormente fueron centrifugados 3500 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante, se llevó aún volumen de 10 mL con diluyente. de la dilución obtenida se extrajo un volumen de 4mL, aforamos a 100mL con agua destilada (Cf=645,6 µg/mL)⁴².

4.10.2.3. Adición del reactivo AlCl₃

A cada 100µL de muestra, se adicionó 100µL tricloruro de aluminio y 800µL de agua, se agitó y se colocó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para este ensayo se preparó la quercetina (por cada 100µL de quercetina se adicionó 100µL de AlCl₃ y 800µL de agua) y un blanco (por cada 100µL de AlCl₃, se agregó 900µL de agua) con ello se calibró el equipo y se hizo lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a 420 nm^{45,46}.

4.10.2.4. Análisis de datos

Se expresaron en unidades de quercetina equivalentes por gramo de extracto seco y concentración de quercetina.

4.11. Capacidad antioxidante

4.11.1. Método de Captación del Radical DPPH

4.11.1.1. Fundamento

El método se basa en la reacción que se produce entre el radical libre DPPH (molécula con electrón desapareado) con un compuesto antioxidante capaz de donar átomos de hidrógeno, el cual se evidencia con el cambio de coloración de púrpura a amarillo esto se debe a la reducción del radical libre, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm⁴⁷.

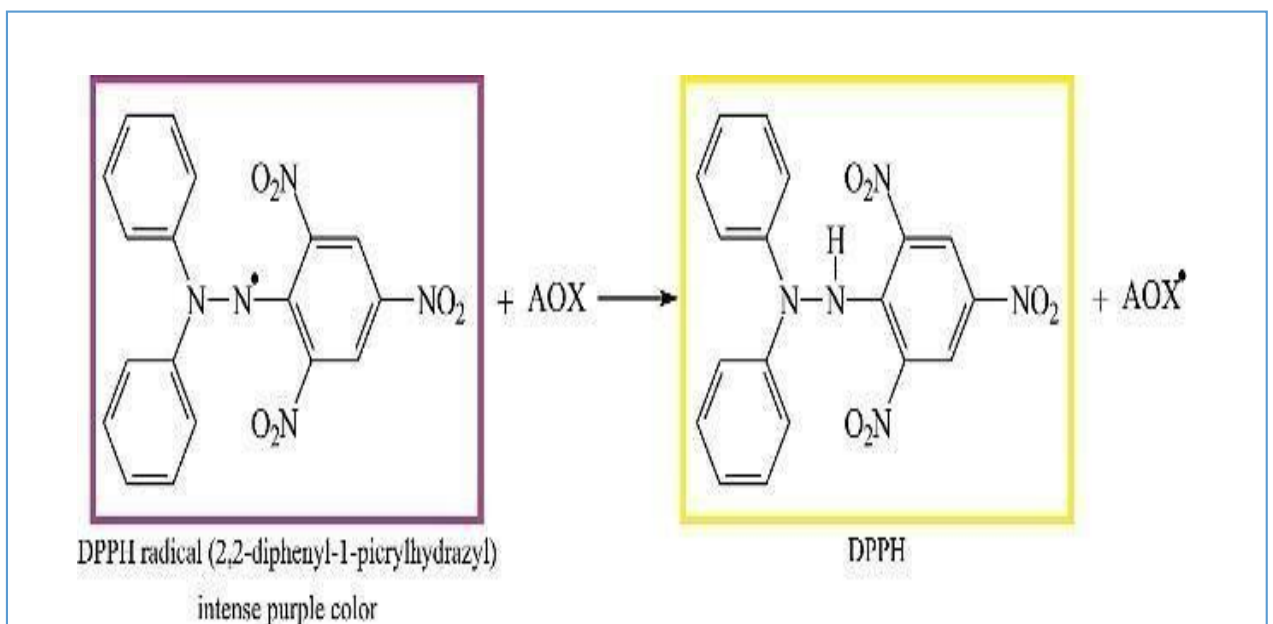


Figura 14. Reacción de reducción de DPPH• por antioxidantes⁴⁸.

4.11.1.2. Procedimiento

4.11.1.2.1. Elaboración del reactivo DPPH

El reactivo se preparó a 0,1 mmol/L (0,0394mg/L) se realizó usando como solvente metanol y las condiciones de almacenamiento fueron a 4°C hasta su empleo.

4.11.1.2.2. Elaboración de la muestra

La reconstitución del extracto se hizo en metanol obteniéndose una concentración stock de 125 µg/mL, posteriormente se realizó diversas diluciones del extracto (3,9, 7,8, 15,6, 31,3 µg/mL).

Tabla 3. Dilución del extracto hidroalcohólico-Ensayo DPPH.

Tubos	C₁	C₂	C₃	C₄
Extracto (125µg/mL)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Solución hidroalcohólica (3:7) C.S.P	32 mL	16 mL	8 mL	4 mL
Concentración	3,9 µg/mL	7,8 µg/mL	15,6 µg/mL	31,3 µg/mL

4.11.1.2.3. Elaboración del patrón

El patrón de referencia se diluyó en metanol hasta obtener una concentración stock de 50 µg/mL posteriormente se realizó diversas diluciones del patrón para el desarrollo de la curva de calibración (2,5; 5; 10; 12,5 µg/mL)

Tabla 4. Dilución del patrón patrón Trolox - Ensayo DPPH.

Tubos	C₁	C₂	C₃	C₄
Estándar (50µg/mL)	2 mL C ₄	4 mL C ₄	4 mL C ₄	3mL
Solución hidroalcohólica (3:7) C.S.P.	10 mL	10 mL	5 mL	12mL
Concentración	2,5 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	12,5µg/mL

4.11.1.2.4. Adición del radical de DPPH.

Se enfrentó 400 µL de cada concentración del extracto o estándar con 800 µL de solución del radical DPPH. Se dejó reaccionar por 30 minutos en la oscuridad.

4.11.1.2.5. Lectura de resultados

Se registró lectura a 517 nm en el espectrofotómetro. Se blanqueó con una solución hidroalcohólica: Sol. DPPH (1:2), la absorbancia obtenida fue restada a las absorbancias de las muestras.

4.11.1.2.6. Análisis de datos

Se expresaron los resultados con el promedio (n=3) ± DE. Se realizó una conversión de los resultados a %CSRL, Cl₅₀ y expresado con valores de TEAC.

$$\%CSRL = \left[1 - \frac{ABS MP}{ABS DPPH} \right] \times 100$$

4.11.2. Método de captación del radical ABTS^{•+}

4.11.2.1. Fundamento

La oxidación del ABTS (2,2'-azino -bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio genera al radical ABTS^{•+}. El cual presenta una coloración verde azulado que desaparece paulatinamente al reaccionar con una compuesto antioxidante, lo cual se cuantifica en el espectrofotómetro a 734 nm^{50, 51}.

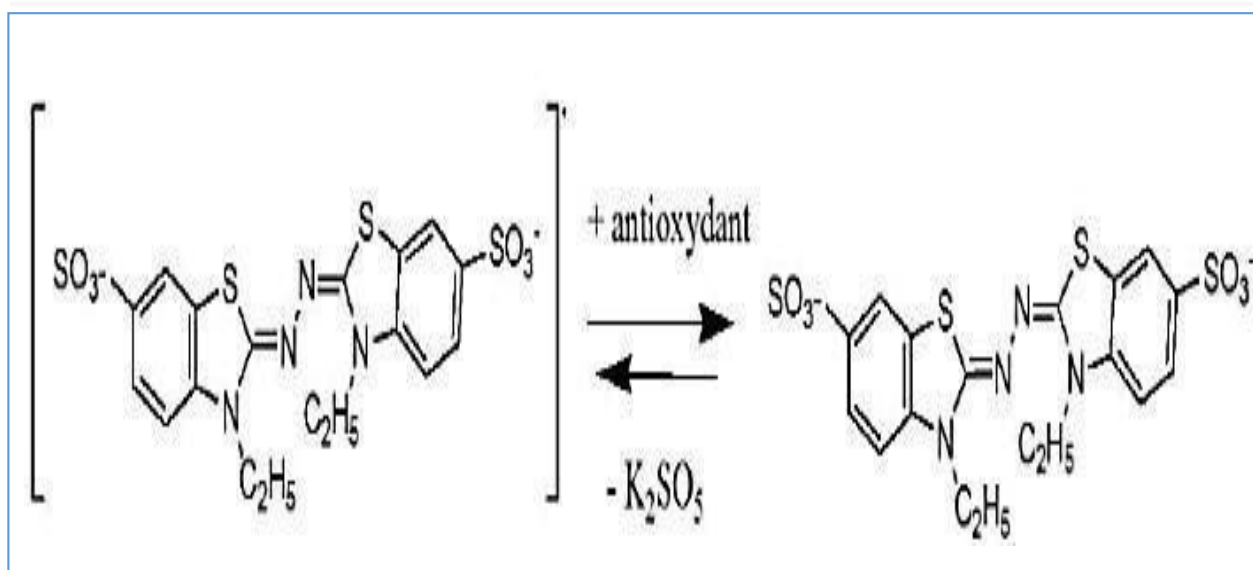


Figura 15. Reacción de reducción de ABTS^{•+} por antioxidantes ⁵².

4.11.2.2. Procedimiento

4.11.2.2.1. Elaboración del reactivo ABTS^{•+}

Se pesó el reactivo ABTS para preparar una solución de concentración 7 mM (3,6 mg/mL) y peroxodisulfato de potasio 0,66229 mg/mL, se dejó en incubación por 16 horas a T° ambiente en oscuridad para obtener el radical ABTS^{•+}; se procedió a diluir en H₂O destilada registrando una lectura de 0,7 ± 0,02 a 734 nm espectrofotométricamente UV-Vis⁵¹.

4.11.2.2.2. Elaboración de las muestras

Se reconstituyó el extracto en la solución hidroalcohólica (3:7) hasta obtener una concentración stock de 1000 µg/mL, posteriormente se realizó diversas diluciones del extracto (100, 200, 400, 600 µg/mL).

Tabla 5. Disolución del extracto hidroalcohólico – Ensayo ABTS^{•+}.

Tubos	C₁	C₂	C₃	C₄
Extracto (1000µg/mL)	1 mL	1 mL	4 mL	3 mL
Solución hidroalcohólica (3:7) C.S.P	10 mL	5 mL	10 mL	5 mL
Concentración	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	600 µg/mL

4.11.2.2.3. Elaboración del patrón

Se diluyó el patrón de referencia en la solución hidroalcohólica hasta obtener una concentración stock de 500 µg/mL a partir de la cual se preparó concentraciones: (50, 100, 150, 200 µg/mL).

Tabla 6. Dilución del patrón Trolox- Ensayo ABTS^{•+}.

Tubos	C₁	C₂	C₃	C₄
Extracto (500µg/mL)	1 mL	1 mL	3 mL	2 mL
Solución hidroalcohólica (3:7) C.S.P	10 mL	5 mL	10 mL	5 mL
Concentración	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL

4.11.2.2.4. Adición del radical de ABTS

Se adicionó el extracto (20 µL) a 980 (µL) del radical catiónico ABTS, dejándose reaccionar por 7 minutos en oscuridad.

4.11.2.2.5. Lectura de resultados

Se midieron las absorbancias a 734 nm. Se blanqueó con una solución de 7 mM del radical catiónico, y la absorbancia obtenida se restó a las absorbancias de las muestras.

$$\%CSRL = \left[1 - \frac{ABS MP}{ABS DPPH} \right] \times 100$$

El **CI₅₀** Es la concentración en la que se produce la inhibición o neutralización de la mitad de los radicales libres de DPPH/ ABTS^{•+}.

TEAC (Equivalente Trolox) mide la capacidad antioxidante de una sustancia dada, en comparación con el estándar de Trolox. representa, cuya expresión es:

$$\text{TEAC} = \text{CI}_{50} \text{ Trolox} / \text{CI}_{50} \text{ Extracto}^{53}.$$

4.11.2.2.6. Análisis estadístico

Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados y se determinó sus diferencias significativas mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de ($\alpha=0.05$).

V. RESULTADOS

5.1. Análisis fitoquímico

Se observaron flavonoides compuestos fenólicos, taninos, saponinas, presencia moderada de antraquinonas naftoquinonas, antronas, antranoles, lactonas α , β insaturadas, trazas de glicósidos, triterpenoides y esteroides, ausencia de alcaloides en el extracto hidroalcohólico de las hojas *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayan".

Tabla 7. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico *L.chequen*.

Prueba	Metabolitos secundarios	Resultados
Shinoda	Flavonoides	+++
FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
Gelatina	Taninos	+++
Bornträger	Antraquinonas, Naftoquinonas Antronas y Antranoles	++
Índice afrosimétrico	Saponinas	+++
Mayer	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Bertrand	Alcaloides	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Baljet	Lactonas α , β insaturadas	++
Vainillina/H ₂ SO ₄	Glicósidos	+
Liebermann – Burchard	Triterpenoides y esteroides	+

Leyenda: Ausencia (-), Presencia de trazas (+), Presencia moderada (++); Presencia abundante (+++)

*Pruebas de Shinoda, FeCl₃ y gelatina se evidencia la presencia de compuestos de naturaleza fenólica en la muestra.

5.2. Compuestos fenólicos totales

Se midieron las absorbancias de las soluciones de ácido gálico a 765 nm (Tabla 8). Con estos datos se elaboró la curva patrón respectiva (Figura 16).

Tabla 8. Absorbancias del estándar de ácido gálico a 765 nm.

Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancias (promedio) \pm DE*
30	0,1968 \pm 0,002
60	0,3670 \pm 0,002
90	0,5434 \pm 0,010
120	0,7044 \pm 0,008

* Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas \pm DE.

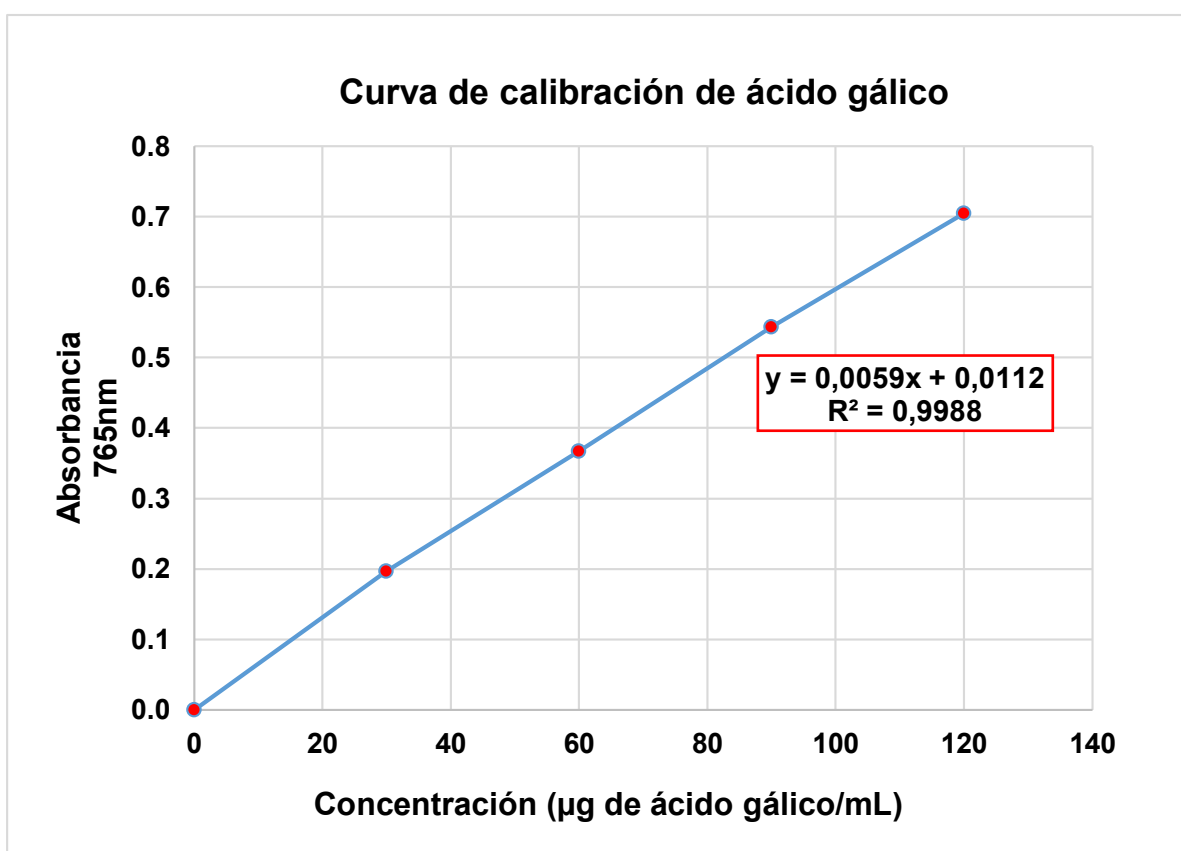


Figura 16. Representación gráfica concentración-absorbancia del ácido gálico.

Tabla 9. Absorbancias promedio y contenido de compuestos fenólicos totales del extracto hidroalcohólico

Muestra	Absorbancia promedio a 765 nm ± DE*	Compuesto Fenólicos totales	
		mg EAG/g ES ± DE*	Concentración de AG ± DE*
Extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i>	0,538 ± 0.006	13,83 ± 0.15	81,30 ± 0,93 μmol AG/g ES

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas ± DE.

El contenido de compuestos fenólicos totales (Tabla 9) tuvo un valor de 13,83 mg EAG/g de extracto seco.

5.3. Flavonoides totales

Los datos presentados en la Tabla 10 corresponden a las absorbancias de la solución estándar quercetina a 420 nm se elaboró la curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides (Figura 17).

Tabla 10. Promedio de las lecturas del estándar de quercetina a 420 nm.

Concentración(μg/mL)	Absorbancias ± DE*
3	0,059±0,005
6	0,140±0,002
12	0,287±0,010
24	0,561±0,020
30	0,705±0,012

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas ± DE.

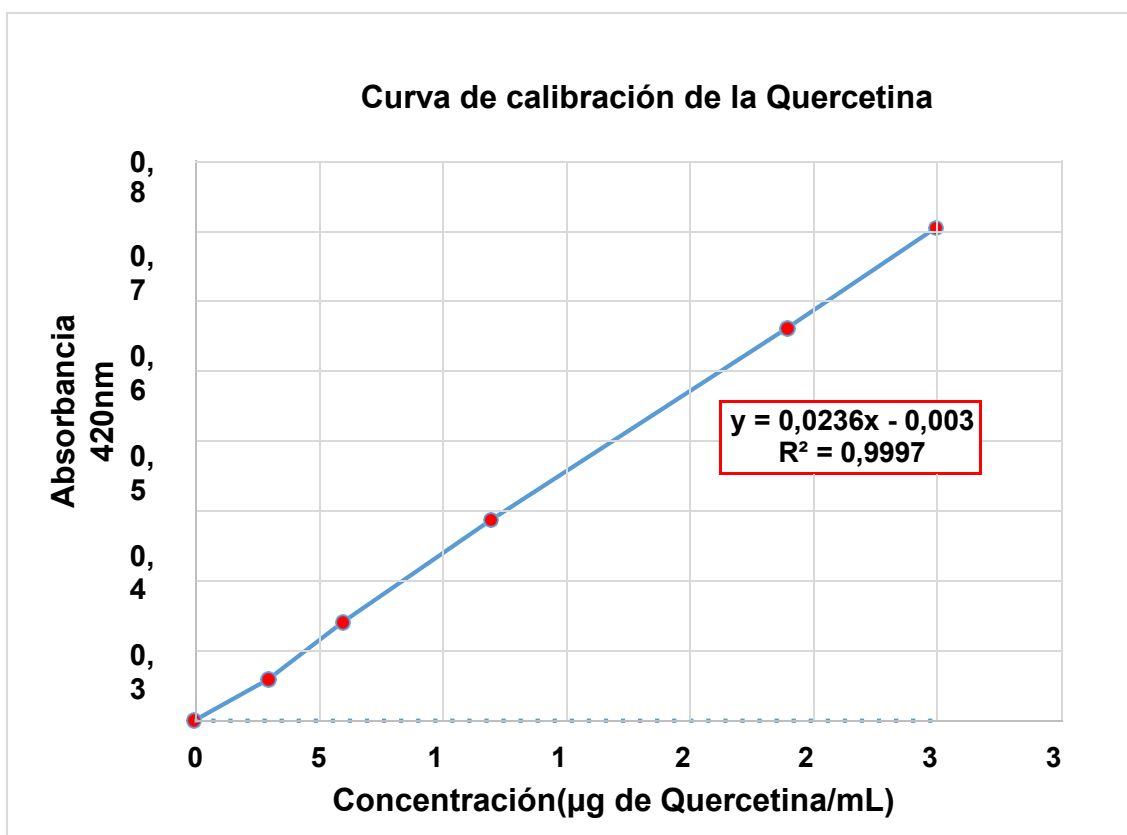


Figura 17. Representación gráfica concentración-absorbancia del estándar de quercetina.

Tabla 11. Promedio de las absorbancias y contenido de flavonoides, extracto hidroalcohólico.

Muestra	Absorbancia promedio a 420 nm \pm DE*	Flavonoides totales	
		mg E Q/g ES \pm DE*	Concentración de Q \pm DE*
Extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i>	0,4826 \pm 0,001	15,94 \pm 0,02	52,74 \pm 0,93 μ mol AG/g ES

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas \pm DE.

En la Tabla 11, se observa los resultados del contenido de flavonoides totales, donde las hojas contienen 15,94 mg EQ/gramo de la muestra seca. En la columna final se observa la concentración de quercetina por gramo de extracto seco.

5.4. Actividad antioxidante

5.4.1. Método del 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

5.4.1.1. Extracto hidroalcohólico

Los datos presentados en la Tabla 12 corresponden a las absorbancias del extracto hidroalcohólico y porcentaje de capacidad secuestrante de los radicales libres para las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* además del valor de CI_{50} ; se elaboró la curva concentración vs % CSRL (Figura 18).

Tabla 12. Resultados del extracto hidroalcohólico de las hojas *Luma chequen*-
Ensayo DPPH

Concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias a 517 $\eta\text{m} \pm \text{DE}^*$	% CSRL
0	0,4159 \pm 0,001	0 %
3,9	0,3806 \pm 0,001	8,48%
7,8	0,3437 \pm 0,011	17,36 %
15,6	0,2689 \pm 0,009	35,35%
31,3	0,1341 \pm 0,005	67,76%
CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$): 22.87		

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas \pm DE.

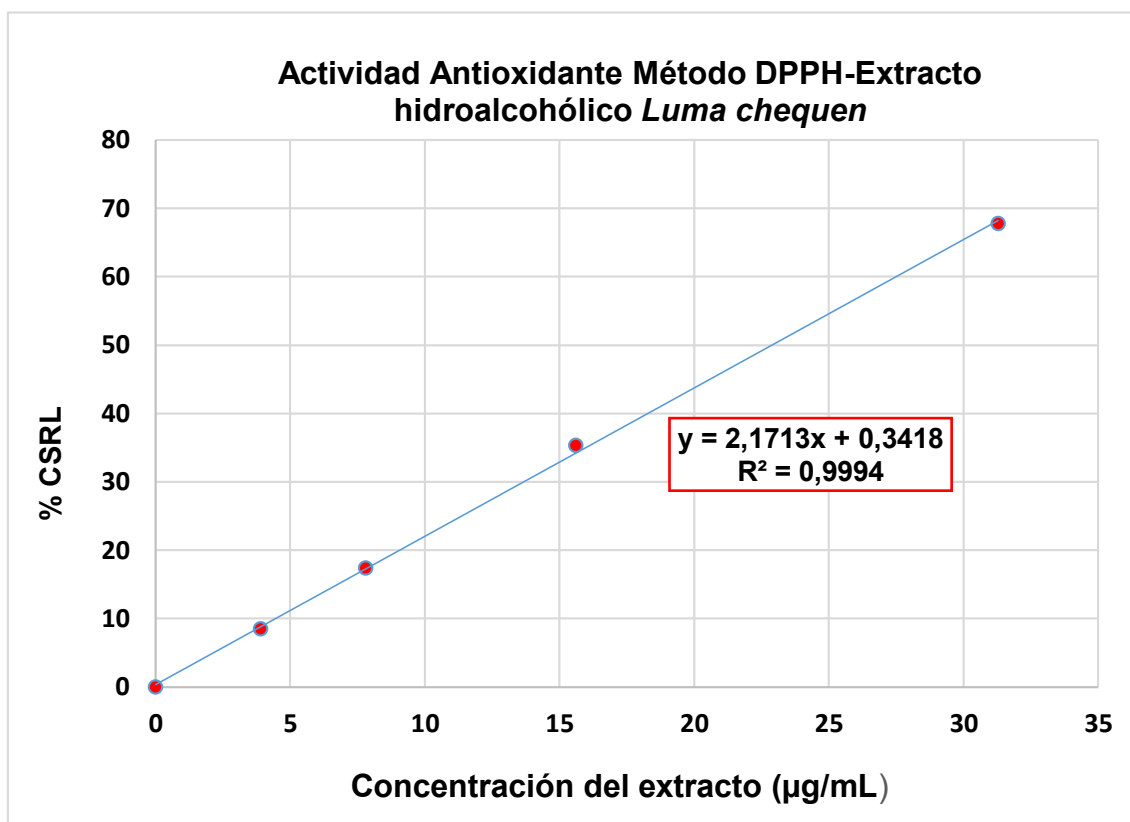


Figura 18. Representación gráfica concentración (µg/mL) vs % CSRL del extracto hidroalcohólico – Ensayo DPPH

5.4.1.2. Patrón trolox

Tabla 13. Promedio de las lecturas de la solución del patrón Trolox a 517nm y su CI₅₀.

Concentración del estándar (µg/mL)	Absorbancias (promedio) a 517 nm ± DE*	% CSRL-DPPH
0	0,4829± 0,001	0 %
2,5	0,3999 ± 0,001	17,19%
5,0	0,3122 ± 0,011	35,35%
10	0,1521 ± 0,009	68,50%
12,5	0,0597 ± 0,005	87,64%
CI₅₀ (µg/mL): 7.19		

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas ± DE.

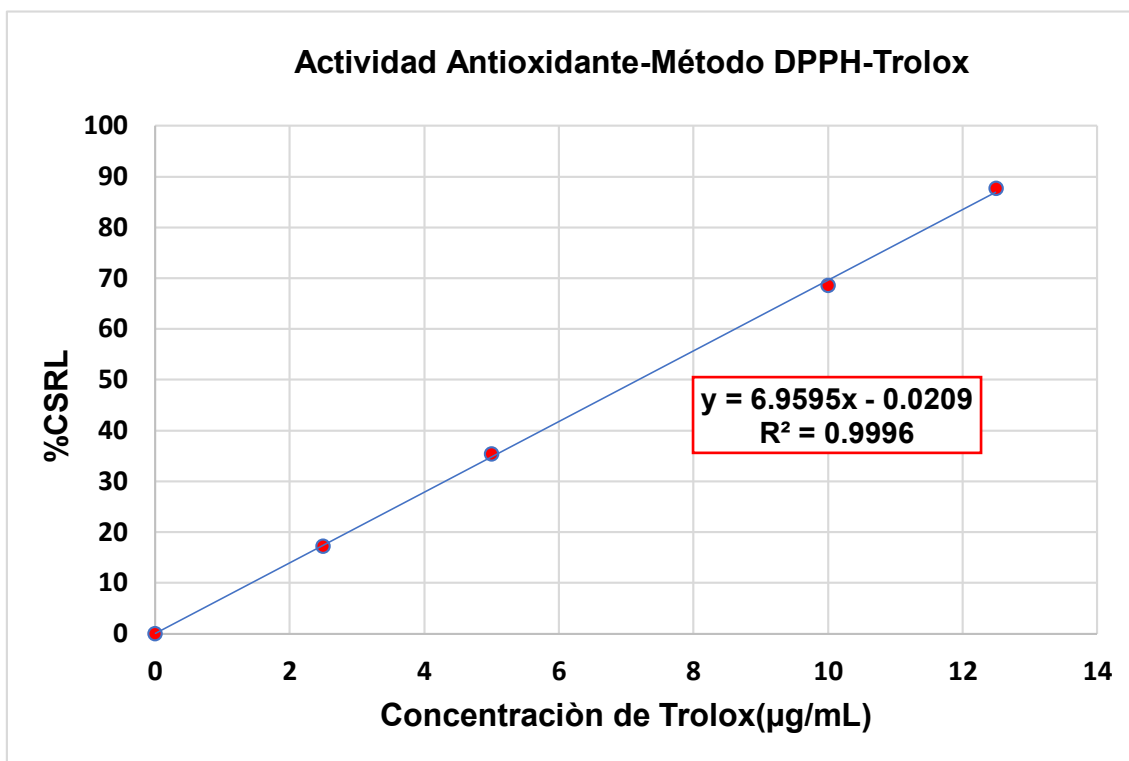


Figura 19. Representación gráfica concentración (µg/mL) vs % CSRL del patrón trolox -Ensayo DPPH

Tabla 14. Resultados expresados en CI_{50} y TEAC por el ensayo DPPH.

MUESTRAS	CI_{50}	TEAC-DPPH
Extracto Hidroalcohólico <i>Luma chequen</i>	22.87 µg/mL	314.3857µg Trolox/mg extracto
Trolox	7.19 µg/mL	

5.4.2. Método 2,2-Azino-Bis-(3-Etilbenzotiazolin-6-Ácido Sulfónico) (ABTS^{•+})

5.4.2.1. Extracto hidroalcohólico

Los datos presentados en la Tabla 15 corresponden a las absorbancias del extracto hidroalcohólico y porcentaje de capacidad secuestrante de los radicales libres para diferentes concentraciones de muestra hidroalcohólica de las hojas de la planta de estudio, además de los valores de CI_{50} ; se elaboró la curva concentración vs % CSRL (Figura 20).

Tabla 15. Resultados del extracto hidroalcohólico de las hojas *Luma chequen*-ensayo ABTS **.

Concentración de la muestra (µg/mL)	Absorbancias 734 nm ± DE*	% CSRL-ABTS **
0	0,7239 ± 0.003	0 %
100	0,5200 ± 0.006	33,69%
200	0,3596 ± 0.002	48,94%
400	0,2393 ± 0.005	66,94%
600	0,1119 ± 0.003	84,54 %
CI 50(µg/mL): 415.07		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

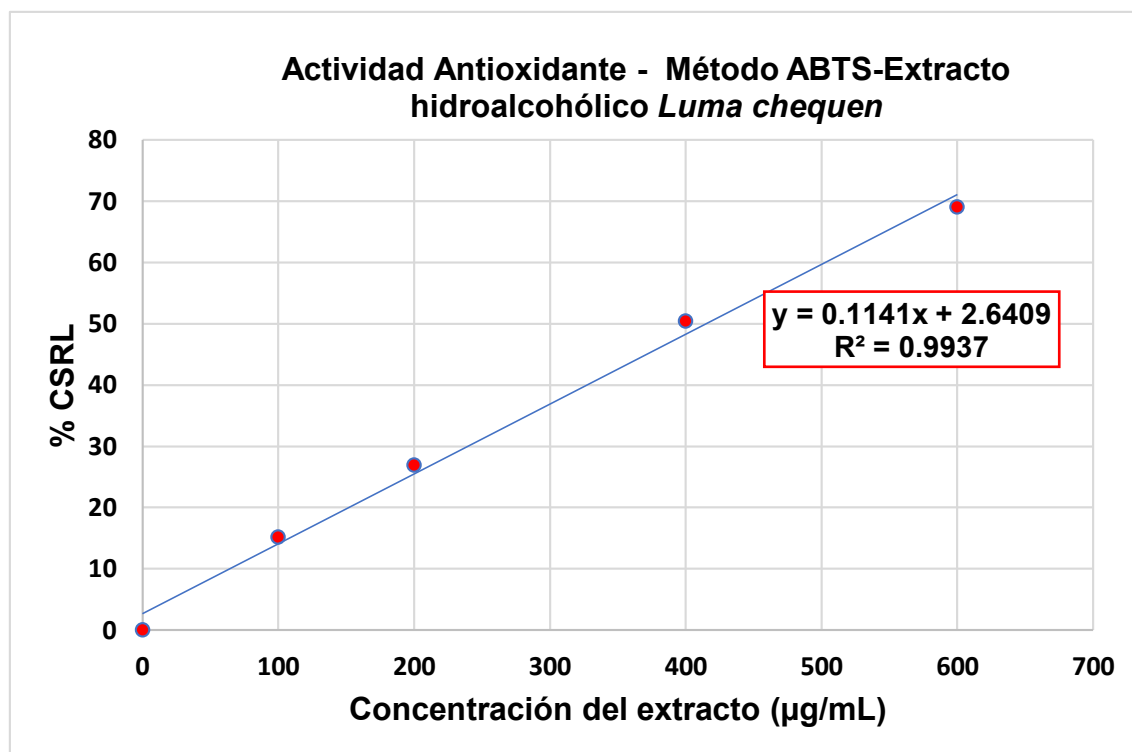


Figura 20. Representación gráfica concentración (µg/mL) vs % CSRL (del extracto hidroalcohólico - Ensayo ABTS).

5.4.2.2. Patrón Trolox

Tabla 16. Promedio de las lecturas de la solución de patrón Trolox a 734nm y su CI₅₀.

Concentración del Trolox (µg/mL)	Absorbancias (promedio) a 734 nm ± DE*	% CSRL-ABTS **
0	0,6839 ± 0.003	0 %
50	0,5088 ± 0.008	18,59%
100	0,3235 ± 0.009	36,84%
150	0,2014 ± 0.004	50,26%
200	0,2214 ± 0.006	67,75%
CI 50 (µg/mL):145.82		

*Los valores presentes en la tabla corresponden al promedio de tres lecturas ± DE

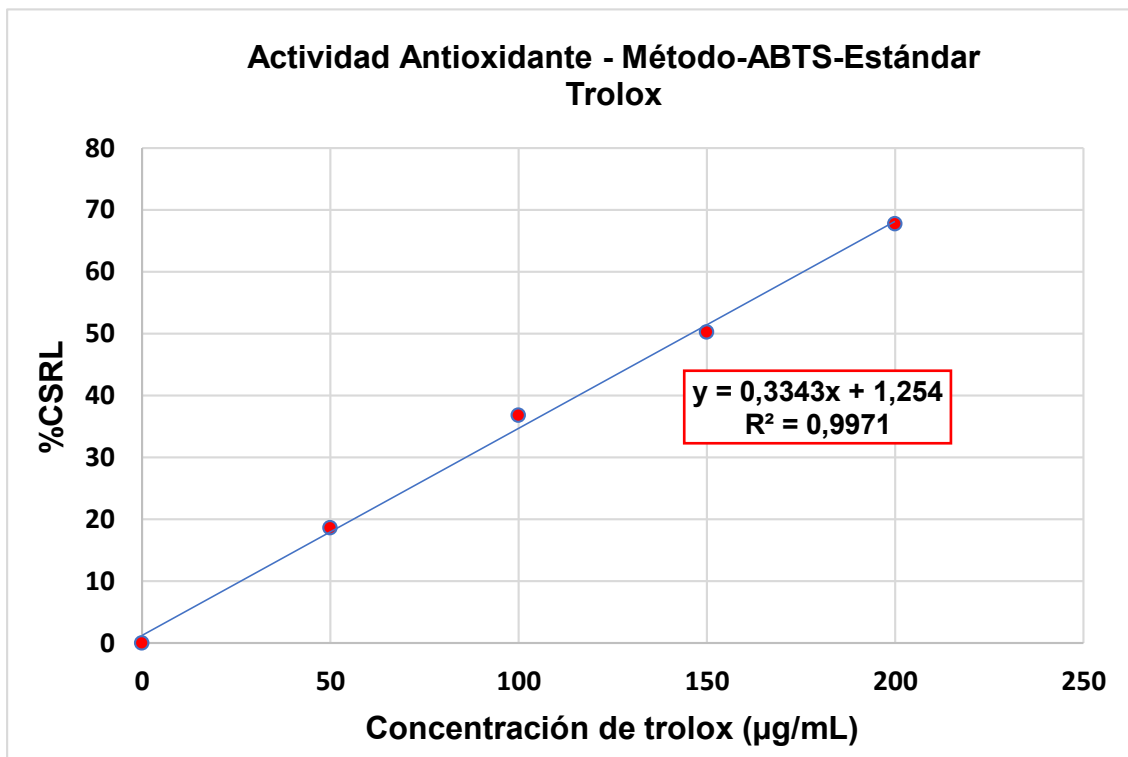


Figura 21. Representación gráfica concentración (µg/mL) vs % CSRL del patrón trolox – Ensayo ABTS.

Tabla 17. Expresión de los resultados en CI_{50} y TEAC por el ensayo ABTS⁺

Muestras	CI_{50}	TEAC-ABTS
Extracto Hidroalcohólico de <i>Luma chequen</i>	415.07 $\mu\text{g/mL}$	351.3142 $\mu\text{g Trolox/mg extracto}$
Trolox	145.82 $\mu\text{g/mL}$	

VI. DISCUSIÓN

Para la obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *L. chequen* se usó una proporción de 3:7 (agua-etanol) mostrando un rendimiento del 8%, cabe resaltar que un estudio realizado por Torres Véliz¹⁸ reportó un rendimiento mayor del 9,5% para el extracto de hojas pulverizadas de *Luma chequen*, las diferencias respecto al rendimiento está relacionado a la ubicación geográfica de las plantas, diferenciando su crecimiento, como los cambio de climas, calidad de suelo y nutrientes que afectan la expresión de sus metabolitos secundarios⁵⁴.

La extracción con una mezcla hidroalcohólica tiene características polares que favorecería la extracción de compuestos fenólicos, otros autores señalan que la baja solubilidad de los polifenoles en disolventes orgánicos absolutos se debe al fortalecimiento de los enlaces de hidrógeno entre polifenoles y proteínas, además el aumento de la solubilidad con la adición de agua a disolventes orgánicos se debe al debilitamiento de los enlaces de hidrógeno en soluciones acuosas¹⁵.

En el extracto hidroalcohólico se evidenció; flavonoides, fenoles totales, taninos, saponinas, antraquinonas, naftoquinonas, antranas, antranoles, lactonas α , β insaturadas, resultados similares a los reportados por Torres Véliz¹⁸, aunque Torres Chati⁵⁵ y Torres Fernandez¹⁵ en los años , 2014 y 2019, respectivamente reportaron la presencia de alcaloides mediante las pruebas Dragendorff, Mayer y Wagner en el extracto acuoso de *Luma*

chequen, estas diferencias estarían relacionadas al tipo de tratamiento que fueron sometidas las hojas, como tipo de solvente de extracción, tamaño de partículas y estadio de recolección de la planta *L. chequen*⁵⁶.

La cuantificación de compuestos polifenólicos en el extracto de hojas de arrayan fue de 13,83 mg EAG /gramo en comparación a un estudio realizado en el año 2014 por Brito y col⁵⁷ quien cuantificó en contenido de polifenoles en las bayas de *Luma chequen* obteniendo un resultado de 5,11mg de AG/g de extracto, evidenciando mayor contenido de polifenoles en las hojas que en bayas.

La cuantificación de flavonoides se realizó mediante un método espectrofotométrico con un valor de 15,94 mg EQ/ gramo de extracto de hojas de *L. chequen* comparado a un estudio realizado en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Eugenia Florida* DC perteneciente a la misma familia evidenció un valor menor equivalente a 8,42 mg de quercetina por gramo de extracto⁶.

La actividad antioxidante depende mucho la composición de los compuestos del extracto y el efecto sinérgico que estos hacen, en otras palabras la capacidad antioxidante está dada por la interacción entre ellos, lo que puede producir efectos sinérgicos o antagónicos⁵⁸. Debido a estos conceptos se determinó la capacidad antioxidante (Tabla 12.) el cual, se partió de una concentración stock de 125 µg/mL, los resultados mostraron su gran capacidad de captación de los radicales libres a bajas concentraciones de extracto mostrando un CI₅₀ en comparación con el método ABTS un poco menor que esta última. Por otra parte a partir de una concentración stock de 1000µg/mL para evaluar la capacidad antiradical por el método de ABTS, en el extracto también se evidenció una gran capacidad de captación de radicales libres (Tabla 15). Sin embargo recalca Giraldo et al⁵⁹.La técnica de ABTS no permite discriminar extractos que contienen buenos compuestos antioxidantes como la gran mayoría de técnicas. Esto se debe a la estabilidad del reactivo ABTS^{•+}, la cual es una estructura completamente plana que reacciona fácilmente con reductores mediante un mecanismo SET (transferencia electrónica

única) y/o HAT (Transferencia de átomos de hidrógeno), lo cual hace que los ensayos ABTS sean poco confiables según estudios, por lo que no es recomendable realizarlos sin otro método de captura de electrones, con el cual se pueda contrastar los resultados obtenidos es por esto, que se justifica el empleo de ambas técnicas⁶⁰.

La actividad antioxidante del extracto de hojas arrayan presentó altos valores en los métodos DPPH y ABTS, mostrando capacidades antioxidantes equivalentes al Trolox (TEAC) de 314,39 para el DPPH y para el ABTS de 351.31 mg de Trolox por gramo de extracto hidroalcohólico de hojas de *L. chequen* , esto resultado se debe a la diversidad de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes entre ellos flavonoides, polifenoles, taninos, entre otros, los cuales fueron identificados mediante el análisis fitoquímico. Los cuales pueden ejercer un efecto sinérgico aumentando la actividad antioxidante del extracto⁵⁷.

Mediante el ensayo de ABTS y DPPH se determinó un CI_{50} en la muestra de estudio y para el estándar Trolox. Lillio en el 2015, evaluó la actividad antioxidante del fruto de *Luma apiculata* "Arrayan" por el método ABTS con un valor de un CI_{50} de 24 $\mu\text{g/mL}$, y para el DPPH un CI_{50} :8,08 mg/mL, comparando la concentración media inhibitoria con nuestro estudio, en el ensayo DPPH y ABTS se evidencia una mayor actividad antioxidante⁸.

El análisis fitoquímico de la muestra y los resultados obtenidos tras evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides están correlacionados a su elevada actividad antioxidante estableciendo aporte académico para futuras investigaciones, con la finalidad de utilizar los metabolitos de la mencionada especie.

VII. CONCLUSIONES

- Se evidenció flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, saponinas, presencia moderada de antraquinonas naftoquinonas, antronas, antranoles, lactonas α , β insaturadas, trazas de glicósidos, triterpenoides y esteroides en el extracto hidroalcohólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayan".
- El extracto presentó un contenido de compuestos fenólicos de 13,83 expresados en mg de ácido gálico por gramo de extracto seco. El extracto presentó un contenido de flavonoides de 15,94 expresados en mg de quercetina por gramo de extracto seco.
- En la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayan" se determinó el CI_{50} por DPPH fue de 22.87 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el CI_{50} para el ABTS fue de 415.07 $\mu\text{g/mL}$.
- Presentó como valor de TEAC 314.39 $\mu\text{g Trolox/ mg extracto}$ y 351.31 $\mu\text{g Trolox/ mg extracto}$, por los métodos de DPPH y ABTS respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

- Aislar y elucidar las estructuras de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto de las hojas de *L. chequen* y poder detallar los mecanismos a través del cual ejercen su actividad antioxidante.
- Realizar la actividad antioxidante *in vivo* para poder establecer su actividad antioxidante real.
- Realizar la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico en la muestra de estudio para determinar el CL₅₀.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización panamericana de la salud [Internet]. Repositorio internacional de intercambio de información. 2018 [citado 4 abril 2020]. Disponible en: <http://iris.paho.org>.
2. Soria Nélica. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. Rev. salud publica Parag. 2018; 8 (1):7-8.
3. Surco-Laos, Felipe et al. Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. Rev. Soc. Quím. Perú. 2016; 82(1):29-37.
4. Ferrera T, Heldwein A, Santos C, Somavilla J, Sautter C. Sustancias fenólicas, flavonoides y capacidad antioxidante en hierbas bajo diferentes capas y sombras del suelo. Rev. Bras. plantas med.2016; 18(2):588-596.
5. Villareal V et al. Actividad antioxidante in vitro y compuestos fenólicos de las hojas de *Beautempisia avicenniifolia* (Kunth) Gaudich (Capparaceae).SciELO Perú.2019; 26(1):409-420.
6. Rosa C. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia Florida* DC (Myrtaceae) leaves. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences .2016; 8 (6):110-115.
7. Panawala P, Abeysinghe D, Dharmadasa R. Phytochemical Distribution and Bioactivity of Different Parts and Leaf Positions of *Pimenta Dioica* (L.) Merr (Myrtaceae) .World Journal of Agricultural Research, 2016; 4(5):143-146
8. Lillio A, Carvajal F, Nuñez D, Balboa N, Alvear M. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. Rev. de Inv. Agropecuarias. 2016:32-39.
9. Kabra S, Patel S. Total Phenolics and flavonoid content of the leaves of *Carica papaya* and *Syzygium cumini* .Pharmaceutical Research .2018; 7(14): 734-741.
10. Nesrine M. et al. Characterization of phenolic compounds from *Eugenia supraaxillaris* leaf extract using HPLCPDA-MS/MS and its antioxidant, anti-

inflammatory, antipyretic and pain killing activities in vivo. Scientific Reports. 2019; 9 (1):122-137.

11. Bastos R. et al. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. Journal of Botany.2019; 6(3):317–332.
12. Linares D. Efecto Antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) mediante el método de edema subplantar en ratas. [Tesis]. Lima. Universidad Norbert Wiener; 2019.
13. Camelo D. Contribución al estudio fitoquímico de frutos de *Syzygium paniculatum* (G.) y evaluación de su actividad antioxidante. [Tesis] .Bogotá. Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2016.
14. Flores Romero Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis] .Lima .Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
15. Torres Fernández R. Efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (molina) A. gray (Arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en achatina (*Lissachatina fulica bowdich*, 1822 (caracol africano). [Tesis]. Lima. Universidad Inca Garcilaso de La Vega; 2019.
16. Herbario Rapid Reference [Internet]. Plantidtools Field Museum; [actualizado enero 2017; fecha de acceso el año 2018]. Disponible en:<https://plantidtools.fieldmuseum.org>.
17. Llerena S, Yucra J. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Echerichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Candida albicans*. [Tesis]. Arequipa. Universidad Católica de Santa María; 2017.
18. Torres Vèliz R. Efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina.) A. Gray “rayan castilla” en ratas dislipidemicas. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.

19. Shay J, Elbaz H, Lee I, Zielske S, Malek M, Hüttemann M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer , Inflammation , Diabetes , and Neurodegeneration.Rev. Scielo. 2015:15-25.
20. Vaca S, González A, Maldonado Y, Fernández W, Cuevas P. Importancia de los taninos en especies del género Quercus como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. Rev.Cien.Biol. 2016; 18(1): 10 – 20.
21. Losada S, Bravo C .Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. European Journal of Medicinal Chemistry .2017; 133: 379-402.
22. Chena Lei et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. Rev. in Food Science and Nutrition.2017; 39(8):1-15.
23. Martín G. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. Rev Inv. 2018;9(1):81-102.
24. Pruchniak .P, Arazna, M, Demkow U. Biochemistry of Oxidative Stress. Advs Exp. Medicine, Biology - Neuroscience and Respiration.2015; 161.
25. Yanna C, Sallett M, Souza R, Vanderlei F. Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities .Food Chemistry.2018, 23:480-49.
26. Wang T, Qing Li, Shun Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. ScienceDirect. 2 0 1 8; 13: 12–23.
27. Banjarnahor S et al. Antioxidant properties of flavonoids. Med. Journal of Indonesia. 2014; 23(4): 239-244.
28. Tipantuña Claudia. Contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante en inflorescencias, hojas y tallos de plantas endémicas: *Verbena litoralis* Kunth y *Duranta triacantha* Juss. [Tesis].Quito. Universidad Central del Ecuador.2019.

29. Maravillas A. Estudio de la complejación de flavonoides en ciclodextrinas. [Tesis]. España. Universidad Católica de Murcia; 2017.
30. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders .Int. J of. Mol. Sci. 2016; 17(160):1-41.
31. Hannim N, Chi Z, Abd A.. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. Rev. Life Science. 2018:111-122.
32. Chodakowska I, Witkowska A, Zujko M. Antioxidantes endogenos no enzimaticos en el cuerpo humano. Advances in Medical Sciences, 2018; 63(1): 68–78.
33. Anthony E, Meredith L, Kenneth J, Ramesh A. Oxidative stress in reproductive toxicology. Rev. Sciencedirect. 2018 ;(7):95–101.
34. Granato D, *et al.* Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods. Food Chem. 2018 ;(264):471- 475.
35. Francisco Ayala-Mata, *et al.* Antioxidants in asthma: polyphenols. Med Int Méx. 2019; 35(2):223-234.
36. Ángeles M, Zeledón S, Vargas T. Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. Rev. Méd. Sinergia. 2019; 14 (5): 89 – 100.
37. Neha K, Rafi M, Pathak A, Shahar M. Medicinal prospects of antioxidants. Rev. Elsevier. 2019 ;(178):687-704.
38. Argimon J, Jimènez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 5ª edición Barcelona. Elsevier España; 2019:27-31.
39. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en estudios de productos naturales. 3ª Edición. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 2016.
40. Muñoz B, *et al.* Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas ,2017; 20(2): 23-28.

41. Culquimboz L, Escudero J. Evaluación in vitro de la actividad antioxidante, antielastasa y anticlagenasa en el extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V. M. Badillo y determinación de la actividad fotoprotectora in vitro en una crema base. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos;2018
42. Cárdenas C, Ruiz J, Castro A, Ramos N, Rojas J, Ramos D. Actividad antibacteriana y antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* (algarrobo). Rev. Cubana de Plantas Medicinales; 2017, 22 (4):1-11.
43. Fernández R. Extracción de compuestos fenólicos de la macro alga marina *Lessonia trabeculata*, determinación de su actividad antioxidante y evaluación citotóxica. [Tesis]. Arequipa. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2017.
44. Amaya L, Portillo C. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. [Tesis]. San Salvador, Universidad de El Salvador; 2013.
45. Gaete J. Identificación de estructuras de naturaleza flavónica mediante espectroscopía UV-VIS a partir de estándares de flavonoides. Aplicación de la metodología a un extracto vegetal comercial. [Tesis]. Chile .Universidad Andrés Bello;2018
46. Cieza M, Castillo E. Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey "Cardo santo". [Tesis]. Lima. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2019.
47. Vásquez M. Polifenoles y actividad antioxidante del extracto etanólico de *Gentianella dianthoides* (Kunth) Fabris y elaboración de una crema dermocosmética. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2018.
48. Becker J, Magda M. *et al.* Determinación de la capacidad antioxidante de los frutos rojos mediante ensayos de espectrofotometría miniaturizada. J. Bras. Chem Soc. 2019; 30(5):1108-1114.

49. Guija E, Inocente M, Ponce J, Zarzosa E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med.* 2015; 15 (1): 57-60.
50. Navarro A. Cuantificación de los compuestos polifenólicos y evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale* L, *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) End. y *Gamochaeta purpurea* (L.). [Tesis]. Lima. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2018.
51. Navarro A, De La Cruz F. Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia*. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2019.
52. Cruz R, Vieira T, Possedente L. Potential antioxidant of brazilian coffee from the region of Cerrado. *Food Sci. Technol.* 2018; 38(3):447-453.
53. Aguado M, Nuñez M, Bela A, Okulik N, Bregni C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* 100 (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas (Chaco)* 2013; 44 (3): 46-51.
54. .Morgan J. Plant-Soil Interactions:Nutrient Uptake. *Nature Education Knowledge.* 2013; 4(8):101-109.
55. Torres Chati J. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. "Arrayan" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2014.
56. Matsuura H, Fett-Neto A. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *Plant Toxins.* 2015; 1(1):111-123.
57. Brito A, Simirgiotis M, Sepúlveda B, Kennelly E. Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts. *Molecules.* 2014; 19(8):10936-10955.

58. Ruiz S, Venegas E, Valdiviezo J, Plasencia. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante in vitro del zumo de "pur pur" *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Passifloraceae). Scielo Perú. 2018; 25(3):1003-1014.
59. Giraldo L, Ramírez L. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae). Rev Cubana Farm .2013; 47(4): 483-491.
60. Sanchez Y, Rodriguez J, Pozo Y, Diaz N, Rodriguez M, Sanchez P. Composicion fenolica y actividad antioxidante de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied .Rev. Med. del centro.2019; 13(3):328- 341.

X. ANEXOS





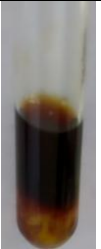








ANEXO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

 	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO	
MUSEO DE HISTORIA NATURAL		
 <i>"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"</i> 		
CONSTANCIA N° 305-USM-2018		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (planta estéril), recibida de la Bachiller Katherine Yuliana CADILLO ESPINOZA; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):</p>		
<p>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</p>		
<p>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</p>		
<p>SUBCLASE: ROSIDAE</p>		
<p>ORDEN: MYRTALES</p>		
<p>FAMILIA: MYRTACEAE</p>		
<p>GENERO: <i>Luma</i></p>		
<p>ESPECIE: <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray</p>		
<p>Nombre vulgar: "Arrayan"</p>		
<p>Determinado por: el Biólogo Severo Baldeón Malpartida</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>		
<p>Lima, 22 de agosto del 2018</p>		
<p> Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>		
<p>ACE/dcb</p>		

ANEXO 2. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen*



**ANEXO 3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
LUMA CHEQUEN (MOLINA) A. GRAY “ARRAYAN”**

Shinoda	FeCl ₃	Gelatina
1 	2 	3 
Borntrager	Liebermann – Burchard	Dragendorff
4 	5 	6 
Mayer	Bertrand	Wagner
7 	8 	9 
Popoff	Indice	Baljet
10 	11 	12 
Vainillina /H ₂ SO ₄		
13 		

Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Luma chequen*.

**ANEXO 4. ANLISIS DE VARIANZA PARA EL ESTÁNDAR DE ÁCIDO GALICO -
MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU**

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_POLIF	,160	12	,200 [*]	,911	12	,222
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

ANOVA

ANOVA					
ABS_POLIF					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,404	3	,135	6,564	,015
Dentro de grupos	,164	8	,021		
Total	,568	11			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES:HSD TUKEY

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: ABS_POLIF

				Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
(I) CONC_POLIF	(J) CONC_POLIF	Límite inferior	Límite superior					
HSD Tukey	30	60		-,1701667	,1169229	,503	-,544595	,204261
		90		-,1870333	,1169229	,430	-,561461	,187395
		120		-,5075667*	,1169229	,011	-,881995	-,133139
	60	30		,1701667	,1169229	,503	-,204261	,544595
		90		-,0168667	,1169229	,999	-,391295	,357561
		120		-,3374000	,1169229	,078	-,711828	,037028
	90	30		,1870333	,1169229	,430	-,187395	,561461
		60		,0168667	,1169229	,999	-,357561	,391295
		120		-,3205333	,1169229	,096	-,694961	,053895
120	30		,5075667*	,1169229	,011	,133139	,881995	
	60		,3374000	,1169229	,078	-,037028	,711828	
	90		,3205333	,1169229	,096	-,053895	,694961	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA EL ESTÁNDAR DE QUERCETINA POR EL
MÉTODO TRICLORURO DE ALUMINIO**

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_FLAV	,192	15	,142	,864	15	,028

a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA					
ABS_FLAV					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,909	4	,227	1688,119	,000
Dentro de grupos	,001	10	,000		
Total	,910	14			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES:HSD TUKEY
PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES:HSD TUKEY

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: ABS_FLAV							
	(I) CONC_FLAV	(J) CONC_FLAV	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	3	6	-,0813333 [*]	,0094728	,000	-,112509	-,050158
		12	-,2276667 [*]	,0094728	,000	-,258842	-,196491
		24	-,5020000 [*]	,0094728	,000	-,533176	-,470824
		30	-,6456667 [*]	,0094728	,000	-,676842	-,614491
	6	3	,0813333 [*]	,0094728	,000	,050158	,112509
		12	-,1463333 [*]	,0094728	,000	-,177509	-,115158
		24	-,4206667 [*]	,0094728	,000	-,451842	-,389491
		30	-,5643333 [*]	,0094728	,000	-,595509	-,533158
	12	3	,2276667 [*]	,0094728	,000	,196491	,258842
		6	,1463333 [*]	,0094728	,000	,115158	,177509
		24	-,2743333 [*]	,0094728	,000	-,305509	-,243158
		30	-,4180000 [*]	,0094728	,000	-,449176	-,386824
	24	3	,5020000 [*]	,0094728	,000	,470824	,533176
		6	,4206667 [*]	,0094728	,000	,389491	,451842
		12	,2743333 [*]	,0094728	,000	,243158	,305509
		30	-,1436667 [*]	,0094728	,000	-,174842	-,112491
30	3	,6456667 [*]	,0094728	,000	,614491	,676842	
	6	,5643333 [*]	,0094728	,000	,533158	,595509	
	12	,4180000 [*]	,0094728	,000	,386824	,449176	
	24	,1436667 [*]	,0094728	,000	,112491	,174842	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**ANEXO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA *Luma chequen* POR
EL MÉTODO DPPH**

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_EXT_DPPH	,175	15	,200 [*]	,903	15	,104

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA

ANOVA					
ABS_EXT_DPPH					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,162	4	,040	172,002	,000
Dentro de grupos	,002	10	,000		
Total	,164	14			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES: HSD TUKEY

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: ABS_EXT_DPPH							
	(I) CONC_EXT_DPPH	(J) CONC_EXT_DPPH	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	A: 0	B: 3.9	,2991333 [*]	,0125192	,000	,257932	,340335
		C: 7.8	,1644000 [*]	,0125192	,000	,123198	,205602
		D: 15.6	,0896000 [*]	,0125192	,000	,048398	,130802
		E: 31.3	,0526333 [*]	,0125192	,012	,011432	,093835
	B: 3.9	A: 0	-,2991333 [*]	,0125192	,000	-,340335	-,257932
		C: 7.8	-,1347333 [*]	,0125192	,000	-,175935	-,093532
		D: 15.6	-,2095333 [*]	,0125192	,000	-,250735	-,168332
		E: 31.3	-,2465000 [*]	,0125192	,000	-,287702	-,205298
	C: 7.8	A: 0	-,1644000 [*]	,0125192	,000	-,205602	-,123198
		B: 3.9	,1347333 [*]	,0125192	,000	,093532	,175935
		D: 15.6	-,0748000 [*]	,0125192	,001	-,116002	-,033598
		E: 31.3	-,1117667 [*]	,0125192	,000	-,152968	-,070565
	D: 15.6	A: 0	-,0896000 [*]	,0125192	,000	-,130802	-,048398
		B: 3.9	,2095333 [*]	,0125192	,000	,168332	,250735
		C: 7.8	,0748000 [*]	,0125192	,001	,033598	,116002
		E: 31.3	-,0369667	,0125192	,084	-,078168	,004235
	E: 31.3	A: 0	-,0526333 [*]	,0125192	,012	-,093835	-,011432
		B: 3.9	,2465000 [*]	,0125192	,000	,205298	,287702
		C: 7.8	,1117667 [*]	,0125192	,000	,070565	,152968
		D: 15.6	,0369667	,0125192	,084	-,004235	,078168

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL PATRÓN TROLOX POR EL MÉTODO DPPH

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_ST_DPPH	,179	15	,200 [*]	,889	15	,065

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA

ANOVA					
ABS_ST_DPPH					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,335	4	,084	228,424	,000
Dentro de grupos	,004	10	,000		
Total	,339	14			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES: HSD TUKEY

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: ABS_ST_DPPH							
	(I) CONC_ST_DPPH	(J) CONC_ST_DPPH	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	A: 0	B: 2.5	,0574667*	,0156368	,028	,006005	,108929
		C: 5.0	,1452333*	,0156368	,000	,093771	,196695
		D: 10	,3053333*	,0156368	,000	,253871	,356795
		E: 12.5	,3976667*	,0156368	,000	,346205	,449129
	B: 2.5	A: 0	-,0574667*	,0156368	,028	-,108929	-,006005
		C: 5.0	,0877667*	,0156368	,002	,036305	,139229
		D: 10	,2478667*	,0156368	,000	,196405	,299329
		E: 12.5	,3402000*	,0156368	,000	,288738	,391662
	C: 5.0	A: 0	-,1452333*	,0156368	,000	-,196695	-,093771
		B: 2.5	-,0877667*	,0156368	,002	-,139229	-,036305
		D: 10	,1601000*	,0156368	,000	,108638	,211562
		E: 12.5	,2524333*	,0156368	,000	,200971	,303895
	D: 10	A: 0	-,3053333*	,0156368	,000	-,356795	-,253871
		B: 2.5	-,2478667*	,0156368	,000	-,299329	-,196405
		C: 5.0	-,1601000*	,0156368	,000	-,211562	-,108638
		E: 12.5	,0923333*	,0156368	,001	,040871	,143795
	E: 12.5	A: 0	-,3976667*	,0156368	,000	-,449129	-,346205
		B: 2.5	-,3402000*	,0156368	,000	-,391662	-,288738
		C: 5.0	-,2524333*	,0156368	,000	-,303895	-,200971
		D: 10	-,0923333*	,0156368	,001	-,143795	-,040871

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA *Luma chequen* POR EL MÉTODO ABTS

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_EXT_ABTS	,179	15	,200 [*]	,897	15	,085

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA

ANOVA					
ABS_EXT_ABTS					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,427	4	,107	6091,133	,000
Dentro de grupos	,000	10	,000		
Total	,427	14			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES: HSD TUKEY

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: ABS_EXT_ABTS							
	(I) CONC_EXT_ABTS	(J) CONC_EXT_ABTS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	A: 0	B: 100	,1039000*	,0034162	,000	,092657	,115143
		C: 200	,1843000*	,0034162	,000	,173057	,195543
		D: 400	,3446333*	,0034162	,000	,333390	,355876
		E: 600	,4719667*	,0034162	,000	,460724	,483210
	B: 100	A: 0	-,1039000*	,0034162	,000	-,115143	-,092657
		C: 200	,0804000*	,0034162	,000	,069157	,091643
		D: 400	,2407333*	,0034162	,000	,229490	,251976
		E: 600	,3680667*	,0034162	,000	,356824	,379310
	C: 200	A: 0	-,1843000*	,0034162	,000	-,195543	-,173057
		B: 100	-,0804000*	,0034162	,000	-,091643	-,069157
		D: 400	,1603333*	,0034162	,000	,149090	,171576
		E: 600	,2876667*	,0034162	,000	,276424	,298910
	D: 400	A: 0	-,3446333*	,0034162	,000	-,355876	-,333390
		B: 100	-,2407333*	,0034162	,000	-,251976	-,229490
		C: 200	-,1603333*	,0034162	,000	-,171576	-,149090
		E: 600	,1273333*	,0034162	,000	,116090	,138576
	E: 600	A: 0	-,4719667*	,0034162	,000	-,483210	-,460724
		B: 100	-,3680667*	,0034162	,000	-,379310	-,356824
		C: 200	-,2876667*	,0034162	,000	-,298910	-,276424
		D: 400	-,1273333*	,0034162	,000	-,138576	-,116090

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**ANEXO 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL PATRÓN TROLOX POR
EL MÉTODO ABTS**

PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ABS_ST_ABTS	,129	15	,200*	,918	15	,182

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA

ANOVA					
ABS_ST_ABTS					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,396	4	,099	2139,241	,000
Dentro de grupos	,000	10	,000		
Total	,397	14			

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES: HSD TUKEY

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: ABS_ST_ABTS							
	(I) CONC_ST_ABTS	(J) CONC_ST_ABTS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	A: 0	B: 50	,1276000*	,0055558	,000	,109315	,145885
		C: 100	,2529333*	,0055558	,000	,234649	,271218
		D: 150	,3450667*	,0055558	,000	,326782	,363351
		E: 200	,4650333*	,0055558	,000	,446749	,483318
	B: 50	A: 0	-,1276000*	,0055558	,000	-,145885	-,109315
		C: 100	,1253333*	,0055558	,000	,107049	,143618
		D: 150	,2174667*	,0055558	,000	,199182	,235751
		E: 200	,3374333*	,0055558	,000	,319149	,355718
	C: 100	A: 0	-,2529333*	,0055558	,000	-,271218	-,234649
		B: 50	-,1253333*	,0055558	,000	-,143618	-,107049
		D: 150	,0921333*	,0055558	,000	,073849	,110418
		E: 200	,2121000*	,0055558	,000	,193815	,230385
	D: 150	A: 0	-,3450667*	,0055558	,000	-,363351	-,326782
		B: 50	-,2174667*	,0055558	,000	-,235751	-,199182
		C: 100	-,0921333*	,0055558	,000	-,110418	-,073849
		E: 200	,1199667*	,0055558	,000	,101682	,138251
	E: 200	A: 0	-,4650333*	,0055558	,000	-,483318	-,446749
		B: 50	-,3374333*	,0055558	,000	-,355718	-,319149
		C: 100	-,2121000*	,0055558	,000	-,230385	-,193815
		D: 150	-,1199667*	,0055558	,000	-,138251	-,101682

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

REGLAS DE DECISIÓN DE ACUERDO A LA PRUEBA ESTADÍSTICA

1. PRUEBA DE NORMALIDAD

- H_0 : Los datos analizados presentan distribución normal
- H_1 : Los datos analizados no presentan distribución normal

Si $p\text{-valor} < 0.05$, se RECHAZA H_0 y se considera H_1

Si $p\text{-valor} > 0.05$, se ACEPTA H_0 , por tanto los datos tendrían distribución normal

En ambos casos la afirmación se realiza con un nivel de confianza del 95%

2. PRUEBA ANOVA

- H_0 : Las medias de los grupos analizados son estadísticamente iguales
- H_1 : Al menos una de las medias de los grupos es estadísticamente diferente

Si $p\text{-valor} < 0.05$, se RECHAZA H_0 y se considera H_1 . En este escenario se aplicaría las pruebas de comparaciones múltiples para ver qué grupos presentan disimilitud

Si $p\text{-valor} > 0.05$, se ACEPTA H_0

En ambos casos la afirmación se realiza con un nivel de confianza del 95 %

3. PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES HSD-TUKEY

- H_0 : La media del grupo 1 es estadísticamente igual a la media del grupo 2
- H_1 : La media del grupo 1 es estadísticamente diferente a la media del grupo 2

Si $p\text{-valor} < 0.05$, se RECHAZA H_0 y se considera H_1 .

Si $p\text{-valor} > 0.05$, se ACEPTA H_0

En ambos casos la afirmación se realiza con un nivel de confianza del 95 %