

UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias



Una Institución Adventista

**“Caracterización del perfil fenólico y flavonoide de
eucalyptos, olea europeae y lippia nodiflora con potencial
antioxidante”**

Por:

Bach. Eulalia Vargas Tapia

Asesor:

Ing. Joel Jerson Coaquira Quispe

Lima, 11 de noviembre de 2019

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA DEL INFORME DE TESIS

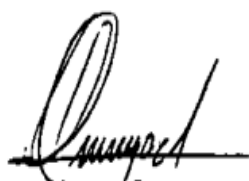
Ing. Joel Jerson Coaquira Quispe, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura,
Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: ***“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO Y FLAVONOIDE DE EUCALYPTOS, OLEA EUROPEAE Y LIPPIA NODIFLORA CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE”*** constituye la memoria que presenta la **Bachiller Eulalia Vargas Tapia** para aspirar al título de Profesional de Ingeniería de Alimentos ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en Juliaca, a los 26 días del mes de diciembre del año 2019



Ing. Joel Coaquira Quispe

Caracterización del perfil fenólico y flavonoide de *eucalyptos, olea
europeae y lippia nodiflora* con potencial antioxidante

TESIS

Presentada para optar el título profesional de Ingeniero
de Alimentos

JURADO CALIFICADOR



Dr. Rodrigo Alfredo Matos Chamorro
Presidente



Ing. Guido Fulgencio Anglas Hurtado
Secretario



Dr. Julio Florencio Paredes Guzmán
Vocal



PHD. Leonor Segunda Bustinza Cabala
Vocal



Ing. Joel Coaquira Quispe
Asesor

Lima 26 de noviembre de 2019

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mis hijos: Danielly y Víctor André y mi familia, por toda la comprensión, motivación y ayuda constante en mis actividades académicas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios creador y sustentador de mi vida, que sin su voluntad divina no hubiese llegado hasta aquí.

A mi Sr. padre, Eduardo Vargas y mi madre Josefina Tapia de Vargas (in memoriam) que hicieron todo lo posible para que podamos tener acceso a una educación de calidad y a mis hermanos Eufemia, Eufracia y Iver Vargas por todo el apoyo y la comprensión. Y como dejar de agradecer a mis preciosos hijos Danielly y Víctor André.

A mi asesor, Ing. Joel Coaquira, por su valioso aporte en la ejecución del proyecto, asesoría y también por su paciencia, motivación y confianza.

A mi co-asesora MSc. Silvia Pilco por la motivación, apoyo y confianza.

Al Dr. Yong Kun Park (In memoriam), por la orientación y por disponibilizar el laboratorio de Bioquímica de alimentos del Departamento de Ciencias de Alimentos – de la Universidad Estadual de Campinas- UNICAMP para la realización de los análisis de identificación molecular. Por todo el conocimiento compartido y consejería.

Al equipo de investigación del laboratorio de bioquímica de alimentos dirigido por la Profa. Hélia Harumi. Por el compañerismo y el acogimiento durante mi estancia en el laboratorio de Bioquímica.

Al equipo de investigación del laboratorio ThoMSon del Instituto de Química. Al Prof. Marcos Eberlin por la oportunidad de realizar la parte de detección de iones presentes en los extractos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Compuestos fenólicos en plantas	17
2.2. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	20
2.3. Métodos analíticos utilizados para determinar la actividad antioxidante.....	21
2.4. Descripción de las plantas seleccionadas para este estudio.....	22
2.4.1. Planta Eucalipto (<i>Eucalyptus sp.</i>).....	22
2.4.2. Planta Olivo (<i>Olea europea</i>).....	23
2.4.3. Planta Tayakasi (<i>Lippia nodiflora</i>)	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Lugar de ejecución.....	26
3.2. Materia prima.....	26
3.3. Preparación de extractos vegetales	26
3.4. Determinación cualitativa de compuestos fenólicos	28
3.4.1. Cromatografía en camada delgada de alta eficiencia en fase reversa EEP y EMV.	28
3.5. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos	28
3.5.1. Cuantificación de fenólicos totales	28
3.5.2. Cuantificación de flavonoides totales	28
3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	29
3.6.1. Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC).....	29
3.6.2. Potencial antioxidante reductor férrico (FRAP).....	29

3.7. Identificación de compuestos químicos a través de EASI-MS	29
3.8. Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Matrices vegetales utilizados en el siguiente estudio	30
4.2. Preparación del extracto vegetal.....	32
4.3. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos	33
4.4. Determinación de capacidad antioxidante.....	35
4.4. Identificación de los principales iones presentes en los extractos etanólicos de las plantas analizadas por EASI- MS.....	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
ANEXOS.....	61

TABLA DE FIGURAS

Tabla 1. Los iones detectados en los extractos etanolicos del eucalipto	38
Tabla 2. Los iones detectados en los extractos etanolicos de olivo.....	42
Tabla 3. Los iones detectados en los extractos etanolicos de olivo.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra los compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides, junto con los ejemplos típicos.	18
Figura 2. Esquema de la estructura química asociada a los compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides presentados en la Figura 1.	19
Figura 3. Esquema de la metodología de la investigación	27
Figura 4. Hojas de eucalipto que fueron utilizadas en este estudio.	31
Figura 5. Hojas de olivo que fueron utilizadas en este estudio	31
Figura 6. Hojas de Tayakasi que fueron utilizadas en este estudio	32
Figura 7 . Extractos etanólicos de Eucalipto, Oliva e Tayakasi colectadas en Lambayeque y Tacna.	33
Figura 8. Cuantificación de fenólicos totales y flavonoides de los extractos etanólicos de las plantas analizadas.....	34
Figura 9. Cuantificación de flavonoides totales de los extractos etanolicos de las plantas estudiadas.	36
Figura 10. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Eucalipto colectado en Lambayeque-Andamarca	40
Figura 11. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Eucalipto colectado en Lambayeque – Andamarca (Continuación).....	41
Figura 12. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de hojas de Olivo colectada en Tacna- Candarave.....	43
Figura 13. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de oliva colectado en Tacna-Candarave (Continuación).....	44
Figura 14. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de oliva colectada en Tacna – Candarave (Continuación)	45
Figura 15. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi colectada en Tacna-Candarave.	48
Figura 16. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi colectada en Tacna – Candarave (Continuación).	49
Figura 17. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi de Lambayeque-Andamarca (Continuación).....	50

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Andamarca localizado en la Región de Lambayeque situado a 3800m de altitud.	61
Anexo 2 Curva calibración de fenoles totales R^2 0.998.....	62
Anexo 3 Curva de calibración de flavonoides totais R^2 0.999.....	62
Anexo 4 Curva de calibración de FRAP R^2 0.998	63
Anexo 5 Curva de calibración de ORAC R^2 0.995.....	63
Anexo 6 Muestra estándar de ácido clorogénico m/z 367.10306	64
Anexo 7 muestra estándar de Artipillin C m/z 299.16513.....	64
Anexo 8 muestra estándar de pinocembrina m/z 255.06600.....	65
Anexo 9 muestra estándar de camferol m/z 284.04044	65
Anexo 10 muestra estándar de apigenina m/z 269.04551	66
Anexo 11 muestra estándar de crisina m/z 253.05034.....	66
Anexo 12 muestra estándar de galangina m/z 269.04538	67
Anexo 13 muestra estándar de Quercetina m/z 301.03518.....	67
Anexo 14 muestra estándar de CAPE m/z 283.09744	68
Anexo 15 muestra estándar de ácido felúrico m/z 193.04982	68
Anexo 16 muestra estándar de ácido P. Cumárico m/z 163.03905.....	69
Anexo 17 muestra estándar de ácido P. Cafeíco m/z 179.03403.....	69

NOMENCLATURA DE LOS SIMBOLOS

AAPH: Dicloreto de 2,2'azobis (2-Amidinopropano)

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAG: Equivalente de Ácido Gálico

EASI-MS: Espectrometria de Massa ambiente com Ionización por Eletro Spray

ET: Equivalente Trolox

FRAP: Poder antioxidante de reducción férrica

ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

TROLOX : 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico

RESUMEN

El Perú cuenta con una biodiversidad abundante de plantas nativas con propiedades medicinales. Este es el caso del Eucalipto, Olivo y Tayakasi, que desde tiempos remotos fueron utilizados por nuestros ancestrales como remedios naturales. En este sentido, el objetivo del proyecto fue caracterizar los extractos etanólicos de las hojas de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*), olivo (*Olea europaea L*) y Tayakasi (*Lippia nodiflora*) en relación a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides y determinar la actividad antioxidante. Se utilizaron métodos espectrofotométricos para cuantificar la concentración de fenólicos totales, cuantificar la concentración de flavonoides y para evaluar la capacidad antioxidante fue utilizado dos metodologías FRAP y ORAC. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de fenoles totales mostraron valores de: $9955,2 \pm 557,4$ mg EAG mL⁻¹ (Eucalipto), $9184,2 \pm 770,1$ mg EAG mL⁻¹ (Olivo) y $10994,5 \pm 423,1$ mg EAG mL⁻¹ (Tayakasi). El contenido de flavonoides fue mayor en los extractos etanólicos de Olivo y Tayakasi encontrándose ambas entre $9,0353 \pm 0,928$ mg EC mL⁻¹ y $10,7263 \pm 0,98$ mg EC mL⁻¹ respectivamente y $6,1738 \pm 0,049$ mg EC mL⁻¹ para Eucalipto. La capacidad antioxidante fue evidenciada en los tres extractos analizados, obteniendo valores desde $145711,125 \pm 6656,95086$ μmol TE mL⁻¹ (Eucalipto), $143411,75 \pm 8159,1$ μmol TE mL⁻¹ (Tayakasi) y $58820,73$ $3074,27893$ μmol TE mL⁻¹ (Olivo). Analizados por la técnica de ORAC mayor actividad de eliminación de radical peróxido fue observado en el extracto etanólico de Olivo con $269511,3 \pm 10892,4$ μmol TE mL⁻¹ mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$), con respecto a los extractos de Eucalipto $90830,2 \pm 10531,1$ μmol TE mL⁻¹ y Tayakasi $117916,0 \pm 5688,6$ μmol TE mL⁻¹. Por EASI-MS fue posible identificar diversos iones presentes, siendo que los iones más intensos para Eucalipto son m/z 453.2, m/z 454.2 m/z 485.25419, m/z 499.26982. Para olivo m/z 539,1 y m/z 540,1 y para el extracto de Tayakasi son: m/z 189, m/z 190, m/z 249, m/z 352 y m/z 515.

Palabras clave: Plantas medicinales, actividad antioxidante, caracterización química.

ABSTRACT

Peru has an abundant biodiversity of native plants with medicinal properties. This is the case of Eucalyptus, Olivo and Tayakasi, which since ancient times were used by our ancestors as natural remedies. In this sense, the objective of the project was to characterize the ethanolic extracts of the Eucalyptus (*Eucalyptus* sp.), Olive (*Olea europaea* L) and Tayakasi (*Lippia nodiflora*) plants in relation to the presence of phenolic and flavonoid compounds and to determine their activity antioxidant. If spectrophotometric methods are used to quantify the concentration of total phenolics, to quantify the concentration of flavonoids and to evaluate the antioxidant capacity of FRAP and ORAC methodologies. The results obtained by other phenol concentrations showed: 9955.2 ± 557.4 mg EAG mL⁻¹ (Eucalyptus), 9184.2 ± 770.1 mg EAG mL⁻¹ (Olivo) and 10994.5 ± 423.1 mg EAG mL⁻¹ (Tayakasi). The flavonoid content contained in Olivo and Tayakasi ethanol extracts was both between 9.0353 ± 0.928 mg EC mL⁻¹ and 10.7263 ± 0.98 mg EC mL⁻¹ respectively and 6.1738 ± 0.049 mg EC mL⁻¹ for eucalyptus. The antioxidant capacity was evidenced in the three analyzed extracts, obtaining values from 145711.1 ± 6656.9 μ mol TE mL⁻¹ (Eucalyptus), 143411.7 ± 8159.1 μ m TE mL⁻¹ (Tayakasi) and 58820.7 ± 27893 μ mol TE mL⁻¹ (Olivo). Analyzed by the ORAC technique higher peroxide radical scavenging activity was observed in the ethanol extract of Olivo with 269511.3 ± 10892.4 μ mol TE mL⁻¹ showing significant differences ($p \leq 0.05$), as regards the extracts. of Eucalyptus 90830.2 ± 10531.1 μ mol TE mL⁻¹ and Tayakasi 117916.0 ± 5688.6 μ mol TE mL⁻¹. By EASI-MS it was possible to identify several ions present, assuming that the most intense ions for Eucalyptus are m / z 453.2, m / z 454.2 m / z 485.25419, m / z 499.26982. For olive m / z 539.1 y m / z 540.1 y for Tayakasi extract: m / z 189, m / z 190, m / z 249, m / z 352 y m / z 515.

Keywords: Medicinal plants, antioxidant activity, chemical characterization.

1. INTRODUCCIÓN

La preocupación por una alimentación sana ha sido una constante en toda la historia de la humanidad. No basta poseer el conocimiento teórico de que una buena alimentación es importante y que incide de forma directa en el mantenimiento y recuperación de la salud. En la actualidad, se ha observado el aumento del número de casos de personas con enfermedades crónicas no transmisibles, enfermedades crónico-degenerativas, así como síntomas de cansancio, depresión, irritación, estrés fueron generados debido a los inadecuados principios de alimentación ya sea en la ingesta de alimentos en cantidad y calidad, aliados a factores psicológicos y ambientales. De acuerdo a la OMS 2,6 millones de personas mueren como consecuencia de su sobrepeso y obesidad; 4,4 millones de personas mueren como resultado de unos niveles de colesterol total elevados; 7,1 millones de personas mueren como resultado de una tensión arterial elevada.

En la década de los 80 se lanzó en Japón una nueva concepción sobre alimentos, con el objetivo de desarrollar alimentos saludables para una población que presentaba una gran expectativa de vida (Toreti, 2011). Surgiendo así los llamados alimentos funcionales, que además de ofrecer las propiedades nutricionales básicas, también contengan moléculas biológicamente activas que desempeñan un papel fisiológico, promoviendo beneficios específicos para la salud de las personas que los consuman regularmente (Pastrana et al., 2017)

En la industria de alimentos, debido a esa creciente demanda de alimentos saludables y funcionales, elaborada con aditivos naturales. Ha generado una intensa investigación en este campo, con el afán de sustituir los antioxidantes sintéticos y menos seguros por aditivos con capacidad antioxidante obtenida a partir de fuentes naturales (Boulekbatche-Makhlouf, Slimani, & Madani, 2013). En este sentido, en las últimas dos décadas, los extractos fenólicos obtenidos a partir de las plantas, brindan una posibilidad atractiva como fuente de antioxidantes naturales porque son abundantes y poco costosos (Fernández-Agulló, Freire, & González-Álvarez, 2015; Mota et al., 2012).

Las plantas como el eucalipto, la oliva y el Tayakasi fueron utilizados empíricamente desde la antigüedad por nuestros antepasados. Estas plantas eran usadas principalmente en forma de mates, extractos obtenidos a partir de macerados y en forma de emplastos para tratar diversas enfermedades como, resfriados, tos, reumatismo, problemas digestivos y para cicatrizar las heridas.

En los últimos años diversas investigaciones fueron realizadas con el objetivo de identificar los compuestos bioactivos en estas plantas (Meirinhos et al., 2005; Pascual, Slowing, Carretero, Sánchez Mata, & Villar, 2001; Scognamiglio et al., 2012; Sudha, Jeyakanthan, & Srinivasan, 2017; Zanuncio, Colodette, Gomes, Carneiro, & Vital, 2013; J. Zhang et al., 2017). La mayoría de estos estudios fueron realizados en la india y países europeos. En Sudamérica estudios usando estas plantas son pocas. La presencia de compuestos químicos en las plantas es determinada por diversos factores ambientales como clima, ubicación geográfica, altitud, tipo de suelo, así como también por el tipo de especie o familia botánica (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2002), evidenciando que no es posible encontrar componentes bioactivos en cantidad y calidad igual en las plantas cultivadas en diferentes regiones geográficas.

Por consiguiente, el presente trabajo busca, identificar compuestos bioactivos presentes en plantas nutricionales colectadas en el departamento de Tacna y Lambayeque y evaluar su potencial antioxidante. La investigación realizada servirá de base científica para la continuidad de estudios futuros abordando las propiedades biológicas de las plantas medicinales de nuestro país. Así como permitirá su aplicación segura en la elaboración de aditivos naturales con capacidad antioxidante, como también por la industria farmacéutica, dando un valor agregado a estas fuentes que se encuentran poco aprovechado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar los extractos etanólicos vegetales de *Eucalyptos*, *Olea europeae* y *Lippia nodiflora* en relación a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides y determinar la actividad antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Cuantificar la concentración de fenólicos totales
- ✓ Cuantificar la concentración de flavonoides
- ✓ Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos usando las metodologías FRAP y ORAC
- ✓ Identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos vegetales por medio de EASI-MS.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compuestos fenólicos en plantas

Los vegetales poseen dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios, que responden por la supervivencia del vegetal, ejerciendo función activa en los procesos de fotosíntesis, respiración y asimilación de nutrientes; y los metabolitos secundarios están íntimamente asociados a las estrategias de defensa de las plantas.

Los compuestos fenólicos originan una de las clases más importantes de los metabolitos secundarios de las plantas, y en su mayoría son derivados de fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina (Paulsen, 2010). Los compuestos fenólicos son sustancias ampliamente distribuidas en la naturaleza, más de 8000 compuestos fenólicos ya fueron detectados en las plantas (Paulsen, 2010). Estos compuestos se dividen en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides. De acuerdo a Burns et al., (2001), los denominados flavonoides son los que presentan la estructura química descrita como $C_6-C_3-C_6$ mientras que los no flavonoides se clasifican como:

- ✓ Los derivados de las estructuras químicas C_6-C_1 específicas de los ácidos hidroxibenzoico, gálico y elágico.
- ✓ Los derivados de las estructuras químicas C_6-C_3 específicas de los ácidos caféicos y p-cumárico hidroxicinamatos.
- ✓ Los derivados de las estructuras químicas $C_6-C_2-C_6$ específicas del trans-resveratrol, cis-resveratrol y trans-resveratrol-glucosídico.

Estructuralmente, los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático con uno o más radicales hidroxilos, que van desde moléculas simples a compuestos altamente polimerizados. En la Figura 1 y Figura 2, podemos visualizar los compuestos fenólicos divididos en subgrupos, como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos y sus estructuras químicas.

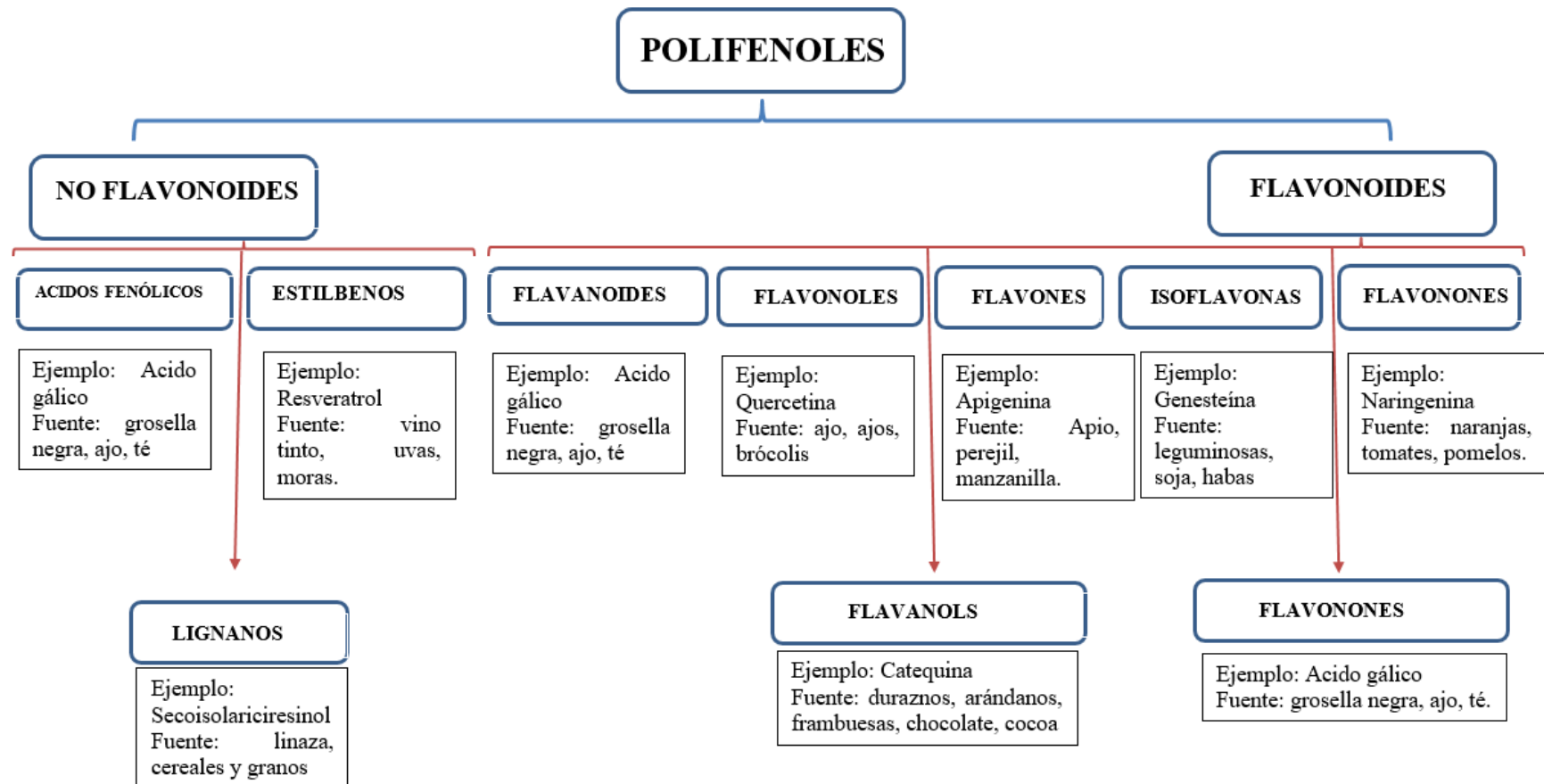


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides, junto con los ejemplos típicos.

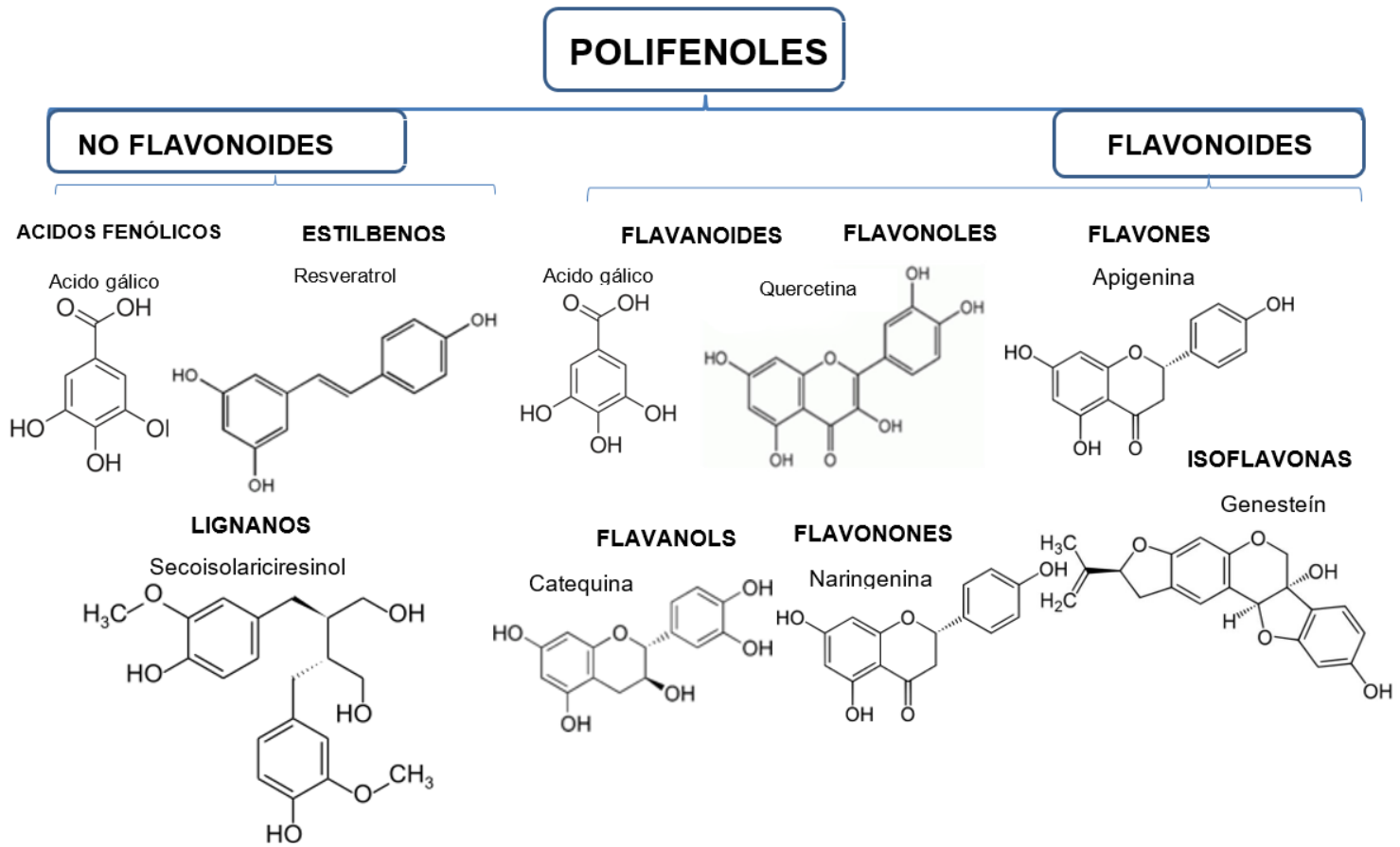


Figura 2. Estructura química asociada a los compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides.

La distribución y concentración de los flavonoides en los vegetales depende de diversos factores de acuerdo con la fila / orden / familia del vegetal, así como de la variación de las especies, y las condiciones ambientales (Ou et al., 2002). Los flavonoides se forman de la combinación de derivados sintetizados de la fenilalanina (vía metabólica del ácido chiquímico) y ácido acético (Bobbio & Bobbio, 1989).

En los últimos años, se ha encontrado que los compuestos fenólicos ayudan a reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas (Lin et al., 2016). Diversos estudios informaron efectos benéficos para la salud como: antioxidante (Ali, Ranneh, Ismail, & Esa, 2015), antimicrobiano (Mocan et al., 2015), anticancerígeno, anti-inflamatorio (L. Zhang, Shamaladevi, Jayaprakasha, Patil, & Lokeshwar, 2015), diabetes (Zhao et al., 2016).

2.2. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

"Antioxidante" es un término ampliamente utilizado en la sociedad, y puede ser definido como "sustancia que impide la oxidación de otras sustancias por acción de oxígeno"(Huang, Boxin, & Prior, 2005). La FDA define como "sustancias utilizadas para preservar los alimentos a través del retraso del deterioro, la rancidez y la decoloración causadas por la auto oxidación". El área de los alimentos los antioxidantes se usan de forma más específica en las características organolépticas y conservan una característica nutricional de los productos (Bobbio & Bobbio, 1989). Los antioxidantes son diferentes sustancias (vitaminas, minerales, pigmentos naturales, poli fenoles y enzimas), la biosíntesis de estas sustancias está profundamente influenciada por una serie de factores, como ubicaciones, condiciones climáticas y períodos de cosecha (Ou et al., 2002).

La actividad antioxidante se suele atribuir a la presencia de compuestos fenólicos incluyendo hidroxibenzoico ácidos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y taninos (Boulekbache-Makhlouf, Slimani, et al., 2013). En este sentido, estos compuestos son responsables de una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antioxidantes, anticarcinogénico, antialérgico, antiinflamatorio y antimicrobiano efectos, entre otros (Hagerman et al., 1998; Ou et al., 2002; Santos, Villaverde, Silva, Neto, & Silvestre, 2012),

y por tal motivo son ampliamente utilizado en la alimentación, así como en la industria farmacéutica.

2.3. Métodos analíticos utilizados para determinar a actividad antioxidante

Diversas metodologías analíticas se han empleado para determinar la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas (Rojas, Jaramillo, & Lemus, 2015). Sin embargo, hasta ahora, no existe un método oficial estandarizado, por lo tanto, es recomendable realizar la medición con diferentes métodos y con varias condiciones de oxidación (Frankel & Meyer, 2000). A seguir describiremos brevemente los mecanismos de los principales métodos antioxidantes utilizados para medir la capacidad antioxidante en plantas.

De acuerdo Huang et al.,(2005), los ensayos utilizados para medir la capacidad antioxidante se clasifican básicamente en dos grupos, dependiendo del mecanismo de reacción: métodos basados en la transferencia de los átomos de hidrógeno y métodos basados en la transferencia de electrones. La mayoría de los ensayos basados en transferencia de átomos de hidrógeno, la reacción es un esquema competitivo, en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peróxidos generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azoicos (Zulueta, Esteve, & Frígola, 2009). Los ensayos basados en transferencia de electrón miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce, siendo que el grado de cambio de color está correlacionado con las concentraciones de antioxidantes de la muestra (Huang et al., 2005; Zulueta et al., 2009).

Dávalos et al., (2004), menciona que el ensayo de ORAC (capacidad de absorción de radical oxígeno), actúa capturando el radical peróxido, generado por la descomposición de AAPH [dicloruro de 2,2'azobis (2-amidinopropano) en la presencia de oxígeno atmosférico, reaccionando con un indicador fluorescente formando un producto no fluorescente. En presencia de antioxidantes, se conserva la fluorescencia. La medida es realizada por la reducción de fluorescencia (excitación a 485 nm y emisión a 520 nm).

De acuerdo con Ou et al., (2002), el ensayo FRAP, actúa reduciendo el hierro, en presencia de antioxidantes que actúan como donadores de electrón, el complejo Fe^{3+} - TPTZ [2,4,6-tri (2-piridil)-(1,3,5-triazina) se reduce a Fe^{2+} - TPTZ, generando un cambio de coloración de azul claro a azul oscuro, la medida es realizada por el aumento de absorbancia a 593 nm.

De acuerdo con Gómez - Guillén et al.,(2010) el ensayo de ABTS + actúa capturando el radical ABTS + (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) que se estabiliza en presencia de antioxidantes donantes de hidrógeno, presentando un cambio de color de verde oscuro a verde claro. La medida es realizada por la reducción de absorbancia a 734 nm.

El Método de la eliminación de radicales de DPPH es uno de los más utilizados para materiales vegetales (Bankova et al., 2016). DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) es un radical libre estable que reacciona con compuestos que pueden donar un átomo de hidrógeno. Este método se basa en la eliminación de DPPH mediante la adición de un radical o de un antioxidante que descolora la solución DPPH, la medida es realizada por la disminución de la absorción en 517 nm generada por el cambio de coloración violeta a amarillo (O. P. Sharma & Bhat, 2009).

2.4. Descripción de las plantas seleccionadas para este estudio

2.4.1. Planta Eucalipto (*Eucalyptus sp.*)

Eucalyptus (*Eucalyptus sp.*) es un árbol perteneciente a la familia Myrtaceae, siendo que el 27% del volumen total corresponde a la madera y es una de las especies forestales más importantes. El uso principal de la madera de eucalipto es la producción de pulpa de celulosa seguida de la fabricación de tableros y paneles (Vázquez et al., 2008). Grandes cantidades de desechos se generan durante procesamiento industrial de madera de eucalipto, incluyendo corteza, retazos de madera, ramas y hojas, que se utilizan principalmente para la producción de energía o simplemente es dejado en el bosque para la modificación del suelo y la fertilización (Santos et al., 2012). En esta perspectiva, la

valorización de estos residuos mejoraría el proceso industrial tanto económicamente como ambientalmente. En los últimos años, los residuos de biomasa a partir de eucalipto atrajeron gran interés como fuente de compuestos de alto valor agregado (Mota et al., 2012; Santos et al., 2012).

Algunos de los compuestos interesantes que se pueden obtener de los restos de biomasa pertenecen al grupo de compuestos fenólicos, estos compuestos presentan actividad antioxidante, motivo por lo que existe una atención creciente de la comunidad científica porque juegan un papel importante tanto en el mantenimiento de la salud humana como en la conservación de los alimentos (Harkat-Madouri et al., 2015; Paz et al., 2015).

Diversos trabajos reportaron el alto potencial de varios subproductos de eucalipto como fuentes naturales de compuestos fenólicos biológicamente activos (Santos et al., 2012). Estudios realizados por Boulekbache-Makhlouf et al., (2013) informaron que los extractos fenólicos de *E. globulus*. Poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas. Además, la corteza del eucalipto también fue analizada presentando efecto antioxidante (Vázquez et al., 2008). Las actividades anti proliferativas asociadas a los compuestos fenólicos presentes en eucalipto también fueron estudiadas (Mota et al., 2012).

Boulekbache-Makhlouf et al., (2013) caracterizó los compuestos fenólicos presentes en las hojas del eucalipto y también estudió el aceite esencial evaluado sus propiedades antibacterianas contra las bacterias responsables de las enfermedades infecciosas orales (Harkat-Madouri et al., 2015).

2.4.2. Planta Olivo (*olea europaea*)

Olea europaea L. (Oleaceae), es una especie mediterránea, es una de los árboles cultivados más antiguos en el mundo, utilizado para producir aceitunas y aceites. Se conocen diferentes genotipos (cultivares) de *O. europaea* L. A lo largo de los siglos, los agricultores seleccionaron los cultivos de olivo para obtener cualidades como mayor productividad, rendimiento y resistencia a las plagas (Scognamiglio et al., 2012).

Las propiedades biológicas de las hojas de olivo parecen deberse a su riqueza en componentes antioxidantes (Meirinhos et al., 2005). El análisis HPLC-DAD del extracto acuoso de hoja de olivo permitió la identificación de varios compuestos fenólicos (Pereira et al., 2007).

Scognamiglio et al., (2012), estudio la composición fenólica de estos varios cultivares, aplicando las técnicas metabolómicas (RMN 1D y 2D y análisis de HPLC). Los datos espectrales de ¹H-NMR se procesaron y analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA) para señalar posibles diferencias en la composición de polifenoles entre los cultivares. La capacidad de eliminación de radicales libres se evaluó a través de 2,2-difenil-1-picryldrazyl (DPPH). Se usó el reactivo Folin-Ciocalteu para cuantificar el contenido fenólico total. Os resultados indicaron diferencias significativas en concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

2.4.3. Planta Tayakasi (*Lippia nodiflora*)

Lippia nodiflora (Verbenaceae), también conocida como *Phyla nodiflora*, es una hierba medicinal perenne rastrera de crecimiento rápido que pertenece a la familia de las Verbenaceae y que se distribuye ampliamente en las regiones más templadas y subtropicales del mundo (R. A. Sharma & Singh, 2013).

La planta contiene una variedad de constituyentes como triterpenoides, flavonoides, fenoles, esteroides y muchos otros (Pascual et al., 2001). Los principales flavonoides encontrados en las hojas de *L. nodiflora* son: nodifloretina, glucósido de β -sitosterol y el glucósido de estigmasterol, nodifloridin A, nodifloridin B y flavona lippiflorin A y lippiflorin B. (Balamurugan, Duraipandiyar, & Ignacimuthu, 2011; Pascual et al., 2001; Sudha et al., 2017).

Tradicionalmente esta planta ha sido usado para el tratamiento del dolor articular de la rodilla, la falta de movimientos intestinales, litiasis, diarrea, asma, resfriado, fiebre, diuréticos, trastornos menstruales, antipalúdico, sífilis, gonorrea, úlceras, bronquitis y

enfermedad cardíaca (Balamurugan et al., 2011; Pascual et al., 2001). En Sudamérica, como Perú, Brasil y Venezuela, también se emplea como remedio para los resfriados, bronquitis, tos y asma (Pascual et al., 2001). También se ha registrado en la medicina tradicional china como un remedio para eliminar el viento, el calor y la hinchazón, y la desintoxicación. Estudios previos mostraron que la planta poseía amplios efectos farmacológicos que incluían antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorio (Cheng, Murugaiyah, & Chan, 2015; Kuo et al., 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos de la Facultad de ingeniería de alimentos. Laboratorio Thomson del Instituto de Química de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), Brasil.

3.2. Materia prima

Las muestras vegetales de eucalipto (*Eucalyptos*), fueron colectadas en el departamento de Lambayeque, (Andamarca 6° 13' 51" S 79° 26' 48.9" W) y las hojas de *Olivo* (*Olea europeae*) y *Tayakasi* (*Lippia nodiflora*) en el departamento de Tacna (Candarave 17°16'13"S 70°15'06"O. Las hojas y yemas de las plantas se cortaron con una navaja sin romperlos en pedazos, se secaron a temperatura ambiente (22°C) durante 5 días y se almacenaron herméticamente.

3.3. Preparación de extractos vegetales

Dos gramos de las muestras secas previamente trituradas (hojas y yemas), se mezclaron con 20 mL de etanol/agua al 80% (v/v) y se agitaron a 60 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó para separar el sobrenadante. Los sobrenadantes se usaron para los análisis químicos. Las plantas vegetales fueron previamente identificadas por botánico especialista en áreas reservadas de la región de Lambayeque.

En la Figura 3, se presenta en forma resumida la esquematización de la metodología de la investigación.

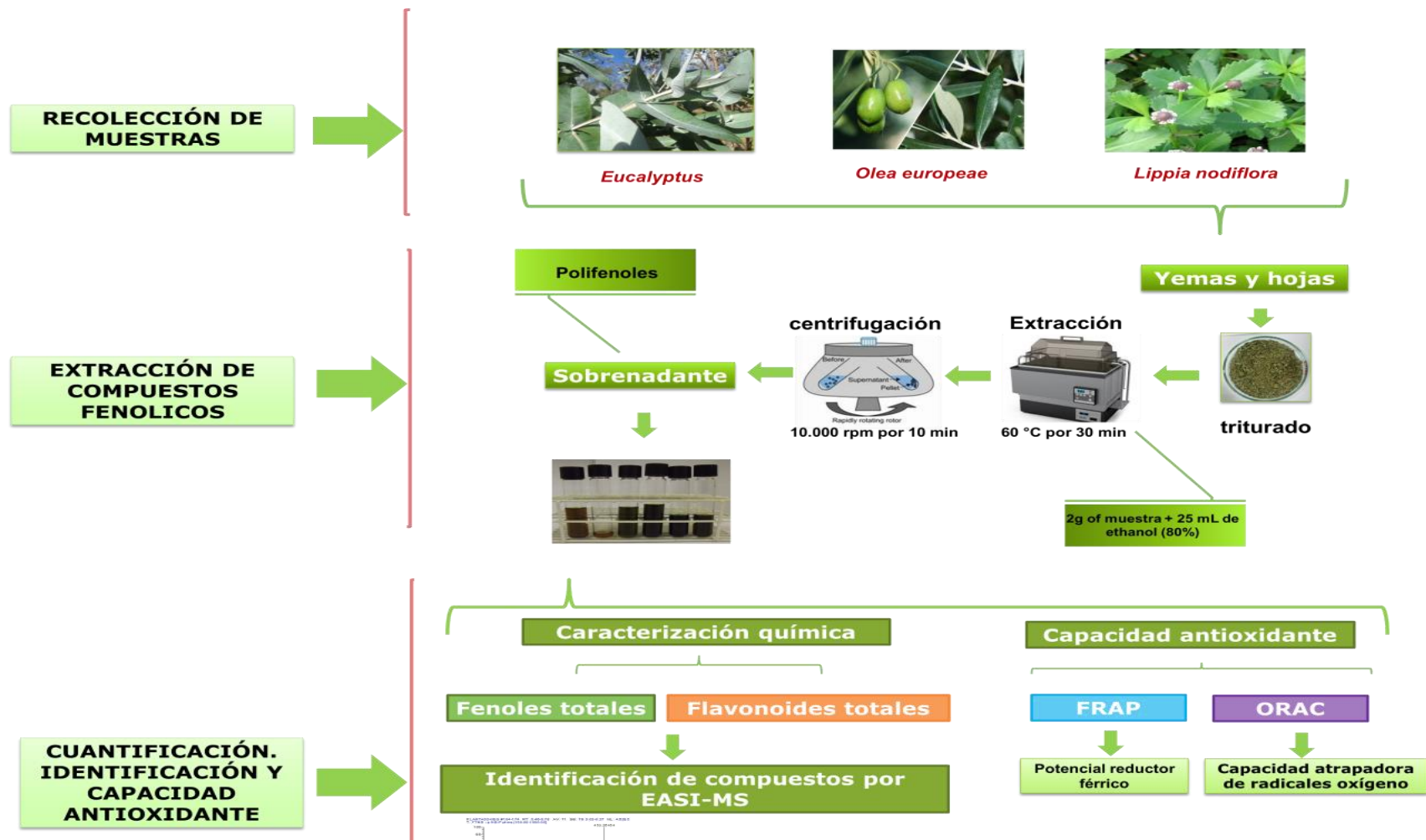


Figura 3. Esquema de la metodología de la investigación

3.4. Determinación cualitativa de compuestos fenólicos

3.4.1. Cromatografía en camada delgada de alta eficiencia en fase reversa EEP y EMV.

Alícuotas de 3 μ L dos EEV fueron preparados conforme ítem 3.3 y aplicadas en placas de RP18 F254S (Merck - Alemania) de 0,2 mm de espesura (10X10cm) de acuerdo con PARK et al (2002). Como fase móvil fue utilizada etanol / agua (55:45, v/v) (Etanol, P.A., 99.5 °GL - Ecibra Cetus Ltda). La fase móvil se dejó en cuba por 10 minutos para saturación y se inició la corrida cromatográfica por un periodo de 100 min. Después de la corrida la placa fue secado con la ayuda de un secador y visualizado en una lámpara de luz ultravioleta UV Cole Parmer (UVP-UVGL - 58 - CA) a 254 nm y 366 nm de longitud de onda.

3.5. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos

3.5.1. Cuantificación de fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales de los extractos etanólico vegetales (EEV) se determinaron mediante el método de Folin - Ciocalteu, adaptado de Swain & Hillis (1959). La absorbancia fue medida a 725 nm usando un espectrofotómetro (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT, EE.UU.) Y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por mg de muestra vegetal (mg GAE mL^{-1}). Se usó ácido gálico para construir la curva padrón.

3.5.2. Cuantificación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó de acuerdo con Zhishen, Mengcheng, & Jianming (1999). La absorbancia fue medida a 510 nm usando un espectrofotómetro (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT, EE. UU.) fue utilizado la catequina para construir una curva estándar, y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de catequina por mL de muestra de vegetal (mg CE mL^{-1}).

3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante.

3.6.1. Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC (Ou, Chang, Huang, & Prior, 2013) se llevó a cabo añadiendo 25 μL de muestras de extracto o soluciones estándar, 150 μL de fluoresceína diluida en tampón de fosfato (pH 7,4) y 25 μL de AAPH (2, 20'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) a microplacas negras de 96 pozos, en la oscuridad. Se utilizó Trolox (ácido (\pm) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) como estándar y el lector de microplacas (Synergy HT, Biotek) con filtros fluorescentes: longitud de onda de excitación, 485 nm; longitud de onda de emisión, 520 nm. Los valores de ORAC se expresaron en μmol de equivalente trolox ($\mu\text{mol TE}$) por ml de muestra.

3.6.2. Potencial antioxidante reductor férrico (FRAP)

El reactivo FRAP (tampón acetato, TPTZ en HCl, FeCl_3) se mezcló con muestras diluidas en agua o soluciones estándar (Trolox). Después de 30 minutos a 37°C , las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, y la absorbancia fue leída a 595 nm. Los resultados se expresaron como μmol de equivalente trolox ($\mu\text{mol TE}$) mL^{-1} de muestra (Benzie & Strain, 1996).

3.7. Identificación de compuestos químicos a través de EASI-MS

La metodología utilizada fue de acuerdo con Sawaya *et al* (2004, 2010). El solvente usado en la pulverización fue el metanol. Se usó papel de Brown Kraft como analito-soporte. Para este estudio, los espectros se obtuvieron en el modo de iones negativos utilizando el espectrómetro de masas Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, San José, EE. UU.) Equipado con una fuente EASI. Las condiciones analíticas fueron: resolución: 140,000; Tensión de pulverización: 3,5 kV; promedio de 3 micro escaneados por cada espectro; temperatura capilar: 275°C y el espectro de masas fue procesado por el software Xcalibur (versión 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation).

La ionización EASI se basa en una pulverización supersónica (SSI) utilizada para generar gotas de disolvente que se cargan eléctricamente debido a la distribución desequilibrada de cationes y aniones. El flujo denso de 1 min. de pulverización supersónica en la superficie del analito hace que sus gotículas cargadas des-absorben las moléculas de la superficie, las ionicen, y luego estas moléculas cargadas se transfieren a la fase gaseosa.

3.8. Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron por triplicado y los datos se expresaron como el valor medio \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron por análisis de varianza (ANOVA) a $P < 0,05$. Los gráficos serán elaborados utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.)

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Matrices vegetales utilizados en el siguiente estudio

4.1.1. Eucalipto (*Eucalyptos*)

Las hojas de Eucalipto (*Eucalyptos*) fueron colectados en el departamento de Lambayeque (Andamarca 6° 13' 51" S 79° 26' 48.9" W). Las hojas tiernas fueron cortadas usando una navaja. El material colectado fue colocado en embalaje de papel, secado y almacenado herméticamente. En la Figura 4, podemos visualizar el eucalipto en la planta, el eucalipto cortado y las hojas de eucalipto secos y triturados.



Figura 4. Hojas de eucalipto que fueron utilizadas en este estudio.

4.1.2. Olivo (*Olea europaea*)

Las muestras vegetales de *Olivo (Olea europaea)* y *Tayakasi (Lippia nodiflora)*, fueron colectados en el departamento de Tacna a una altitud de 3.415 msnm a 70 12'15" de longitud Oeste, 17 15'30" latitud Sur. Hojas y yemas fueron cortadas usando una navaja. El material colectado fue colocado en embalaje de papel, secado y almacenado herméticamente. En la Figura 5, podemos visualizar el olivo en la planta, el olivo cortado y las hojas de olivo secos y triturados.



Figura 5. Hojas de olivo que fueron utilizadas en este estudio

4.3.1. Tayakasi (*Lippia nodiflora*)

Las hojas de *Tayakasi (Lippia nodiflora)*, fueron colectados en el departamento de Tacna a una altitud de 3.415 msnm a 70 12'15" de longitud Oeste, 17 15'30" latitud Sur. Hojas y yemas fueron cortadas usando una navaja. El material colectado fue colocado en

embalaje de papel, secado y almacenado herméticamente. En la Figura 6, podemos visualizar el Tayakasi en la planta, el Tayakasi cortado y las hojas de Tayakasi secas y trituradas.



Figura 6. Hojas de Tayakasi que fueron utilizadas en este estudio

4.2. Preparación del extracto vegetal

Los extractos etanolicos de las hojas de eucalipto, olivo y Tayakasi, fueron preparados de acuerdo con el ítem 3.3. Los extractos etanolicos presentan olor aromático característico, la coloración de los extractos etanolicos presentaron variación de color, de amarillo verdoso a verde oscuro. Estas variaciones están estrictamente ligadas a la pigmentación de las hojas de las plantas analizadas. Figura 7 ilustra los extractos etanólicos de las plantas.



Figura 7 . Extractos etanólicos de Eucalipto, Oliva e Tayakasi colectadas en Lambayeque y Tacna.

4.3. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos

Las cuantificaciones de los compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos son útiles por su rapidez y eficiencia, y son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, en la industria farmacéutica, en el área de la salud. La cuantificación de fenólicos totales de los extractos etanolicos de las plantas de Eucalipto, Olivo y Tayakasi, fueron realizados de acuerdo al ítem 3.5.1. a seguir presentamos los resultados obtenidos en los extractos analizados.

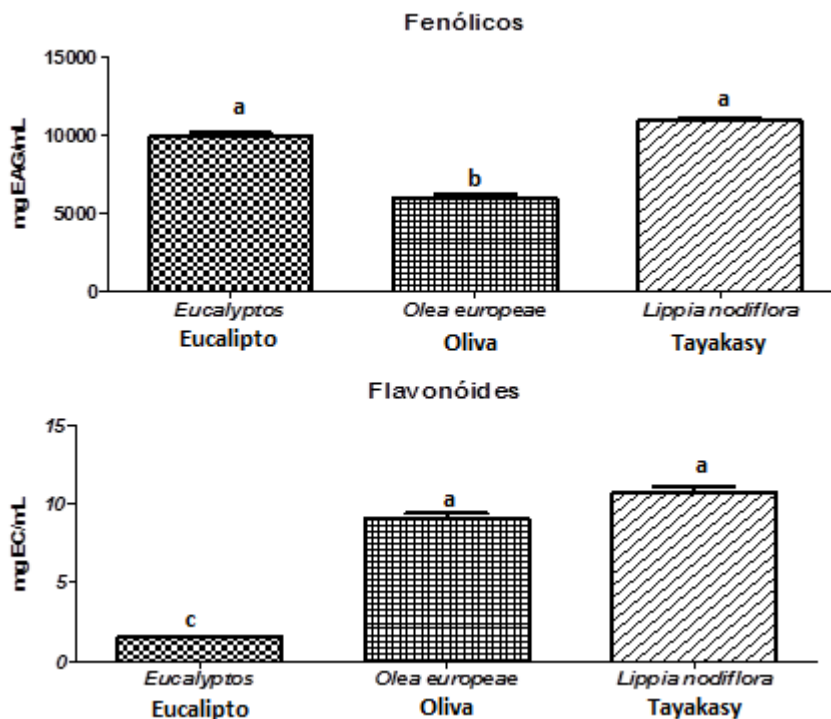


Figura 8. Cuantificación de fenólicos totales y flavonoides de los extractos etanólicos de las plantas analizadas
Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos muestran que los extractos etanólicos de las hojas de eucalipto y Tayakasi presentaron mayor concentración de fenólicos totales (no mostraron diferencias significativas entre ambas muestras $p \leq 0,05$) (Figura 8). Las concentraciones de fenólicos totales obtenidas para el *Eucalyptus* (Eucalipto) son $9955,2 \pm 557,4$ mg EAG mL^{-1} , para el extracto etanólico de hojas de olivo fueron $9184,1944 \pm 770,1$ mg EAG mL^{-1} y para extracto etanólico de Tayakasi fue de $10994,5 \pm 423,1$ mg EAG mL^{-1} .

Los resultados del contenido de flavonoides mostraron mayor contenido en los extractos etanólicos de Olivo y Tayakasi encontrándose ambas entre $9,0353 \pm 0,9$ mg EC mL^{-1} y $10,7263 \pm 0,9$ mg EC mL^{-1} respectivamente. En este análisis el extracto etanólico de Eucalipto, presentó menor concentración de flavonoides con un valor de $6,1738 \pm 0,04$ mg EC mL^{-1} .

Diversos estudios fueron realizados utilizando las plantas con el objetivo de encontrar nuevas fuentes de compuestos bioativos que posean propiedades biológicas. (Mgbeahuruike, Yrjönen, Vuorela, & Holm, 2017). Los metabolitos secundarios son los compuestos más abundantes en las plantas, y estas han recibido más atención en los últimos años debido a sus distintas propiedades terapéuticas (Xu, Wang, Pu, Tao, & Zhang, 2017).

4.4. Determinación de capacidad antioxidante

Las propiedades de los antioxidantes en plantas fueron investigados por diversos investigadores (Gomez-Caravaca, Gomez-Romero, Arraez-Roman, Segura-Carretero, & Fernandez-Gutierrez, 2006; Latif & Mohamed, 2016; Mota et al., 2012; Pietta, 2000). Diversas metodologías fueron utilizadas para medir la capacidad antioxidante en las matrices vegetales (Bankova et al., 2016; Frozza et al., 2013; Kumazawa et al., 2004; Lima et al., 2009; Mello y Hubinger, 2012; Nagai et al., 2003). En este estudio, para medir la actividad antioxidante de los extractos etanolicos de las plantas: Eucalipto, Olivo y Tayakasi, fueron utilizadas las técnicas de FRAP y ORAC (Figura 8). La técnica de FRAP se basa en la reducción de Hierro (III) para o Hierro (II), y los valores de ORAC miden la capacidad de eliminar el radical peróxido (OU et al., 2002).

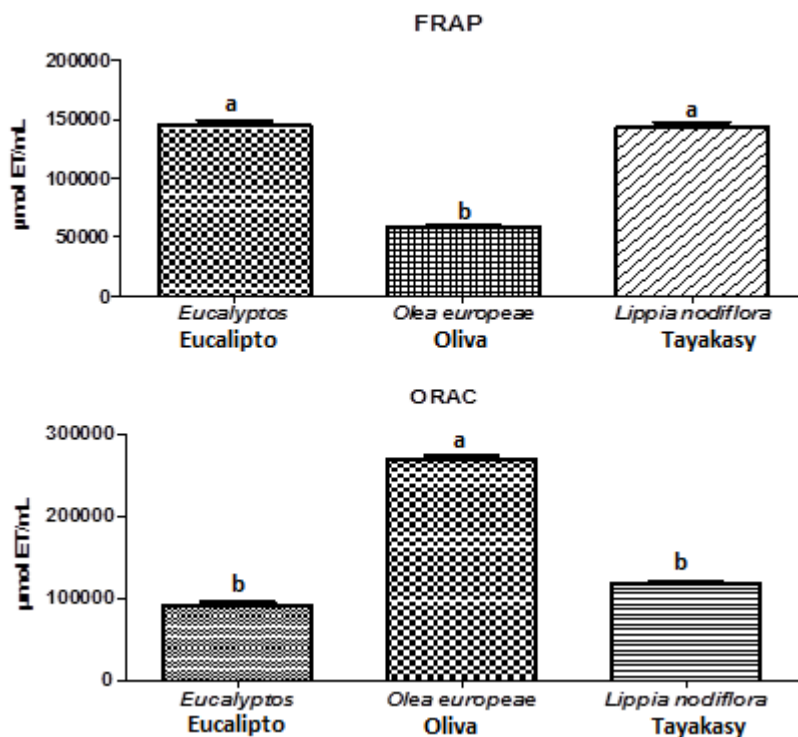


Figura 9. Cuantificación de flavonoides totales de los extractos etanólicos de las plantas estudiadas.
Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos por la técnica de FRAP mostrados una correlación directa con la presencia de compuestos fenólicos presentes en las muestras analizadas, (Figura 9). Mayores actividades de reducción de hierro fueron observadas en los extractos etanólicos de Eucalipto y Tayakasi que mostraron valores similares desde $145711,125 \pm 6656,95086 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ y $143411,75 \pm 8159,1 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ y una menor capacidad de reducción fue observado en los extractos etanólicos de Olivo con $58820,73 \pm 3074,27893 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$.

Analizados por la técnica de ORAC (Figura 8), mayor actividad de eliminación de radical peróxido fue observado en el extracto etanólico de Olivo con $269511,3 \pm 10892,4 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$), con respecto a los extractos de Eucalipto con $90830,2 \pm 10531,1 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ y Tayakasi con $117916,0 \pm 5688,6 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$. Diversos estudios fueron usando las matrices vegetales para la obtención de antioxidantes de fuentes naturales (Bittencourt et al., 2015; Da Silva Frozza et al., 2013; Falcão et al., 2016; Lan et al, 2016; Laskar et al.,2010; Vargas-Sánchez et al., 2015; Yang et al., 2011).

La actividad antioxidante presentadas en los extractos etanólicos de las plantas estudiadas se mostraron bastante promisoros, en vista de que altos valores fueron observados. Así las informaciones obtenidas en este estudio son importantes debido a que nos indican que son fuentes potenciales de compuestos fenólicos y flavonoides con actividad antioxidante. Estas plantas ya están siendo utilizadas empíricamente en forma de té, para prevenir diversas enfermedades, basándose en el conocimiento popular adquiridos a través de generaciones. A pesar de eso estudios científicos realizados en nuestro país, con estos materiales aún son escasos dificultando una comparación de resultados.

4.4. Identificación de los principales iones presentes en los extractos etanólicos de las plantas analizadas por EASI- MS

La espectrometría de masas de ionización por Sonic-spray (EASI-MS), es una técnica moderna bastante utilizada para la identificación de compuestos químicos presentes en las diversas matrices vegetales. En ese sentido la caracterización de compuestos presentes en los extractos etanólicos son fundamentales para identificar los principales iones presentes y conocer sus actividades biológicas ya sea de forma aislada o combinada para ver observar si posee una actividad sinérgica de los compuestos químicos. la EASI- MS es un método de ionización simple, rápida y de fácil implementación, que nos permite realizar análisis de forma directa de los extractos etanólicos y en condiciones ambientales, evitándonos previos procesos de acondicionamiento de las muestras a analizar (Sawaya et al., 2010). La fuente de ionización EASI es acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap), lo que nos permite identificar de forma segura las formulas moleculares de los iones basándose en las masas moleculares de alta resolución.

Esta técnica tiene ventajas por que preserva la integridad de las muestras y es aplicable en matrices naturales (Fernandes et al., 2014). EASI-MS fue utilizada en este estudio para identificar la composición química y evaluar su potencial aplicación biológica (Bankova et al., 2016; Sawaya et al., 2010).

Los principales iones detectados con alta resolución, así como los *fingerprints* presentes en el extracto etanólico de eucalipto, olivo y Tayakasi se muestra a seguir (Tabla 1)

4.4.1. Eucalipto (*Eucalyptos*)

En las Figuras 8 y 9 podemos observar los *fingerprints* del extracto etanólico de eucalipto y en la Tabla 1 podemos visualizar con mayores detalles todos los iones presentes, así como su fórmula química de cada uno de los compuestos detectados en la muestra analizada.

El eucalipto es una planta rica en compuestos biológicamente activos como los terpenoides, taninos, flavonoides y derivados de floroglucinol. Nuestros resultados indicaron la presencia de cuatro iones intensos m/z 453.2, m/z 454.2 m/z 485.25, m/z 499.26 (Tabla 1) en los extractos etanólicos de hojas de eucalipto.

Tabla 1 Iones detectados en los extractos etanólicos del eucalipto

Masa experimental (m/z)	Intensidad	Abundancia Relativa	Masa teórica	Delta (ppm)	Fórmula química
169,01310	2971,4	2971,4	169,01315	0,3	C ₇ H ₅ O ₅
255,23159	1843,9	1843,9	255,23186	1,0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂
255,23409	1764,5	1764,5	255,23186	8,7	C ₁₆ H ₃₁ O ₂
453,26201	46465,4	46465,4	453,26355	3,4	C₂₈ H₃₇ O₅
453,26771	41371,2	41371,2	453,26942	3,8	C₂₁ H₄₁ O₁₀
454,26560	14458,5	14458,5	454,27138	12,7	C₂₈ H₃₈ O₅
454,26974	11923,9	11923,9	454,27138	3,6	C₂₈ H₃₈ O₅
455,26905	2506,7	2506,7	455,26394	11,2	C ₂₄ H ₃₉ O ₈
471,27308	23628	23628	471,27412	2,2	C ₂₈ H ₃₉ O ₆
471,27776	21471	21471	471,27999	4,7	C ₂₁ H ₄₃ O ₁₁
472,27634	7105,9	7105,9	472,28194	11,9	C ₂₈ H ₄₀ O ₆
472,28103	6392,4	6392,4	472,28194	1,9	C ₂₈ H ₄₀ O ₆
473,17914	1835,1	1835,1	473,18061	3,1	C ₂₅ H ₂₉ O ₉
485,25106	8950,8	8950,8	485,25338	4,8	C ₂₈ H ₃₇ O ₇
485,25785	8027,8	8027,8	485,25925	2,9	C ₂₁ H ₄₁ O ₁₂

Por medio de la espectrometría de masas fue posible identificar la fórmula molecular de cada uno de los compuestos presentes. En su mayoría en el extracto etanólico de eucalipto fue posible identificar compuestos pertenecientes al grupo de los flavonoides en su mayoría. Estudios realizados por Gonzales Burgos (2018), identificaron la presencia de compuestos fenólicos y ácido clorogénico en muestras de eucalipto extraídos en acetona, estos compuestos demostraron actividad antioxidante significativa variando su potencial de acuerdo a las técnicas utilizadas.

Otros reportes indicaron propiedades anti proliferativas del extracto acuoso crudo de *Eucalyptus microcorys* contra células de cáncer de páncreas (Deep Jyoti Bhuyan et al., 2018), antimicrobianos, anti fúngicos y principalmente antioxidantes (D. J. Bhuyan et al., 2017; Domingues, Sousa, Freire, Silvestre, & Neto, 2010; Faustino, Gil, Baptista, & Duarte, 2010; Rodrigues, de Melo, Portugal, & Silva, 2018; Santos et al., 2012; Silici, Ünlü, & Vardar-Ünlü, 2007).

PLANTA02-NEG #104-174 RT: 0.46-0.78 AV: 71 SB: 78 0.03-0.37 NL: 4.62E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

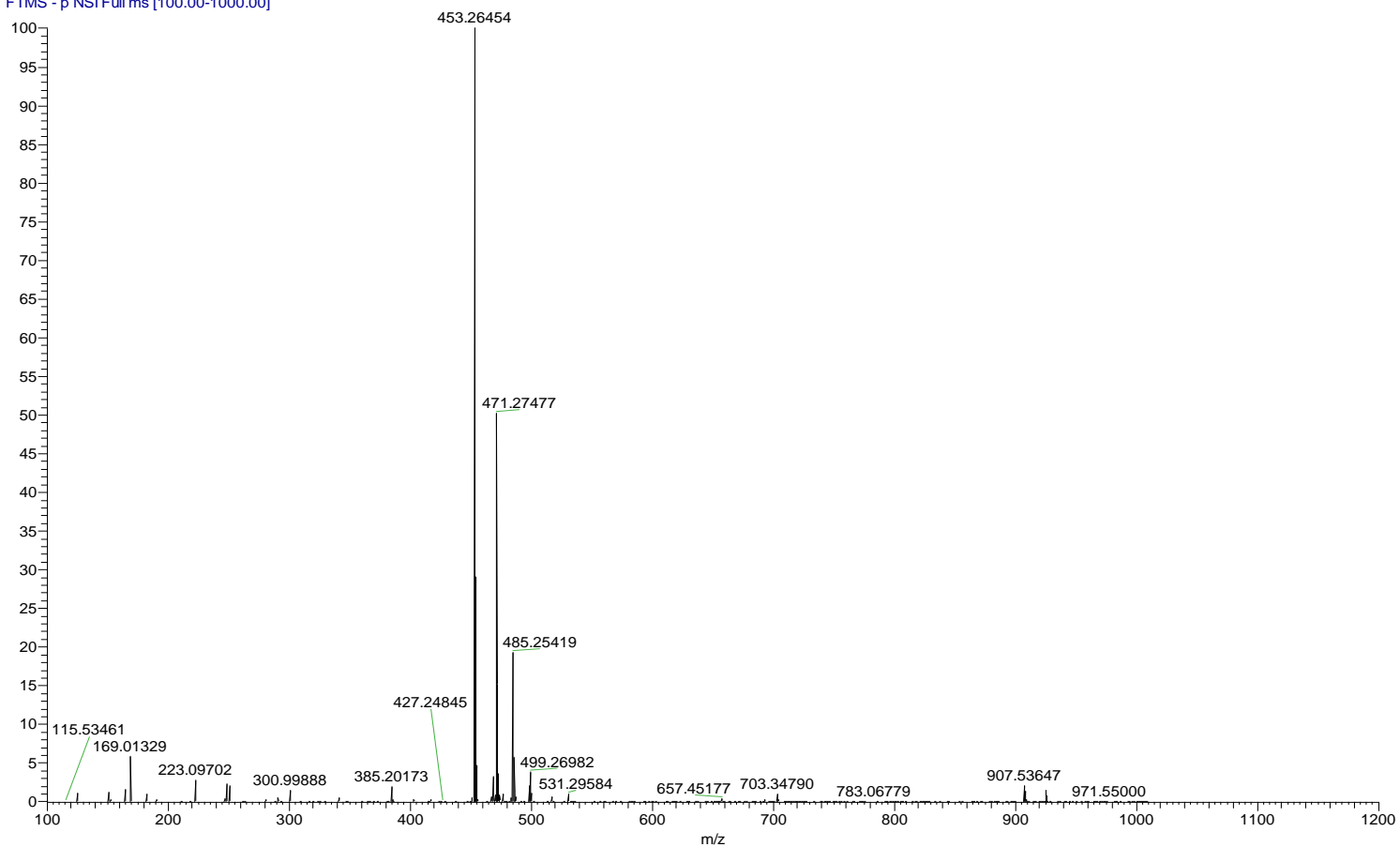


Figura 10. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Eucalipto colectado en Lambayeque-Andamarca

PLANTA02-NEG #104-174 RT: 0.46-0.78 AV: 71 SB: 78 0.03-0.37 NL: 4.62E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

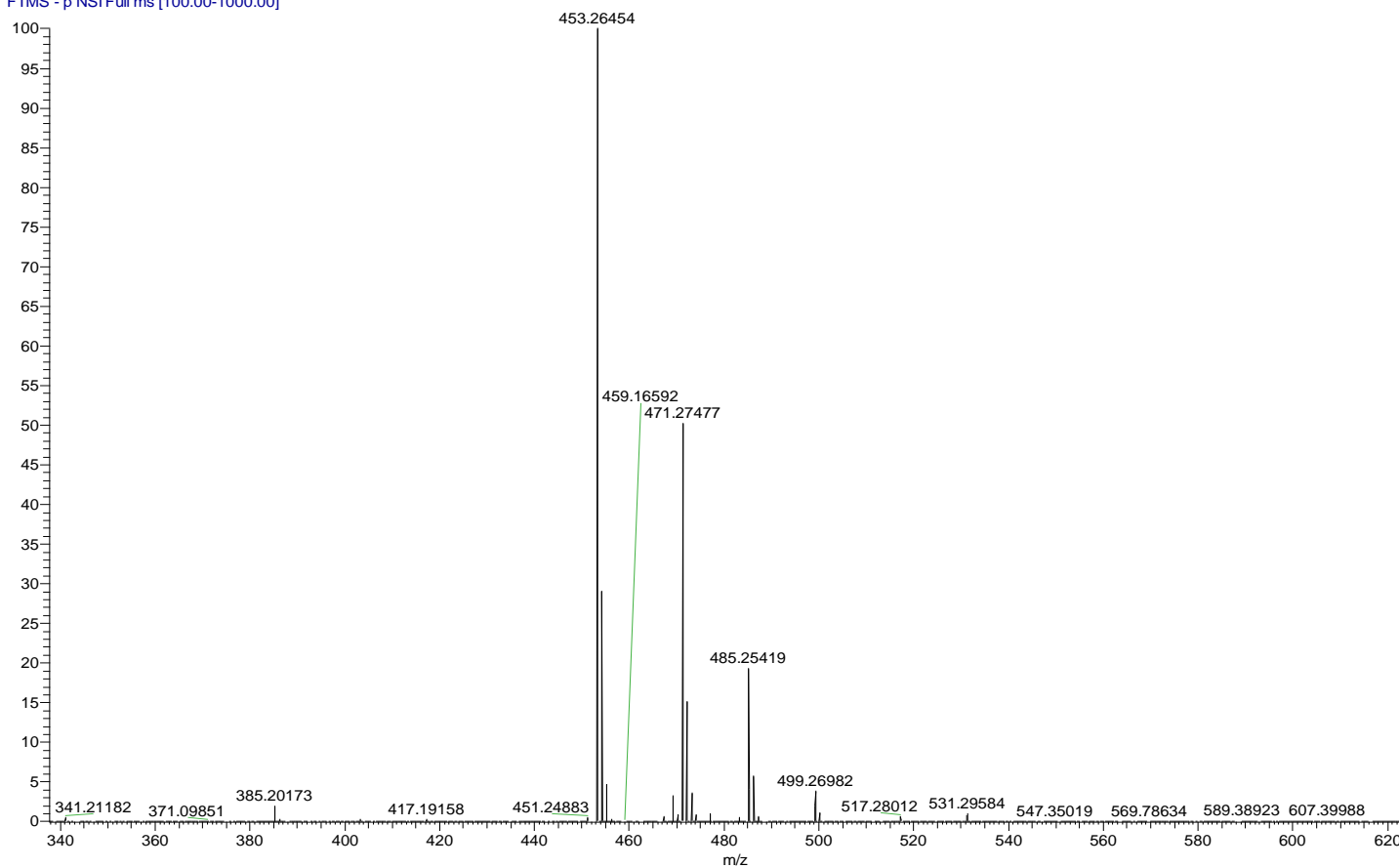


Figura 11. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Eucalipto colectado en Lambayeque – Andamarca (Continuación)

4.4.2. Olivo (*Olea europaea*)

Los principales iones detectados en los extractos etanólicos de Olivo de acuerdo a los *fingerprints* se observan en la Figura 11 al 13. Cada ion corresponde a un determinado compuesto químico. En la Tabla 2 podemos visualizar con mayores detalles todos los iones presentes, así como su fórmula química del compuesto presente.

Tabla 2. Los iones detectados en los extractos etanólicos de olivo

Olivo (<i>Olea europaea</i>)					
Masa experimental (<i>m/z</i>)	Intensidad	Abundancia Relativa	Masa teórica	Delta (ppm)	Composición química
151,03883	1389,8	2,1	151,03897	-0,9	C8 H7 O3
165,05460	807,0	1,22	165,05462	-0,2	C9 H9 O3
181,07068	1268,9	1,92	181,07066	0,1	C6 H13 O6
199,16900	488,4	0,74	199,16926	-1,3	C12 H23 O2
201,03720	8693,4	13,13	201,03936	-10,8	C8 H9 O6
271,10323	896,7	1,35	271,10236	3,2	C9 H19 O9
313,05142	427,1	0,65	313,04954	6,0	C20 H9 O4
447,09295	1685,6	2,55	447,09219	1,7	C21 H19 O11
455,35253	5010,4	7,57	455,35197	1,2	C30 H47 O3
456,35608	1084,0	1,64	456,35980	-8,2	C30 H48 O3
539,17653	66189,5	100	539,17592	1,1	C25 H31 O13
540,17975	18253,0	27,58	540,18374	-7,4	C25 H32 O13
541,18202	3585,2	5,42	541,19157	-17,7	C25 H33 O13
569,18720	510,9	0,77	569,18648	1,3	C26 H33 O14
575,15317	9251,8	13,98	575,13953	23,7	C27 H27 O14

En el extracto etanólico de las hojas de olivo fueron detectados dos iones principales: *m/z* 539,1 y *m/z* 540,1. Estos iones corresponden al grupo de los triterpenos. Estudios realizados por Cláudio et al., (2018), identificaron triterpenos como el ácido oleanólico en hojas secas de olivo. Las propiedades biológicas atribuidas a los compuestos fenólicos presentes en las hojas de olivo son: antioxidantes, antimicrobianos e antioxidantes (Abaza, Taamalli, Nsir, & Zarrouk, 2015; Cheurfa et al., 2019).

PLANTA07-NEG #156-243 RT: 0.69-1.08 AV: 88 SB: 88 0.04-0.43 NL: 8.37E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

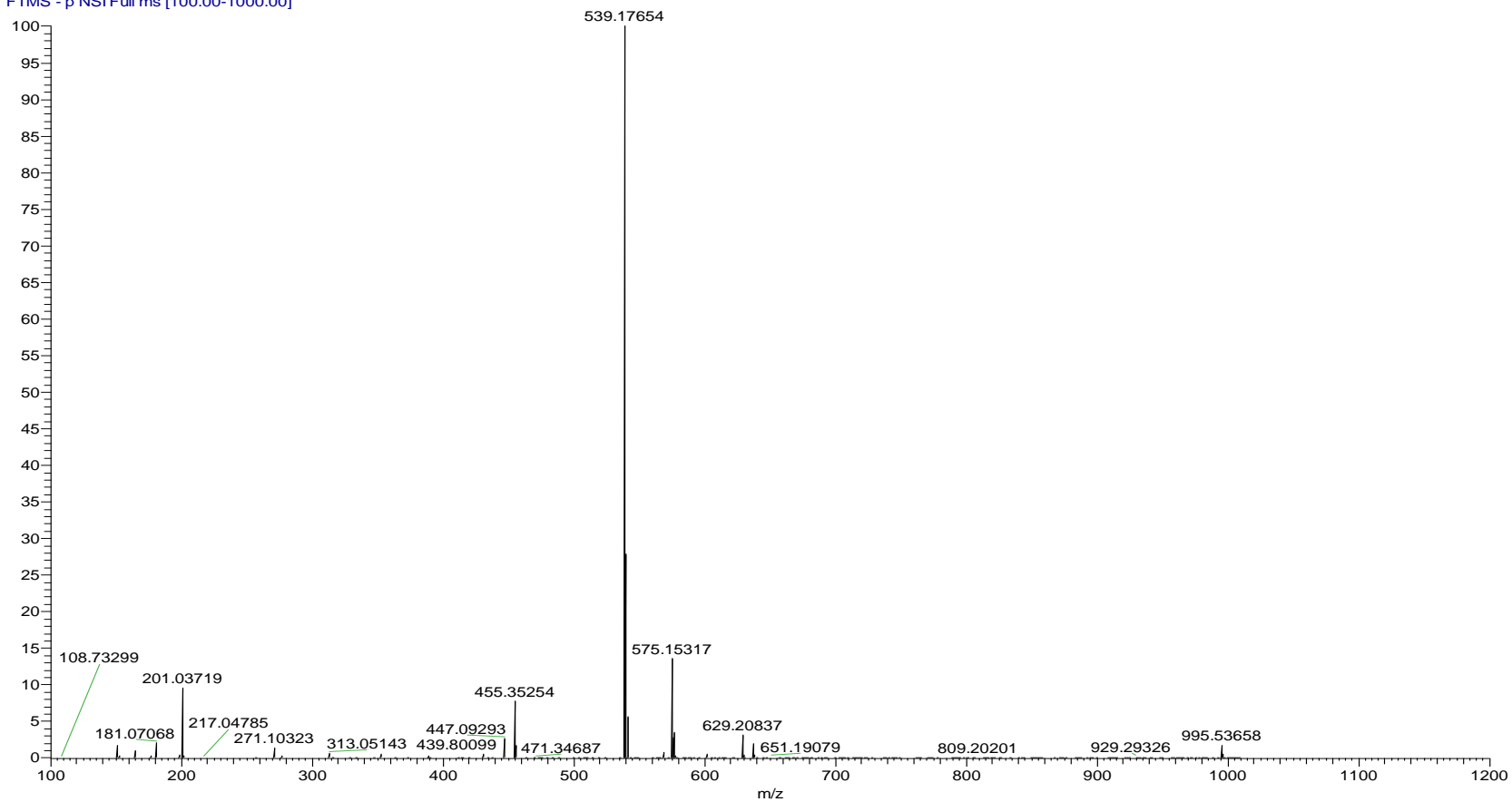


Figura 12. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de hojas de Olivo colectada en Tacna- Candarave.

PLANTA07-NEG #156-243 RT: 0.69-1.08 AV: 88 SB: 88 0.04-0.43 NL: 8.02E3
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

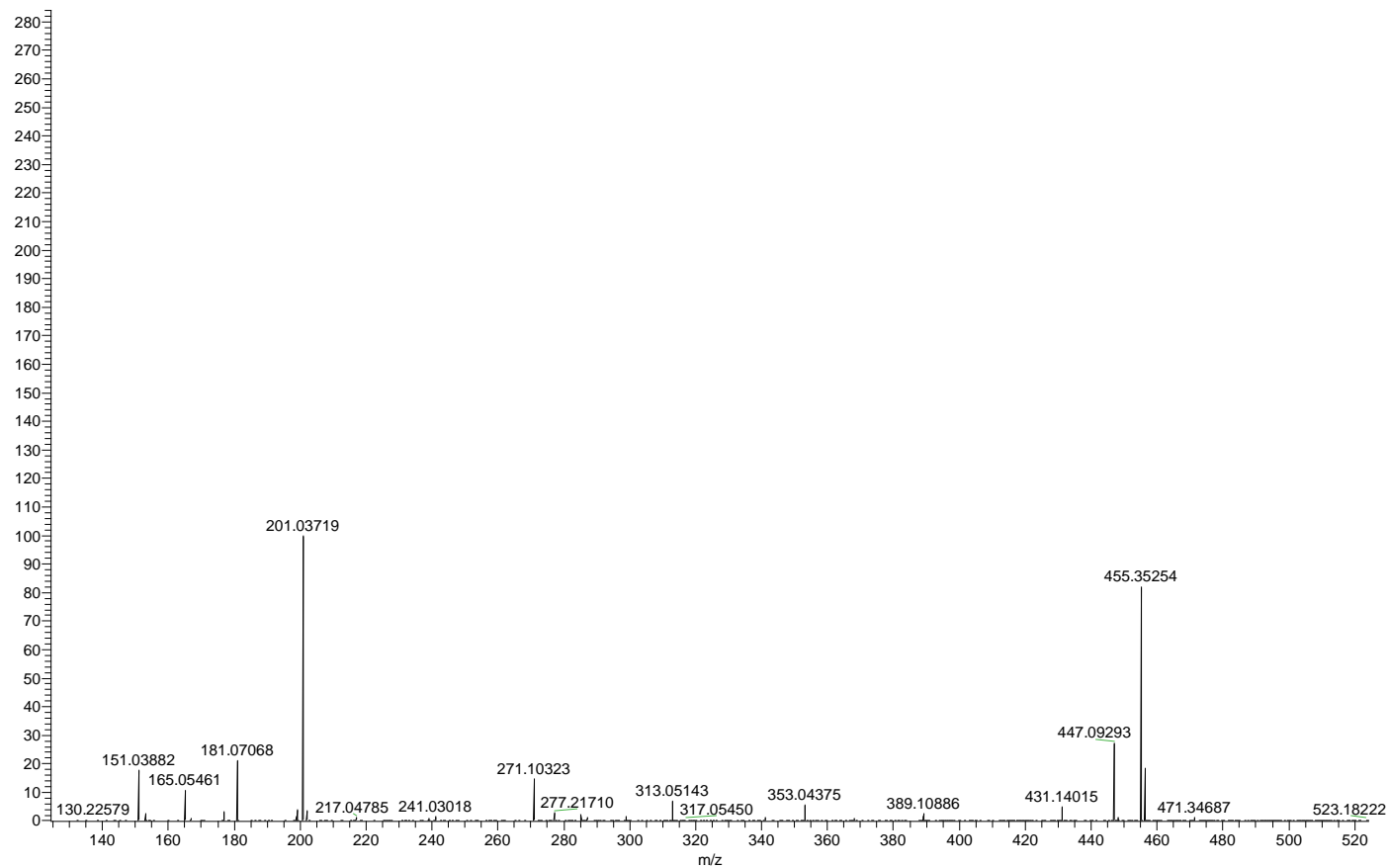


Figura 13. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de oliva colectado en Tacna-Candarave (Continuación)

PLANTA07-NEG #156-243 RT: 0.69-1.08 AV: 88 SB: 88 0.04-0.43 NL: 1.14E4
T: FTMS -p NSI Full ms [100.00-1000.00]

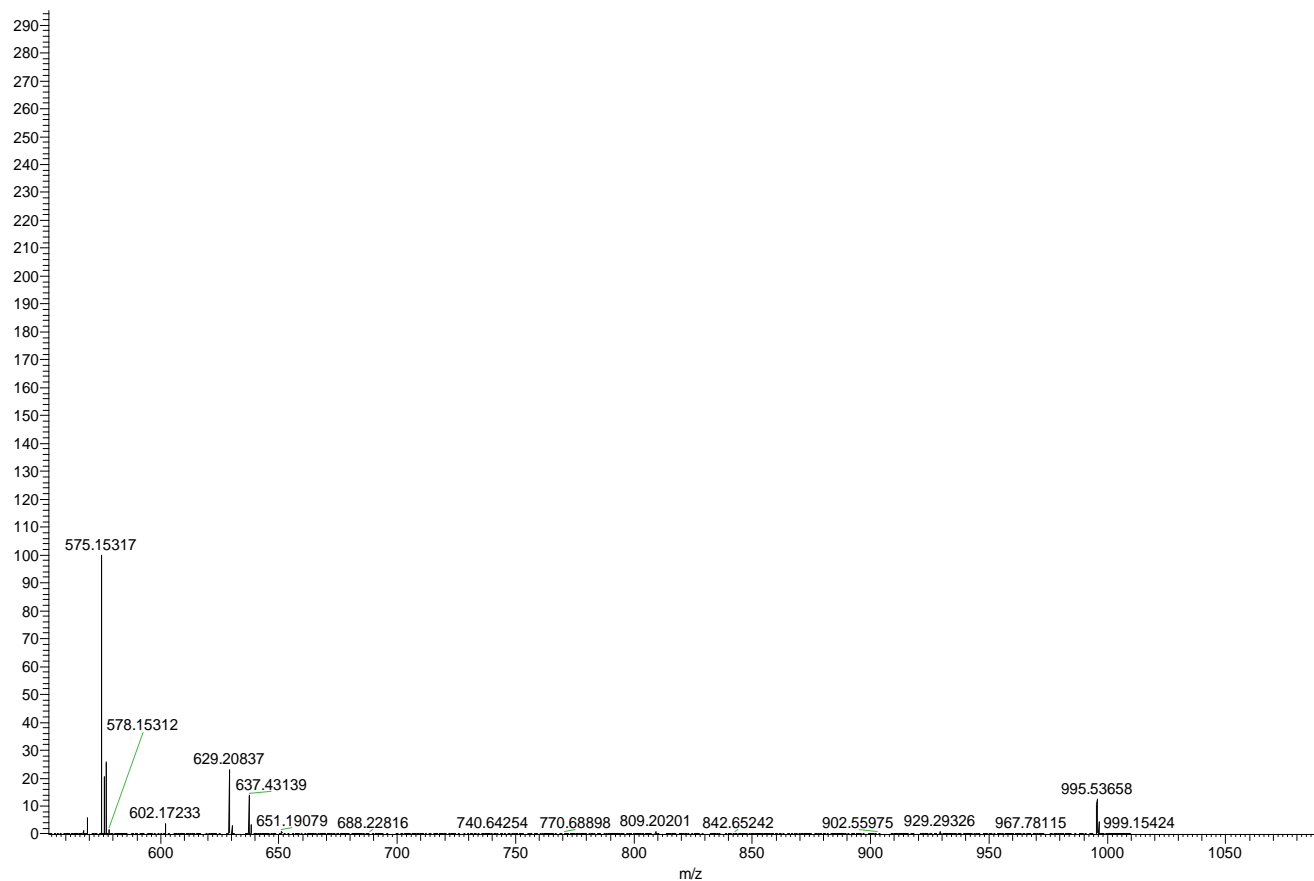


Figura 14. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de oliva colectada en Tacna – Candarave (Continuación)

4.4.3. Tayakasi (*Lippia nodiflora*)

Los principales iones detectados en los extractos etanólicos de Tayakasi de acuerdo a los *fingerprints* (Figura 14 al 16). Cada ion corresponde a un determinado compuesto químico. En la tabla 3 podemos visualizar con mayores detalles todos los iones presentes, así como su fórmula química del compuesto presente.

Tabla 3. Los iones detectados en los extractos etanolicos de olivo

Tayakasi (<i>Lippia nodiflora</i>)					
Masa experimental (m/z)	Intensidad Relativa	Relativa	Masa teórica	Delta (ppm)	Composición química
137,02317	127,6	3,67	137,02332	-1,05	C7 H5 O3
189,07590	82	2,36	189,07575	0,33	C9 H9 O3
190,07928	3475,5	100	190,07770	0,78	C8 H13 O5
201,03697	284,2	8,18	201,03936	8,3	C15 H10
215,03204	548,7	15,79	215,03389	-10,52	C8 H9 O6
233,15413	156,8	4,51	233,15361	-8,6	C12 H7 O4
246,99141	216,9	6,24	246,99320	2,89	C15 H21 O2
247,13356	70,1	2,02	247,13287	-7,25	C4 H7 O12
249,07988	540,2	15,54	249,07575	2,8	C15 H19 O3
249,14925	633,3	18,22	249,14852	16,58	C13 H13 O5
257,08171	91,2	2,62	257,08084	2,91	C15 H21 O3
271,09747	72,4	2,08	271,09649	3,41	C15 H13 O4
344,05322	74	2,13	344,05267	3,62	C9 H17 O9
353,08747	451,5	12,99	353,08671	3,64	C16 H15 O4
359,07692	156,1	4,49	359,07614	2,15	C16 H17 O9
377,08512	537,2	15,46	377,08671	2,16	C18 H15 O8
515,11883	1426,5	41,04	515,11840	0,83	C25 H23 O12
516,12212	377,6	10,86	516,12623	-7,96	C25 H24 O12
537,10099	255,1	7,34	537,10275	-3,27	C27 H21 O12

No existen estudios que detallen los constituyentes de la especie *Lippia* (Verbenaceae) en Perú. Los resultados obtenidos de los extractos etanólicos de hojas de Tayakasi (*Lippia nodiflora*) se identificaron cuatro iones principales *m/z* 190, *m/z* 249, *m/z*

352 y m/z 515. Los compuestos pertenecen al grupo de los flavonoides más identificados son flavonas. Hay referencias científicas sobre el contenido de flavonas trisulfatos en especie de *L. nodiflora* (L.) (Pascual et al., 2001).

Por otra parte, algunos flavanones como la pinocembrina y naringenina se identificaron de *Lippia* (Pascual et al., 2001). Otros reportes científicos también mencionan la presencia de flavonoides como: salvigenina, eupatorina, eupafolina, luteolina, hispidulina, diosmetina, cismaritina, cirsiolol, pectolina-arigenina, 6-hidroxluteolina de *L. citriodora* (Lattanzio, Kroon, Quideau, & Treutter, 2009).

Estudios realizados con extractos acuosos y alcohólicos obtenidos a partir de los brotes de *Lippia citriodora* Kunth, cultivadas en Egipto, exhibieron propiedades antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas y antioxidantes, es este estudio tres compuestos fenólicos se identificaron aislaron e identificaron dos ácidos fenólicos, ácido dihidrocafféico (1) y ácido 4-hidroxicinámico (3) y un glucósido flavonoide, luteolin-7-O-glucósido (2), de la fracción de acetato de etilo de la planta (Pascual et al., 2001; Sudha et al., 2017; Tomás-Barberán, Harborne, & Self, 1987).

En nuestros resultados, las muestras de extractos etanolicos de hojas de Tayakasi (*Lippia nodiflora*) se identificaron iones principales m/z 190, m/z 249, m/z 352 y m/z 515. Estos iones corresponden a los ácidos fenólicos y flavonoides. No fue posible encontrar en la literatura estudios de identificación de iones principales en las plantas analizadas en nuestro país, imposibilitando así, una comparación de los principales iones marcadores presentes.

PLANTA10-NEG #161-317 RT: 0.72-1.41 AV: 157 SB: 52 0.12-0.35 NL: 6.92E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

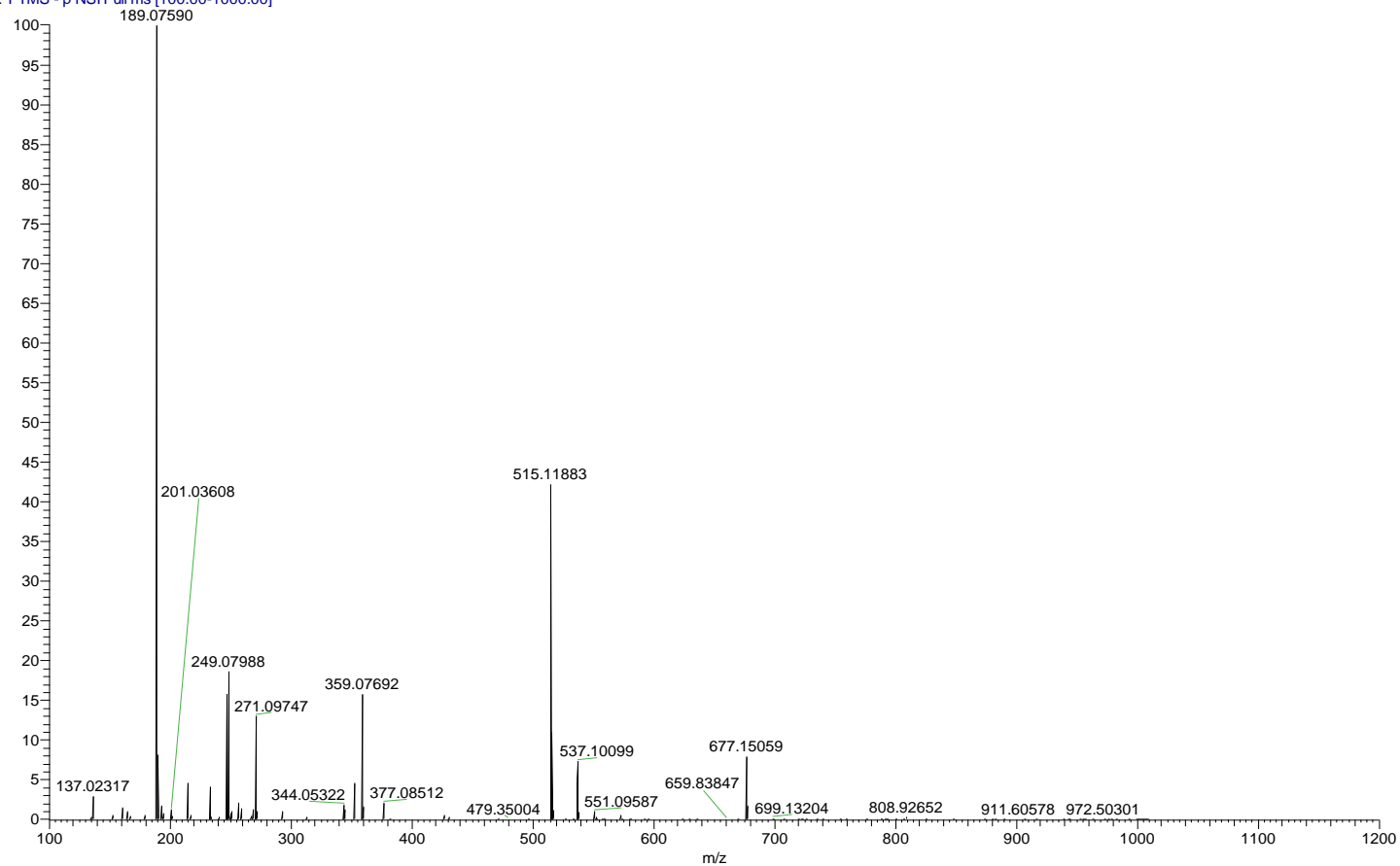


Figura 15. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi colectada en Tacna-Candarave.

PLANTA10-NEG #161-317 RT: 0.72-1.41 AV: 157 SB: 52 0.12-0.35 NL: 1.29E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

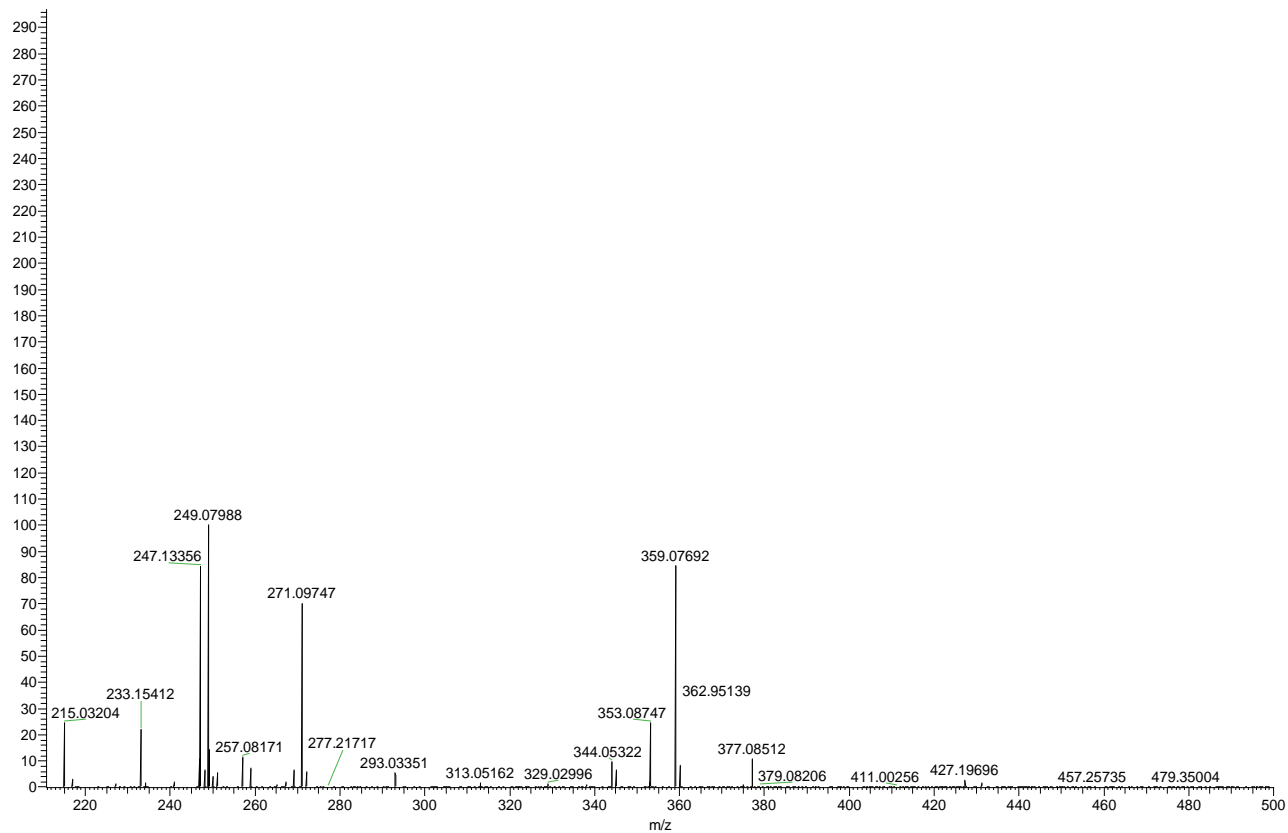


Figura 16. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi colectada en Tacna – Candarave (Continuación).

PLANTA10-NEG #161-317 RT: 0.72-1.41 AV: 157 SB: 52 0.12-0.35 NL: 2.91E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]

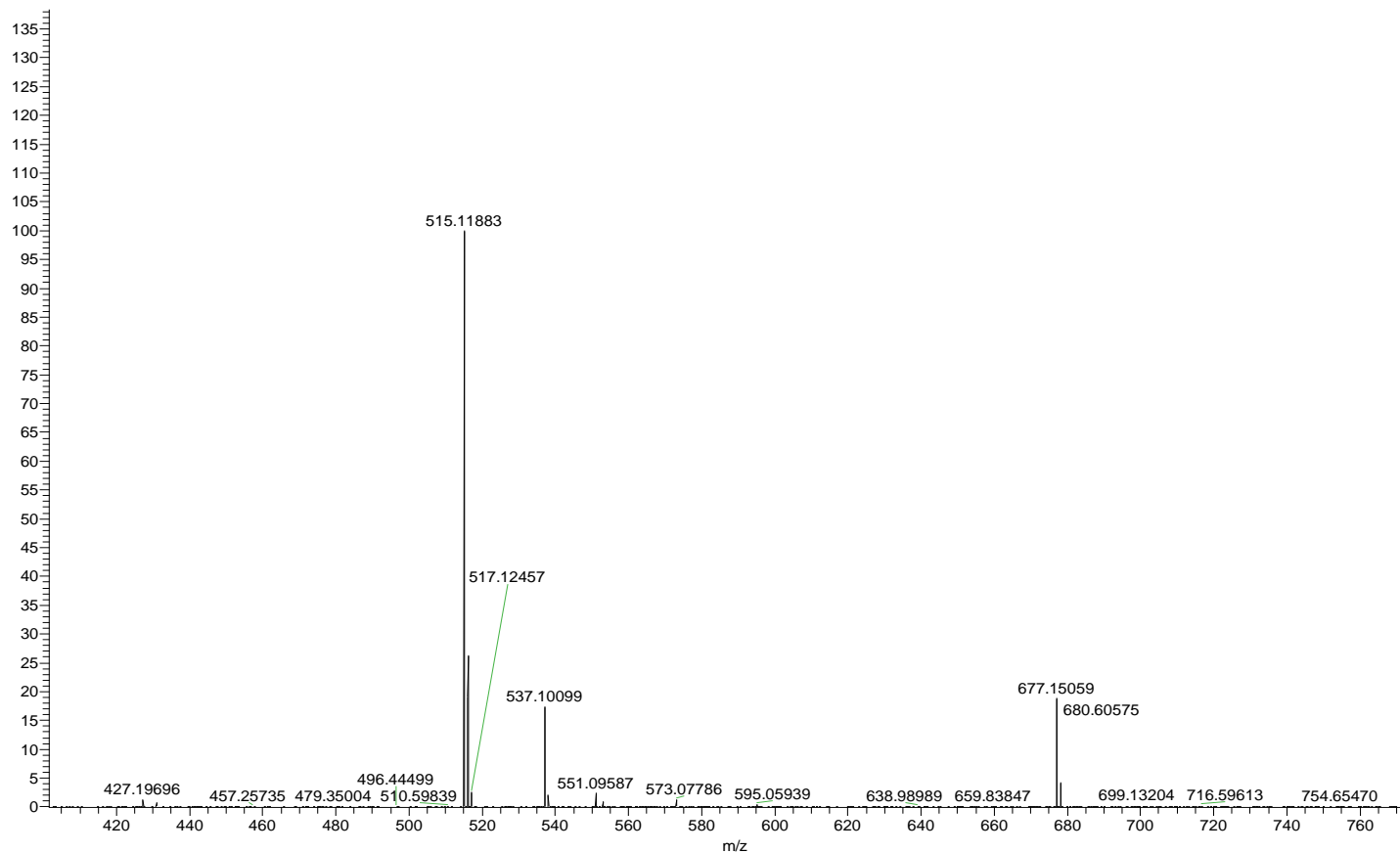


Figura 17. Fingerprint obtenido por EASI-MS en modo negativo de extracto etanólico de Tayakasi de Lambayeque-Andamarca (Continuación)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el Perú existen matrices vegetales con potencial biológico de alto valor terapéutico y nutricional, extraerlos y utilizarlos como sustitutos de aditivos sintéticos son promisorios para la industria de alimentos y farmacéutica.

Los extractos etanólicos de las hojas de Eucalipto, Olivo y Tayakasi se mostraron ricos en compuestos fenólicos y flavonoides. Los valores de fenoles totales obtenidos se encuentran en el rango de 9184,2 mg EAG mL⁻¹ (Olivo) y 10994,5 mg EAG mL⁻¹ (Tayakasi). Y flavonoides entre 6,1738 mg EC mL⁻¹ (Eucalipto) y 9,0353 mg EC mL⁻¹ (Tayakasi).

Todos los extractos etanolicos analizados mostraron actividad antioxidante, obteniendo valores desde 145711,125 μmol TE mL⁻¹ (Eucalipto), 143411,75 μmol TE mL⁻¹ (Tayakasi) y 58820,73 μmol TE mL⁻¹ (Olivo). Analizados por la técnica de ORAC mayor actividad de eliminación de radical peróxido fue observado en el extracto etanólico de Olivo con 269511,3 μmol TE mL⁻¹ mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$), con respecto a los extractos de Eucalipto 90830,2 μmol TE mL⁻¹ y Tayakasi 117916,0 μmol TE mL⁻¹.

Por EASI-MS fue posible identificar iones marcadores en cada uno de los extractos correspondientes a los ácidos fenólicos, flavonas, flavonoides y triterpenos.

Futuros estudios son necesarios para aislar los compuestos bioactivos presentes en los extractos a fin de determinar los principales contribuyentes a la actividad antioxidante y elucidar sus mecanismos de acción. No debe descartarse la acción sinérgica de los compuestos presentes en los extractos analizados.

REFERENCIAS

- Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 4(4), 682–698. <https://doi.org/10.3390/antiox4040682>
- Ali, F., Ranneh, Y., Ismail, A., & Esa, N. M. (2015). Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2103–2111. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1187-4>
- Balamurugan, R., Duraipandiyar, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1–3), 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.025>
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Cunha, I. B. d. S., Danert, C., ... Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 8839(October), 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Benzie, I. ., & Strain, J. . (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhuyan, D. J., Vuong, Q. V., Chalmers, A. C., van Altena, I. A., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2017). Phytochemical, antibacterial and antifungal properties of an aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* leaves. *South African Journal of Botany*, 112, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.030>
- Bhuyan, Deep Jyoti, Vuong, Q. V., Bond, D. R., Chalmers, A. C., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2018). *Eucalyptus microcorys* leaf extract derived HPLC-fraction reduces the viability of MIA PaCa-2 cells by inducing apoptosis and arresting cell cycle. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105(May), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.150>
- Bittencourt, M. L. F., Ribeiro, P. R., Franco, R. L. P., Hilhorst, H. W. M., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76, 449–457.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.008>
- Boulekbache-Makhlouf, L., Meudec, E., Mazauric, J.-P., Madani, K., & Cheynier, V. (2013). Qualitative and Semi-quantitative Analysis of Phenolics in *Eucalyptus globulus* Leaves by High-performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection and Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 24(2), 162–170. <https://doi.org/10.1002/pca.2396>
- Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., & Madani, K. (2013). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.019>
- Burns, J., Gardner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, J., & Crozier, A. (2001). Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5797–5808. <https://doi.org/10.1021/jf010682p>
- Cheng, L. C., Murugaiyah, V., & Chan, K. L. (2015). Flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Lippia nodiflora* as promising antihyperuricemic agents and elucidation of their mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.025>
- Cheurfa, M., Abdallah, H. H., Allem, R., Noui, A., Picot-Allain, C. M. N., & Mahomoodally, F. (2019). Hypocholesterolaemic and antioxidant properties of *Olea europaea* L. leaves from Chlef province, Algeria using in vitro, in vivo and in silico approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 98–105. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.10.002>
- Cláudio, A. F. M., Cognigni, A., de Faria, E. L. P., Silvestre, A. J. D., Zirbs, R., Freire, M. G., & Bica, K. (2018). Valorization of olive tree leaves: Extraction of oleanolic acid using aqueous solutions of surface-active ionic liquids. *Separation and Purification Technology*, 204(February), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.042>
- da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Domingues, R. M. A., Sousa, G. D. A., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2010). Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.002>
- Falcão, S. I., Tomás, A., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2016). *Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products*. 242(8), 1393–1401. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2642-z>
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308–9322. <https://doi.org/10.3390/molecules15129308>
- Fernandes, A. M. A. P., Fernandes, G. D., Barrera-Arellano, D., De Sá, G. F., Lins, R. D., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2014). Desorption/ionization efficiencies of triacylglycerols and phospholipids via EASI-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(5), 335–341. <https://doi.org/10.1002/jms.3366>
- Fernández-Agulló, A., Freire, M. S., & González-Álvarez, J. (2015). Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 64, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). *Review The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. 1941(March), 1925–1941.
- Frozza, C. O. da S., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 52, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>
- Gomez-Caravaca, A., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
- Gómez-Guillén, M., Me, L.-C., a, A. a. L. D. L., Giménez, B., & Montero, P. (2010).

- Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea By-Products as Real Material*, 661(2), 89–115. Retrieved from [http://digital.csic.es/bitstream/10261/40679/1/CAPITULOS_DE_LIBROS302952\[1\].pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/40679/1/CAPITULOS_DE_LIBROS302952[1].pdf)
- González-Burgos, E., Liudanskas, M., Viškelis, J., Žvikas, V., Janulis, V., & Gómez-Serranillos, M. P. (2018). Antioxidant activity, neuroprotective properties and bioactive constituents analysis of varying polarity extracts from Eucalyptus globulus leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.05.010>
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887–1892. <https://doi.org/10.1021/jf970975b>
- Harkat-Madouri, L., Asma, B., Madani, K., Bey-Ould Si Said, Z., Rigou, P., Grenier, D., ... Boulekbache-Makhlouf, L. (2015). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of Eucalyptus globulus from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 78, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.015>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kuo, Y.-Y., Jim, W.-T., Su, L.-C., Chung, C.-J., Lin, C.-Y., Huo, C., ... Chuu, C.-P. (2015). Caffeic Acid Phenethyl Ester Is a Potential Therapeutic Agent for Oral Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10748–10766. <https://doi.org/10.3390/ijms160510748>
- Lan, X., Wang, W., Li, Q., & Wang, J. (2016). *The Natural Flavonoid Pinocebrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications* (Vol. 53, pp. 1794–1801). Vol. 53, pp. 1794–1801. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9125-2>
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233–237.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.068>
- Latif, H. H., & Mohamed, H. I. (2016). Exogenous applications of moringa leaf extract effect on retrotransposon, ultrastructural and biochemical contents of common bean plants under environmental stresses. *South African Journal of Botany*, *106*, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.010>
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S., & Treutter, D. (2009). Plant Phenolics - Secondary Metabolites with Diverse Functions. In *Recent Advances in Polyphenol Research* (Vol. 1, pp. 1–35). <https://doi.org/10.1002/9781444302400.ch1>
- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabiani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., ... Feresin, G. E. (2009). Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(7), 2691–2698. <https://doi.org/10.1021/jf803866t>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... Chen, S. (2016). An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Meirinhos, J., Silva, B. M., Valentão, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A., Dias, A., ... Ferreres, F. (2005). Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*olea europaea* L.) leaf cultivars. *Natural Product Research*, *19*(2), 189–195. <https://doi.org/10.1080/14786410410001704886>
- Mello, B. C. B. S., & Hubinger, M. D. (2012). Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(12), 2510–2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03129.x>
- Mgbeahuruike, E. E., Yrjönen, T., Vuorela, H., & Holm, Y. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. *South African Journal of Botany*, *112*, 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Mocan, A., Vlase, L., Raita, O., Hanganu, D., Păltinean, R., Dezsi, Ş., ... Crişan, G. (2015). Comparative studies on antioxidant activity and polyphenolic content of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *28*(4), 1511–1515. <https://doi.org/10.3390/molecules190710056>

- Mota, I., Rodrigues Pinto, P. C., Novo, C., Sousa, G., Guerreiro, O., Guerra, Â. R., ... Rodrigues, A. E. (2012). Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: Process optimization and screening for biological activity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(20), 6991–7000. <https://doi.org/10.1021/ie300103z>
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., & Suzuki, N. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80(1), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00231-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00231-5)
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2017.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372–1376.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201–214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- Pastrana, L., González, R., Estévez, N., Pereira, L., Rodríguez Amado, I., Fuciños, P., ... Troncoso, R. (2017). Functional Foods. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 165–200). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00007-8>
- Paulsen, B. S. (2010). Highlights through the history of plant medicine. In *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals* (Vol. 50).
- Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., ... Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.102>
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153–1162.

<https://doi.org/10.3390/12051153>

- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924197>
- Rodrigues, V. H., de Melo, M. M. R., Portugal, I., & Silva, C. M. (2018). Extraction of Eucalyptus leaves using solvents of distinct polarity. Cluster analysis and extracts characterization. *Journal of Supercritical Fluids*, 135(August 2017), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.010>
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas*. 108. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>
- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, 71, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.004>
- Sawaya, A. C. H. F., Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S., Vassya, S., Marcucci, M. C., Custodio, R., ... Paulo, S. (2004). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *The Analyst*, 129, 739–744. <https://doi.org/10.1039/b403873h>
- Sawaya, A. C. H. F., Verardi, P., Eberlin, M. N., Kumazawa, S., Ahn, M., Bang, K., ... Afrouzan, H. (2010). Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 81, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.043>
- Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Fiumano, V., De Luca, P. F., Monaco, P., & Fiorentino, A. (2012). Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). *Food Research International*, 46(1), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.022>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Sharma, R. A., & Singh, R. (2013). A Review on *Phyllanthus nodiflora* Linn.: A wild wetland medicinal herb. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20(1), 57–63.
- Silici, S., Ünlü, M., & Vardar-Ünlü, G. (2007). Antibacterial activity and phytochemical

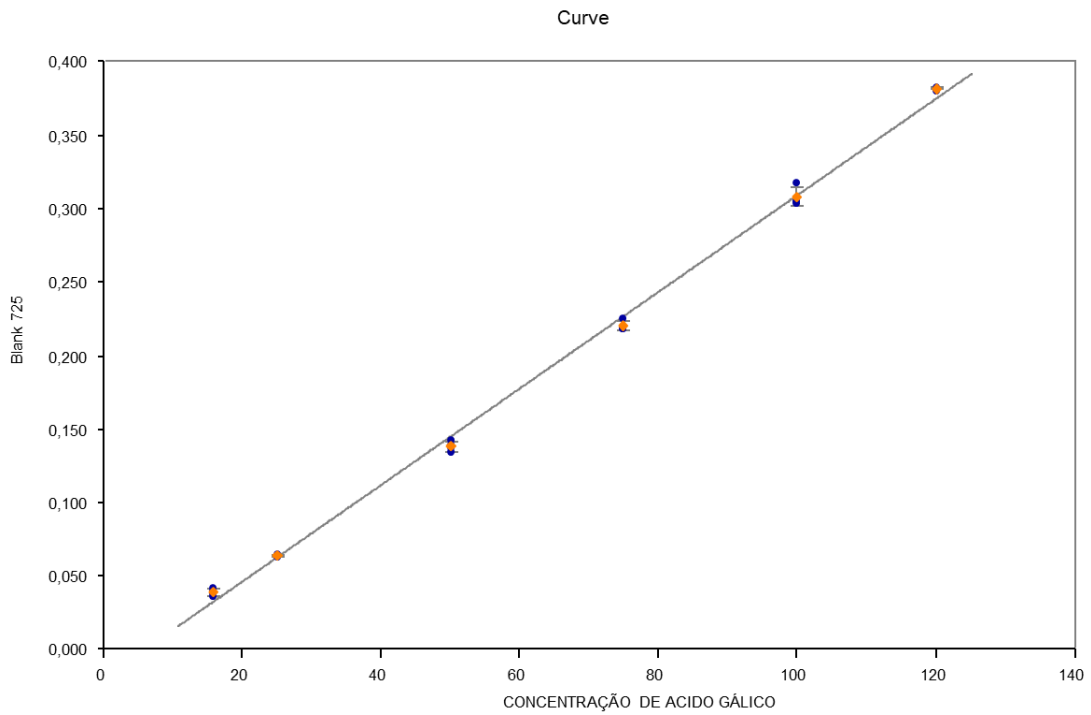
- evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1797–1803. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9430-7>
- Sudha, A., Jeyakanthan, J., & Srinivasan, P. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. *Resource-Efficient Technologies*, 0, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.07.002>
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Tomás-Barberán, F. A., Harborne, J. B., & Self, R. (1987). Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*. *Phytochemistry*, 26(8), 2281–2284. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84701-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84701-9)
- Toreti, V. C. (2011). Estudo da influência da sazonalidade sobre algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis de dois apiários do Estado de São Paulo (Universidade Estadual de Campinas). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Vargas-Sánchez, R. D., Mendoza-Wilson, A. M., & Balandrán-Quintana, R. R. (2015). Study of the molecular structure and chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations. *Computacional and Theoretical Chemistry*, 1058, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.01.014>
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.003>
- XU, C.-C., WANG, B., PU, Y.-Q., TAO, J.-S., & ZHANG, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721–731. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16(4), 3444–3455. <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>
- Zanuncio, A. J. V., Colodette, J. L., Gomes, F. J. B., Carneiro, A. de C. O., & Vital, B. R. (2013). *Composição química da madeira de eucalipto com diferentes níveis de*

- desbaste*. 23(4), 755–760. <https://doi.org/10.5902/1980509812359>
- Zhang, J., Shen, X., Wang, K., Cao, X., Zhang, C., Zheng, H., & Hu, F. (2017). *Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of Baccharis propolis and Eucalyptus propolis in RAW64.7 cells*. pp. 1–16. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1151444>
- Zhang, L., Shamaladevi, N., Jayaprakasha, G. K., Patil, B. S., & Lokeshwar, B. L. (2015). Polyphenol-rich extract of *Pimenta dioica* berries (Allspice) kills breast cancer cells by autophagy and delays growth of triple negative breast cancer in athymic mice. *Oncotarget*, 6(18), 16379–16395. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3834>
- Zhao, L., Pu, L., Wei, J., Li, J., Wu, J., Xin, Z., ... Guo, C. (2016). Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Internacional Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph13050498>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

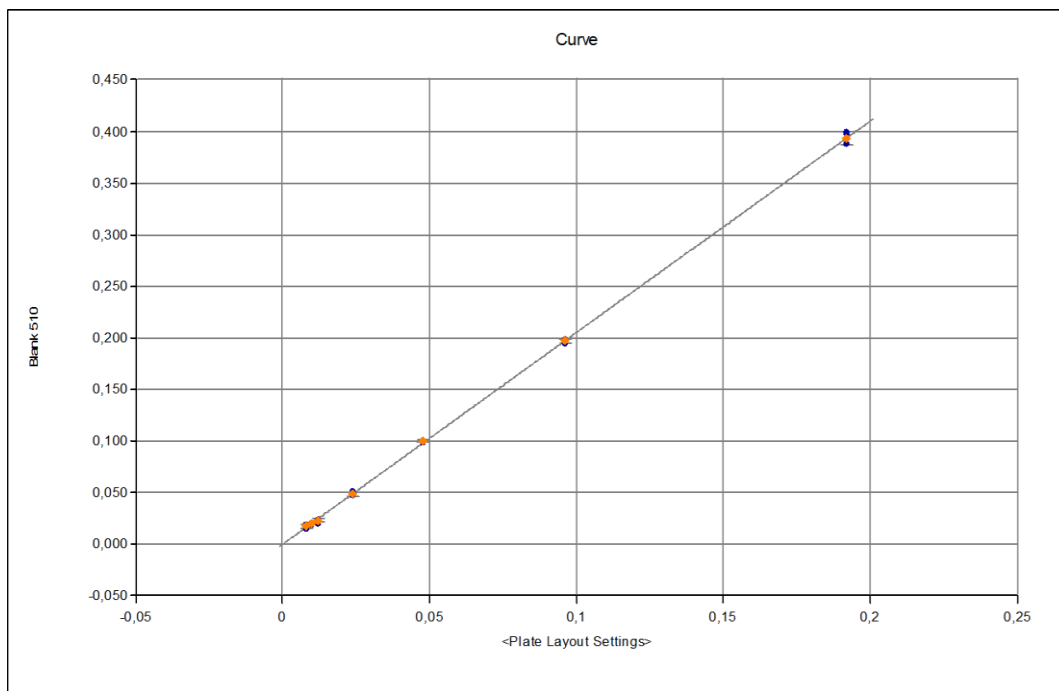
ANEXOS



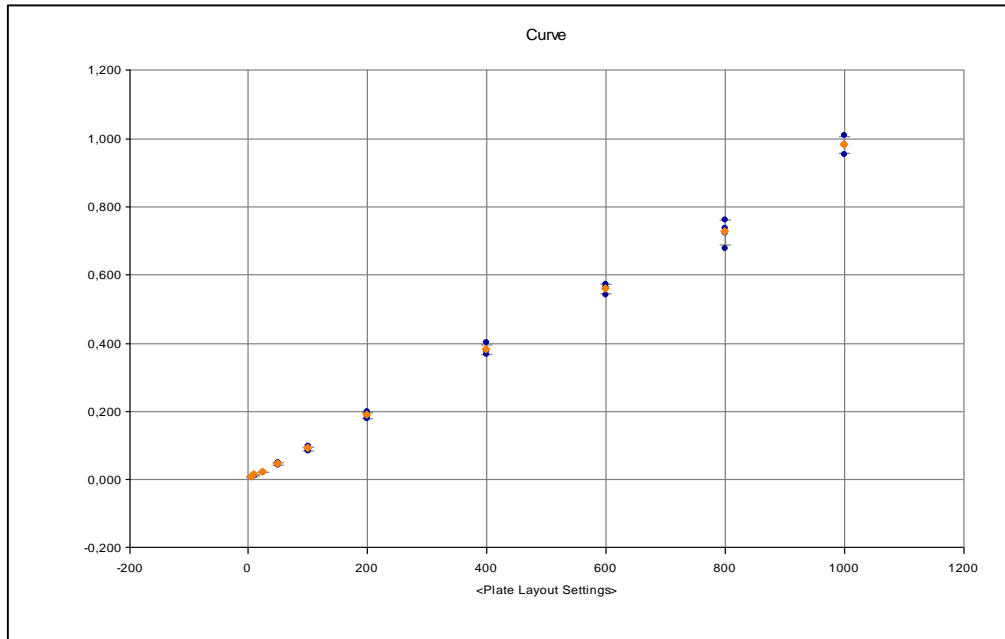
Anexo 1 Andamarca localizado en la Región de Lambayeque situado a 3800m de altitud.



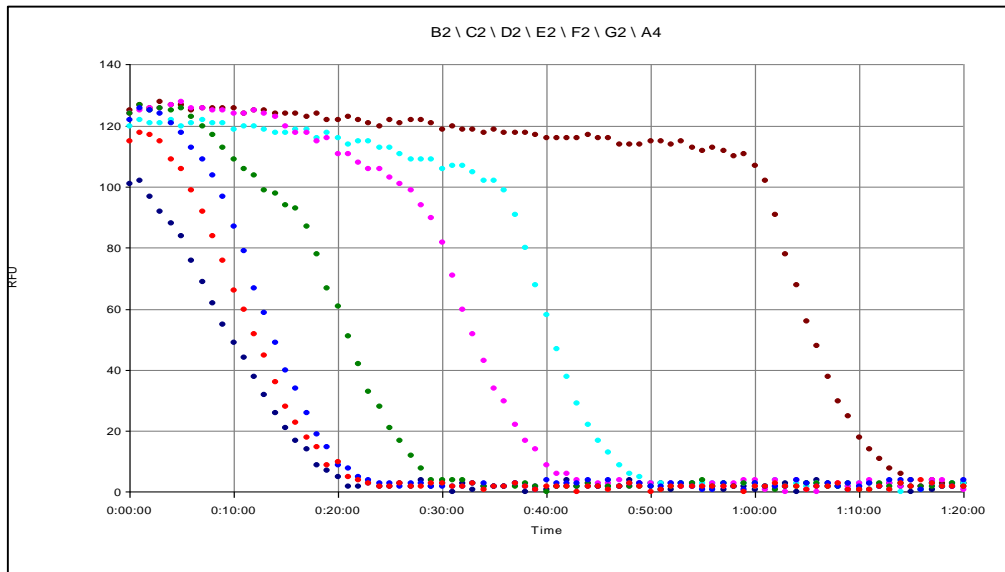
Anexo 2 Curva calibración de fenoles totales R^2 0.998



Anexo 3 Curva de calibración de flavonoides totais R^2 0.999



Anexo 4 Curva de calibración de FRAP R² 0.998

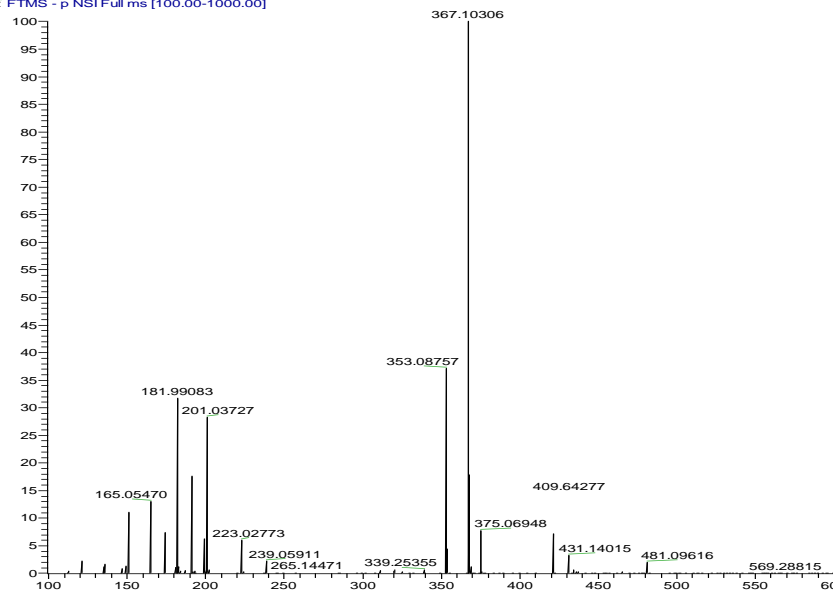


Anexo 5 Curva de calibración de ORAC R² 0.995

Muestras estándar utilizados para la identificación de polifenoles en las matrices vegetales.

ÁCIDO CLOGENICO m/z 367.10306

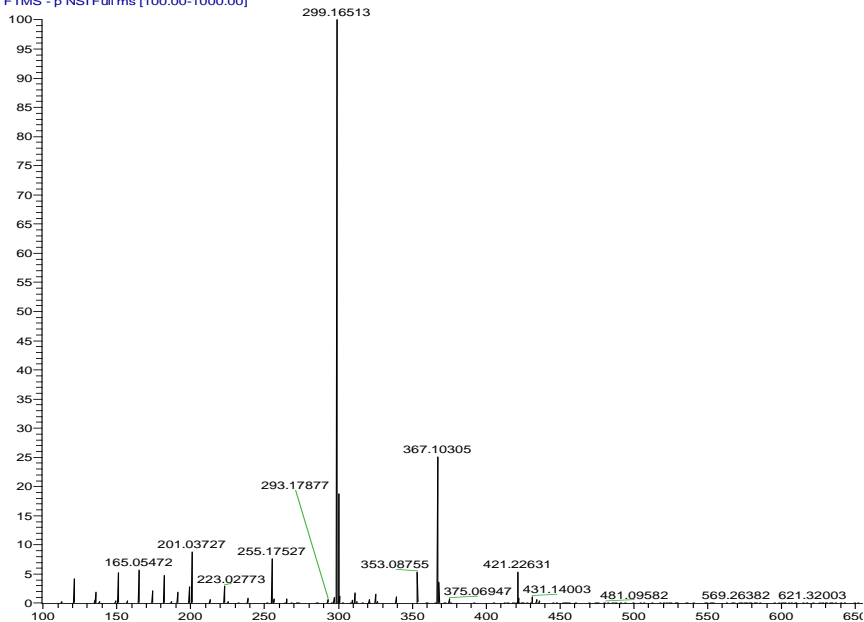
AC-CLOGROGENICO #183-270 RT: 0.82-1.20 AV: 88 SB: 98 0.06-0.49 NL: 4.90E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 6 Muestra estándar de ácido clorogénico m/z 367.10306

ARTEPILIN C m/z 299.16513

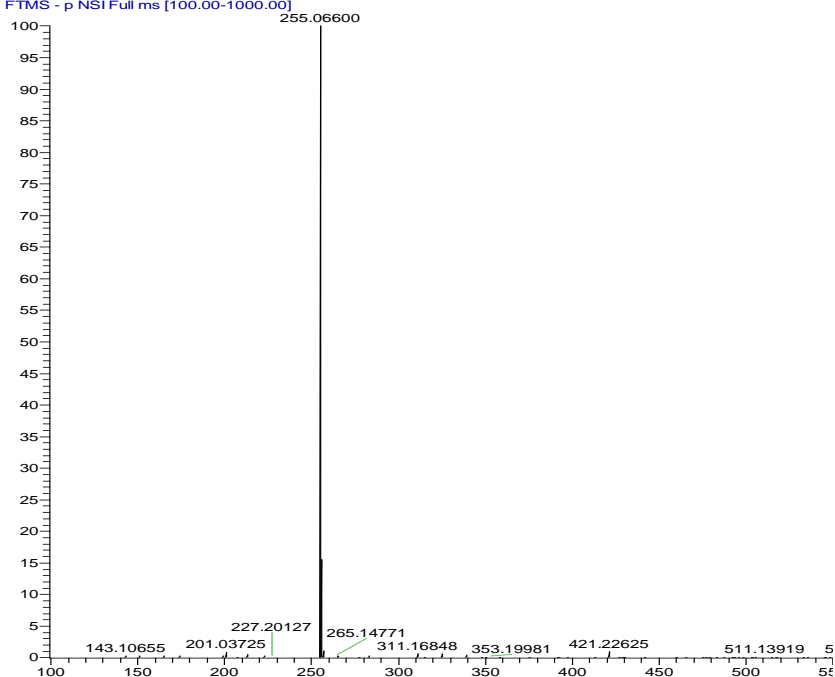
ARTEPILIN #182-277 RT: 0.81-1.23 AV: 96 SB: 93 0.08-0.49 NL: 8.93E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 7 muestra estándar de Artipillin C m/z 299.16513

PINOCEMBRINA m/z 255.06600

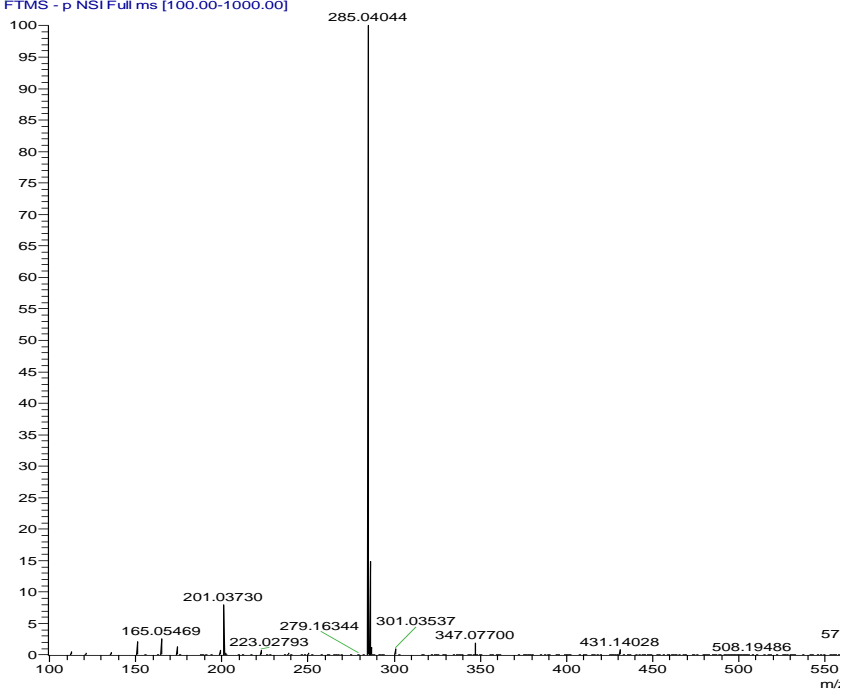
PINOCEMBRINA #211-330 RT: 0.94-1.47 AV: 120 SB: 69 0.13-0.43 NL: 1.18E6
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 8 muestra estándar de pinocembrina m/z 255.06600

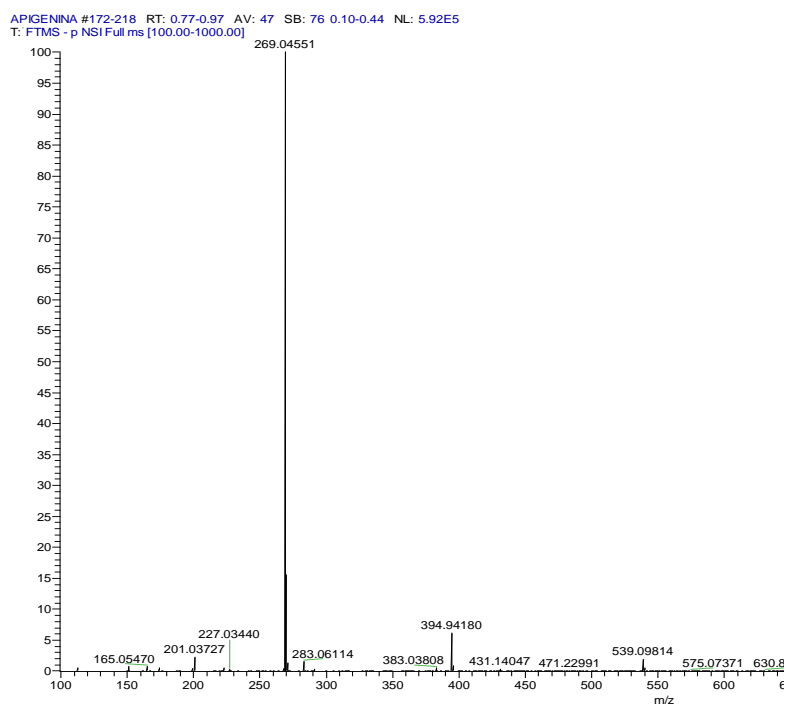
CAMFEROL m/z 284.04044

CAMFEROL #186-235 RT: 0.83-1.05 AV: 50 SB: 90 0.10-0.50 NL: 2.36E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



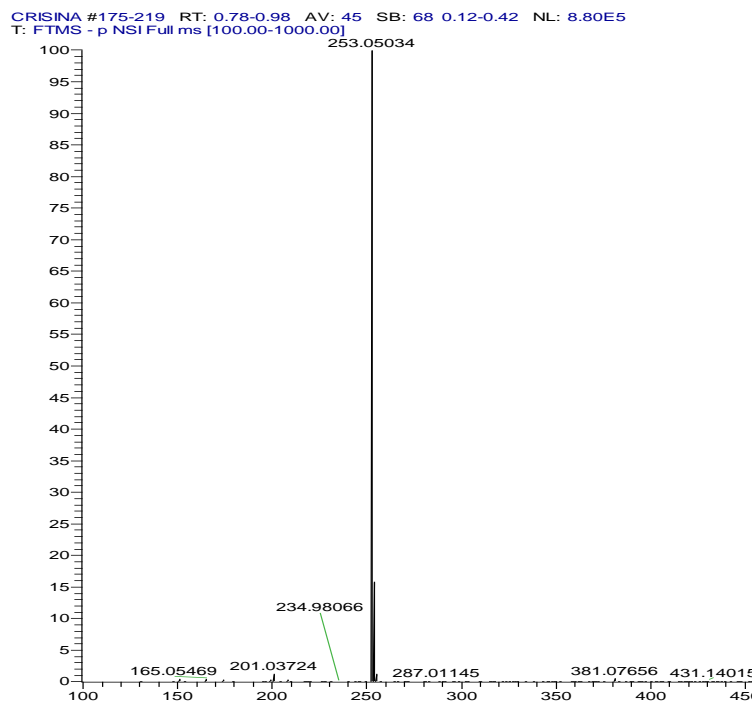
Anexo 9 muestra estándar de camferol m/z 284.04044

APIGENINA m/z 269.04551



Anexo 10 muestra estándar de apigenina m/z 269.04551

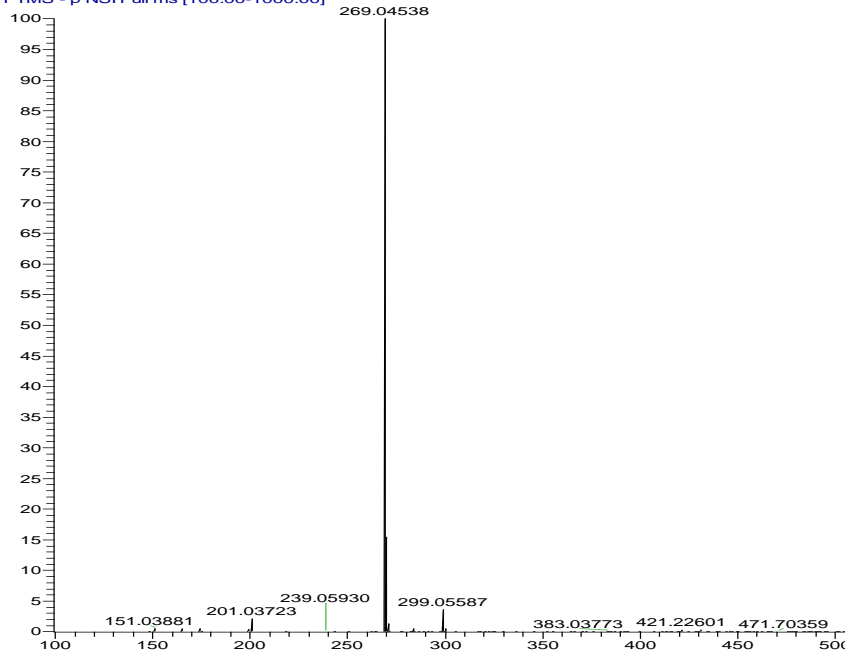
CRISINA m/z 253.05034



Anexo 11 muestra estándar de crisina m/z 253.05034

GALANGINA m/z 269.04538

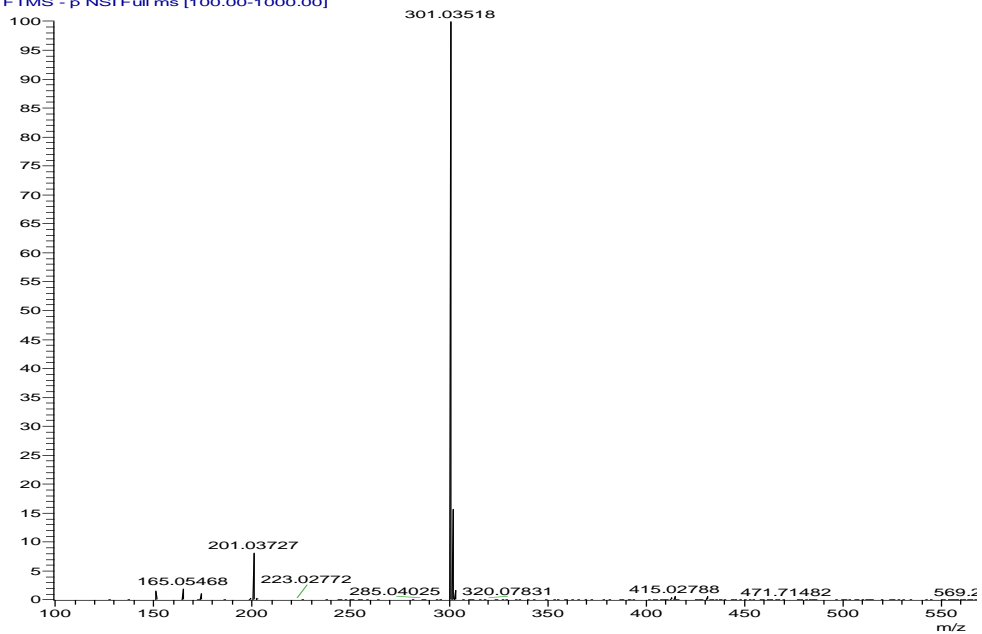
GALANGINA-1 #172-238 RT: 0.77-1.06 AV: 67 SB: 90 0.07-0.46 NL: 6.63E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 12 muestra estándar de galangina m/z 269.04538

QUERCETINA m/z 301.03518

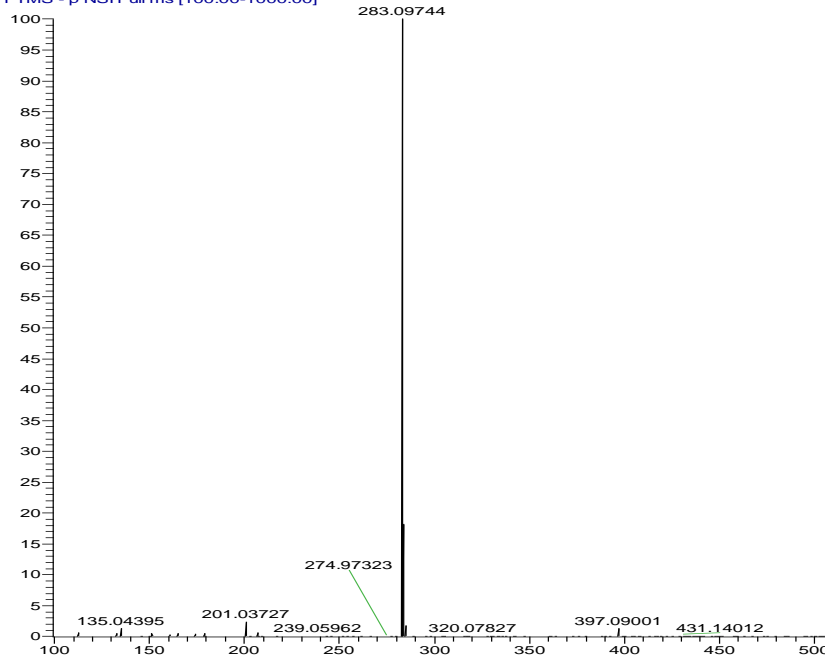
QUERCETINA #177-244 RT: 0.79-1.09 AV: 68 SB: 74 0.11-0.44 NL: 3.24E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 13 muestra estándar de Quercetina m/z 301.03518

CAPE m/z 283.09744

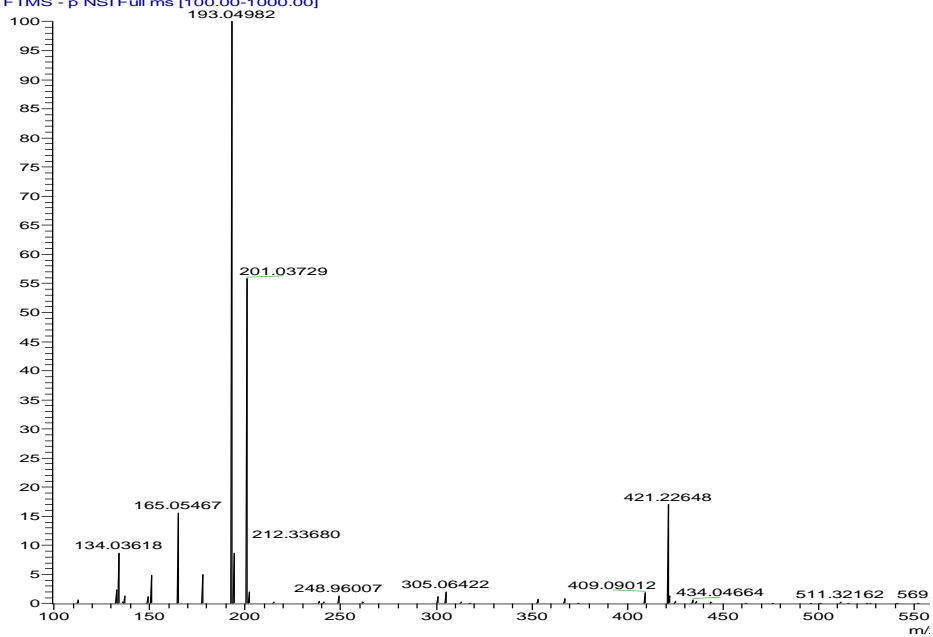
CAPE #186-253 RT: 0.83-1.13 AV: 68 SB: 80 0.09-0.44 NL: 7.70E5
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 14 muestra estándar de CAPE m/z 283.09744

ACIDO FELURICO m/z 193.04982

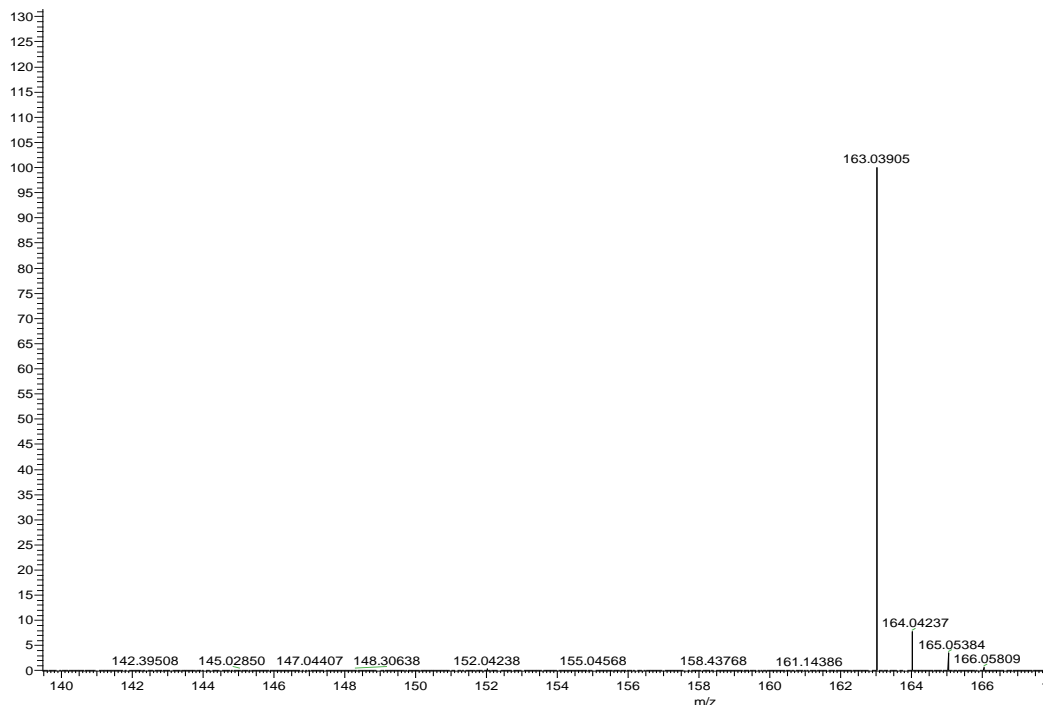
ACIDO FERULICO #290-470 RT: 1.29-2.09 AV: 181 SB: 76 0.03-0.36 NL: 1.48E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 15 muestra estándar de ácido felúrico m/z 193.04982

ACIDO P-CUMÁRICO m/z 163.03905

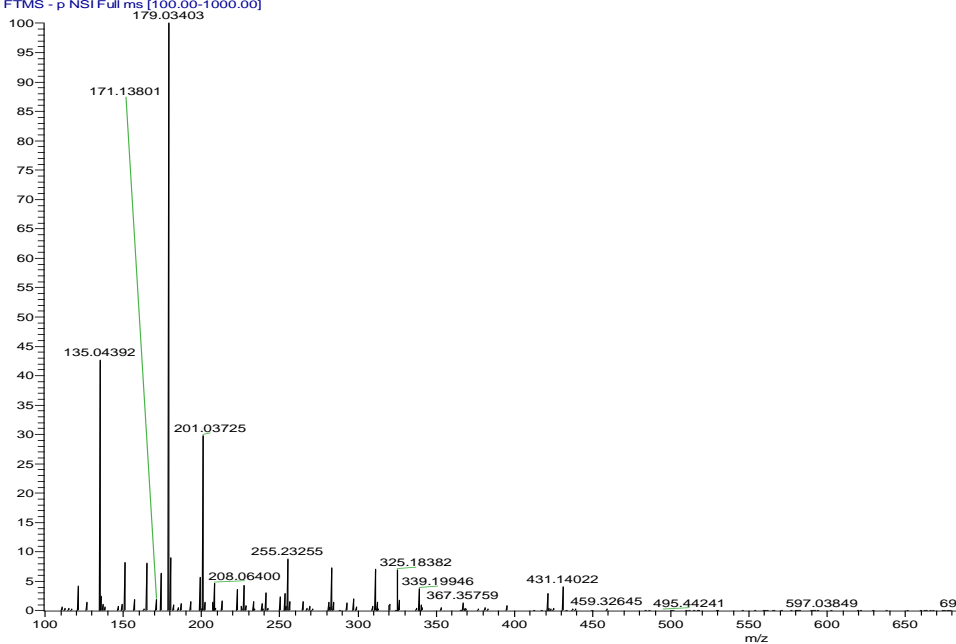
ACIDO P-CUMARICO #169-287 RT: 0.75-1.28 AV: 119 SB: 94 0.03-0.45 NL: 1.00E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 16 muestra estándar de ácido *P. Cumárico* m/z 163.03905

ACIDO CAFEICO m/z 179.03403

ACIDO CAFEICO #191-349 RT: 0.85-1.56 AV: 159 SB: 97 0.08-0.51 NL: 8.83E4
T: FTMS - p NSI Full ms [100.00-1000.00]



Anexo 17 muestra estándar de ácido *P. Cafeico* m/z 179.03403