

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS**

**“Evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos de *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) y su estudio de liberación controlada en nanopartículas de quitosano”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR:  
CARLOS RODRIGO SALAZAR GALLUPE**

**ASESOR:  
M.Sc. GOLFER MUEDAS TAIPE**

**LIMA-PERÚ**

**2023**

*A mi hermanita*

*A mi madre*

*A mi familia*

## **Agradecimientos**

Me gustaría, en primer lugar, agradecer a mi asesor MSc. Golfer Muedas y la Dra. Ana Valderrama por la paciencia, ánimos y aportes durante todo el tiempo de realización de la tesis. Además, agradecer a la Ing. Tarsila Tuesta por sus palabras y oportunas intervenciones en todo este último año permitiéndome enfocar en un solo objetivo profesional.

Agradezco a los laboratorios LIBIPMET, GIEA, GISMA y sus integrantes por el apoyo y facilidades en el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo de este trabajo de investigación.

## RESUMEN

Los radicales libres presentes en el medio dañan a nuestras células produciendo así el rápido envejecimiento y diversas enfermedades, por lo que resulta necesario buscar nuevas fuentes de compuestos antioxidantes a fin de combatir el estrés oxidativo en nuestro cuerpo. El objetivo de este trabajo de investigación es evaluar la actividad antioxidante del extracto bruto acuoso (EBA), extracto bruto orgánico (EBO) y sus residuos, obtenidos a partir de la especie *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) mediante procesos de maceración con solventes. Asimismo, realizar los estudios de liberación controlada, de los extractos y/o residuos con buena actividad antioxidante, cargados en nanopartículas de quitosano.

La extracción se realizó mediante maceración etanólica y acuosa a partir de la muestra de chancapiedra, obteniéndose así 277,24 g EBO y 251,32 g EBA respectivamente. A partir del EBO se obtuvieron los residuos butanólico (BUT), clorofórmico (CLO) y acuoso (AC). La capacidad antioxidante de los extractos y residuos fue evaluada mediante pruebas químicas con DPPH y electroquímicas, donde se determinó que el EBO y BUT presentan las mejores actividades antioxidantes. Por consiguiente y mediante las técnicas de HPLC-MS y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se lograron identificar y dilucidar los metabolitos secundarios presentes en ambas muestras.

El EBO y BUT fueron cargadas en nanopartículas de quitosano (Cs-EBO y Cs-BUT) mediante el método de gelación iónica. El tamaño de las nanopartículas de quitosano sin cargado, Cs-EBO y Cs-BUT fueron 169,5; 356,2 y 197,7 nm, respectivamente. El potencial Z y el índice de polidispersidad de las nanopartículas de quitosano indicaron buena estabilidad. La espectroscopía infrarroja (FTIR) y la microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmaron la interacción, el cargado y formación de las nanopartículas. Además, según su estudio de liberación controlada, se determinó que las Cs-EBO pueden liberar más muestra cargada comparando con las Cs-BUT, liberando fácilmente el EBO cargado.

Finalmente, podemos indicar que el extracto EBO y residuo BUT del *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) podrían ser considerados como buenas fuentes de agentes antioxidantes, ya que estas, al ser encapsuladas en nanopartículas de quitosano, tendrán buena y prolongada actividad antioxidante.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, DPPH, técnicas electroquímicas, chancapiedra, liberación controlada, nanopartículas de quitosano.

## ABSTRACT

The free radicals present in the environment damage our cells, thus producing rapid aging and various diseases, which is necessary to look for new sources of antioxidant compounds in order to combat oxidative stress in our body. The objective of this research is to evaluate the antioxidant activity of the crude aqueous extract (EBA), crude organic extract (EBO) and their residues, obtained from the species *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) through maceration processes with solvents. Likewise, carry out controlled release studies of extracts and/or residues with good antioxidant activity, loaded in chitosan nanoparticles.

The extraction was carried out by ethanolic and aqueous maceration from the chancapiedra sample, thus obtaining 277.24 g EBO and 251.32 g EBA, respectively. From EBO, butanolic (BUT), chloroform (CLO) and aqueous (AC) residues were obtained. The antioxidant capacity of the extracts and residues was evaluated by chemical tests with DPPH and electrochemical tests, where it was determined that EBO and BUT present the best antioxidant activities. Therefore, and by means of the HPLC-MS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques, the secondary metabolites present in both samples were identified and elucidated.

The EBO and BUT were loaded onto chitosan nanoparticles (Cs-EBO and Cs-BUT) by the ionic gelation method. The particle size of the uncharged chitosan nanoparticles, Cs-EBO and Cs-BUT were 169.5, 356.2 and 197.7 nm, respectively. The Z potential and the polydispersity index of the chitosan nanoparticles indicated good stability. Infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the interaction, charging and formation of the nanoparticles. Furthermore, based on their controlled release study, it was determined that Cs-EBO can release more loaded sample compared to Cs-BUT, readily releasing loaded EBO.

Finally, we can indicate that the EBO extract and BUT residue of *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) could be considered as good sources of antioxidant agents, since these, when encapsulated in chitosan nanoparticles, will have good and prolonged antioxidant activity.

**Keywords:** Antioxidant activity, DPPH, electrochemical techniques, stone breaker, controlled release, chitosan nanoparticles.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ABREVIATURAS.....	xii
PRÓLOGO.....	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción del problema.....	1
1.2. Justificación.....	1
1.3. Objetivos.....	2
1.3.1. Objetivo general.....	2
1.3.2. Objetivos específicos .....	2
1.4. Estado del arte.....	2
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	7
2.1. Género <i>Phyllanthus</i> .....	7
2.1.1. Distribución y ubicación .....	7
2.1.2. Composición química del género <i>Phyllanthus</i> .....	7
2.1.3. Actividad biológica .....	8
2.1.4. <i>Phyllanthus stipulatus</i> (Raf.) Webster (PS).....	11
2.2. Actividad antioxidante .....	12
2.2.1. Radicales libres .....	13
2.2.2. Antioxidantes .....	14
2.2.3. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante .....	17
2.3. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos.....	19
2.3.1. Espectroscopía de masa (MS) .....	19
2.3.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	22
2.4. Nanopartículas de quitosano.....	26
2.4.1. Quitosano .....	26

2.4.2.	Preparación de nanopartículas.....	26
2.4.3.	Caracterización de las nanopartículas.....	28
<b>CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL .....</b>		<b>34</b>
3.1.	Materiales y reactivos.....	34
3.2.	Especie vegetal y pretratamiento .....	35
3.3.	Obtención de extractos y residuos de chancapiedra .....	36
3.3.1.	Extracción sólido-líquido: Obtención del EBO .....	36
3.3.2.	Extracción sólido-líquido: Obtención del EBA .....	36
3.3.3.	Partición líquido-líquido del EBO .....	37
3.4.	Evaluación de la actividad antioxidante .....	39
3.4.1.	Método químico .....	39
3.4.2.	Método electroquímico .....	41
3.5.	Identificación espectroscópica de los principios activos del EBO y BUT .....	43
3.5.1.	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) ...	43
3.5.2.	Resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup> H) y de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C).....	44
3.6.	Obtención de nanopartículas de quitosano .....	44
3.6.1.	Preparación de nanopartículas de quitosano sin cargado.....	44
3.6.2.	Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con EBO y BUT (Cs-EBO y Cs-BUT)	45
3.6.3.	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de quitosano.....	45
3.7.	Determinación de la eficiencia de cargado (EC) de las nanopartículas de quitosano .....	45
3.8.	Estudio de la liberación controlada de Cs-EBO y Cs-BUT .....	46
3.9.	Evaluación de la actividad antioxidante de Cs-EBO y Cs-BUT .....	46
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>		<b>48</b>
4.1.	Obtención de los extractos EBO y EBA de la chancapiedra.....	48
4.2.	Partición líquido-líquido del EBO.....	48
4.3.	Evaluación de la actividad antioxidante .....	49
4.3.1.	Método químico .....	49
4.3.2.	Método electroquímico .....	51
4.4.	Identificación espectroscópica de los principios activos del EBO y BUT .....	57
4.5.	Caracterización de las nanopartículas de quitosano.....	68
4.5.1.	Tamaño de partícula y potencial Z.....	68
4.5.2.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	70
4.5.3.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	72
4.6.	Estudio de la liberación controlada de las nanopartículas de quitosano.....	73
4.7.	Evaluación de la actividad antioxidante de las nanopartículas cargadas.....	74

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Fitocompuestos principales presentes en el género <i>Phyllanthus</i> . .....	7
<b>Tabla 2</b> Identificación taxonómica del <i>Phyllanthus stipulatus</i> (Raf.) Webster. ....	35
<b>Tabla 3</b> Preparación de soluciones de muestras y estándar a 10 y 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....	40
<b>Tabla 4</b> Preparación de los blancos (muestra y estándar) a 10 y 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....	40
<b>Tabla 5</b> Adición de DPPH para muestras y estándar a 10 y 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....	40
<b>Tabla 6</b> Parámetros de operación para la voltamperometría cíclica (VC). ....	42
<b>Tabla 7</b> Parámetros de operación para la voltamperometría de pulso diferencial (DPV). ....	42
<b>Tabla 8</b> Parámetros de operación para la voltamperometría de onda cuadrada (SWV). ....	43
<b>Tabla 9</b> Gradiente de los eluyentes A y B utilizados en el HPLC. ....	43
<b>Tabla 10</b> Porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de los extractos, residuos y el ácido gálico. ....	50
<b>Tabla 11</b> Picos de oxidación y los índices electroquímicos obtenidos a partir de los DPV de los extractos y residuos. ....	54
<b>Tabla 12</b> Picos de oxidación y los índices electroquímicos obtenidos a partir de los SWV de los extractos y residuos. ....	56
<b>Tabla 13</b> Comparación de los resultados obtenidos con el ensayo DPPH y las técnicas electroquímicas. ....	57
<b>Tabla 14</b> Compuestos identificados en el EBO y BUT. ....	60
<b>Tabla 15</b> Características de las nanopartículas de quitosano sin cargado y cargadas con EBO y BUT. ....	69
<b>Tabla 16</b> Evaluación de la actividad antioxidante (%AA) de las nanopartículas sin cargado y cargados con EBO y BUT. ....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructuras de fitocompuestos presentes en el género <i>Phyllanthus</i> (a) flavonoides, (b) lignanos y (c) taninos.....	8
<b>Figura 2</b> Imagen de la especie vegetal <i>Phyllanthus stipulatus</i> (Raf.) Webster. (a) Hojas; (b) Flores masculinas; (c) Flores femeninas y frutos jóvenes.....	12
<b>Figura 3</b> Grupos activos para la actividad antioxidante en flavonoides: a) grupo catecol, b) grupo 4-oxo en anillo C y doble enlace C2-C3, y c) 3,5-OH en anillo C y A. ....	15
<b>Figura 4</b> Estructuras de algunos antioxidantes primarios y secundarios. ....	16
<b>Figura 5</b> Voltamperometría cíclica de la vitamina C. ....	19
<b>Figura 6</b> Espectro de masa por (a) EI y (b) CI de la 3,4-dimetoxiacetofenona. ....	21
<b>Figura 7</b> Mecanismos de ionización propuestos durante la ionización por electrospray.....	22
<b>Figura 8</b> Estructura de la rutina (quercetina 3-O-rutinósido). ....	23
<b>Figura 9</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H de la rutina en CH <sub>3</sub> OH. ....	24
<b>Figura 10</b> Espectro RMN <sup>13</sup> C de la rutina en CH <sub>3</sub> OH. ....	25
<b>Figura 11</b> Estructura del biopolímero quitosano. ....	26
<b>Figura 12</b> Representación del (a) extracto en gotas de quitosano, (b) partículas de quitosano cargadas con el extracto y (c) estructura química del quitosano reticulado iónicamente con TPP.....	28
<b>Figura 13</b> Representación de una partícula cargada negativamente señalando las distintas capas electrostáticas. ....	30
<b>Figura 14</b> Espectro FTIR de quitosano (CTS) y nanopartículas de quitosano (nanoCTS). ....	31
<b>Figura 15</b> Microscopía electrónica de barrido del (a) quitosano puro y (b) nanopartículas de quitosano. ....	33
<b>Figura 16</b> Diagrama de los procesos de obtención de los extractos EBO, EBA y residuos a partir de la especie chancapiedra. ....	37
<b>Figura 17</b> Diagrama del proceso de partición líquido-líquido del EBO. ....	39
<b>Figura 18</b> Reacción entre el radical DPPH y un agente antioxidante. ....	50
<b>Figura 19</b> Diagrama de barras de actividad antioxidante de los extractos, residuos y ácido gálico a concentraciones de 10 y 50 µg.mL <sup>-1</sup> . ....	51

<b>Figura 20</b> Mecanismo de oxidación de compuestos catecólicos. ....	52
<b>Figura 21</b> Voltamperometría cíclica del residuo butanólico (BUT). ....	53
<b>Figura 22</b> Voltamperogramas de pulso diferencial de los extractos y residuos en etanol: buffer PBS a pH= 6 (1:1) a $v= 10 \text{ mV.s}^{-1}$ . ....	54
<b>Figura 23</b> Voltamperogramas de onda cuadrada de los extractos y residuos en etanol: buffer PBS pH= 6 (1:1). ....	55
<b>Figura 24</b> Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS para (a) EBO y (b) BUT. ....	58
<b>Figura 25</b> Espectro de masas del (a) ácido elágico y (b) 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoilglucopiranosida (corilagina). ....	59
<b>Figura 26</b> Espectros RMN $^1\text{H}$ obtenidos a partir del (a) EBO y (b) BUT. ....	61
<b>Figura 27</b> Espectros RMN $^{13}\text{C}$ obtenido a partir del (a) EBO y (b) BUT. ....	62
<b>Figura 28</b> Estructuras de los metabolitos secundarios identificados en el EBO y BUT. ....	63
<b>Figura 29</b> Espectros FTIR del (a) EBO, nanopartículas sin cargado y Cs-EBO; (b) del BUT, nanopartículas sin cargado y Cs-BUT. ....	71
<b>Figura 30</b> Imágenes SEM de las nanopartículas sin cargado y nanopartículas cargadas (Cs-EBO y Cs-BUT). ....	73
<b>Figura 31</b> Perfiles de liberación controlada de las nanopartículas cargadas con EBO y BUT. ....	73

## ABREVIATURAS

% AA	Actividad antioxidante	GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a masas
ABTS <sup>•+</sup>	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	HHDP	Hexahidroxidifenilo
AH	Agente antioxidante	HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas
ATR	Reflectancia tota atenuada	IR	Espectroscopía infrarroja
BHA	Butilhidroxil anisol	LC-MS	Cromatografía líquida acoplado a masas
BHT	Hidroxitolueno butilado	MM	Masa molecular
BUT	Residuo butanólico	MS	Espectroscopía de masas
CI	Ionización química	PA	<i>Phyllanthus amarus</i>
CLO	Residuo clorofórmico	PBS	Solución buffer de fosfatos
Cs-BUT	Nanopartículas de quitosano cargado con residuo butanólico	PS	<i>Phyllanthus stipulatus</i>
Cs-EBO	Nanopartículas de quitosano cargado con extracto bruto orgánico	PZ	Potencial Z
DLS	Dispersión de luz dinámica	RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial	SEM	Microscopía electrónica de barrido
EBA	Extracto bruto acuoso	SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
EBO	Extracto bruto orgánico	TPP	Tripolifostato de sodio
EC	Eficiencia de cargado	TR	Tiempo de retención
EI	Ionización electrónica	UV	Espectroscopía ultravioleta
ESI	Ionización por electrospray	VC	Voltamperometría cíclica
FTIR	IR por transformada de Fourier		

## PRÓLOGO

El presente trabajo de investigación lleva por título “Evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos de *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (Chancapiedra) y su estudio de liberación controlada en nanopartículas de quitosano”. Este trabajo se ha realizado con la finalidad de obtener la Licenciatura en Química en la Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

El enfoque de este trabajo está centrado en identificar las sustancias químicas responsables de la actividad antioxidante de la Chancapiedra. Para lograr ello, se ha realizado la extracción con solventes y la partición biodirigida a partir de la muestra vegetal. Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron mediante un método químico (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, DPPH) y método electroquímico (voltamperometría). Asimismo, para realizar el estudio de liberación controlada en medios acuosos, se ha realizado el cargado de los extractos y residuos con mayor actividad antioxidante dentro de nanopartículas de quitosano. La importancia relevante del trabajo de tesis fue obtener una nueva fuente vegetal con actividad antioxidante y de esta manera esta especie pueda ser utilizada para reducir y/o eliminar las sustancias radicalarias que tienen efectos dañinos a la salud humana.

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1. Descripción del problema

En los últimos años se ha podido apreciar un incremento significativo de radicales libres en el ambiente. Estos nos pueden afectar si se encontrasen en gran concentración en nuestros cuerpos. Uno de los efectos más importantes es la formación de reacciones oxidativas en cadena, que generan el envejecimiento de la piel (se toman un electrón del colágeno de la piel perdiendo su elasticidad), y debilitan nuestro organismo afectando el sistema inmunológico, por lo que es necesario buscar nuevas fuentes naturales de antioxidantes a fin de ayudar al sistema de defensa que tiene nuestro cuerpo y neutralizar el exceso de los radicales libres.

## 1.2. Justificación

En esta investigación se presenta al *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (conocido, comúnmente, como chancapiedra por sus beneficios al ayudar en el tratamiento de cálculos renales) como una nueva fuente alternativa de antioxidantes naturales, ya que esta planta posee fitocompuestos fenólicos y polifenólicos, los cuales son muy conocidos por su alta actividad antioxidante. Estos fitocompuestos son extraídos de la planta mediante los procesos de maceración con solvente polares, tales como etanol y agua. Asimismo, poder antioxidante de los extractos orgánicos y acuosos pueden ser mejorados cuando éstas son encapsuladas dentro de nanopartículas de quitosano. El quitosano tiene la función principal de proteger a los compuestos encapsulados y liberarlos de forma continua y prolongada, por lo que la actividad antioxidante de los extractos del *Phyllanthus stipulatus* actuarían por más tiempo comparado con los extractos que no han sido encapsulados.

Por lo mencionado, en este trabajo de tesis se realizará la evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos de *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (Chancapiedra) y seguidamente se hará el estudio de liberación controlada en nanopartículas de quitosano.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante del extracto bruto acuoso (EBA), extracto bruto orgánico (EBO) y sus residuos, obtenidos a partir de la especie *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) mediante procesos de maceración con solventes; y seguidamente realizar los estudios de liberación controlada de los extractos cargados en nanopartículas de quitosano.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Obtener el extracto bruto orgánico (EBO) y el extracto bruto acuoso (EBA) a partir de la maceración de la especie vegetal *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra).
- ✓ Realizar la partición líquido-líquido del EBO de la especie vegetal para obtener los residuos: clorofórmico (CLO), butanólico (BUT) y acuoso (AC).
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos y residuos obtenidos de la especie vegetal mediante métodos: químico y electroquímico.
- ✓ Identificar y elucidar los principios activos responsables de la actividad antioxidante del EBO y BUT de la especie vegetal.
- ✓ Preparar las nanopartículas de quitosano mediante gelación iónica y caracterizar mediante dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z, espectroscopía infrarroja (IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- ✓ Realizar estudio de liberación controlada de las nanopartículas cargadas con EBO y BUT de la especie vegetal.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de las nanopartículas sin cargado y cargadas con los extractos EBO y BUT de la especie vegetal.

### 1.4. Estado del arte

En los últimos años varias especies del género *Phyllanthus* han sido materia de investigación debido a sus diversas propiedades farmacológicas. En 2018, se reportó que el extracto hidroalcohólico de las hojas del *Phyllanthus brasiliensis* poseen propiedades analgésicas/antiinflamatoria en el tratamiento de edemas en las patas de

ratones, debido a la presencia de lignanos tales como Arabelino, Cleistantina, Filantostatina A, entre otros (Borges et al., 2018).

En 2020, Roumy y colaboradores reportaron una lista de especies vegetales con actividad antiviral contra la Hepatitis C en la ciudad de Loreto-Perú. Dentro de esta lista se encontraba el *Phyllanthus stipulatus*, el cual presentó una inhibición de la infección mayor del 50% del virus de la Hepatitis C a una concentración de 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de su extracto metanólico. Esta propiedad de la especie se debe a la presencia de compuestos fenólicos, tales como la quercetina y derivados del ácido gálico los cuales poseen propiedades antioxidantes y antivirales (Roumy et al., 2020).

Debido a que el género *Phyllanthus* manifiesta diversas propiedades biológicas tales como: antiinflamatoria, antihepatotoxicidad, anticancerígena, antihiperuricémico, antiviral, etc. (Yashvardhini et al., 2021); recientes investigaciones apuntan a extraer y aislar los principios activos presentes en la planta a fin de buscar nuevas fuentes de fitocompuestos.

Kátia et al. (2020) determinaron cuantitativamente, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, la presencia de filantina e hipofilantina dentro de seis especies del *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. stipulatus*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis*, *P. urinaria*), confirmando que la presencia de estos compuestos varía entre las especies vegetales. Nikule et al. (2020) postularon al *Phyllanthus tenellus* Roxb como nueva fuente de filantina, hipofilantina y filotetralina, presentando una posible forma de producir lignanos bioactivos. Por su parte V. Patel et al. (2021), también presentaron un perfil comparativo entre cuatro lignanos muy conocidos; filantina, hipofilantina, nirtetralina y nirantina presentes en nueve especies *Phyllanthus* provenientes de la India (*P. amarus*, *P. debilis*, *P. fraternus*, *P. lawii*, *P. maderaspatensis*, *P. reticulatus*, *P. tenellus*, *P. urinaria* y *P. virgatus*) usando una fase estacionaria inversa validada del método de detección HPLC-PDA.



En los últimos años, debido a sus diferentes actividades biológicas, el quitosano es uno de los biopolímeros más recurrente dentro de los temas de investigación. MubarakAli y colaboradores, por ejemplo, señalan que las nanopartículas de quitosano preparadas mediante gelación iónica presentan actividad bactericida contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y fungicida contra *Candida albicans* (MubarakAli et al., 2018). Saravanakumar y colaboradores sintetizaron nanopartículas de quitosano funcionalizadas con una enzima fungicida derivado del *Trichoderma harzianum*. Ellos realizaron diferentes ensayos para medir la actividad antioxidante. Utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), obtuvieron una actividad de  $35,21 \pm 5,2\%$  y  $75,21 \pm 2,5\%$ . También se comprobó su actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica Typhimurium* con zonas de inhibición de  $1,7 \pm 0,2$  cm y  $1,8 \pm 0,2$  cm, respectivamente. Del mismo modo, reportaron que a concentraciones de  $0-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  estas nanopartículas no presentaron toxicidad alguna contra los fibroblastos NIH-3T3 (Saravanakumar et al., 2018).

Abdel-Aziz estudió el efecto que genera las nanopartículas de quitosano sobre la germinación y crecimiento de la plántula de las semillas de *Vicia faba*. A pesar de que a concentraciones de 0,05% y 0,10%, las nanopartículas de quitosano retarda la germinación de la semilla, se observa una mejora en su sistema de defensa favoreciendo el aumento de fenoles totales y enzimas antioxidantes (polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa, ascorbato peroxidasa) (Abdel-Aziz, 2019).

Además, aprovechando que las nanopartículas de quitosano proporcionan protección para los principios activos encapsulados dentro de ellas, Onyebuchi y Kavaz encapsularon aceites esenciales obtenidos de *Ocimum Gratissimum* dentro de nanopartículas de quitosano y de N,N,N-trimetilquitosano. Este proceso se realizó con la finalidad de proteger los aceites esenciales del medio exterior. Las pruebas *in vitro* de estas nanopartículas cargadas exhibieron actividad antioxidante muy alta debido a la sinergia entre el quitosano y los aceites esenciales, actividad antibacterial contra patógenos alimentarios Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) y Gram-negativo bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), e inhibieron la

proliferación de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (Onyebuchi & Kavaz, 2019). Del mismo modo, Kain y Kumar señalaron que el extracto acuoso del *Achillea millefolium* encapsulado dentro de nanopartículas quitosano mostraron una zona máxima de inhibición de  $30,0 \pm 0,5$  mm para *Bacillus subtilis* (Gram-positiva) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), y 68% de inhibición en la prueba de actividad antiurolitiática (Kain & Kumar, 2020).

Manne y colaboradores reportaron que las nanopartículas de quitosano cargadas con el extracto acuoso del *Pterocarpus marsupium* Roxb. heartwood presentaron 59,34% de inhibición del  $\alpha$ -Amilasa (enzima involucrada en la descomposición del almidón), lo que también apoyaría a un posible tratamiento contra la diabetes tipo II. Además, se señaló que las nanopartículas cargadas podrían prevenir la desnaturalización de proteínas hasta en un 63,52%, lo que implica que podría ser considerado como un buen agente antiinflamatorio (Manne et al., 2020).

El olivo (*Olea europaea*) es conocido por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobiana. En consecuencia, Muzzalupo y colaboradores evaluaron la actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano cargadas con los extractos obtenidos de las hojas del *Olea europaea* a fin de proponer una alternativa a los productos fungicidas utilizados actualmente. Los resultados mostraron 87,96% y 58,13% de inhibición para los extractos clorofórmico y etilacetato respectivamente, frente a la germinación y crecimiento del *F. proliferatum* (aislado de dientes de ajo, *Allium sativum*) (Muzzalupo et al., 2020).

Sahyon y Al-Harbi encapsularon el extracto hidroetanólico del corazón del árbol *Phoenix dactylifera* en nanopartículas de quitosano. Luego se evaluó su actividad antioxidante de estas nanopartículas cargadas mediante el ensayo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)) con un 51,77% de poder antioxidante. Para las pruebas antimicrobianas y fungicidas, las zonas de inhibición contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* fueron de  $12,6 \pm 0,15$  mm,  $17,3 \pm 0,12$  mm y  $8,3 \pm 0,06$  mm, respectivamente. La prueba anticancerígena fue realizada contra tres

tipos de células (MCF-7, Caco-2 y Hela). En los tres casos se aprecia un incremento de la actividad ( $IC_{50}$ ,  $8,16 \pm 1,0$ ;  $17,67 \pm 1,6$  y  $7,27 \pm 0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) cuando el extracto se encuentra encapsulado en las nanopartículas de quitosano (Sahyon & Al-Harbi, 2020).

Soltanzadeh y colaboradores realizaron la preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con el extracto hidroetanólico de la cascara del *Punica granatum L.* Los resultados para el ensayo de contenido fenólico total (prueba Folin-Ciocalteu) fue que, por cada gramo de nanopartículas sin cargar, nanopartículas cargadas y extracto libre equivalen a 2,5; 59,6 y 205,2 mg de ácido gálico, respectivamente. Para la actividad antioxidante (según prueba de DPPH), las nanopartículas cargadas presentaron una inhibición del 56%, mientras que para el extracto libre fue del 85%. Los autores indican que esta disminución del contenido fenólico total y de la actividad antioxidante que presentaron las nanopartículas cargadas con respecto al extracto libre, se debe a la buena encapsulación y lenta liberación del mismo extracto. Mientras que, para la prueba antibacterial, las nanopartículas cargadas retardaron el crecimiento de la *Staphylococcus aureus* a una concentración de  $1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Soltanzadeh et al., 2021).

Fritea y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de las nanopartículas de quitosano cargadas con el extracto hidroetanólico del propóleo. Estas pruebas fueron realizadas mediante métodos electroquímicos: voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Según la VC, las nanopartículas cargadas presentaron los picos de oxidación en 400, 600 y 800 mV, los que fueron asignados a la oxidación electroquímica de los principios activos presentes en el extracto, tales como: ácido cafeico, quercetina, kaempferol, entre otros. Con respecto al DPV, el potencial antioxidante de las nanopartículas fue del 35,04% comparado con la capacidad antioxidante de la vitamina C (Fritea et al., 2021).

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Género *Phyllanthus*

#### 2.1.1. Distribución y ubicación

El género *Phyllanthus* de la familia de Euphorbiaceae, presenta cerca de 800 especies aproximadamente, de las cuales se pueden encontrar en países tropicales y subtropicales (Verma et al., 2014) tales como: Aruba, Brasil, Haití, India, Perú, Nigeria, entre otros (J. R. Patel et al., 2011). El nombre “*Phyllanthus*” significa “hoja y flor” y es nombrado así por tener una apariencia donde la flor, la fruta y la hoja aparecen fusionadas (Verma et al., 2014).

#### 2.1.2. Composición química del género *Phyllanthus*

El género *Phyllanthus* tiene numerosos fitocompuestos tales como alcaloides, flavonoides, taninos, lignanos, compuestos polifenólicos (Tabla 1).

**Tabla 1**

Fitocompuestos principales presentes en el género *Phyllanthus*.

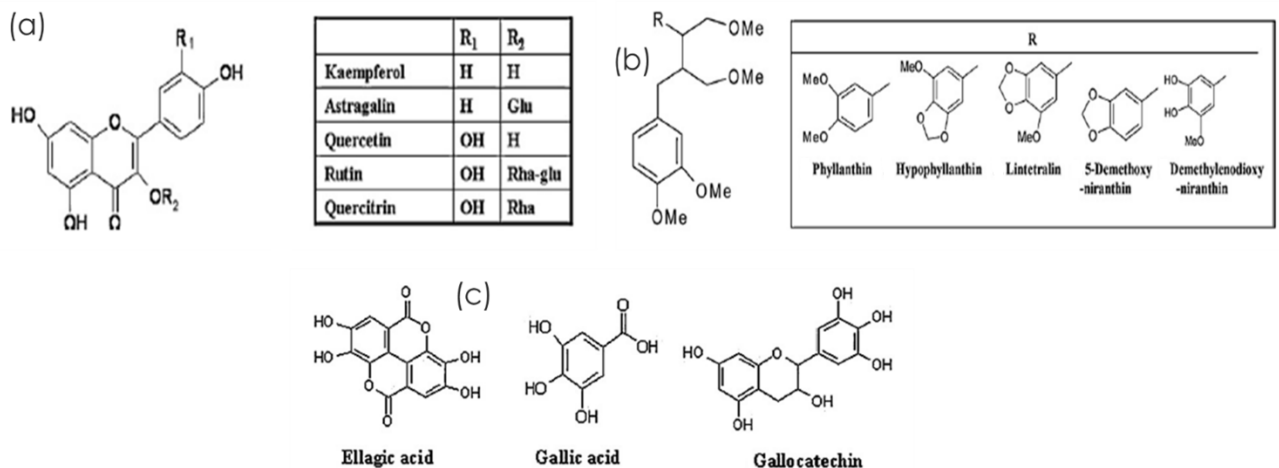
Metabolitos secundarios	Fitocompuestos
Lignanos	Filantina, hipofilantina, nirantina, filotetralina, nirtetralina, isonirtetralina, hinoquinina, lintetralina, isolintetralina, demetilendioxinirantina.
Flavonoides	Rutina, astragalina, kaempferol, quercetina-3-O-glucósido, quercetina, quercitrina.
Elagitaninos	Ácido gálico, ácido elágico, galocatequina, 1,6-digaloilglucopiranosina, ácido 4-O-galoilquínico, geraniina, amariina, furosina, ácido geraniínico B, ácido amariínico, amarulona, ácido repandusínico A, corilagina, isocorilagina, elaeocarpusina, filanthusina melatonina.

Metabolitos secundarios	Fitocompuestos
Alcaloides	Securinina, dihidrosecurinina, tetrahidrosecurinina, securinol, filantina, alosecurina, nor-securinina, epibubbialina, isobubbialina 4-metoxi-nor-securinina, 4-metoxi dihidrosecurinina, 4-metoxitetrahidrosecurinina, 4-hidrosecurinina Fenazina y derivados de fenazina
Triterpenos	22E-farnesilfarnesol, lupeol, phyllantheol, phyllanthenona, phyllantheol, ácido oleanólico, ácido ursólico
Esteroles	Amarosterol A, amarosterol B
Taninos	Ácido elágico, ácido gálico, galocatequina

Fuente: (J. R. Patel et al., 2011; Verma et al., 2014).

### Figura 1

Estructuras de fitocompuestos presentes en el género *Phyllanthus* (a) flavonoides, (b) lignanos y (c) taninos.



Fuente: (J. R. Patel et al., 2011).

#### 2.1.3. Actividad biológica

La planta ha sido utilizada por las tribus locales de la región de Chotanagpur en India para el tratamiento de ictericia, llagas, fiebre, disentería e infecciones diarreicas (Mazumder et al., 2006) y en Perú para ayudar en problemas como cálculos renales, diurético, emenagogo, cálculos biliares,

hepatitis, dolor renal, problemas renales, infecciones urinarias, vermífugo. Todas las partes de esta planta, sobre todo sus hoja, son empleadas de forma terapéutica mediante infusiones (Oluwafemi & Debiri, 2008; J. R. Patel et al., 2011). Por ello, la planta ha sido estudiada para comprobar la diversidad de sus propiedades farmacológicas:

✓ **Actividad antioxidante**

Se ha observado que los extractos (metanólico y acuoso) obtenidos de diferentes especies *Phyllanthus* exhiben diversas actividades biológicas. Esto debido a la presencia de compuestos polifenólicos dentro de ellos. La actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos se basa en sus propiedades redox (absorber y neutralizar radicales libres, extinguir oxígeno singlete y triplete o descomponer peróxidos). Los compuestos usualmente encontrados en los extractos del *Phyllanthus* son: alcaloides, taninos, flavonoides, lignanos, entre otros. Algunos de estos se descomponen rápidamente bajo el sol o a una temperatura relativamente alta, por lo que es importante tener cuidado en las formas y condiciones de secado de la muestra vegetal, a fin de no afectar sus actividades biológicas (Eldeen et al., 2011; Kumaran & Joel Karunakaran, 2007; J. R. Patel et al., 2011).

✓ **Propiedad antibacterial**

Las propiedades antibacterianas del género *Phyllanthus* viene asociado con la presencia de taninos, alcaloides y flavonoides (Oluwafemi & Debiri, 2008).

El extracto etanólico del *Phyllanthus amarus* (PA), por ejemplo, mostró actividad antibacterial contra *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus* (Srinivasan et al., 2001), *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* (Kloucek et al., 2005) y *Salmonella typhi* (Oluwafemi & Debiri, 2008). El extracto metanólico del *Phyllanthus amarus*

(PA) presentó una buena actividad contra *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus*; y actividad moderada contra *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mazumder et al., 2006).

✓ **Propiedad hepatoprotectora**

Se ha reportado que el género del *Phyllanthus* tiene actividad hepatoprotectora inhibiendo la hepatitis B. Además, los compuestos *hipofilantina* y *filantina*, presentes en la planta, previenen el estrés oxidativo inducido por el etanol e inhiben el daño a las células hepáticas en ratas (Buddhachat et al., 2015).

En un estudio realizado, el 50% de los infectados con el virus de hepatitis B crónica perdieron uno de los principales marcadores sanguíneos de la infección (por ejemplo, el antígeno de superficie de la hepatitis B) después de usar *Phyllanthus* durante 30 días (Oluwafemi & Debiri, 2008).

✓ **Actividad antinociceptiva**

Se han realizado pruebas en ratones (25-30 g) con los extractos metanólicos del *Phyllanthus stipulatus* (PS), *P. fraternus* y *P. caroliniensis*. Estos extractos inhibieron la formación de formalina, (actividad antinociceptiva), esto gracias a la presencia de  $\beta$ -sitosterol, gloquidonol y gloquidona, principalmente (Catapan et al., 2000). Además, se demostró la reducción del daño muscular después de una sesión de ejercicios, gracias a la presencia de compuestos fenólicos como alcaloides, flavonoides, taninos, lignanos en el *Phyllanthus amarus*, por lo que también se le atribuye con propiedades analgésicos y antiinflamatorios (Roengrit et al., 2015).

✓ **Actividad antiamnésica**

Se evaluó los efectos nootrópicos (estimulación de la memoria) del extracto acuoso de las hojas y tallos del PS para determinar la actividad de la

colinesterasa cerebral en ratones albinos suizos. La escopolamina y el diazepam se usaron como fármacos estándar para producir amnesia y el paradigma elevado de laberinto como modelo para la evaluación de las funciones cognitivas. El resultado revela una atenuación de los déficits amnésicos inducidos por diazepam y escopolamina y la reducción de la actividad de la colinesterasa cerebral. Dado que existe una relación entre la reducción de la colinesterasa y el aumento de la concentración de acetilcolina en el cerebro (responsable de mejorar la memoria), nos proporciona una justificación para utilizar este potencial terapéutico en el tratamiento de pacientes con trastornos cognitivos (Verma et al., 2014).

#### ✓ **Actividad anticonvulsiva**

La epilepsia es un trastorno neurológico importante que afecta a gran parte del mundo. Este trastorno crónico progresivo del sistema nervioso central es caracterizado por la aparición de convulsiones recurrentes. En busca de nuevos tratamientos naturales, se evaluó la actividad anticonvulsiva del extracto acuoso y etanólico del PS (hojas y tallos) contra el efecto causado por el pentilentetrazol y las convulsiones inducidas por electroshock en ratas albinas suizas. El resultado mostró que los extractos usados fueron significativamente efectivos en la reducción de convulsiones inducidas tanto por pentilentetrazol y por electroshock (Verma et al., 2014).

#### **2.1.4. *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (PS)**

El *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster es una hierba de 9–30 cm de altura, rama filantoide y pinatiformes, estípulas de 0,8–1,3 mm de largo, lanceoladas. Además, presenta un limbo de 4–9 × 2–3,5 mm, elíptico a oblongo, ápice redondeado a obtuso, base redondeada a obtusa y pecíolo 0,5 mm de largo. Las flores estaminadas son de 1 a 1,5 mm de largo; pedicelo de 0,8–1,0 mm de largo, sépalos de 0,8–1 mm de largo, obovados, ápice redondeado u obtuso; 3 estambres, completamente unidos, anteras bilobadas. Las flores pistiladas de 1,7–2,5 mm de largo; pedicelo de 1,5–2,0 mm de largo, sépalos 0,8–1,2 mm de largo,



obovados, ápice redondeado; ovario de 0,2 a 0,4 mm de diámetro, globoso. Por último, las semillas son trigonal estiradas 0,8–1,0 × 0,5–0,7 mm (ver Figura 2) (Lima et al., 2020).

La especie vegetal *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster es muy usado en todo el mundo, principalmente en Brasil, India, Estados Unidos y Perú. Dado que se es usado en varios países, se le conoce con diferentes nombres tales como: chancapiedra en idioma español (en Sudamérica), Bhuyiavla en hindi y Stone breaker en inglés (J. R. Patel et al., 2011).

## Figura 2

Imagen de la especie vegetal *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster. (a) Hojas; (b) Flores masculinas; (c) Flores femeninas y frutos jóvenes.



Fuente: (Kawakita et al., 2019).

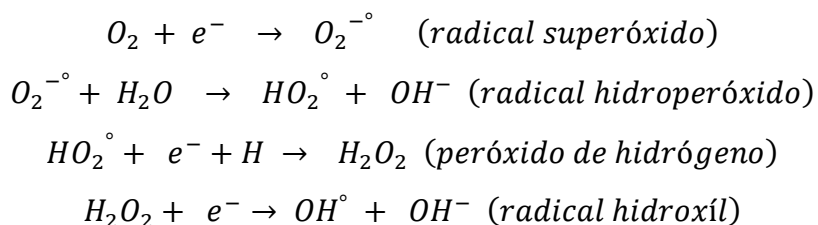
## 2.2. Actividad antioxidante

Hoy en día existe un interés grande por buscar nuevas fuentes de antioxidantes, esto luego del descubrimiento de que las especies químicas altamente reactivas en nuestro cuerpo, conocidos como radicales libres, aumentan durante la vida cotidiana. Nuestro complejo sistema de defensa depende de la ingesta de vitaminas, minerales y de la producción endógena de compuestos antioxidantes como el glutati6n (Clarkson & Thompson, 2000).

### 2.2.1. Radicales libres

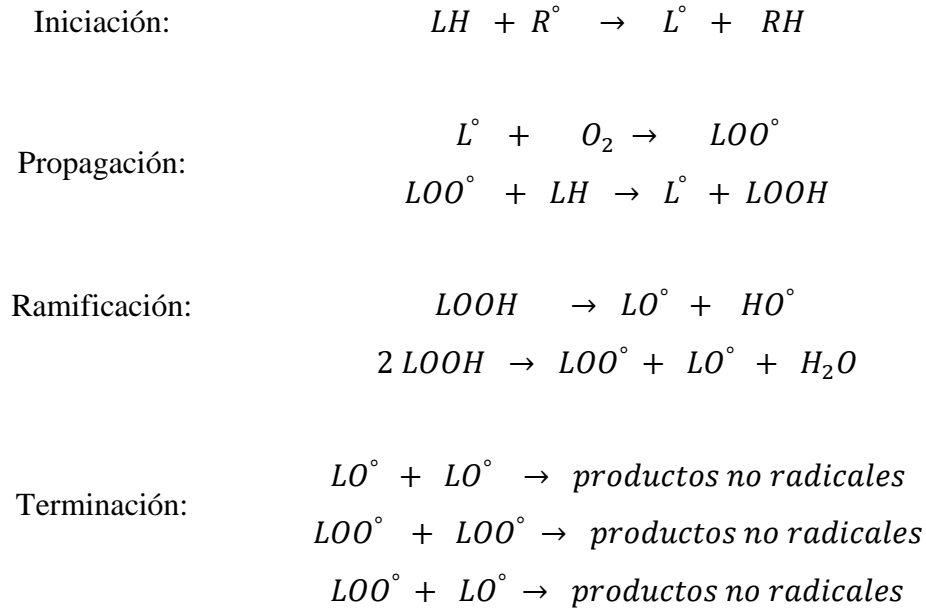
En los últimos años se ha escuchado hablar más de los productos antioxidantes y los radicales libres, pero poco sobre qué son los radicales libres y cómo actúan en nuestro cuerpo (Sen & Batra, 2013).

Un radical libre es una molécula que presenta un electrón desapareado en su último orbital. El oxígeno molecular es un di-radical ya que contiene dos electrones desapareados, uno por cada átomo de oxígeno, con espines paralelos. Como se sabe, los electrones deben tener espines opuestos para ocupar un mismo orbital, por lo que los electrones agregados al oxígeno molecular deben transferirse de uno en uno durante su reducción, lo que da como resultado varios intermedios altamente reactivos. El oxígeno se reduce completamente a agua (H<sub>2</sub>O) mediante la sucesión de cuatro reacciones, en el transcurso de estas reacciones existe la generación de varios radicales libres, así como la formación de peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este último no es considerado un radical libre en sí mismo por no contener electrones no apareados, pero si como una especie de oxígeno reactivo debido a su capacidad para generar radicales hidroxilos libres, los cuales si son altamente reactivos. La reducción completa de oxígeno se resume en las siguientes ecuaciones (Clarkson & Thompson, 2000):



Todos estos compuestos intermedios formados son inestables debido a sus configuraciones de electrones, y para que estos se estabilicen deben atraer electrones de otras moléculas, que a su vez forma otro radical libre y así sucesivamente. Esta cadena de reacciones se caracteriza por presentar cuatro

etapas: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Antolovich et al., 2002).



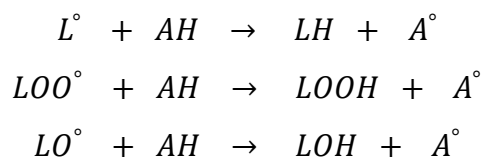
En las reacciones descritas, LH representan a moléculas como por ejemplo un lípido y R° como radical libre. El proceso puede iniciarse por la acción de agentes externos ya sea luz, calor, radiación ionizante o por iniciación química que involucra iones metálicos o metaloproteínas. Se cree que esta reacción en cadena está relacionada con la peroxidación lipídica, el daño al ADN y la degradación de proteínas (Clarkson & Thompson, 2000). El estrés oxidativo juega un rol muy importante en el desarrollo de dolencias crónica o degenerativas tales como el cáncer, desordenes inmunes, artritis y problemas neurodegenerativas (Sen & Batra, 2013).

### 2.2.2. Antioxidantes

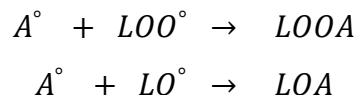
Los antioxidantes son compuestos que pueden proteger a las células de un posible daño por parte de los radicales libres, aun cuando se encuentren en menores concentraciones. Un antioxidante es capaz de retrasar o inhibir significativamente la oxidación del sustrato oxidable. Entre los antioxidantes más

conocidos son: los flavonoides, los betacarotenos, las vitaminas C, E y A, entre otros (ver Figura 3) (Antolovich et al., 2002; Hamid et al., 2010).

El mecanismo de acción de los antioxidantes es detener las reacciones en cadena originadas por un radical libre eliminando los compuestos intermedios e inhibiendo otras reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos:



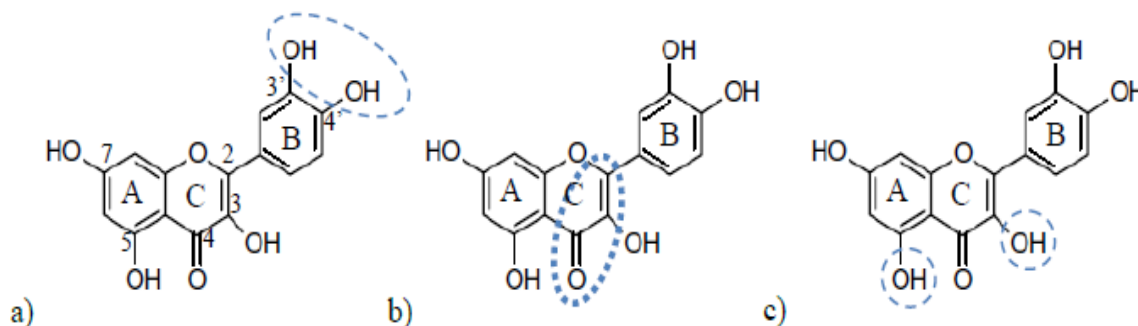
En donde, AH es el antioxidante y  $L^{\circ}$  el radical formado por la reacción con otro radical libre. La acción del antioxidante termina con la formación de compuestos antioxidantes de peroxilo:



Por lo que se infiere que la eficacia del antioxidante aumenta al disminuir la fuerza de enlace A-H (Antolovich et al., 2002).

### Figura 3

Grupos activos para la actividad antioxidante en flavonoides: a) grupo catecol, b) grupo 4-oxo en anillo C y doble enlace C2-C3, y c) 3,5-OH en anillo C y A.



Fuente: (González Fuentes, 2009).

Los antioxidantes se pueden dividir en dos clases: primarios o antioxidantes naturales y secundarios o antioxidantes sintéticos (Antolovich et al., 2002; Hamid et al., 2010).

✓ **Antioxidantes primarios**

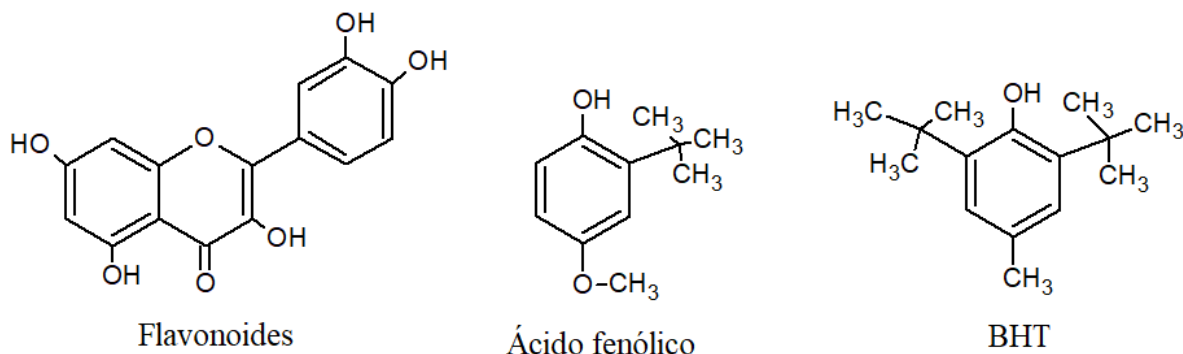
Se caracteriza por romper la cadena que reacciona con los radicales lipídicos para convertirlos en productos más estables. Los compuestos presentes en este grupo son principalmente fenólicos: antioxidantes minerales (cobre, hierro), vitaminas antioxidantes (vitamina C, E, B) y compuestos fitoquímicos (flavonoides, carotenoides, extractos de hierbas, compuestos polifenólicos en general).

✓ **Antioxidantes secundarios**

Son compuestos fenólicos que capturan radicales libres para detener las reacciones en cadena, los más conocidos son: butilhidroxil anisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT); usados principalmente en la industria alimentaria.

**Figura 4**

Estructuras de algunos antioxidantes primarios y secundarios.



Fuente: (Hamid et al., 2010)

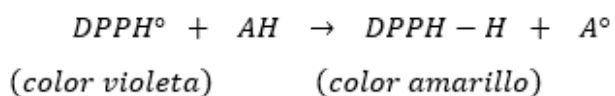
### 2.2.3. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

Existen diversas formas para evaluar la actividad antioxidante, pero todas se basan en dos enfoques: la primera consiste en la generación de una especie de radicales libres midiendo directamente la inhibición debido a la adición de antioxidante, y el otro consiste en acoplar la generación de un radical a la oxidación del sustrato, en este caso la medida del efecto se basa en la detección del radical o los productos de la oxidación. La actividad antioxidante se puede determinar con la medida de la inhibición a través de la fluorescencia, la quimioluminiscencia, la absorción de oxígeno o la absorbancia (Antolovich et al., 2002).

#### ✓ Método químico: Ensayo DPPH

Este ensayo es el método más usado con respecto a actividad antioxidante. El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, siglas por su nombre en inglés) es un radical libre estable de color violeta y a modo que este se va reduciendo su color va cambiando a amarillo. Su reducción se da en presencia de donantes de hidrógenos. La decoloración del DPPH se mide por espectrofotometría a 517 nm (Sen & Batra, 2013).

El mecanismo de acción del radical DPPH sería el siguiente:

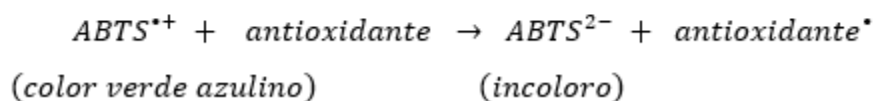
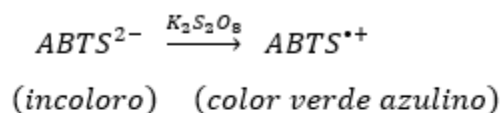


#### ✓ Método químico: Ensayo ABTS

Este ensayo es uno de los más utilizados en muestras de plantas. El ensayo consiste en generar el catión radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico; color verde azulino) mediante la oxidación del ABTS<sup>2-</sup> con persulfato de potasio y luego reducirlo en presencia de compuestos antioxidantes donantes de hidrógeno. La capacidad antioxidante se mide espectrofotométricamente a 734 nm determinando la decoloración de la solución (radical + compuesto antioxidante). El efecto de la concentración

de antioxidantes y la duración de la inhibición de la absorción de cationes radicales se tienen en cuenta cuando se determina la actividad antioxidante. Para el control positivo se usa trolox, un compuesto análogo a la vitamina E soluble en agua, por lo que la actividad se expresa en términos de la capacidad antioxidante equivalente a trolox del extracto (Krishnaiah et al., 2011).

El mecanismo de acción del  $ABTS^{2-}$  y del  $ABTS^{\bullet+}$ , es el siguiente:



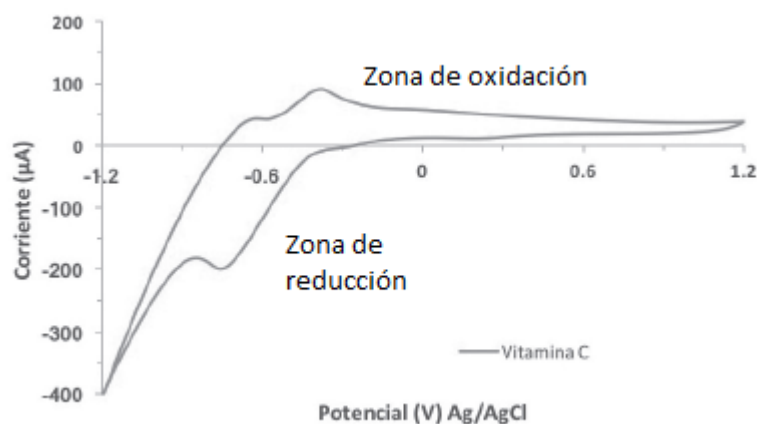
✓ **Método electroquímico: Ensayo voltamperométrico**

La sencillez y bajo costo del ensayo del DPPH hace que sea una de las técnicas más usadas; sin embargo, en los últimos se ha estado empleando técnicas electroquímicas para determinar el poder antioxidante de diferentes muestras, obteniendo resultados muy parecidos al ensayo del DPPH.

Por lo general, los compuestos antioxidantes actúan como agentes reductores y, en disolución, tienden a ser fácilmente oxidados sobre la superficie de un electrodo, por lo que se puede establecer una relación intrínseca entre el comportamiento electroquímico del compuesto antioxidante y su consiguiente actividad antioxidante. (Estévez Brito, 2016). En la Figura 5 se muestra el perfil voltamperométrico de la vitamina C, donde se puede observar los picos de oxidación y reducción.

**Figura 5**

Voltamperometría cíclica de la vitamina C.



Fuente: (Pérez-cabeza et al., 2017).

## 2.3. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos

### 2.3.1. Espectroscopía de masa (MS)

La espectroscopía de masa presenta un concepto relativamente simple: el compuesto es ionizado mediante un método específico, luego los iones son separados en base a su relación masa/carga ( $m/z$ ), y finalmente el número de iones que representan cada unidad de masa/carga se registra como un espectro. Es común que la espectroscopía de masas se acople con algún tipo de instrumento cromatográfico, tales como un cromatógrafo de gases (GC-MS) o un cromatógrafo de líquidos (LC-MS). La espectroscopía de masas se puede usar para identificar compuestos que sean conocidos (mediante la comparación con una librería de espectros de masa), y desconocidos, mediante el patrón de fragmentación y una evidencia espectrométrica adicional (IR o RMN) (Silverstein et al., 2005).

Existen diversos métodos de ionización: ionización mediante fase gaseosa, desorción y por evaporación. Entre los métodos comúnmente usados están los siguientes:



✓ **Ionización por impacto electrónico (EI)**

Este método ha sido usado principalmente por ser el primero en desarrollarse antes que los otros métodos de ionización y porque la mayoría de base de datos y librerías de espectros de masas han sido desarrollados mediante esta ionización.

Este método consiste básicamente en que las moléculas de la muestra en fase de vapor son bombardeadas con electrones de alta energía (generalmente 70 eV); estas moléculas liberan un electrón para producir un catión radical también conocido como ion molecular. El potencial de ionización de un compuesto orgánico es usualmente menos que 15 eV, por lo que queda un excedente de energía para la generación de nuevos iones moleculares y ruptura de enlaces covalentes. Estas rupturas son usualmente reproducibles y muy característicos de cada compuesto, haciendo así que este método sea la fuente del poderoso potencial de elucidación de estructuras de la espectrometría de masas (Silverstein et al., 2005).

✓ **Ionización química (CI)**

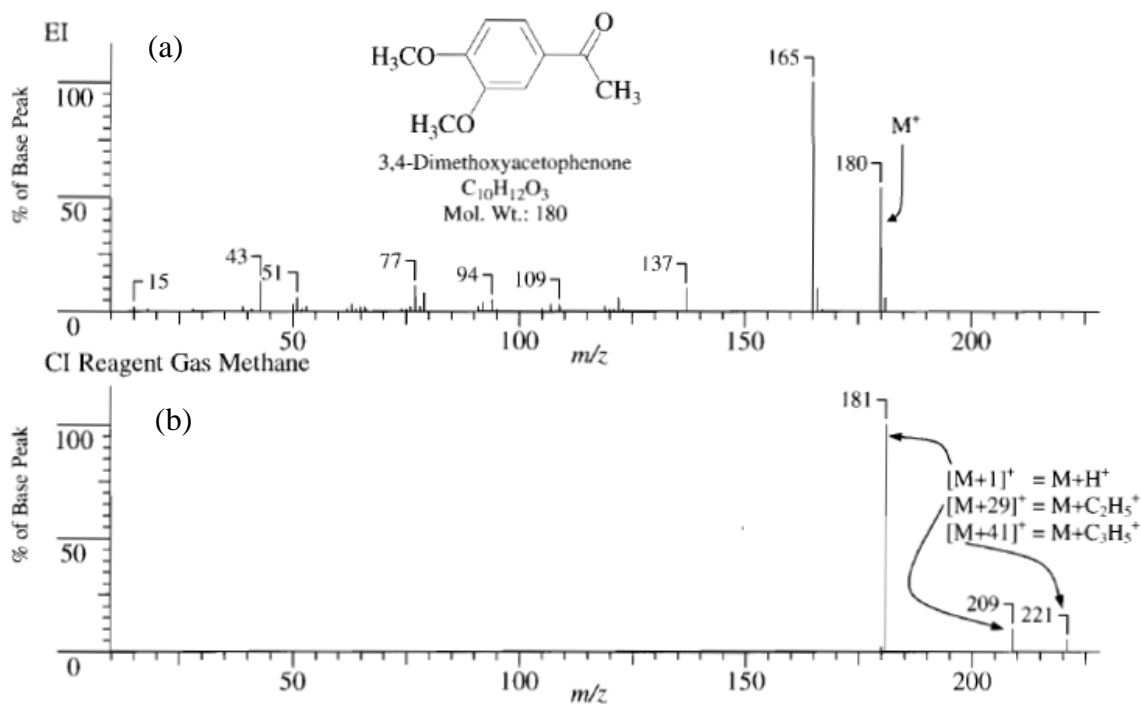
La ionización por impacto electrónico genera una fragmentación extensa impidiendo a veces la observación del ion molecular. Para evitar esto, se puede utilizar la ionización química, aquí la muestra ya no es ionizada directamente, sino que se usa un gas reactivo (usualmente metano, isobutano y amoníaco), el cual se ionizará primero para luego impactar con las moléculas de la muestra. El exceso de energía transferido a las moléculas de la muestra durante la ionización es menor a 5 eV, lo que implica mucho menos fragmentaciones a comparación del EI. Al haber menos fragmentaciones, aumenta la sensibilidad y la abundancia del ion molecular, sin embargo se pierde información sobre la estructura de la muestra (Silverstein et al., 2005).

En la Figura 6, se observa el espectro de masa EI de 3,4-dimetoxiacetofenona. Este presenta varios picos de fragmentación,

incluyendo el ion molecular  $m/z$  180. Para el caso del espectro de masa CI (gas reactivo, metano,  $\text{CH}_4$ ) del mismo compuesto, se puede observar el ion cuasi- molecular  $m/z$  181 como el pico base (100%) y otros dos picos  $m/z$  209 y  $m/z$  221, estos como resultados de la adición electrofílica de los carbocationes  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  y  $\text{C}_3\text{H}_3^+$ , respectivamente (Silverstein et al., 2005).

**Figura 6**

Espectro de masa por (a) EI y (b) CI de la 3,4-dimetoxiacetofenona.



Fuente: (Silverstein et al., 2005).

### ✓ Ionización por electrospray (ESI)

Se recomienda optar este tipo ionización cuando los compuestos a analizar presentan polaridad alta o moderada, pesos moleculares variables y varios sitios ionizables, como por ejemplo las proteínas.

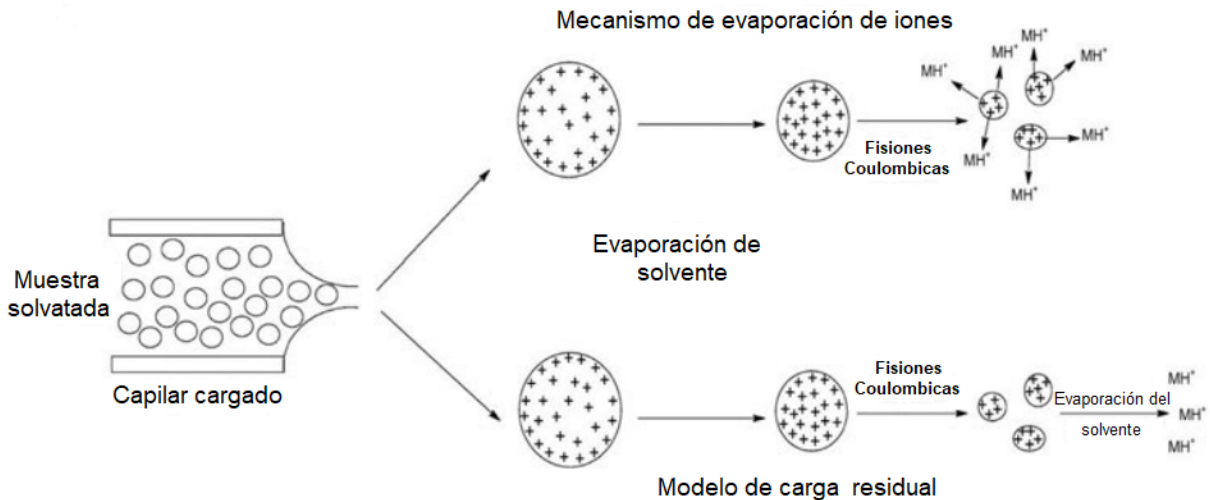
El método consiste en introducir la muestra en solución a un voltaje alto (3-6 kV) con un caudal de  $1\text{--}1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  dentro de una aguja/capilar de pulverización. Dependiendo del analito, el voltaje podría ser positivo o

negativo, el cual genera los iones mediante la nebulización de las gotitas cargadas que van desde la punta de la aguja hacia la atmósfera.

Se han propuesto dos tipos de mecanismos para la generación de iones: el mecanismo de evaporación de iones y el modelo de carga residual. El primero indica que los iones en fase gaseosa se liberan directamente de la superficie de las gotitas pequeñas formadas mediante las fisiones Coulómbicas, mientras que el modelo de carga residual indica que la generación de iones no se da por la liberación sino por la evaporación completa del solvente, siendo esto lo más probable que ocurra con una molécula grande (Awad et al., 2015). En la Figura 7, se muestra los dos tipos de mecanismos planteados.

**Figura 7**

Mecanismos de ionización propuestos durante la ionización por electrospray.



Fuente: (Awad et al., 2015).

### 2.3.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Al igual de la espectroscopía infrarroja (IR) y ultravioleta (UV), la resonancia magnética nuclear es una forma de espectroscopía. Por lo que, a determinadas condiciones, la muestra expuesta a un campo magnético absorbe

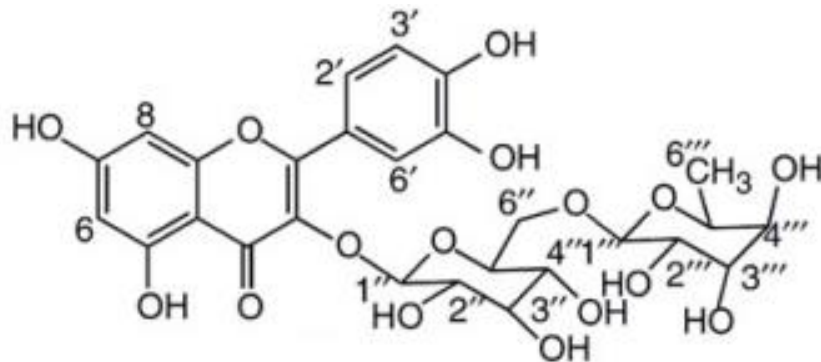
radiación electromagnética a ciertas frecuencias características de la misma muestra. El espectro muestra las frecuencias de absorción en el eje X y el pico de intensidad en el eje Y (Silverstein et al., 2005).

✓ **Resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H)**

Cuando los protones (núcleos de hidrógeno) de una muestra, son expuestos a un campo magnético externo, se generan dos niveles de energías ( $\alpha$  y  $\beta$ ). El nivel  $\alpha$  es el de menor energía y presenta un ligero excedente de protones, a los cuales se les puede aplicar un pulso de energía con un rango amplio de frecuencias, provocando que salten al nivel de mayor energía ( $\beta$ ), a esta transición se le denomina resonancia. Cuando los protones excitados regresan a su estado inicial liberan energía, la cual es recopilada por el detector del equipo y expresada en función de la frecuencia (Silverstein et al., 2005). El espectro obtenido después de análisis muestra señales que pueden ser asignados a determinados hidrógenos en de estructura de un compuesto Figura 8, como se observa en las Figura 9.

**Figura 8**

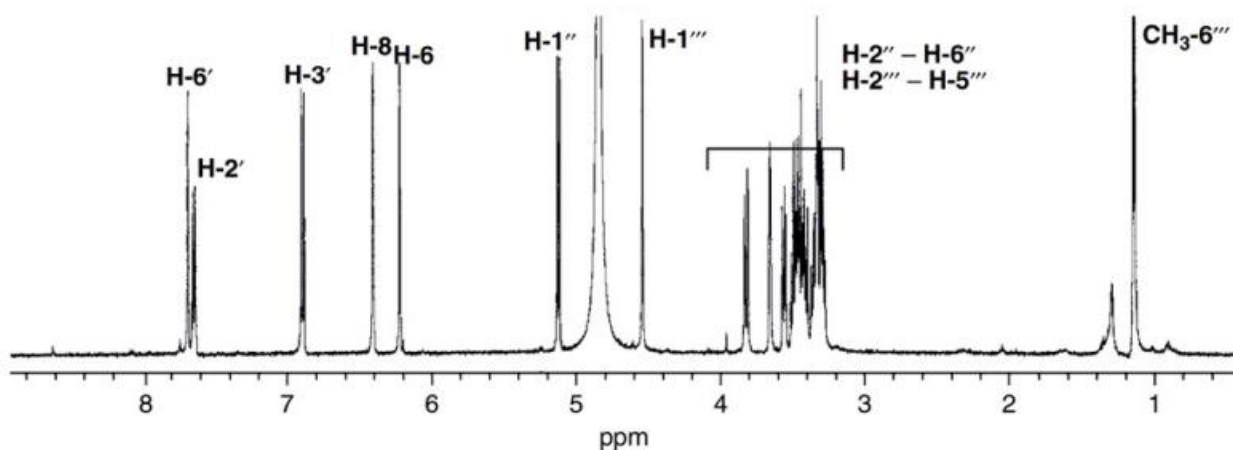
Estructura de la rutina (quercetina 3-O-rutinósido).



Fuente: (Sturm & Seger, 2012)

## Figura 9

Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la rutina en  $\text{CH}_3\text{OH}$ .



Fuente: (Sturm & Seger, 2012)

En la Figura 9 se puede observar los diferentes picos en el espectro RMN  $^1\text{H}$  de la rutina (quercetina 3-O-rutinósido), los desplazamientos ( $\delta_{\text{H}}$ , ppm) para cada hidrogeno son: 6,20 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-6); 6,39 (1H, d,  $J = 2,2$  Hz, H-8); 7,66 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-2'); 6,86 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-5'), 7,60 (1H, dd,  $J = 8,0/1,8$  Hz, H-6'), 5,09 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-1''); 3,25-3,47 (4H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 3,38 (1H, m, Ha-6''); 3,80 (1H, d,  $J = 10,5$  Hz, Hb-6''); 4,51 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-1'''); 3,63 (1H, dd,  $J = 3,5/1,5$  Hz, H-2'''); 3,53 (1H, dd,  $J = 9,5/3,5$  Hz, H-3'''); 3,28 (1H, m, H-4'''); 3,44 (1H, m, H-5'''); 1,11 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-6}'''$ ) (Güvenalp et al., 2006).

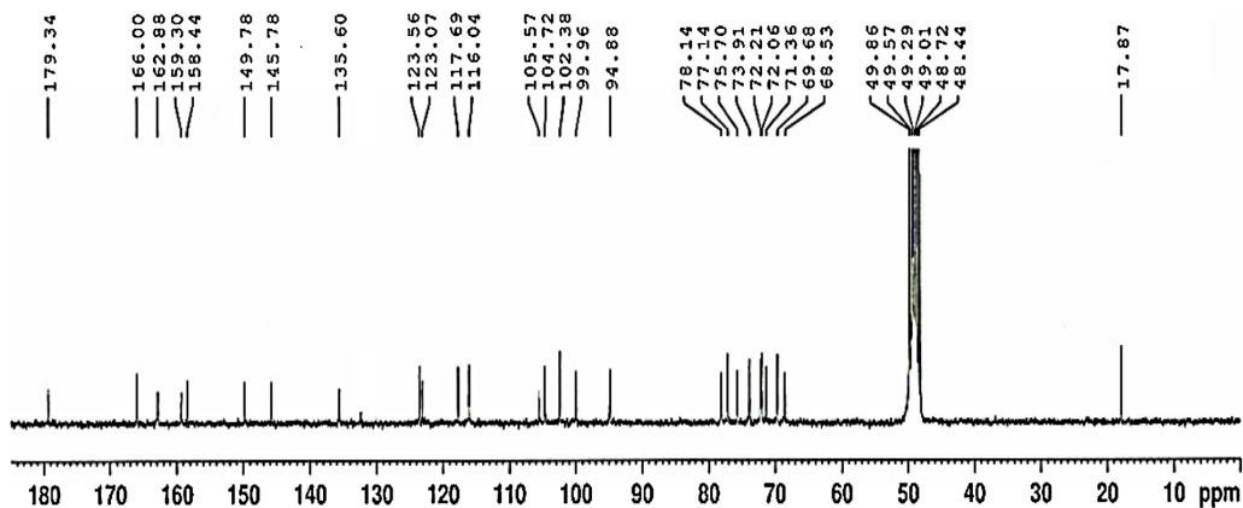
### ✓ Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ )

A diferencia del  $^1\text{H}$ , el núcleo del  $^{12}\text{C}$  no es magnéticamente activo, lo que significa que no puede ser detectado por el equipo de RMN. Es por esta razón que el RMN se realiza con respecto al núcleo del  $^{13}\text{C}$ . Sin embargo, la abundancia de este isotopo es solo el 1,1% del  $^{12}\text{C}$  y su sensibilidad es cerca de un 1,6% de con respecto al  $^1\text{H}$ , requiriendo así más tiempo para completar el análisis. Pese a todo esto, el RMN  $^{13}\text{C}$  es una herramienta muy útil al momento de analizar compuestos orgánicos, ya que el espectro tiene un

amplio rango de desplazamiento (220 ppm), lo que nos ayuda a intuir el entorno y grupos funcionales cerca a cada carbono; además nos da una idea del esqueleto de carbono que puede presentar el compuesto y finalmente el número de carbonos presentes en la molécula (Silverstein et al., 2005).

**Figura 10**

Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la rutina en  $\text{CH}_3\text{OH}$ .



Fuente: (Yingyuen et al., 2020)

En la Figura 10 se puede observar varias señales a diferentes desplazamientos ( $\delta_c$ , ppm), para el caso de la rutina, las señales RMN  $^{13}\text{C}$  son: 158,5 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 162,5 (C-5), 99,9 (C-6), 166,0 (C-7), 94,8 (C-8), 159,3 (C-9), 105,6 (C-10), 123,1 (C-1'), 117,7 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,1 (C-5'), 123,5 (C-6'), 104,7 (C-1''), 75,7 (C-2''), 77,2 (C-3''), 71,4 (C-4''), 78,1 (C-5''), 68,6 (C-6''), 102,4 (C-1'''), 72,0 (C-2'''), 72,2 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 69,7 (C-5'''), 17,9 (C-6''') (Güvenalp et al., 2006).

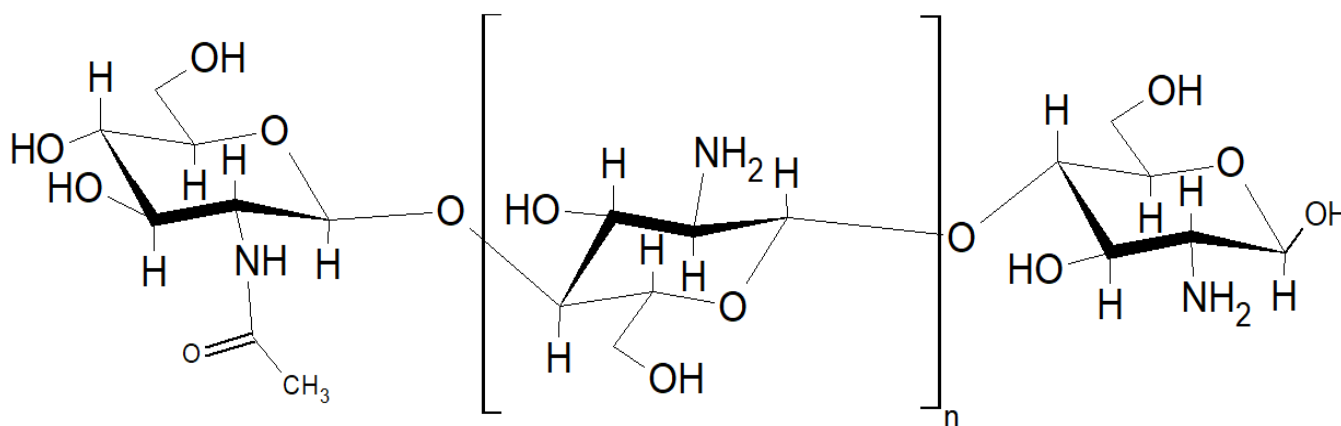
## 2.4. Nanopartículas de quitosano

### 2.4.1. Quitosano

El quitosano es un polisacárido de cadena larga y lineal compuesta por unidades enlazadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (ver Figura 11).

**Figura 11**

Estructura del biopolímero quitosano.



Gracias a sus propiedades de no toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, el quitosano presenta diversas aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales, agricultura, biomedicina, industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Este biopolímero puede ser utilizado mediante diversas formas, tales como: perlas, láminas, hidrogeles, nanopartículas, entre otros. Estudios indican que las nanopartículas presentan mayores ventajas sobre las microesferas debido a la variación de tamaño (Fan et al., 2012).

### 2.4.2. Preparación de nanopartículas

Existen varios métodos para la preparación de nanopartículas de quitosano mediante: emulsión, síntesis con alginato, micelar inverso y el más utilizado en la literatura, la gelación iónica (de Pinho Neves et al., 2014). Este

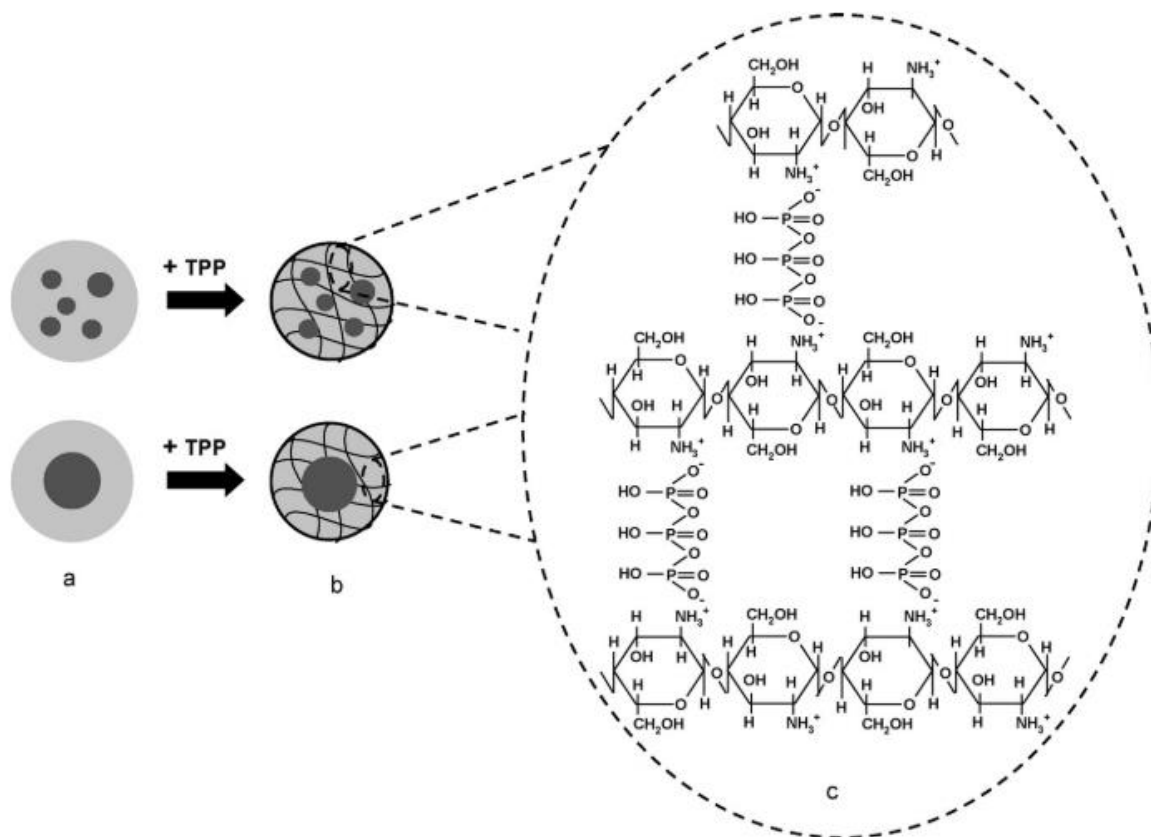
método tiene varias ventajas debido a que su proceso no es tóxico, controlable y libre de solventes orgánicos (Fan et al., 2012).

La gelación iónica consiste en aprovechar las interacciones iónicas entre la carga negativa del tripolifosfato (TPP) y la carga positiva del quitosano. (Fàbregas et al., 2013). Mediante esta interacción nos evitamos el uso de agentes entrecruzantes químicos (usualmente tóxicos) (Fan et al., 2012), favorece la formación de nanopartículas y además debido a su cristalinidad, densidad e hidrofilia puede proteger a los compuestos contra el calor o exposición a la luz, extendiendo aún más sus posibles aplicaciones en transporte y liberación de compuestos bioactivos tales como proteínas, vitaminas o minerales (Lamarra et al., 2016). En la Figura 12 se representa el cargado de un extracto de una planta dentro de nanopartículas de quitosano.



**Figura 12**

Representación del (a) extracto en gotas de quitosano, (b) partículas de quitosano cargadas con el extracto y (c) estructura química del quitosano reticulado iónicamente con TPP.



Fuente: (Keawchaon & Yoksan, 2011).

### 2.4.3. Caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas de quitosano pueden ser caracterizadas mediante diversas técnicas instrumentales, tales como dispersión de luz dinámica, potencial Z, espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido, entre otros.

#### ✓ Dispersión de luz dinámica (DLS)

El DLS (por sus iniciales en inglés, Dynamic Light Scattering) es una técnica que ha sido empleada en diversas disciplinas científicas debido a que

puede caracterizar el comportamiento hidrodinámico de difusión de las partículas en solución mediante la determinación de su tamaño y dispersión. (Stetefeld et al., 2016).

La dispersión de nanopartículas en suspensión está determinada por el índice de polidispersidad, el cual es un valor que va de 0 a 1. Cuando se tiene valores más cercanos a 0, indica que la dispersión es más homogénea, mientras que para valores superiores a 0,3 son considerados heterogéneos (L. Zhang & Kosaraju, 2007).

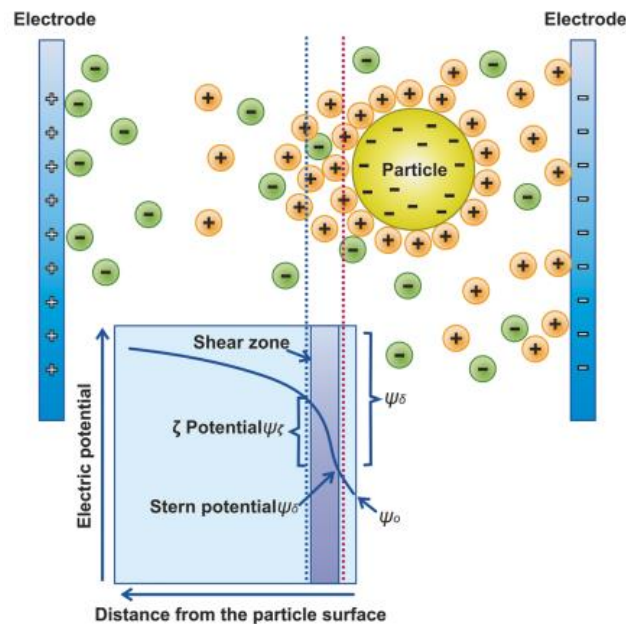
Para el caso de las nanopartículas quitosano – TPP, la dispersión y el tamaño de las partículas depende directamente del peso molecular, condiciones de mezclado (agitación o sonicación) y sobre todo de su concentración (a más concentración mayor el tamaño de nanopartícula formado). (Gan et al., 2005).

#### ✓ **Potencial Z (PZ)**

El potencial electrocinético o también conocido como potencial Z, es la diferencia de potencial entre la capa inmediatamente siguiente de la superficie de la partícula (Stern layer) y la capa dispersante alrededor de la partícula (Shear zone), tal como se muestra en la Figura 13 (Cano-Sarmiento et al., 2018). Matemáticamente se puede considerar que esta interacción electrostática se extiende hacia el infinito, pero experimentalmente solo se aprecia hasta pocos nanómetros desde la superficie de la nanopartícula. Además, el PZ usualmente es relacionado con la estabilidad coloidal, para el caso de nanopartículas cargadas con fármacos es usual usar la siguiente escala:  $\pm 0 - 10$  mV (altamente inestable),  $\pm 10 - 20$  mV (relativamente estable),  $\pm 20 - 30$  mV (moderadamente estable) y mayores  $\pm 30$  mV (altamente estable). (Bhattacharjee, 2016).

**Figura 13**

Representación de una partícula cargada negativamente señalando las distintas capas electrostáticas.



Fuente: (Cano-Sarmiento et al., 2018)

### ✓ Espectroscopía infrarroja (IR)

Dentro de todo el espectro electromagnético, se encuentra la radiación infrarroja ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ). Los compuestos orgánicos pueden absorber y convertir la radiación infrarroja en energía de vibración molecular. Las frecuencias o longitudes de onda de la radiación absorbida dependen de las constantes de enlace, la geometría y de las masas relativas de los átomos. La energía absorbida genera vibraciones de tensión y flexión, causando cambios rítmicos en el momento dipolar de la molécula. Estos cambios en el momento dipolar son detectados por el equipo de IR y representados en el espectro.

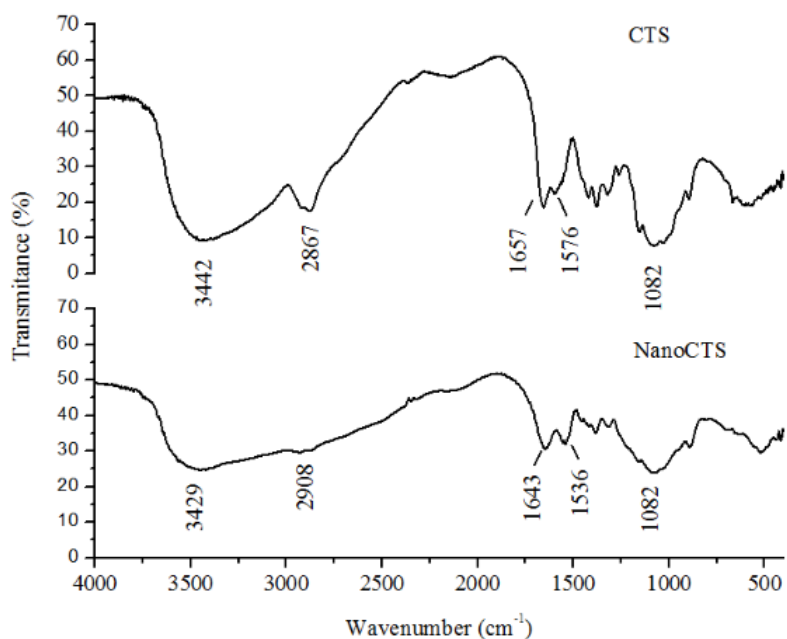
Cada compuesto presenta un único espectro IR característico, lo que permite identificar a un compuesto desconocido a través de la correlación “pico por pico” entre su espectro IR con otro ya estandarizado. Así mismo,

cada grupo funcional exhibe frecuencias de absorción muy similares sin importar el resto de la molécula, lo que proporciona al investigador información estructural de la muestra, indicando si están presentes o no dichos grupos funcionales en la estructura (Silverstein et al., 2005).

Mediante los espectros IR también se puede observar si una estructura ha sufrido algún cambio o si presenta interacción con otro compuesto. En la Figura 14 se muestran los espectros FTIR del quitosano y nanopartículas de quitosano. A pesar que ambos espectros son muy parecidos, se puede apreciar que las señales del espectro de las nanopartículas de quitosano han sufrido pequeñas variaciones con respecto al espectro del quitosano solo. Un ejemplo claro es el cambio de la banda 3442  $\text{cm}^{-1}$  (en el espectro del quitosano) a la banda 3429  $\text{cm}^{-1}$  (nanopartícula), lo cual indica una cantidad reducida de enlaces hidrógeno producto del entrecruzamiento con el TPP (de Pinho Neves et al., 2014).

**Figura 14**

Espectro FTIR de quitosano (CTS) y nanopartículas de quitosano (nanoCTS).



Fuente: (de Pinho Neves et al., 2014)

✓ **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El SEM (por las iniciales del inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica ampliamente usada en la investigación debido a que puede proporcionar imágenes de materiales orgánicas e inorgánicas a escala micro y nanométrica.

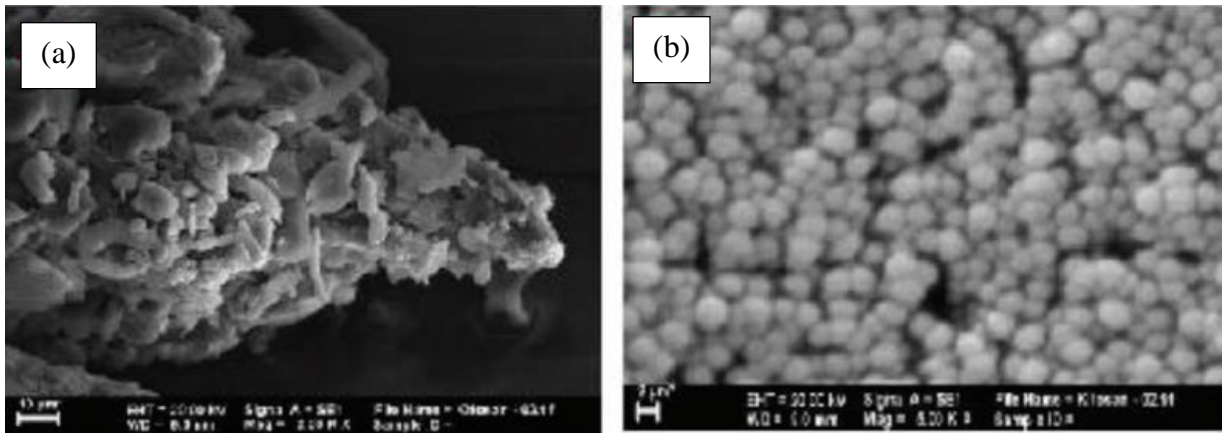
Esta técnica consiste básicamente en focalizar y hacer incidir un haz de electrones de alta energía (100 – 5000 eV) sobre la superficie de una muestra; en respuesta, la muestra escaneada emite electrones (conocidos como electrones secundarios y retrodispersados) que son detectados por el equipo. Esta señal eléctrica es registrada y traducida a valores de escala de grises, los cuales dependerán de la superficie. En las zonas con mayor presencia de electrones secundarios se representarán con un color blanco, mientras que con las de menor presencia, con un color oscuro o gris. De esta manera, se obtiene una imagen digital de la superficie de la muestra analizada.

La imagen obtenida mediante SEM proporciona información sobre la morfología superficial de la muestra (forma, tamaño y textura superficial), por lo que convierte a esta técnica en una de las más usadas al momento de caracterizar materiales como nanoalambres, nanobarras y nanopartículas (Clavijo, 2013; Klein et al., 2012; Mohammed & Abdullah, 2019).

En la Figura 15 se observa la diferencia en la morfología de las superficies entre el quitosano puro y las nanopartículas de quitosano. El quitosano puro presenta una superficie irregular mientras que las nanopartículas de quitosano muestran esferas formadas debido al procedimiento de preparación de gelificación iónica junto al tripolifosfato de sodio (TPP) (Wardani et al., 2018).

### Figura 15

Microscopía electrónica de barrido del (a) quitosano puro y (b) nanopartículas de quitosano.



Fuente: (Wardani et al., 2018)

## CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiales y reactivos

Los reactivos usados en las etapas de la investigación fueron: buffer de fosfato (PBS) 0,1 M a pH 6 en la determinación de la actividad antioxidante con el método electroquímico; 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de Aldrich para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método químico, quitosano de bajo peso molecular, tripolifosfato de sodio (TPP) de Aldrich para la preparación y cargados de las nanopartículas de quitosano; y solventes en general tales como etanol, ácido acético de grado analítico.

Entre los materiales usados en la experimentación fueron: columna cromatográfica para la separación líquido-líquido del EBO, refractarios para facilitar la elución de los solventes. Para las lecturas electroquímicas se usó una celda electroquímica (80 mL) de 5 bocas, un electrodo de referencia de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ , un electrodo de platino como contraelectrodo, y un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo. También se usó tubos de membrana porosa molecular Spectra/Por® (Spectrum Laboratories, Inc.).

Los equipos e instrumentos usados fueron: El potenciostato PalmSens (Palm Instruments BV) fue utilizado para las medidas electroquímicas. Las medidas espectrofotométricas UV-Vis fueron realizados en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. La centrifugación se realizó en la ultracentrífuga Centrifuge 5810R y las medidas de DLS y potencial Z en el NanoBrook 90 Plus (Brookhaven Instruments). Todos estos instrumentos están ubicados dentro de los Laboratorios del Grupo de Electroquímica Aplicada y Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. La identificación de los principios activos fue realizada en un cromatógrafo UHPLC modelo: Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific), ubicado en la Unidad de Investigación en Productos

Naturales de la Universidad Peruano Cayetano Heredia. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Ascend (11,75 T) Avance III HD 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) equipado con la criosonda Bruker CP TCI 500S1 H-C/N-D-05-Z, ubicado en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear CERMN – Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

### 3.2. Especie vegetal y pretratamiento

La muestra de *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (PS, chancapiedra) fue recolectada en el mes de enero del 2017 en la provincia de Maynas, Loreto-Perú; e identificada en el Herbario de Plantas Medicinales (HEPLAME) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La identificación botánica (ver Anexo N° 1) fue realizada por el biólogo Camilo Diaz Santibañez. Los resultados del estudio taxonómico se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Identificación taxonómica del *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster.

Características	Descripción
Nombre vernacular	Chancapiedra
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledónea)
Orden	MALPIGHIALES
Familia	PHYLLANTHACEAE (EUPHORBIACEAE)
Género	<i>Phyllanthus</i>
Especie	<i>Phyllanthus stipulatus</i> (Raf.) Webster

La muestra vegetal recolectada (hojas y tallos) se dejó secar a temperatura ambiente durante dos semanas. Luego esta muestra seca (6 kg), utilizando un Molinex, se trituró a grano fino obteniéndose así 5,44 kg de muestra molida del *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra).



### **3.3. Obtención de extractos y residuos de chancapiedra**

La obtención de los extractos fue realizada mediante el procedimiento expresado por (Fernandes Gusmão et al., 2013) con ciertas modificaciones.

#### **3.3.1. Extracción sólido-líquido: Obtención del EBO**

La extracción de la muestra seca de chancapiedra (5,44 kg) se realizó mediante un proceso de maceración con etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) a temperatura ambiente como se puede observar en la Figura 16.

La muestra seca de chancapiedra se dividió en porciones de 500 g, puestos en frascos ámbar de 2,5 L. El proceso de maceración se realizó por 3 veces consecutivas adicionando 1,5 L de etanol a cada frasco en cada maceración: la primera maceración fue durante 8 días, la segunda maceración durante 15 días y finalmente, la tercera maceración durante 25 días. Luego de los procesos de maceración, los extractos etanólicos se juntaron y filtraron por gravedad utilizando filtros de algodón farmacéutico. Después de obtener el filtrado, la solución total etanólica obtenida fue concentrada mediante un proceso de evaporación del solvente a temperatura ambiente. Al final de estos procesos, se obtuvo del extracto bruto orgánico (EBO).

#### **3.3.2. Extracción sólido-líquido: Obtención del EBA**

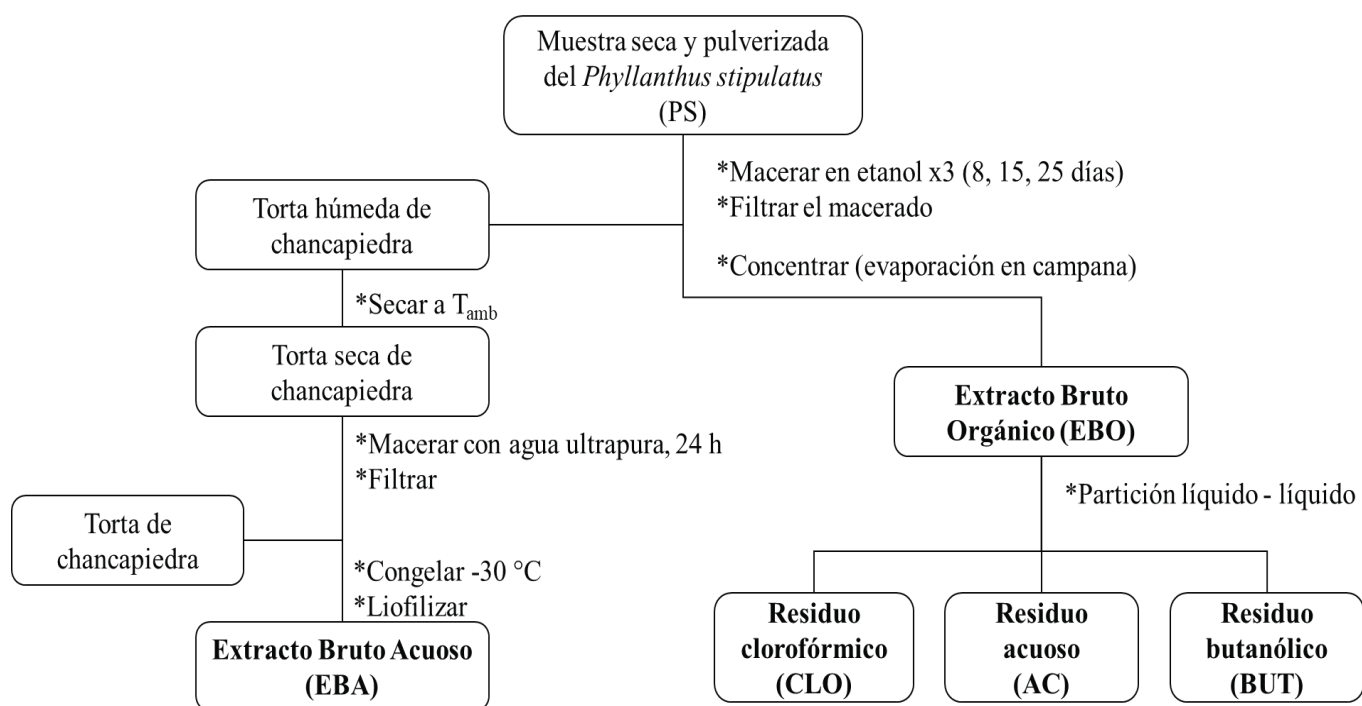
El extracto bruto acuoso (EBA) se obtuvo a partir de toda la torta residual (5,06 kg) proveniente del proceso de extracción del EBO como se puede observar en la Figura 16.

La torta residual se dejó al aire libre a fin de eliminar posibles restos de etanol. La torta seca se dividió en 20 porciones. El proceso de extracción de cada porción de la torta seca se realizó mediante la maceración con 500 mL agua ultrapura en un frasco transparente de vidrio durante un período de 24 horas a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se separó la fase acuosa de la fase

sólida mediante filtración al vacío. Todos los líquidos filtrados se mezclaron para obtener un solo extracto y se llevó a congelar a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser liofilizados, a fin de eliminar el solvente y de esta manera obtener el extracto bruto acuoso (EBA).

**Figura 16**

Diagrama de los procesos de obtención de los extractos EBO, EBA y residuos a partir de la especie chancapiedra.



### 3.3.3. Partición líquido-líquido del EBO

Los residuos clorofórmicos (CLO), acuoso (AC) y butanólico (BUT) se obtuvieron mediante una partición líquido-líquido del extracto bruto orgánico (150 g de EBO), ver Figura 17.

En un vaso de precipitado, el EBO se solubilizó con 600 mL de una mezcla de solventes metanol:cloroformo (1:5). Parte de la solución de EBO obtenida (300 mL) se colocó en una columna cromatográfica que inicialmente

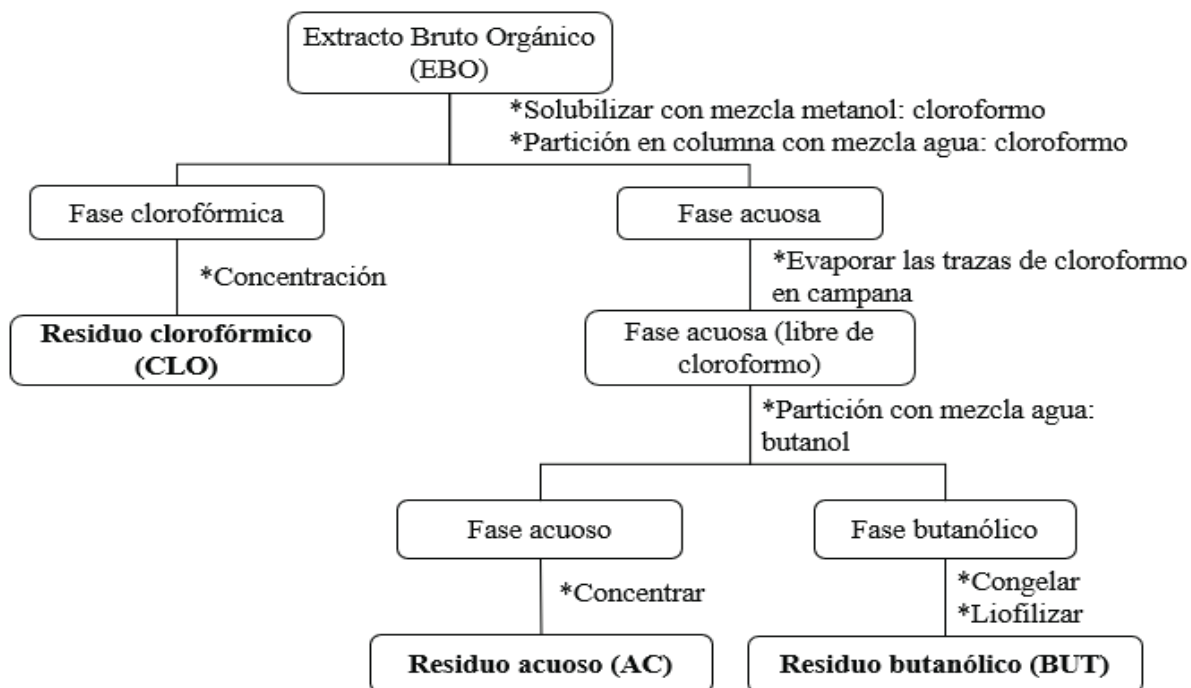
contenía 50 mL de agua ultrapura. Esta mezcla se agitó con una varilla de vidrio y luego se dejó en reposo para que se separen en dos fases (fase superior: acuoso, fase inferior: clorofórmico). Finalmente, luego de este proceso de partición, se retiró la fase clorofórmica. Sobre la fase acuosa que quedó en la columna se volvió a agregar el resto de la solución de EBO. Se agitó, se dejó en reposo la mezcla y nuevamente se separó la fase clorofórmica.

Las fases clorofórmicas obtenidas en la partición líquido-líquido fueron juntadas y llevadas a campana de extracción para la evaporación completa del solvente a temperatura ambiente. Luego de este proceso, se obtuvo el residuo clorofórmico (CLO).

Para obtener los residuos butanólicos (BUT) y acuoso (AC) se realizó el siguiente procedimiento: la fase acuosa obtenida en el proceso anterior fue llevado a la campana para la completa evaporación de residuos de cloroformo. Para realizar la partición líquido-líquido se procedió a añadir 200 mL de butanol a la columna cromatográfica seguida de la adición de toda la fase acuosa; luego se agitó la mezcla y se dejó en reposo hasta la formación de dos fases (fase superior: butanólico, fase inferior: acuoso). Luego de este proceso de partición, la fase butanólica fue separado de la fase acuosa. Finalmente, después de un proceso de evaporación del solvente de la fase butanólica, a temperatura ambiente, se obtuvo el residuo butanólico (BUT). El residuo acuoso (AC) se obtuvo luego de un proceso de liofilización a partir de la fase acuosa congelada a -30 °C.

**Figura 17**

Diagrama del proceso de partición líquido-líquido del EBO.



### 3.4. Evaluación de la actividad antioxidante

El poder antioxidante de los extractos y residuos obtenidos de la chancapiedra fueron evaluados siguiendo dos métodos: químico y electroquímico. Con la comparación de estos dos métodos se podrá obtener el extracto y residuo con mayor actividad antioxidante y así ser seleccionados para el cargado en nanopartículas de quitosano.

#### 3.4.1. Método químico

La evaluación de la actividad antioxidante fue realizada utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). La prueba fue llevada a cabo de acuerdo con el procedimiento presentado por Hara et al., 2018 pero con ligeras modificaciones. Este método consiste en disolver 5 mg de extractos o residuos (muestras de EBO, EBA, CLO, BUT y AC) en 50 mL de etanol, obteniendo así una solución patrón de concentración de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . De manera similar, se prepararon las soluciones patrón de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ácido gálico y de DPPH.

A partir de las soluciones obtenidas se prepararon soluciones (muestra y estándar) con concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , tal como se indican en las Tablas 3, 4 y 5.

**Tabla 3**

Preparación de soluciones de muestras y estándar a 10 y 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Muestra	Código	Concentración ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Solución patrón ( $\mu\text{L}$ )	Etanol ( $\mu\text{L}$ )
DPPH		-----	-----	1250
Ácido gálico	AG10	10	175	1075
	AG50	50	875	375
Muestra	M10	10	175	1075
	M50	50	875	375

Estas soluciones se prepararon por duplicado, pues uno de ellos se utilizó como blanco y el otro para la reacción contra el DPPH.

**Tabla 4**

Preparación de los blancos (muestra y estándar) a 10 y 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Blancos	Código	Concentración ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Etanol ( $\mu\text{L}$ )
Ácido gálico	BAG10	10	500
	BAG50	50	500
Muestra	BM10	10	500
	BM50	50	500

**Tabla 5**

Adición de DPPH para muestras y estándar a 10 y 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Reacción	Código	Concentración ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	DPPH ( $\mu\text{L}$ )
DPPH	DPPH	-----	500
Ácido gálico	AG10	10	500
	AG50	50	500
Muestra	M10	10	500
	M50	50	500

Después de agregar el etanol o el DPPH, las soluciones se mantuvieron dentro de una caja oscura a fin de evitar el contacto con la luz. Al cabo de 30 minutos se procedió a medir la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro UV- visible.

El porcentaje de la actividad antioxidante (% AA) se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% AA = 100 - \left\{ \frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_{control}} \right\}$$

donde,

% AA : Porcentaje de actividad antioxidante.

$A_m$  : Absorbancia de la muestra con DPPH.

$A_b$  : Absorbancia del blanco de la muestra.

$A_{control}$  : Absorbancia del reactivo DPPH.

La relación  $(A_m - A_b) / A_{control}$  nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra.

### 3.4.2. Método electroquímico

Para los ensayos electroquímicos (voltamperometría) se siguió el procedimiento presentado por (Carneiro et al., 2018) pero con ciertas modificaciones. Primero se prepararon soluciones de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de los extractos o residuos obtenidos (EBO, EBA, CLO, BUT y AC). El blanco fue una solución de 35 mL de etanol y 35 mL de buffer de fosfatos (PBS) 0,1 M a pH 6.

Para las medidas electroquímicas, a la mezcla de 35 mL de etanol y 35 mL de PSB se agregó de forma gradual de 1 a 5 mL de las soluciones de los

extractos o residuos preparados. Después de la adición de cada mililitro de las muestras, se agitó y se dejó en burbujeo con N<sub>2</sub> durante 3 minutos.

Para este estudio se emplearon tres técnicas voltamperométricas: la voltamperometría cíclica (VC), voltamperometría de pulso diferencial (DPV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV), bajo las condiciones de operación indicadas en las Tablas 6, 7 y 8.

**Tabla 6**

Parámetros de operación para la voltamperometría cíclica (VC).

Parámetro	Valores
Tiempo de estabilización	10 s
Rango	-1,5 a 1,5 V
Potencial de paso	0,005 V
Velocidad de barrido	0,025 V.s <sup>-1</sup>
Ciclos	3

**Tabla 7**

Parámetros de operación para la voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

Parámetro	Valores
Tiempo de estabilización	10 s
Rango	0 a 1,0 V
Potencial de paso	0,002 V
Potencial de pulso	0,05 V
Tiempo de pulso	0,05 V
Velocidad de barrido	0,01 V.s <sup>-1</sup>

**Tabla 8**

Parámetros de operación para la voltamperometría de onda cuadrada (SWV).

Parámetro	Valores
Tiempo de estabilización	10 s
Rango	0 a 1,0 V
Potencial de paso	0,002 V
Amplitud	0,05 V
Frecuencia	10 Hz

### 3.5. Identificación espectroscópica de los principios activos del EBO y BUT

Los metabolitos presentes en los extractos y residuos obtenidos de la chancapiedra fueron identificados mediante la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas y resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13.

#### 3.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

Para este análisis se utilizó el cromatógrafo UHPLC modelo: Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific), volumen de inyección: 2  $\mu$ L, columna: Luna<sup>®</sup> Omega C18 100 Å, Phenomenex (150 x 2,1 mm, 1,6 $\mu$ m), temperatura de columna: 40 °C y flujo: 0,25 mL/min. Los eluyentes fueron A: 0,1% de HCOOH en agua, B: 1% de HCOOH en acetonitrilo (ver Tabla 9).

**Tabla 9**

Gradiente de los eluyentes A y B utilizados en el HPLC.

Tiempo (min)	A	B
0	90	10
1	90	10
30	0	100
32	0	100
34	90	10
40	90	10



Para el análisis de masas se usó un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific) con los siguientes parámetros: **Scan Full MS:** Rango, 120 - 1500 m/z; resolución, 35 000; microscans, 1; AGC target, 5 x 10<sup>6</sup>; máximo IT, 80 ms. **Parámetros MS2:** Resolución, 17 500; AGC target, 1 x 10<sup>6</sup>; máximo IT, 100 ms. **Parámetros de fuente de ionización:** Fuente y modo de ionización, ESI (positivo y negativo); voltaje de spray: 3,2 / 2,5 kV; temperatura de capilar, 300 °C/250 °C; gas móvil, N<sub>2</sub> (Caudal de gas envolvente: 50, flujo de gas de barrido: 1); temperatura del calentador de gas, 400 °C; nivel S-Lens RF, 100; energía de colisión normalizada: 35,45.

### **3.5.2. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)**

El análisis de RMN fue realizado utilizando un espectrómetro Bruker Ascend (11,75 T) Avance III HD 500 MHz (<sup>1</sup>H) y 125,75 MHz (<sup>13</sup>C) equipado con la criosonda Bruker CP TCI 500S1 H-C/N-D-05-Z. Las muestras EBO y BUT fueron disueltas en metanol y DMSO, respectivamente.

## **3.6. Obtención de nanopartículas de quitosano**

La preparación de las nanopartículas de quitosano fue llevada a cabo mediante el procedimiento de gelación iónica realizado por Ing et al., 2012 pero con ciertas modificaciones.

### **3.6.1. Preparación de nanopartículas de quitosano sin cargado**

Se dejó disolviendo 32 mg de quitosano en 32 mL de buffer ácido acético/acetato de sodio a pH 4,7 por 24 horas, para así obtener una solución de quitosano de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de concentración. Después de ese tiempo, se agitó la solución de quitosano a 700 rpm mientras se le agregaba, mediante goteo lento, 8 mL de solución acuosa de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de tripolifosfato de sodio (TPP). Luego de la adición completa del TPP, la solución se mantuvo en agitación durante 1 hora para asegurar el entrecruzamiento y obtener así las nanopartículas de quitosano.

### **3.6.2. Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con EBO y BUT (Cs-EBO y Cs-BUT)**

El procedimiento para obtener las nanopartículas cargadas fue similar a lo descrito en la sección 3.6.1, con la diferencia que los 8 mL de TPP fueron mezclados con 8 mL de solución de los extractos (EBO y BUT;  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de chancapiedra, previo al goteo. Para separar las impurezas o extracto que no haya sido cargado, las nanopartículas cargadas (Cs-EBO y Cs-BUT) fueron puestas a diálisis en 300 mL de agua ultrapura durante 20 horas. Luego de esto se determinó la eficiencia de cargado (EC) y actividad antioxidante de las nanopartículas obtenidas.

### **3.6.3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de quitosano**

El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial Z de las nanopartículas en suspensión del Cs, Cs-EBO y Cs-BUT fueron medidas mediante DLS (Dynamic Light Scattering) en el equipo NanoBrook 90 Plus (Brookhaven Instruments).

La espectroscopía infrarroja fue realizada con las nanopartículas de quitosano liofilizadas. La técnica usada fue Reflectancia Total Atenuada (ATR) en el espectrofotómetro Shimadzu Prestige IR21, con un rango de  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ .

Para el estudio de la morfología de las nanopartículas, se secó a temperatura ambiente una gota de las nanopartículas en suspensión sobre una placa de vidrio cubierta por una cinta de carbono. Este estudio se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

### **3.7. Determinación de la eficiencia de cargado (EC) de las nanopartículas de quitosano**

La eficiencia de cargado de las nanopartículas de quitosano se realizó utilizando medidas espectrofotométricas UV-Vis. Luego de las 20 horas de diálisis mencionadas

en la sección 3.6.2, se calculó la cantidad (mg) de muestra (EBO o BUT) contenida en el agua de diálisis mediante una curva de calibración (ver Anexo N° 2 y Anexo N° 3). Esta masa representa la cantidad de muestra no cargada por las nanopartículas. El cálculo del EC se realizó, a partir de 8 mg de muestra añadida, mediante la siguiente fórmula:

$$\%EC = \frac{\text{masa de muestra añadida} - \text{masa de muestra no cargada}}{\text{masa de muestra añadida}} \times 100$$

### **3.8. Estudio de la liberación controlada de Cs-EBO y Cs-BUT**

El estudio de liberación controlada de las nanopartículas cargadas con EBO y BUT fueron realizados mediante diálisis, según el procedimiento realizado por Finotelli et al., 2010. El proceso de liberación se realizó de la siguiente manera: 10 mL de las nanopartículas de quitosano cargadas con EBO (Cs-EBO) fueron colocadas dentro en una membrana de diálisis (corte de peso molecular 12.4 kDa). Luego, la membrana fue sellada y puesta dentro de 150 mL de agua ultrapura a temperatura ambiente con agitación horizontal constante 100 rpm. A determinados intervalos de tiempos, se tomó 2 mL del medio acuoso y luego se midió su absorbancia con el fin de determinar la cantidad de muestra liberada a un tiempo determinado. Las pruebas de liberación controlada del Cs-BUT fue desarrollado de manera similar que las indicadas para el Cs-EBO.

### **3.9. Evaluación de la actividad antioxidante de Cs-EBO y Cs-BUT**

La evaluación de la actividad antioxidante de las nanopartículas sin cargado y cargadas con EBO y BUT fue realizado acorde con el procedimiento presentado por Y. Zhang et al., 2008. Brevemente, se mezcló 1 ml de solución de DPPH (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) con 1 mL de las nanopartículas sin cargado, Cs-EBO, Cs-BUT, y las soluciones de los extractos (EBO y BUT; 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Luego de 30 min se midió la absorbancia a 517 nm de todas las soluciones incluyendo la solución sola de DPPH.

El porcentaje de la actividad antioxidante (% AA) se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%AA = \left( \frac{A_{control} - A_m}{A_{control}} \right) \times 100$$

donde,

% AA : Porcentaje de actividad antioxidante.

$A_m$  : Absorbancia de la muestra con DPPH.

$A_{control}$  : Absorbancia del reactivo DPPH.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Obtención de los extractos EBO y EBA de la chancapiedra

Después de realizar los procesos de maceración con etanol ( $C_2H_5OH$ ) y agua ( $H_2O$ ) a partir de 5,44 kg de la especie de *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster, conocido comúnmente como chancapiedra, se obtuvieron 277,24 g del extracto bruto orgánico (EBO, sólido pastoso de color verde oscuro) y 251,32 g del extracto bruto acuoso (EBA, sólido de color marrón claro). En estos procesos, se obtuvieron un rendimiento de extracción de 5,10% para el EBO y 4,62% para el EBA, los cuáles son coherente con la literatura (Sen & Batra, 2013).

El proceso de extracción se pudo llevar a cabo debido a la presencia de compuestos polifenólicos en la muestra chancapiedra, los cuales son afines a los solventes polares (etanol y agua) utilizados en la extracción. Los compuestos polifenólicos poseen gran poder antioxidante y estos son necesarios para biodirigir esta investigación (Laczkowski et al., 2018; Sen & Batra, 2013).

### 4.2. Partición líquido-líquido del EBO

La partición líquido-líquido del extracto etanólico se realizó en una columna cromatográfica, donde se observó la separación en dos fases debido a la diferencia de polaridad de los solventes utilizados.

En la primera partición, se utilizó una mezcla de cloroformo ( $CHCl_3$ ) y agua ( $H_2O$ ). La fase clorofórmica (fase inferior) arrastró todos los componentes apolares del EBO y en la fase acuosa (fase superior incluyendo al metanol usado para disolver el EBO) se quedaron los compuestos de mediana y alta polaridad. Luego de evaporar el solvente de la fase clorofórmica, se obtuvo 52 g de residuo clorofórmico (CLO, sólido pastoso de color verde oscuro). Para realizar la segunda partición, se adicionó butanol ( $C_4H_9OH$ , solvente de polaridad media) a la fase acuosa. En la columna se formó dos fases: la fase butanólica (fase superior) contenía a los componentes de mediana

polaridad, mientras que los componentes más polares se quedaron en la fase acuosa (Muñoz et al., 2015). Al evaporar el solvente de la fase butanólica obtuvo 9,09 g de residuo butanólico (BUT, sólido de color marrón), y luego de liofilizar la fase acuosa se obtuvo 50,41g del residuo acuoso (AC, sólido de color marrón).

### **4.3. Evaluación de la actividad antioxidante**

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos EBO y EBA y de los residuos CLO, BUT y AC se realizaron mediante el método químico y electroquímico.

#### **4.3.1. Método químico**

La actividad antioxidante de los extractos y residuos de especies vegetales depende de factores estructurales como: número de grupos fenólicos, grupo catecólicos, grupos hidroxilos o metoxilos, grupos ceto o grupos carboxílicos libres presentes en flavonas, taninos y flavonoides, principalmente. (Sen & Batra, 2013). De estos fitocompuestos indicados, los más conocidos por su actividad antioxidante son los flavonoides, que debido a su polaridad estarán presentes en los extractos butanólicos y acuosos (Mercado-Mercado et al., 2013).

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos EBO, EBA y los residuos CLO, BUT y AC obtenidos de la chancapiedra se realizó utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla 10, en la cual se observa que el EBO presenta una mayor actividad antioxidante (79,15 %) respecto al EBA (31,16 %) a la concentración de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esto se debe a la presencia de grupos fenólicos y catecólicos capaces de neutralizar a los radicales de DPPH. Asimismo, comparando los residuos obtenidos a partir de EBO de la chancapiedra, se observa que el BUT presentó mayor actividad antioxidante (92,95 %) en cual es comparable con el ácido gálico utilizado como estándar con buena capacidad antioxidante debido a la presencia de grupos catecólicos.

**Tabla 10**

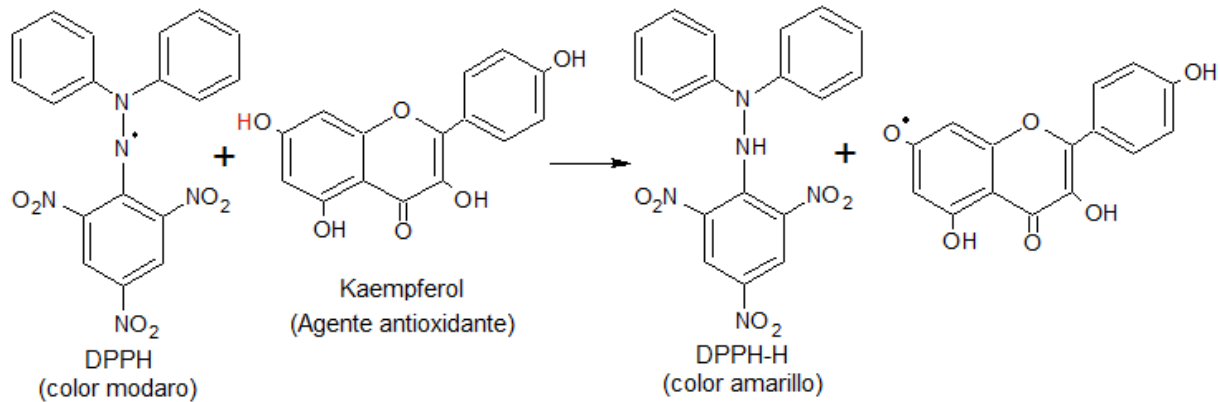
Porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de los extractos, residuos y el ácido gálico.

Muestra	%AA	
	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
EBO	79,15 $\pm$ 6,09	95,03 $\pm$ 2,03
EBA	31,16 $\pm$ 2,09	92,99 $\pm$ 0,78
CLO	12,51 $\pm$ 4,17	56,62 $\pm$ 2,24
BUT	92,95 $\pm$ 2,14	98,20 $\pm$ 2,99
AC	91,58 $\pm$ 1,03	96,08 $\pm$ 1,55
Ácido gálico	95,84 $\pm$ 0,91	95,80 $\pm$ 1,25

La alta actividad antioxidante del EBO y BUT se debe a la presencia de diversos fitocompuestos capaces de neutralizar a la especie radicalaria DPPH, tal como se muestra en la Figura 18.

**Figura 18**

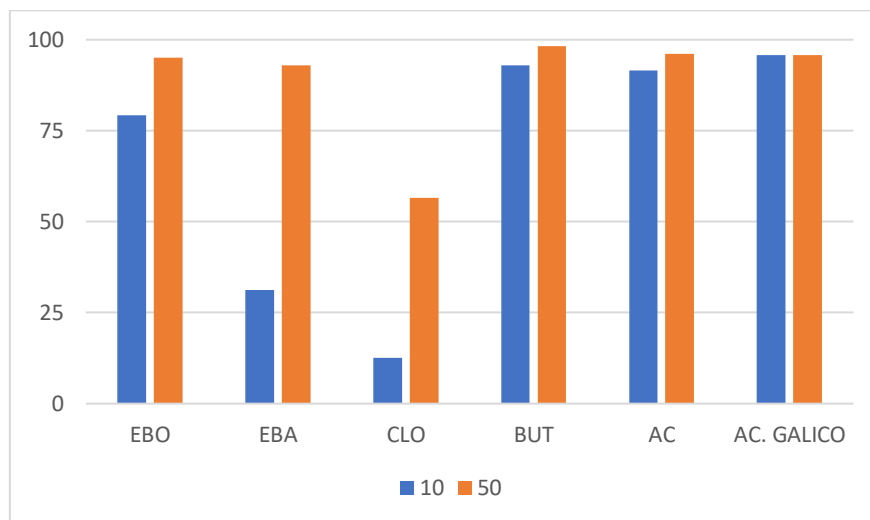
Reacción entre el radical DPPH y un agente antioxidante.



La Figura 19 muestra el diagrama de barras de la actividad antioxidante de los extractos (EBO y EBA), los residuos (CLO, BUT y AC) y del estándar ácido gálico. A partir de este diagrama se puede observar que los extractos y residuos polares (EBO y BUT) presentan mayor actividad antioxidante.

**Figura 19**

Diagrama de barras de actividad antioxidante de los extractos, residuos y ácido gálico a concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



#### 4.3.2. Método electroquímico

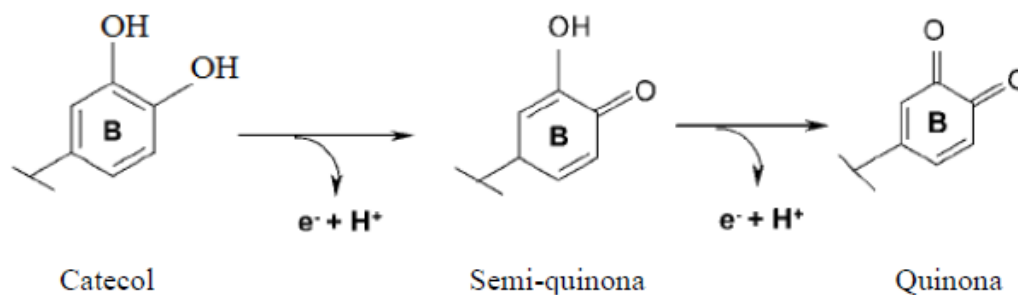
Los compuestos antioxidantes actúan como agentes reductores, lo que significa que entre más bajo sus potenciales de oxidación presentarán mejor actividad antioxidante (Blasco et al., 2004), mostrando un carácter donador de electrones (de Macêdo et al., 2017). Estos potenciales pueden ser detectados mediante técnicas voltamperométricas y luego, a partir de estos poder determinar la actividad antioxidante de dichos compuestos.

La capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos se debe a que, por ejemplo, el grupo catecol de anillo B se oxida a potenciales positivos muy bajos, generando grupos quinonas, tal como se muestra en la Figura 20 (González Fuentes, 2009).



**Figura 20**

Mecanismo de oxidación de compuestos catecólicos.



Fuente: (González Fuentes, 2009).

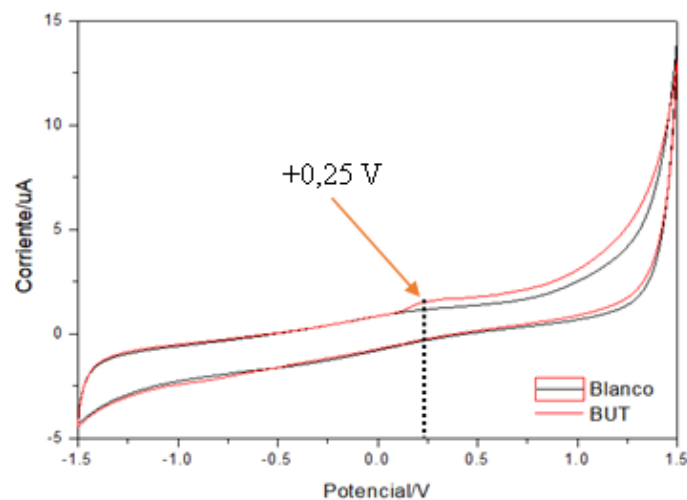
Entre las técnicas voltamperométricas más estudiadas se encuentran la voltamperometría cíclica, voltamperometría del pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada.

✓ **Voltamperometría cíclica (VC)**

Utilizando un sistema de tres electrodos dentro de una celda electroquímica, y con ayuda de un potenciostato, se aplicó la técnica de voltamperometría cíclica a los extractos (EBO y EBA) y a los residuos (BUT, CLO y AC). Como resultados se obtuvieron los voltamperogramas, donde se muestran los picos de oxidación de las muestras. En la Figura 21 se presenta el VC del BUT obtenido a partir del EBO de la chancapiedra, donde se observa un pico de oxidación a +0,25 V.

**Figura 21**

Voltamperometría cíclica del residuo butanólico (BUT).



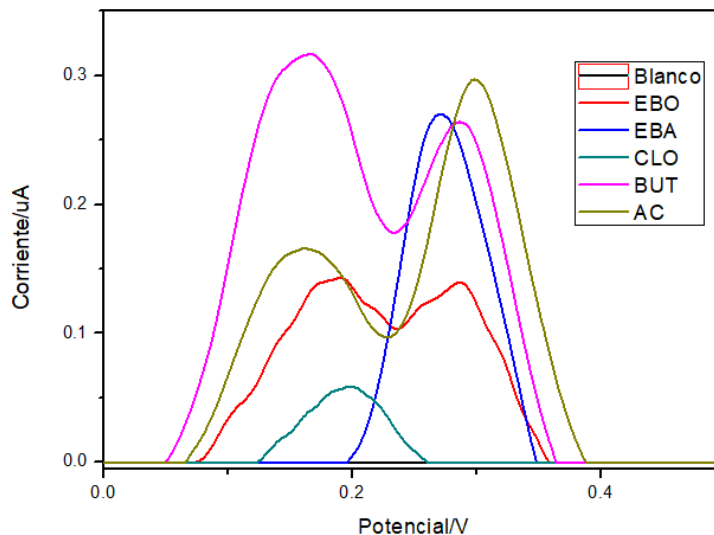
La voltamperometría cíclica realizada muestra pequeñas diferencias entre los picos de oxidación de las muestras (extractos y residuos) y las lecturas del blanco (lectura sin muestras), ya que esta técnica no es muy sensible para las cantidades de muestras usadas en el procedimiento. Por lo tanto, no fue posible calcular los índices electroquímicos, los cuales están relacionados a la actividad antioxidante de las muestras (Carneiro et al., 2018). Debido a lo mencionado, fue necesario aplicar otras técnicas voltamperométricas.

✓ **Voltamperometría de pulso diferencial (DPV)**

Mediante la voltamperometría cíclica, se pudo observar la presencia de picos de oxidación positivos. Debido a esto, se optó en realizar las medidas de voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) a potenciales mayores a 0 V. La línea base y los datos fueron tratados mediante el programa Origin 8 (Figura 22). En la Tabla 11 se señalan los parámetros (corriente y potencial de cada pico) obtenidos a partir del DPV de las muestras (extractos y residuos) de chancapiedra.

**Figura 22**

Voltamperogramas de pulso diferencial de los extractos y residuos en etanol: buffer PBS a pH= 6 (1:1) a  $v= 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



En la Figura 22 se puede observar que el residuo BUT presenta mayor corriente de pico, mientras que el residuo CLO tiene muy baja corriente debido a su poca capacidad redox. Este comportamiento está asociado a que el residuo CLO presenta muy pocos compuestos polifenólicos. (Bara et al., 2008).

**Tabla 11**

Picos de oxidación y los índices electroquímicos obtenidos a partir de los DPV de los extractos y residuos.

Extractos y residuos	Pico de oxidación 1		Pico de oxidación 2		Índice electroquímico ( $\mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}$ )
	$E_{\text{pa1}}$ (V)	$I_{\text{pa1}}$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_{\text{pa2}}$ (V)	$I_{\text{pa2}}$ ( $\mu\text{A}$ )	
<b>EBO</b>	0,19	0,143	0,29	0,140	<b>1,24</b>
EBA	0,27	0,270	--	--	1,00
CLO	0,20	0,059	--	--	0,30
<b>BUT</b>	0,17	0,317	0,29	0,264	<b>2,83</b>
AC	0,16	0,166	0,30	0,297	2,02

El índice electroquímico (EI) fue calculado utilizando los valores del potencial ( $E_{pa}$ ) y corriente ( $I_{pa}$ ) de cada pico anódico y reemplazándolos en la fórmula presentada por (Carneiro et al., 2018):

$$EI = \left( \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} \right) + \left( \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} \right) + \dots + \left( \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \right)$$

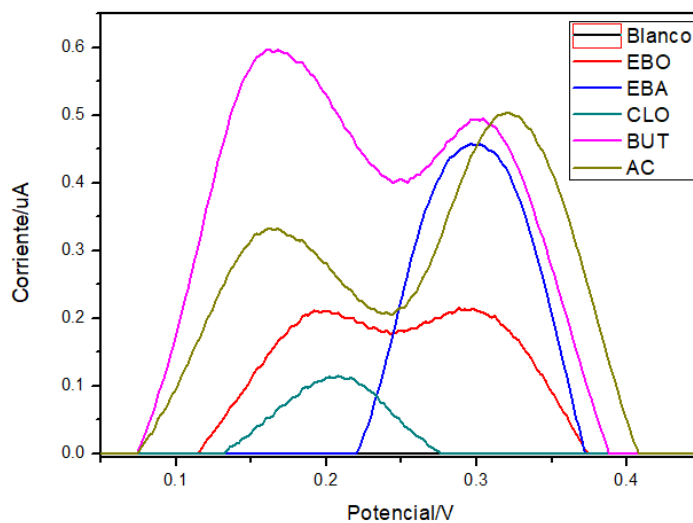
Los valores de los índices electroquímicos calculados confirman que las muestras con mayor actividad antioxidante fueron: el EBO (entre los extractos) con un EI de  $1,24 \mu A.V^{-1}$  y el BUT (entre los residuos) con un EI de  $2,83 \mu A.V^{-1}$ .

#### ✓ Voltamperometría de onda cuadrada (SWV)

Al igual que en la técnica anterior, la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) fue realizada a potenciales positivos. La línea base y los datos fueron tratados mediante el programa Origin 8 (Figura 23). Los parámetros (corriente y potencial de cada pico) obtenidos a partir del SWV de las muestras son presentados en la Tabla 12.

**Figura 23**

Voltamperogramas de onda cuadrada de los extractos y residuos en etanol: buffer PBS pH= 6 (1:1).



**Tabla 12**

Picos de oxidación y los índices electroquímicos obtenidos a partir de los SWV de los extractos y residuos.

Extractos y residuos	Pico de oxidación 1		Pico de oxidación 2		Índice electroquímico ( $\mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}$ )
	$E_{\text{pa1}}$ (V)	$I_{\text{pa1}}$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_{\text{pa2}}$ (V)	$I_{\text{pa2}}$ ( $\mu\text{A}$ )	
<b>EBO</b>	0,19	0,212	0,30	0,214	<b>1,82</b>
EBA	0,30	0,458	--	--	1,55
CLO	0,21	0,115	--	--	0,55
<b>BUT</b>	0,16	0,598	0,30	0,495	<b>5,32</b>
AC	0,16	0,333	0,32	0,504	3,62

Como se puede observar, en la Figura 23, el residuo clorofórmico (CLO) al igual que en las técnicas anteriores, presentó un pico de oxidación muy baja debido principalmente a que el CLO está constituido por los compuestos más apolares del EBO (sección 4.2). Esto indica, que le residuo CLO contiene pocos compuestos polifenólicos o grupos antioxidantes que puedan dar una señal en las técnicas electroquímicas.

Los resultados obtenidos en las pruebas electroquímicas concuerdan con los reportados por (Bara et al., 2008), quienes señalaron que las especies vegetales: *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng* y *Hypericum perforatum* presentaron altos índices electroquímicos (4,75; 4,00 y 3,97  $\mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}$ , respectivamente) debido a la presencia de compuestos polifenólicos, principalmente por flavonoides. Además, Carneiro et al., 2018, señalan que se guarda relación entre los índices electroquímicos y los porcentajes de actividad antioxidante (%AA) obtenidos en la prueba de DPPH (sección 4.3.1), tal como se puede observar en la Tabla 13. Se muestran que el EBO (para el caso de los extractos) y BUT (para los residuos) presentan una mayor actividad antioxidante, razón por la cual fueron seleccionadas para los siguientes procedimientos de esta investigación.

**Tabla 13**

Comparación de los resultados obtenidos con el ensayo DPPH y las técnicas electroquímicas.

Extractos y residuos	DPPH (%)		Índice electroquímico ( $\mu\text{A.V}^{-1}$ )	
	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	DPV	SWV
<b>EBO</b>	<b>79,15</b>	<b>95,03</b>	<b>1,24</b>	<b>1,82</b>
EBA	31,16	92,99	1,00	1,55
CLO	12,51	56,62	0,30	0,55
<b>BUT</b>	<b>92,95</b>	<b>98,20</b>	<b>2,83</b>	<b>5,32</b>
AC	91,58	96,08	2,02	3,62

#### 4.4. Identificación espectroscópica de los principios activos del EBO y BUT

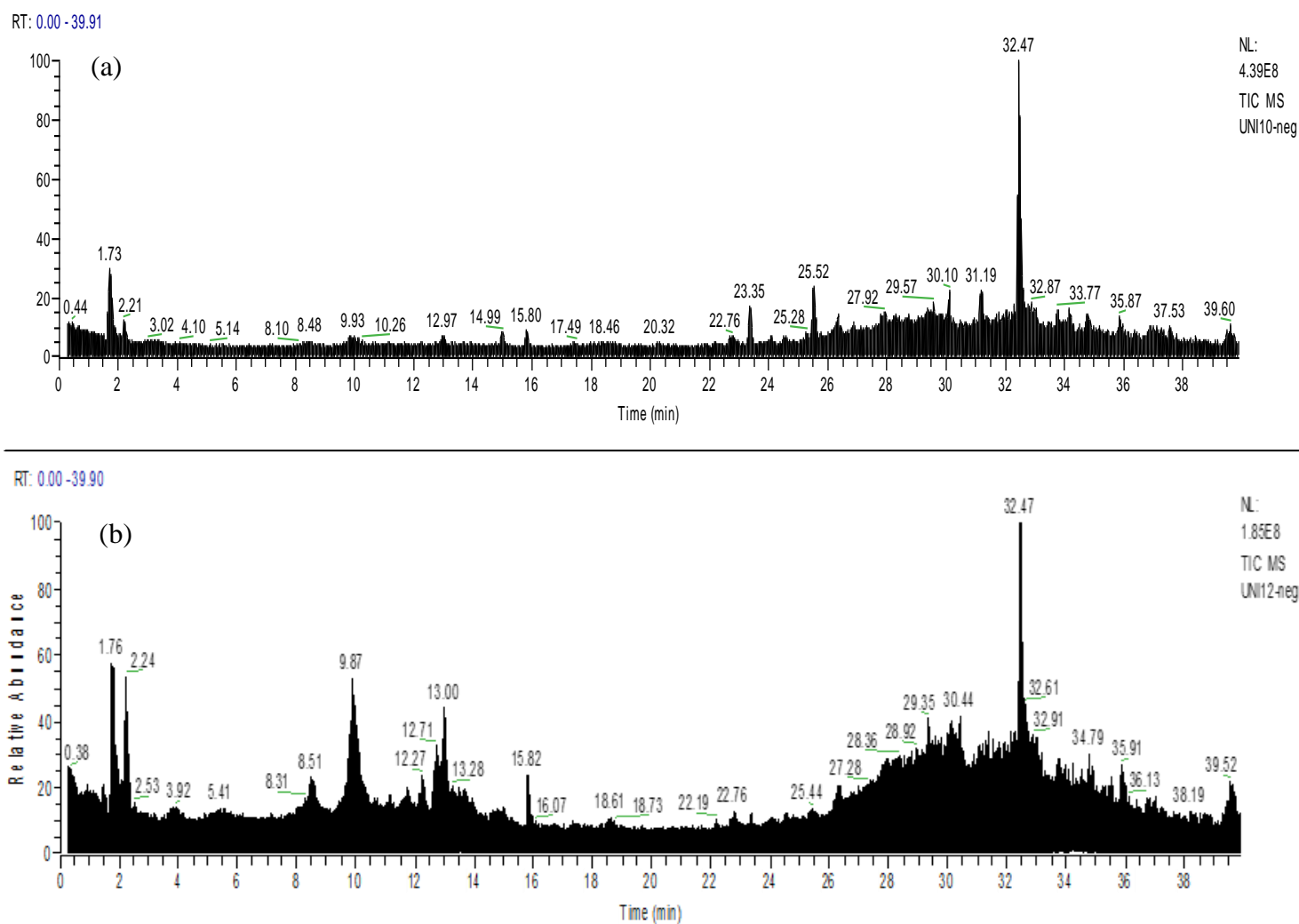
La identificación espectroscópica de los metabolitos secundarios presentes en el extracto EBO y en el residuo BUT de la especie *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) fue realizada mediante HPLC acoplado a MS, RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ . Los principios activos presentes en el EBO y BUT son en su mayoría polifenólicos, lo que conlleva a deducir que estos son los responsables del gran poder antioxidante tanto del EBO como del BUT.

Para el análisis cromatográfico HPLC se utilizó una columna en fase reversa (C18). Esta columna tiene la característica de dejar eluir primero a los compuestos polares y retener a los analitos no polares. La columna C18 consta de una fase estacionaria hidrófoba debido a que presenta ligandos octadecilos unidos al dióxido de silicio. Asimismo, para el estudio de espectrometría de masa (MS) de los extractos y residuos, se utilizó la técnica de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo y negativo.

La Figura 24 muestra los cromatogramas obtenidos para el EBO y BUT mediante HPLC-MS. En este espectro se puede observar, los compuestos presentes en los extractos y residuos tienen distintos tiempos de retención frente al C18. Este comportamiento se debe a la presencia de compuestos con diferentes polaridades. El mayor tiempo de retención es característico para compuesto apolares, mientras que el menor tiempo está asociado a compuestos polares.

## Figura 24

Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS para (a) EBO y (b) BUT.



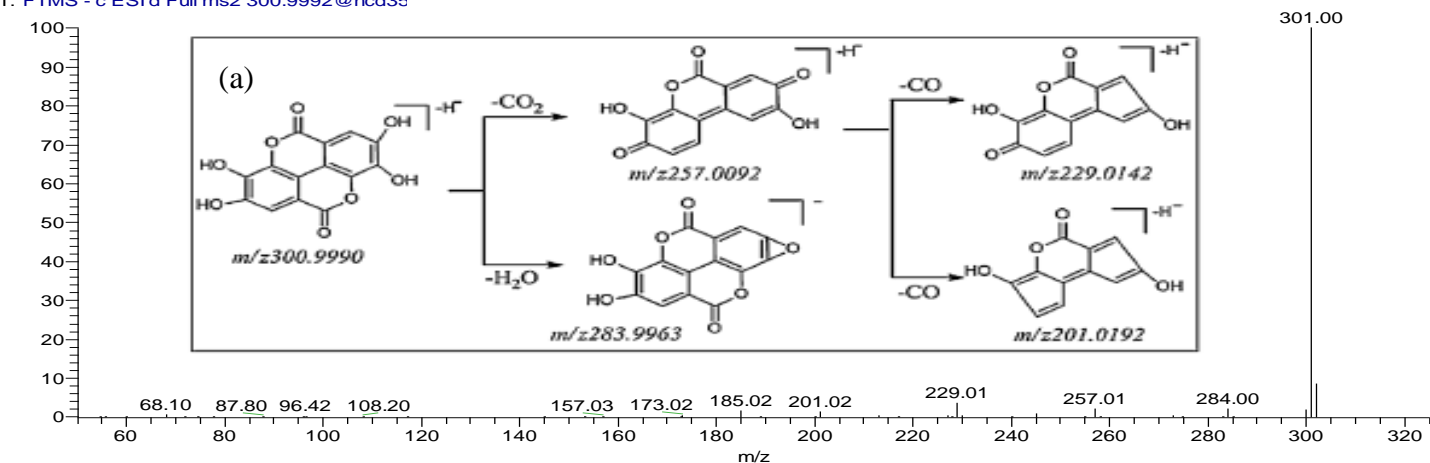
A diferentes tiempos de retención (TR) de cromatograma, se pueden obtener diferentes espectros de masas, los cuales indican la presencia de uno o dos compuestos con características similares. La identificación de cada compuesto depende de los picos de fraccionamiento y los pesos moleculares mostrados en los espectros de masas de cada uno de los componentes del EBO y BUT. En la Figura 25 se muestra el espectro de masas de dos compuestos presentes en el EBO. Luego de realizar el análisis del espectro y comparar con la literatura se dilucidó la estructura del ácido elágico (TR= 12,97 min.) y del 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucoyranosida (TR= 8,52

min.). En la Figura 25a se muestra es espectro MS del ácido elágico, tanto del ion molecular y sus fragmentos, así como el mecanismo de fragmentación propuesta por Yisimayili y colaboradores (Yisimayili et al., 2019). Asimismo, en la Figura 25b se muestra en espectro MS y sus fragmentos del 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucopiranosida.

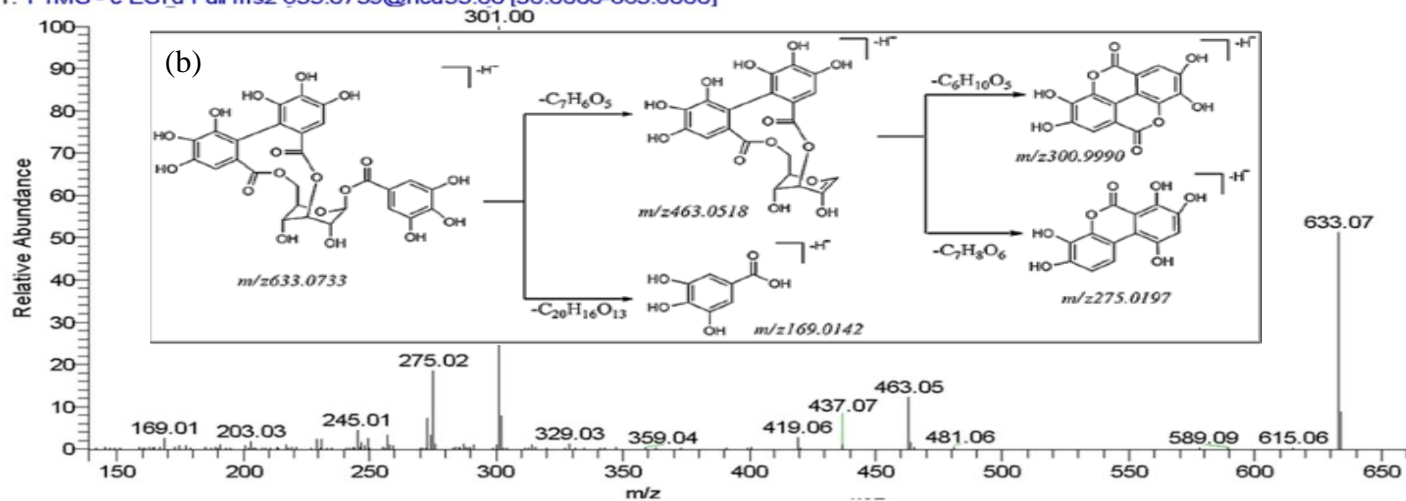
### Figura 25

Espectro de masas del (a) ácido elágico y (b) 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucopiranosida (corilagina).

UNI10-neg #5993 RT: 12.97 AV: 1 NL: 1.57E6  
T: FTMS - c ESI\_d Full ms2 300.9992@hcd35



UNI12-neg #3880 RT: 8.52 AV: 1 NL: 1.70E6  
T: FTMS - c ESI\_d Full ms2 633.0739@hcd35.00 [50.0000-665.0000]



Fuente: (Yisimayili et al., 2019)



Luego de realizar el análisis de MS de los compuestos en el EBO y BUT, a diferentes tiempos de retención (ver los anexos desde el N°4 al N°13), se dilucidaron diversas estructuras correspondientes a los metabolitos secundarios, cuyos nombres y tiempo de retención (TR) se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14**

Compuestos identificados en el EBO y BUT.

	<b>Nombre de los compuestos identificados</b>	<b>TR (min.)</b>
EBO	(a) Ácido elágico	12,97
	(b) Kaempferol	15,82
	(c) Ácido trihidroxicinámico	13,52
	(d) Kaempferol-O-acetilramnosido	15,82
	(e) Quercetina acetilarabinosa	9,94
	(f) Filantusina A	10,80
BUT	(g) 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxi-difenol-gluco-piranosida	8,52
	(h) Ácido protocatechuico	3,92
	(i) Rutina	12,27
	(j) Quercetina-O-glicosilada	12,70
	(k) Quercetina-O-glucurónido	12,70
	(l) Ácido elágico acetilxilosi	5,42
(a) Ácido elágico	13,00	

Con la finalidad de complementar la dilucidación estructural de los compuestos identificados mediante espectrometría de masas, las muestras de EBO y BUT obtenidos de la chancapiedra fueron analizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN). En las Figuras 26 y 27 se muestran los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  del EBO y BUT.

Figura 26

Espectros RMN <sup>1</sup>H obtenidos a partir del (a) EBO y (b) BUT.

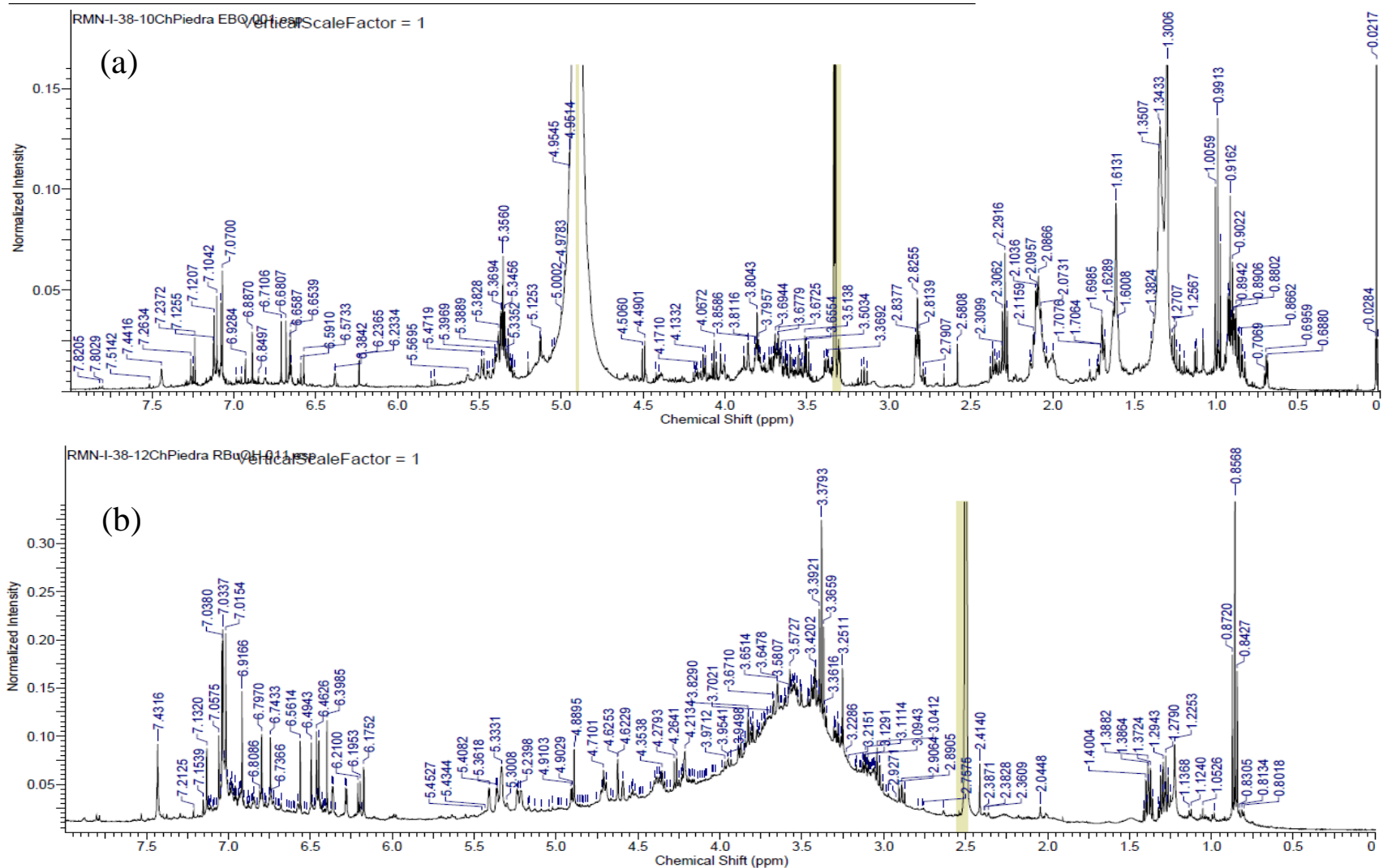
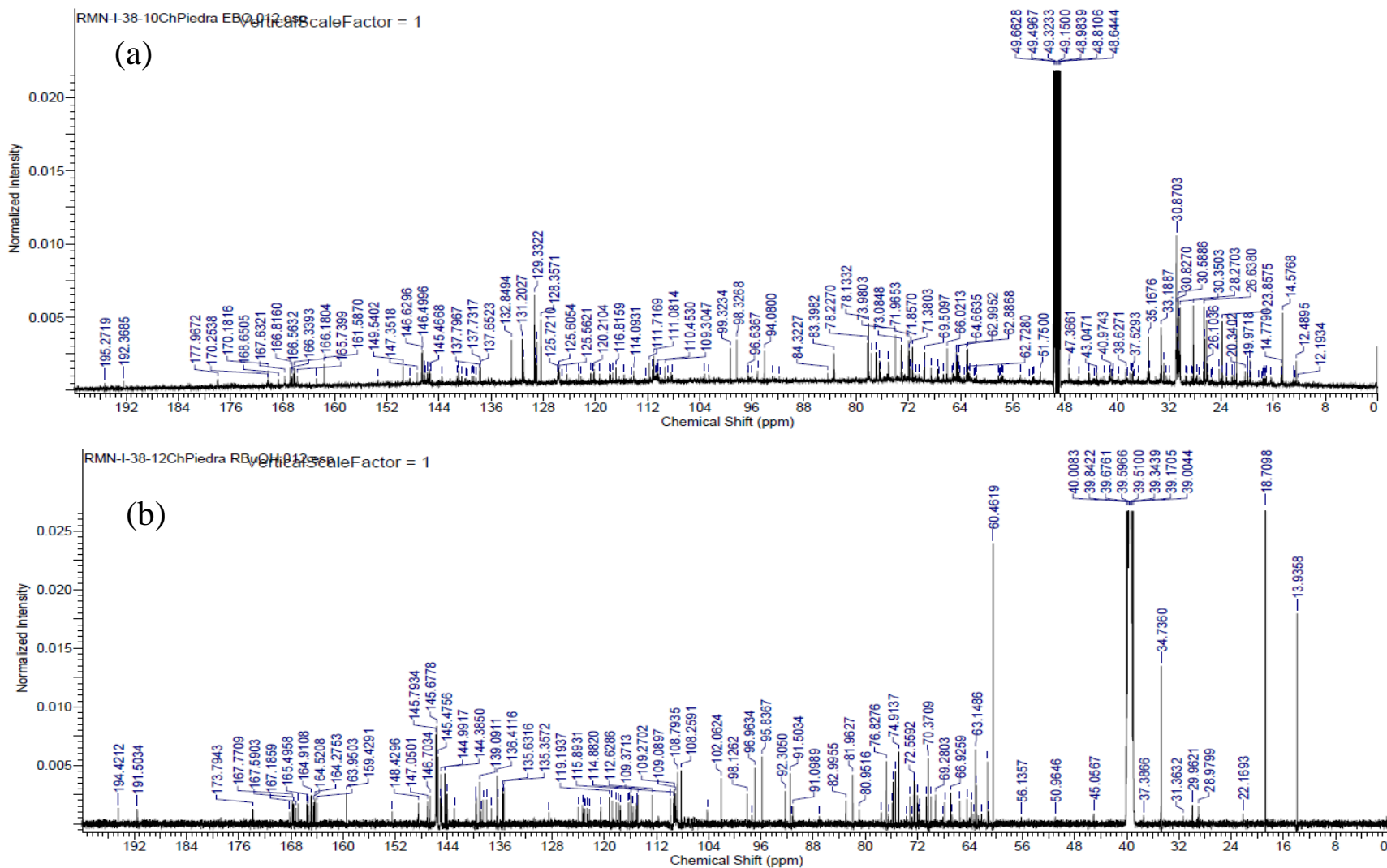
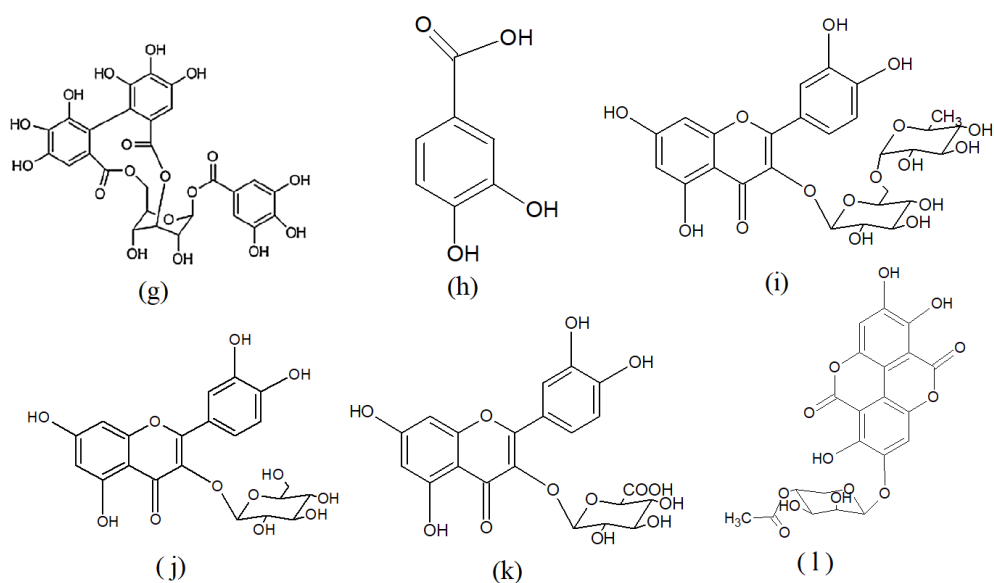


Figura 27

Espectros RMN <sup>13</sup>C obtenido a partir del (a) EBO y (b) BUT.







Luego del análisis de los picos de fragmentación (espectro de masas) y los desplazamientos químicos (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) se encontraron los metabolitos secundarios presentes en el EBO, cuyas características y detalles se muestran a continuación:

(a) **Ácido elágico** (M.M. 302): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}$  – d4)  $\delta$ : 7,51 (2H: H-5, H-5'). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}$ -d4, ppm)  $\delta$ : 114,09 (C1, C1'); 137,65 (C2, C2'); 140,53 (C3, C3'); 148,50 (C4, C4'); 111,72 (C5, C5'); 108,87 (C6, C6'); 161,59 (C1'', C2''). ESI-MS (negativo) m/z: 301  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , (Yisimayili et al., 2019) indica que el ácido elágico tiene un ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  en m/z 300,9994 ( $\text{C}_{14}\text{H}_5\text{O}_8^-$ ). Las fragmentaciones en m/z 283,9963 ( $\text{C}_{14}\text{H}_4\text{O}_7^-$ ) y m/z 257,0092 ( $\text{C}_{13}\text{H}_5\text{O}_6^-$ ) se generaron por la pérdida de la unidad  $\text{H}_2\text{O}$  (18 Da) y la unidad  $\text{CO}_2$  (44 Da) del ion precursor, respectivamente. Los iones del fragmento en m/z 229,0133 ( $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{O}_5^-$ ) y m/z 201,0182 ( $\text{C}_{11}\text{H}_5\text{O}_4^-$ ) se produjeron mediante la eliminación de la unidad de CO (28 Da) y la eliminación continua de la unidad de CO (28 Da) del ion del fragmento en m/z 257,0092 ( $\text{C}_{13}\text{H}_5\text{O}_6^-$ ). La vía de fragmentación propuesta para el ácido elágico se muestra en la Figura 25a.

**(b) Kaempferol** (M.M. 286): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{d}_4$ )  $\delta$ : 6,95 ( $\text{H}5'$ ); 6,93 ( $\text{H}3'$ ); 6,38 ( $\text{H}8$ ); 6,23 ( $\text{H}6$ ). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{d}_4$ , ppm)  $\delta$ : 153,32 ( $\text{C}2$ ); 137,65 ( $\text{C}3$ ); 177,97 ( $\text{C}4$ ); 165,74 ( $\text{C}5$ ); 98,33 ( $\text{C}6$ ); 161,59 ( $\text{C}7$ ); 94,08 ( $\text{C}8$ ); 147,35 ( $\text{C}9$ ); 103,28 ( $\text{C}10$ ); 122,20 ( $\text{C}1'$ ); 129,33 ( $\text{C}2'$ ,  $\text{C}6'$ ); 115,61 ( $\text{C}3'$ ,  $\text{C}5'$ ); 153,32 ( $\text{C}4'$ ). ESI-MS (positivo) m/z: 287  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 121, 153, 165, 258, 269. (ver Anexo N° 4).

**(c) Ácido trihidroxicinámico** (M.M. 196): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{d}_4$ )  $\delta$ : 6,23 (d,  $J = 1.6$  Hz, trans- $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , 1H); 6,57 (s, Ar H-2', 6', 2H); 7,26 (trans- $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , 1H). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{d}_4$ , ppm)  $\delta$ : 108,23 ( $\text{C}2'$ ,  $\text{C}6'$ ); 115,61 ( $\text{C}2$ ); 124,39 ( $\text{C}4'$ ); 137,65 ( $\text{C}1'$ ); 145,34 ( $\text{C}3$ ); 146,17 ( $\text{C}3'$ ,  $\text{C}5'$ ); 168,65 ( $\text{C}1$ ). ESI-MS (positivo) m/z: 197  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 107, 133, 135, 161, 179. (ver Anexo N° 5).

**(d) Kaempferol-O-acetilramnosido** (M.M. 474): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{d}_4$ )  $\delta$ : 6,24 ( $\text{H}6$ ); 6,38 ( $\text{H}8$ ); 7,07 (d,  $J = 4,3$  Hz,  $\text{H}3'$ ,  $\text{H}5'$ ); 7,82 (d,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}6'$ ); 5,51 ( $\text{H}1''$ ); 4,19 ( $\text{H}2''$ ); 3,86 (dd,  $J = 0,9; 0,9$  Hz,  $\text{H}3''$ ); 4,95 (d,  $J = 1,55$  Hz,  $\text{H}4''$ ); 3,39 (dd,  $J = 3,65; 6,1$  Hz,  $\text{H}5''$ ); 0,83 ( $\text{H}6''$ ); 2,00 ( $\text{H}4''$  Ac). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{d}_4$ , ppm)  $\delta$ : 156,32 ( $\text{C}2$ ); 137,65 ( $\text{C}3$ ); 177,97 ( $\text{C}4$ ); 103,28 ( $\text{C}4\text{a}$ ); 162,80 ( $\text{C}5$ ); 99,32 ( $\text{C}6$ ); 166,34 ( $\text{C}7$ ); 95,14 ( $\text{C}8$ ); 161,59 ( $\text{C}8\text{a}$ ); 122,54 ( $\text{C}1'$ ); 131,20 ( $\text{C}2'$ , 6'); 116,82 ( $\text{C}3', 5'$ ); 161,59 ( $\text{C}4'$ ); 102,57 ( $\text{C}1''$ ); 71,38 ( $\text{C}2''$ ); 69,56 ( $\text{C}3''$ ); 75,01 ( $\text{C}4''$ ); 68,55 ( $\text{C}5''$ ); 17,57 ( $\text{C}6''$ ); 20,34 (-COMe); 170,25 (-COMe). ESI-MS (positivo) m/z: 475  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 287. (ver Anexo N° 6).

**(e) Quercetina acetilarabinosa** (M.M. 476): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{d}_4$ )  $\delta$ : 7,51 ( $\text{H}2'$ ); 7,44 ( $\text{H}6'$ ); 6,88 ( $\text{H}5'$ ); 6,38 (d,  $J = 2,15$  Hz,  $\text{H}8$ ); 6,23 (d,  $J = 1,55$  Hz,  $\text{H}6$ ); 5,57 ( $\text{H}1''$ ); 5,33 ( $\text{H}2''$ ); 4,05 (d,  $J = 1,5$  Hz,  $\text{H}3''$ ); 3,88 (d,  $J = 0,9$  Hz,  $\text{H}4''$ ); 3,52 (d,  $J = 0,9$  Hz,  $\text{H}5''\text{a}$ ); 3,48 ( $\text{H}5''\text{b}$ ); 2,09 (MeCOO). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{d}_4$ , ppm)  $\delta$ : 177,97 ( $\text{C}4$ ); 170,25 (MeCO); 165,74 ( $\text{C}7$ ); 162,80 ( $\text{C}5$ ); 161,59 ( $\text{C}2$ ,  $\text{C}9$ ); 149,54 ( $\text{C}4'$ ); 146,31 ( $\text{C}3'$ ); 137,65 ( $\text{C}3$ ); 124,39 ( $\text{C}1'$ ); 122,54 ( $\text{C}6'$ ); 116,82 ( $\text{C}2'$ ); 117,29 ( $\text{C}5'$ ); 108,23 ( $\text{C}1''$ ); 103,28 ( $\text{C}10$ ); 99,32 ( $\text{C}6$ ); 95,14 ( $\text{C}8$ ); 91,77 ( $\text{C}4''$ ); 84,32 ( $\text{C}2''$ ); 76,91 ( $\text{C}3''$ ); 61,81 ( $\text{C}5''$ ); 20,34 (MeCO). ESI-MS (negativo) m/z: 475  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 301. (ver Anexo N° 7).

**(f) Filantusina A** (M.M. 952): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}$  –  $d_4$ )  $\delta$ : Glucosa: 6,23 (H1); 5,42 (H2); 5,57 (H3); 5,20 (H4); 4,51 (H5); 4,95 (d,  $J = 1.55$  Hz); Galoil: 7,12 (H2, H6); HHDP: 7,07 (H3); Anillo D: 7,13 (H3); Anillo E: 3,48 (H4'); 3,17 (H5'). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{CH}_3\text{OH}$ -  $d_4$ , ppm)  $\delta$ : Glucosa: 91,77 (C1); 69,56 (C2); 63,45 (C3); 66,60 (C4); 73,98 (C5); 64,08 (C6); Galoil: 120,33 (C1); 110,82 (C2, C6); 145,78 (C3, C5); 139,67 (C4); 165,74 (C7); HHDP: 116,82 (C1); 124,39 (C2); 110,45 (C3); 145,34 (C4); 137,65 (C5); 145,34 (C6); 166,34 (C7); Anillo C: 115,61 (C1); 125,72 (C2); 108,23 (C3); 145,47 (C4); 137,65 (C5); 145,34 (C6); 168,65 (C7); Anillo D: 117,69 (C1); 120,54 (C2); 111,23 (C3); 143,52 (C4); 138,64 (C5); 145,47 (C6); 165,74 (C7); Anillo E: 170,18 (C1'); 141,23 (C2'); 120,73 (C3'); 47,37 (C4'); 30,95 (C5'); 162,80 (C6'); 166,34 (C7'). ESI-MS (positivo)  $m/z$ : 970  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 783, 463, 429, 337, 303, 277. (ver Anexo N° 8).

Las características estructurales de MS y RMN del BUT se muestran a continuación:

**(g) 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucoyranosida (corilagina)** (M.M. 634): NMR  $^1\text{H}$  (500 MHz –  $\text{DMSO}$  –  $d_6$ )  $\delta$ : Glucosa: 6,36 (H1); 3,99 (H2); 4,81 (H3); 4,47 (H4); 4,52 (H5); 4,16 (H6a); 4,97 (H6b); Galoil: 7,06 (H2', H6'); Anillo A: 6,69 (A3); Anillo B: 6,99 (B3'). NMR  $^{13}\text{C}$  (125,76 MHz –  $\text{DMSO}$  –  $d_6$ , ppm)  $\delta$ : Glucosa: 95,84 (H1); 69,28 (H2); 71,71 (H3); 62,24 (H4); 76,44 (H5); 65,57 (H6); Galoil: 120,54 (H1'); 112,63 (H2', H6'); 146,70 (H3', H5'); 139,68 (H4'); 166,84 (H7'); Anillo A: 117,53 (A1); 123,97 (A2); 109,86 (A3); 145,68 (A4); 138,55 (A5); 145,48 (A6); 168,15 (A7); Anillo B: 116,33 (B1'); 123,97 (B2'); 108,26 (B3'); 146,70 (B4'); 137,26 (B5'); 145,48 (B6'); 173,79 (B7'). ESI-MS (negativo)  $m/z$ : 633  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . (Yisimayili et al., 2019) indica que la corilagina mostró un ion precursor  $[\text{M}-\text{H}]^-$  a  $m/z$  633,0730 ( $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_{18}$ ). En el espectro de MS, el ion del fragmento en  $m/z$  463,0544 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_{13}^-$ ) se generó a través de la pérdida de un resto de ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ , 170 Da) del ion precursor. El fragmento ion a  $m/z$  300,9995 ( $\text{C}_{14}\text{H}_5\text{O}_8^-$ ), como pico base, y  $m/z$  275,0192 ( $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_7^-$ ) se detectaron como resultado de la eliminación de la unidad

azúcar ( $C_6H_{10}O_5$ , 162 Da) y  $C_7H_{10}O_6$  (188 Da) del fragmento ion a  $m/z$  463,0544 ( $C_{20}H_{15}O_{13}^-$ ), respectivamente. El fragmento ion en  $m/z$  169,0130 ( $C_7H_5O_5^-$ ) se generó por la unidad de pérdida de  $C_{20}H_{16}O_{13}$  (464 Da) del ion precursor. Las fragmentaciones en  $m/z$  300,9995 ( $C_{14}H_5O_8^-$ ) y  $m/z$  275,0192 ( $C_{13}H_7O_7^-$ ) se asociaron con el grupo hexahidroxidifenilo (HHDP) de corilagina. El fragmento de ion a  $m/z$  169,0130 ( $C_7H_5O_5^-$ ) se asoció con el grupo galofilo de la corilagina. La vía de fragmentación propuesta de la corilagina se muestra en la Figura 25b.

**(h) Ácido protocatechuico** (M.M. 154): NMR  $^1H$  (500 MHz – DMSO –  $d_6$ )  $\delta$ : 7,21 (H1); 7,43 (H2); 6,75 (H3). NMR  $^{13}C$  (125,76 MHz – DMSO –  $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 123,97 (C1); 117,79 (C2); 145,79 (C3); 152,49 (C4); 115,61 (C5); 123,97 (C6); 168,15 (CO). ESI-MS (negativo)  $m/z$ : 153  $[M-H]^-$ , 109. (ver Anexo N° 9).

**(i) Rutina** (M.M. 610): NMR  $^1H$  (500 MHz – DMSO –  $d_6$ )  $\delta$ : Aglicona: 6,21 (H6); 6,42 (H8); 6,89 (H5'); Glucosa: 5,13 (H1''); 3,50 (H2''); 3,30 (H3'', H4''); 3,43 (H5''); 3,81 (H6''); Rhamnosa: 4,54 (H1'''); 3,65 (H2'''); 3,55 (H3'''); 3,30 (H4'''); 3,46 (H5'''); 1,14 (H6'''). NMR  $^{13}C$  (125,76 MHz – DMSO –  $d_6$ , ppm)  $\delta$ : Aglicona: 159,43 (C2); 135,63 (C3); 173,79 (C4); 163,95 (C5); 98,13 (C6); 166,84 (C7); 95,84 (C8); 159,43 (C9); 104,21 (C10); 123,17 (C1'); 117,79 (C2'); 146,70 (C3'); 152,49 (C4'); 116,25 (C5'); 123,97 (C6'); Glucosa: 104,21 (C1''); 75,87 (C2''); 77,61 (C3''); 71,71 (C4''); 77,61 (C5''); 68,12 (C6''); Rhamnosa: 102,06 (C1'''); 72,04 (C2'''); 72,44 (C3'''); 73,74 (C4'''); 69,98 (C5'''); 18,71 (C6'''). ESI-MS (negativo)  $m/z$ : 609  $[M-H]^-$ , 301, 463. (ver Anexo N° 10).

**(j) Quercetina-O-glicosilada** (M.M. 464): NMR  $^1H$  (500 MHz – DMSO –  $d_6$ )  $\delta$ : 6,28 (d,  $J = 3,35$ , H5); 6,35 (H7); 6,89 (H5'); 5,45 (H1''); 3,35 (H2''); 3,45 (H3''); 3,41 (H4''); 3,30 (H5''); 3,38 (H6''). NMR  $^{13}C$  (125,76 MHz – DMSO –  $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 152,49 (C2); 135,63 (C3); 173,79 (C4); 159,43 (C5); 98,13 (C6); 163,95 (C7); 95,84 (C8); 152,49 (C9); 108,26 (C10); 122,31 (C1'); 115,61 (C2'); 145,68 (C3'); 148,43 (C4'); 115,61 (C5'); 122,31 (C6'); 102,06 (C1''); 74,91 (C2''); 77,61 (C3''); 70,37



(C4''); 76,44 (C5''); 61,29 (C6''). ESI-MS (negativo) m/z: 463 [M-H]<sup>-</sup>, 301. (ver Anexo N° 11).

**(k) Quercetina-O-glucurónido** (M.M. 478): NMR <sup>1</sup>H (500 MHz – DMSO – d6) δ: 7,43 (H6'); 6,83 (H5'); 6,36 (H8); 6,18 (d, J = 1,55 Hz, H6); 5,30 (d, J = 1,85 Hz, H1''); 3,74 (H5''); 3,61 (H2'', H3'', H4''). NMR <sup>13</sup>C (125,76 MHz – DMSO – d6, ppm) δ: 173,79 (C4); 168,15 (C6''); 164,28 (C7); 163,95 (C5); 159,43 (C2, C9); 148,43 (C4'); 144,87 (C3'); 135,36 (C3); 122,31 (C6'); 120,60 (C1'); 116,33 (C5'); 115,09 (C2'); 104,21 (C10); 102,06 (C1''); 98,13 (C6); 95,84 (C8); 76,44 (C3''); 75,40 (C2''); 73,74 (C5''); 71,71 (C4''). ESI-MS (negativo) m/z: 477 [M-H]<sup>-</sup>, 301. (ver Anexo N° 12).

**(l) Ácido eláxico acetilxilosi** (M.M. 476): NMR <sup>1</sup>H (500 MHz – DMSO – d6) δ: 5,02 (H1'); 4,30 – 3,22 (H2', H3'); 4,87 (H4'); 7,43 (H5'); 2,04 (Acetil). ESI-MS (negativo) m/z: 475 [M-H]<sup>-</sup>, 301. (ver Anexo N° 13).

#### **4.5. Caracterización de las nanopartículas de quitosano**

Todas las nanopartículas de quitosano (sin cargado, cargadas con EBO y BUT) fueron preparadas mediante gelación iónica y caracterizadas mediante DLS, FTIR y SEM.

##### **4.5.1. Tamaño de partícula y potencial Z**

El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial Z de las nanopartículas de quitosano sin cargado y cargados con EBO y BUT fueron medidos mediante DLS. Asimismo, se determinó la eficiencia del cargado (con EBO y BUT) que presentaron las nanopartículas de quitosano. Los resultados obtenidos en estos análisis se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15**

Características de las nanopartículas de quitosano sin cargado y cargadas con EBO y BUT.

Análisis	Nanopartículas sin cargado	Nanopartículas cargadas con EBO y BUT	
		Cs-EBO	Cs-BUT
Tamaño de partícula (nm)	169,5 ± 6,3	356,2 ± 24,4	197,7 ± 1,7
Índice de polidispersidad	0,282 ± 0,012	0,253 ± 0,032	0,234 ± 0,046
Potencial Z (mV)	+31,18 ± 3,22	+43,28 ± 4,59	+42,54 ± 4,11
Eficiencia de cargado (%)	--	68,55 ± 3,47	68,82 ± 1,06

En la Tabla 15 se muestra un incremento en el tamaño de partícula de Cs-EBO y Cs-BUT con respecto a las nanopartículas de quitosano sin cargado. Este incremento de tamaño se debe precisamente a que las muestras de chancapiedra (EBO y BUT) fueron cargadas por las nanopartículas de quitosano. Los resultados obtenidos son parecidos a reportado por Hadidi et al., 2020 y Hosseini et al., 2013 al cargar aceites esenciales de clavo de olor y de orégano en nanopartículas de quitosano.

Se observa que el índice de polidispersidad de las nanopartículas cargadas ha disminuido con respecto al índice de las nanopartículas sin cargado, lo que indica que las Cs-EBO y Cs-BUT son más homogéneas que las nanopartículas sin muestra. Esto puede ser debido a que los compuesto presentes en EBO y BUT generan una buena interacción con el quitosano al momento de la formación de las nanopartículas, ya sea de forma iónica, fuerzas de Van der Waals (Azevedo et al., 2014).

El potencial Z se incrementó cuando las nanopartículas fueron cargadas, lo que significa que la estabilidad de las nanopartículas de quitosano aumenta cuando interaccionan con las muestras cargadas con EBO y BUT (Servat-Medina et al., 2015).

Se evaluó la capacidad de encapsulamiento que presentan las nanopartículas de quitosano determinando la eficiencia de cargado de las muestras de EBO y BUT. La eficiencia de cargado del Cs-EBO fue 68,55% mientras que para Cs-BUT fue de 68,82%. El análisis de estos resultados obtenidos fue reportado en la literatura. Hosseini y colaboradores reportaron que, el cargado de aceite esencial de orégano y carvacrol en nanopartículas de quitosano, presentaban baja eficiencia de carga con mayores tamaños de partícula (Hosseini et al., 2013; Keawchaoon & Yoksan, 2011). Asimismo, según Hadidi et al., 2020, al cargar el aceite esencial del clavo de olor en nanopartículas de quitosano y Azevedo et al., 2014, al cargar vitamina B2 en nanopartículas de alginato/quitosano, obtuvieron eficiencias de cargado alrededor del 50% con tamaño de partícula muy cercanos a los presentados en nuestra investigación.

Finalmente, según los resultados obtenidos, las nanopartículas de quitosano preparadas en este trabajo de investigación presentan buenos valores de tamaño, índice de polidispersidad, potencial Z y eficiencia de cargado.

#### **4.5.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

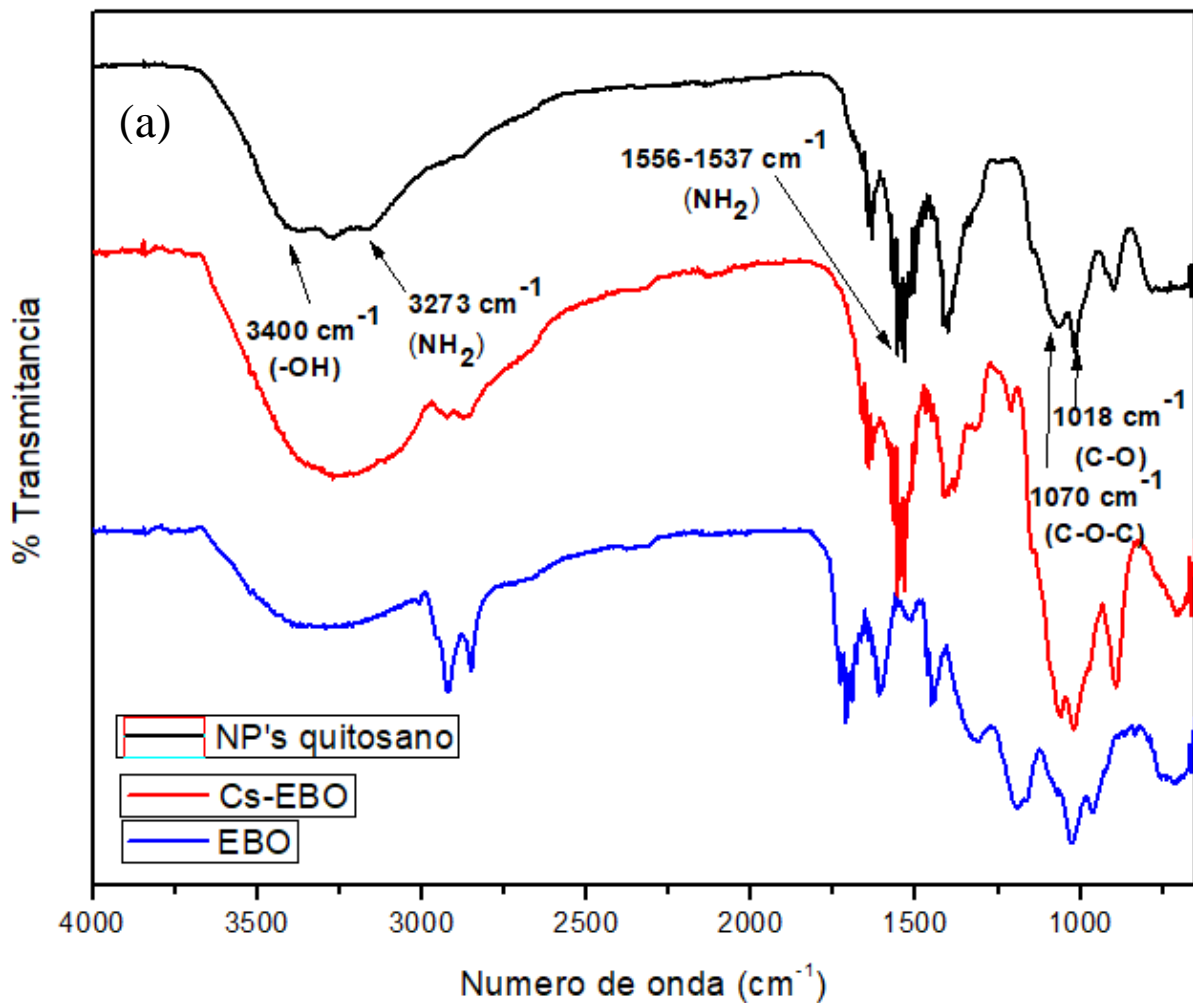
El análisis de FTIR señala las interacciones de Van der Waals que existen entre las muestras cargadas y las nanopartículas de quitosano (Azevedo et al., 2014). Como se puede observar en la Figura 29, las nanopartículas sin cargado muestran picos en  $3400\text{ cm}^{-1}$  (-OH),  $3273\text{ cm}^{-1}$  (N-H<sub>2</sub>, estiramiento),  $2927\text{ cm}^{-1}$  (C-H, estiramiento),  $1556\text{-}1537\text{ cm}^{-1}$  (N-H<sub>2</sub>, amida II),  $1070\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C, estiramiento del anillo glucosa),  $1018\text{ cm}^{-1}$  (C-O, estiramiento),  $900\text{ cm}^{-1}$  (vibración del anillo piranosa) (Hadidi et al., 2020; Lamarra et al., 2016; L. Zhang & Kosaraju, 2007).

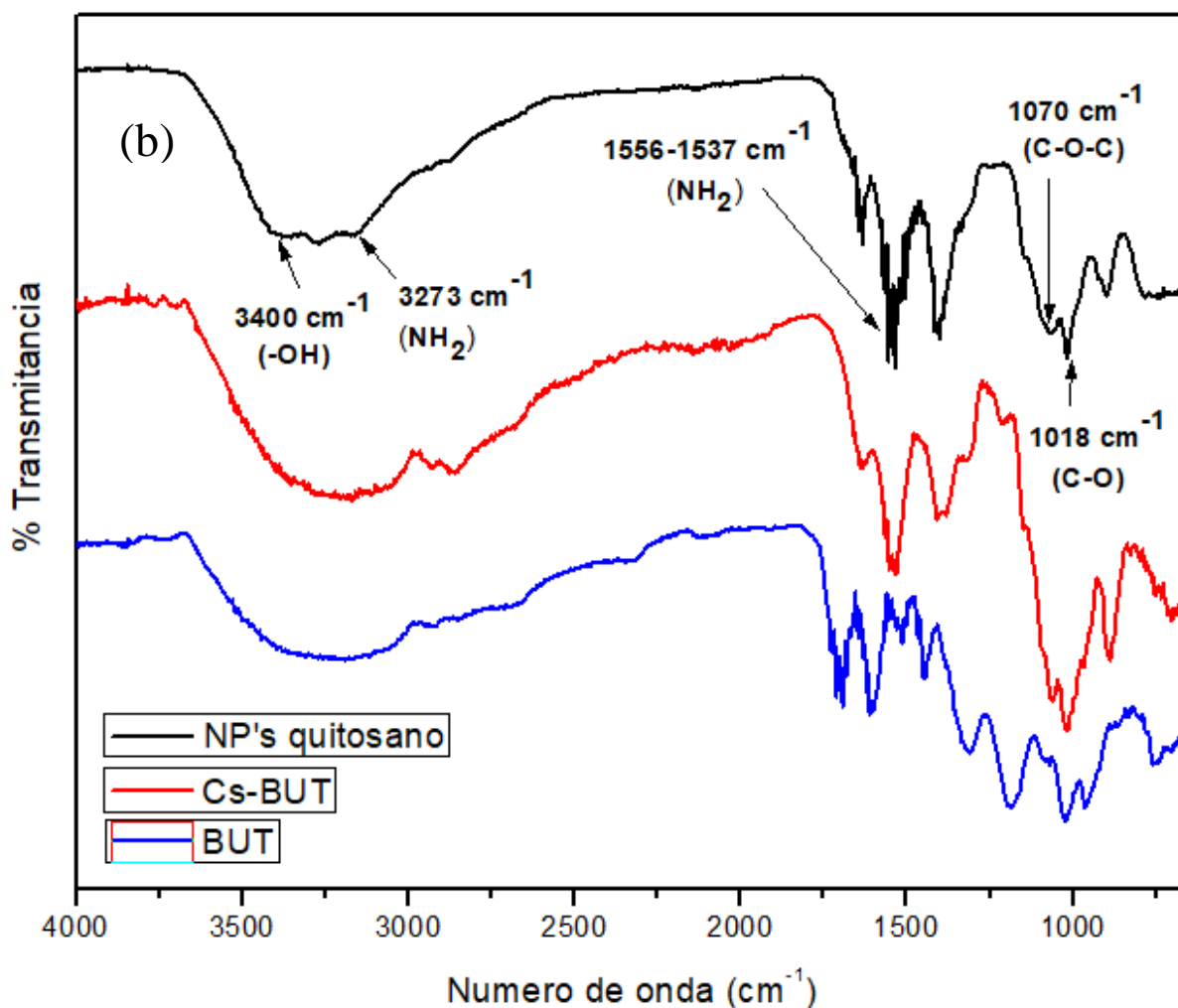
Para el caso de las muestras EBO y BUT (Figura 29) se puede observar que sus picos también se encuentran en el espectro de las nanopartículas cargadas, y que la intensidad en  $2927\text{ cm}^{-1}$  de las nanopartículas sin cargado

aumentó cuando estas fueron cargadas, dando a entender que el cargado fue exitoso. Un trabajo similar a nuestra investigación fue realizado por Hadidi et al., 2020. Ellos reportaron que el FTIR del aceite esencial del *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) presenta varios picos, esto debido a los diferentes compuestos que lo constituye. Además, reportaron que todos los picos que muestran el aceite esencial están presentes en el espectro de las nanopartículas cargadas, lo que indica que el cargado se realizó sin alteraciones entre ambos.

**Figura 29**

Espectros FTIR del (a) EBO, nanopartículas sin cargado y Cs-EBO; (b) del BUT, nanopartículas sin cargado y Cs-BUT.



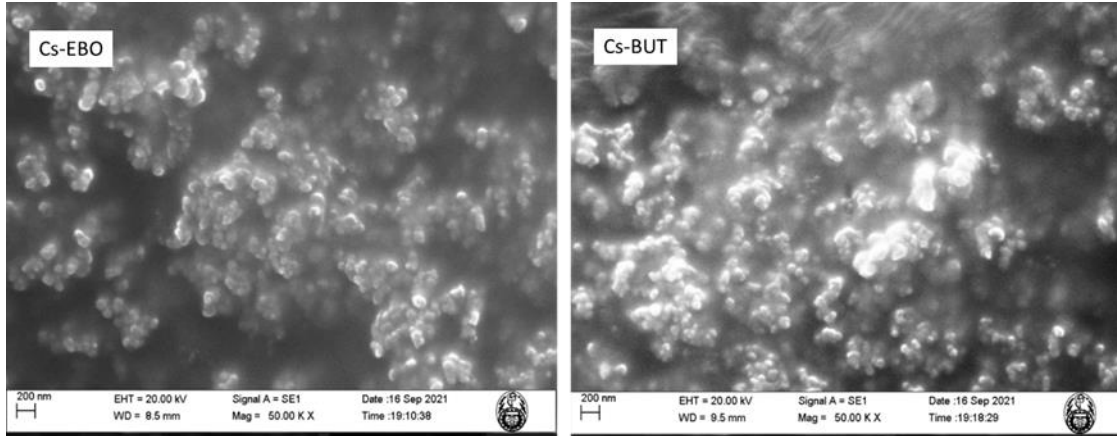


#### 4.5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la superficie de las nanopartículas fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 30, se puede observar que las nanopartículas presentan formas esféricas (tamaño menor a  $200 \text{ nm}$ ), pero aglomeradas. Este mismo efecto también fue reportado por Luo y colaboradores, quienes indican que se podría deber a la baja energía usada en el método a comparación de otros métodos que usan una homogeneizador de alta velocidad (Luo et al., 2012).

**Figura 30**

Imágenes SEM de las nanopartículas sin cargado y nanopartículas cargadas (Cs-EBO y Cs-BUT).

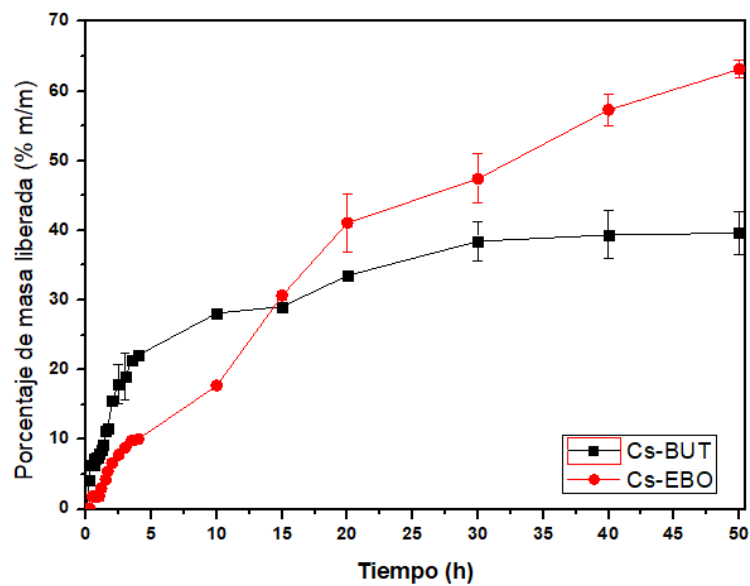


#### 4.6. Estudio de la liberación controlada de las nanopartículas de quitosano

Los perfiles de liberación controlada de los extractos EBO y BUT a partir de las nanopartículas de quitosano Cs- EBO y Cs-BUT fueron realizados a temperatura ambiente y pH= 7, tal como se muestra en la Figura 31.

**Figura 31**

Perfiles de liberación controlada de las nanopartículas cargadas con EBO y BUT.



En la Figura 31 se puede observar que, a inicios del estudio, los perfiles muestran una liberación repentina tanto del EBO como del BUT. Esto concuerda con los resultados de Bulmer et al., 2012. En esta investigación, los autores señalan que esto se debe a la posible presencia de muestra (EBO o BUT) adsorbida en la superficie de las nanopartículas de quitosano. Por otro lado, se observa que las Cs-BUT llegan a su valor máximo liberado y permanece constante con un porcentaje de 39% (después de las 30 horas), mientras que las Cs-EBO seguían liberando a más de las 40 primeras horas, siendo su porcentaje de liberación mayor a 60%. Estos resultados llevan relación con lo señalado por Zhang & Kosaraju, 2007, donde indican que las nanopartículas de mayor tamaño (en nuestra investigación, Cs-EBO) pueden liberar mayor cantidad de muestra cargada debido a que las fuerzas de entrecruzamiento son más débiles que las presentes en las nanopartículas pequeñas (para la investigación Cs-BUT).

#### 4.7. Evaluación de la actividad antioxidante de las nanopartículas cargadas

Para medir la actividad antioxidante de las nanopartículas sin cargar y nanopartículas cargadas con EBO y BUT, se realizó nuevamente mediante el ensayo con DPPH. Se evaluaron la capacidad antioxidante de las nanopartículas sin cargado (blanco) y para las nanopartículas cargadas (Cs-EBO y Cs-BUT), cuyos resultados se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16**

Evaluación de la actividad antioxidante (%AA) de las nanopartículas sin cargado y cargados con EBO y BUT.

Muestras	Actividad antioxidante (% AA)
Blanco	3,21 ± 2,35
EBO	84,32 ± 0,42
Cs-EBO	88,28 ± 0,12
BUT	94,10 ± 0,23
Cs-BUT	90,57 ± 0,45

Al realizar los ensayos de actividad antioxidante, se pudo observar que la decoloración del DPPH (cambio de violeta a amarillo) por efecto de las nanopartículas Cs-EBO y Cs-BUT fue más lenta a comparación de los extractos disueltos EBO y BUT. Este comportamiento se debe a que parte de los extractos y residuos se encuentran encapsulados dentro de las nanopartículas de quitosano y toma un poco de tiempo para que se liberen y actúen contra el radical DPPH, cumpliendo así un efecto antioxidante más prologando. Por otro lado, las nanopartículas de quitosano sin cargado presentaron muy baja actividad antioxidante (ver Tabla 16), lo que indica que la decoloración del DPPH en las Cs-EBO y Cs-BUT es debido a los extractos EBO y BUT liberados a partir de las nanopartículas de quitosano. En un trabajo similar, Chen y colaboradores reportaron que las nanopartículas sin cargado no exhiben actividad antioxidante, mientras que las nanopartículas cargadas con eugenol o aceites esenciales del clavo de olor si tienen actividad, esto debido a los compuestos polifenólicos presentes en ellas. (Chen et al., 2009; Hadidi et al., 2020).



## CONCLUSIONES

En esta investigación, a partir de la especie vegetal *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra), se obtuvo el extracto etanólico EBO (277,24 g) y el extracto acuoso EBA (251,32 g) con rendimientos de extracción de 5,10% y 4,62%, respectivamente. Además, luego de realizar la partición líquido-líquido del EBO se pudo obtener los residuos: clorofórmico (CLO; 52,0 g), butanólico (BUT; 9,09 g) y acuoso (AC; 50,41g).

Mediante la prueba con DPPH, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos y residuos obtenidos, siendo el EBO (79,15% a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y BUT (92,95% a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) el extracto y residuo que presentaron mayor actividad antioxidante. Asimismo, mediante técnicas electroquímicas, se determinó que el EBO y BUT presentaron mayor capacidad antioxidante con un índice electroquímico de 1,24 y 2,83, respectivamente según DPV; y de 1,82 y 5,32 respectivamente, según SWV.

Utilizando las técnicas de HPLC-MS y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se lograron identificar y dilucidar los metabolitos secundarios presentes en el extracto y residuo con mayor actividad antioxidante: EBO y BUT. En el EBO se lograron identificar a los siguientes compuestos: ácido elágico, kaempferol, ácido trihidroxicinámico, kaempferol-O-acetilramnosido, quercetina acetilarabinosa y filantusina A; y en el BUT se identificaron a: 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucopyranosida (corilagina), ácido protocatechuico, rutina, quercetina -O-glicosilada, quercetina-O-glucurónido, ácido elágico acetilxilosi y ácido elágico.

Dentro de los metabolitos identificados en el extracto EBO y residuo BUT, los compuestos polifenólicos tales como el ácido elágico, kaempferol y corilagina, son los principios activos directos y responsables de la buena actividad antioxidante del extracto y residuo.

Las nanopartículas de quitosano preparadas presentaron buenas características, tales como: Tamaño de partícula: nanopartículas sin cargado (169,5 nm), Cs-EBO (356,2 nm) y

Cs-BUT (197,7 nm); Potencial Z: nanopartículas sin cargado (31,18 mV), Cs-EBO (43,28 mV) y Cs-BUT (42,54 mV); y Eficiencia de cargado: 68,55% para Cs-EBO y 68,82% para Cs-BUT. Por otro lado, mediante la caracterización con espectroscopía infrarroja (FTIR) se confirmó que hay interacción de Van der Wals entre las muestras (EBO y BUT) y el quitosano; mientras que mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM), se observó la formación de las nanopartículas de quitosano.

Según el estudio de liberación controlada, se determinó que las nanopartículas Cs-EBO pueden liberar más muestra cargada comparando con las Cs-BUT, esto debido a que las primeras poseen mayor tamaño de partícula y pocas fuerzas de entrecruzamiento, liberando fácilmente el EBO cargado. Las Cs-BUT llegan a su valor máximo liberado y permanece constante con un porcentaje de 39% (después de las 30 horas), mientras que las Cs-EBO seguían liberando a más de las 40 primeras horas con un porcentaje de liberación mayor a 60%.

Mediante las pruebas con DPPH, se determinó que las nanopartículas de quitosano cargadas presentan buena actividad antioxidante: 88,28% para el Cs-EBO y 90,57% para Cs-BUT. Finalmente, podemos concluir que el extracto EBO y residuo BUT del *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster (chancapiedra) podrían ser considerados como buenas fuentes de agentes antioxidantes y que, al ser encapsuladas en nanopartículas de quitosano, estas tengan buena y prolongada actividad antioxidante.

## **RECOMENDACIONES**

Mediante una evaluación cromatográfica, se recomienda realizar el fraccionamiento biodirigido de los residuos butanólico (BUT) y acuoso (AC), con la finalidad de realizar el aislamiento de los principios activos responsables de la buena actividad antioxidante.

Debido a que el residuo acuoso (AC) presentó buena actividad en la prueba de DPPH, se recomienda realizar el cargado en nanopartículas de quitosano para luego evaluar su liberación controlada, a fin de proporcionar otras opciones de fuentes antioxidantes.

Con el objetivo de comparar y corroborar los resultados obtenidos en la presente investigación se recomienda probar nuevos métodos de actividad antioxidante como por ejemplo la prueba con el radical ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), muy usado en otros trabajos de investigación.

Para el desarrollo de medicamentos o aplicación en la industria alimentaria, se recomienda realizar el estudio de la liberación controlada a diferentes pH, además de su estudio cinético con la finalidad de obtener un entendimiento más preciso del mecanismo y acción de liberación de las nanopartículas cargadas dentro de los nuevos medios a aplicar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, H. (2019). Effect of Priming with Chitosan Nanoparticles on Germination, Seedling Growth and Antioxidant Enzymes of Broad Beans. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 18(1), 81–86.  
<https://doi.org/10.21608/cat.2019.28609>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.  
<https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158–175.  
<https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>
- Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 141–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036>
- Bara, M. T. F., Serrano, S. H. P., Asquiere, E. R., Lúcio, T. C., & Gil, E. S. (2008). Medida del potencial anódico en estado sólido: Una herramienta para la determinación del potencial antioxidante de fitoterápicos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(1), 89–92.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.038>

- Borges, L. da C., Negrão-Neto, R., Pamplona, S., Fernandes, L., Barros, M., Fontes-Júnior, E., Maia, C., Yoshioka e Silva, C. Y., & da Silva, M. N. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive studies of hydroalcoholic extract from the leaves of *Phyllanthus brasiliensis* (Aubl.) Poir. and isolation of 5-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyljusticidin B and six other lignans. *Molecules*, *23*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23040941>
- Buddhachat, K., Osathanukul, M., Madesis, P., Chomdej, S., & Ongchai, S. (2015). Authenticity analyses of *Phyllanthus amarus* using barcoding coupled with HRM analysis to control its quality for medicinal plant product. *Gene*, *573*(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.046>
- Bulmer, C., Margaritis, A., & Xenocostas, A. (2012). Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochemical Engineering Journal*, *68*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.007>
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., Alamilla-Beltrán, L., García, H. S., & Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, *10*(3), 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Carneiro, K., Leite, D. S., Ferreira, L., Sanz, G., Vieira, D., & Gonc, E. K. (2018). *Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach*. 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.04.004>
- Catapan, E., Otuki, M. F., Viana, A. M., Yunes, R. A., Bresciani, L. F. V., Ferreira, J., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., & Cechinel-Filho, V. (2000). Pharmacological activity and chemical composition of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus*. *Pharmazie*, *55*(12), 945–946.
- Chen, F., Shi, Z., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2009). *Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles*.
- Clarkson, P. M., & Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical

- activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 637S-646S.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.637S>
- Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3). <https://doi.org/10.15765/e.v3i3.420>
- de Macêdo, I. Y. L., Garcia, L. F., Oliveira Neto, J. R., de Siqueira Leite, K. C., Ferreira, V. S., Ghedini, P. C., & de Souza Gil, E. (2017). Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. *Food Chemistry*, 217, 326–331.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.082>
- de Pinho Neves, A. L., Milioli, C. C., Müller, L., Riella, H. G., Kuhnen, N. C., & Stulzer, H. K. (2014). Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445(2014), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>
- Eldeen, I. M. S., Seow, E. M., Abdullah, R., & Sulaiman, S. F. (2011). In vitro antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthus* sp. *South African Journal of Botany*, 77(1), 75–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.009>
- Estévez Brito, R. (2016). *Antioxidantes alimentarios: mecanismos de oxidación electródica, medida electroquímica de capacidad antioxidante y composición en téis, infusiones y especias*. Universidad de Córdoba.
- Fàbregas, A., Miñarro, M., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Carrillo, C., Sarrate, R., Sánchez, N., Ticó, J. R., & Suñé-Negre, J. M. (2013). Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 446(1–2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.015>
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>

- Fernandes Gusmão, D., Mimoto Estork, D., Barradas Paciencia, M. L., Collantes Díaz, I. E., Frana, S. A., Andreotti Rodrigues, P., Suffredini, I. B., Varella, A. D., Younes, R. N., Lima Reis, L. F., de Souza Montero, E. F., & Bernardi, M. M. (2013). Preliminary evaluation of the acute toxicity related to *Abarema auriculata* to mice and investigation of cytotoxicity of isolated flavonones. *Pharmacologyonline*, *1*, 113–127.
- Finotelli, P. V., Da Silva, D., Sola-Penna, M., Rossi, A. M., Farina, M., Andrade, L. R., Takeuchi, A. Y., & Rocha-Leão, M. H. (2010). Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*(1), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.008>
- Fritea, L., Pasca, P. M., Vlase, L., Gheldiu, A. M., Moldovan, L., Banica, F., Dobjanschi, L., & Cavalu, S. (2021). Electrochemical methods for evaluation of antioxidant properties of propolis extract incorporated in chitosan nanoparticles. *Materiale Plastice*, *57*(4), 96–108. <https://doi.org/10.37358/MP.20.4.5410>
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *44*(2–3), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>
- González Fuentes, F. J. (2009). *Determinación de la capacidad antioxidante y características estructurales de metabolitos secundarios de extractos polares y aceite esencial de orégano mexicano (Lippia graveolens) mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Güvenalp, Z., Kiliç, N., Kazaz, C., Kaya, Y., & Demirezer, L. Ö. (2006). Chemical constituents of *Galium tortumense*. *Turkish Journal of Chemistry*, *30*(4), 515–523.
- Hadidi, M., Pouramin, S., Adinepour, F., Haghani, S., & Jafari, S. M. (2020). Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate Polymers*, *236*, 116075. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>
- Hamid, a a, Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. a, Ameen, O. M., & Lawal, A. (2010).

Antioxidants : Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142–151. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300002>

- Hara, K., Someya, T., Sano, K., Sagane, Y., Watanabe, T., & Wijesekara, R. G. S. (2018). Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in Brief*, 17, 870–875. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.013>
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
- Kain, D., & Kumar, S. (2020). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles of *Achillea millefolium* L. and their activities. *F1000Research*, 9, 1297. <https://doi.org/10.12688/f1000research.26446.1>
- Kátia, V. A. N., Suellen, R. B., Marcelo, R. R. T., Rosa, de B. das N., Dijalma, B. daSilva, Marcos, J. da S., Roberto, F. V., Maria, das D. D. B., & Davyson, de L. M. (2020). Phyllanthin and hypophyllanthin determination by gas chromatography-mass spectrometry of six stonebreaker species from different regions of Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(4), 175–184. <https://doi.org/10.5897/jmpr2020.6909>
- Kawakita, A., Wong Sato, A. A., Llacsahuanga Salazar, J. R., & Kato, M. (2019). Leaf-flower–leaf-flower moth mutualism in the Neotropics: Successful transoceanic dispersal from the Old World to the New World by actively-pollinating leaf-flower moths. *PLoS ONE*, 14(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210727>
- Keawchaoon, L., & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>



- Klein, T., Buhr, E., & Georg Frase, C. (2012). TSEM: A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications. In *Advances in Imaging and Electron Physics* (Vol. 171, pp. 297–356). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394297-5.00006-4>
- Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., & Kokoska, L. (2005). Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(2), 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.062>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(2), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>
- Laczkowski, M. S., Gonçalves, T. R., Gomes, S. T. M., Março, P. H., Valderrama, P., & Matsushita, M. (2018). Application of chemometric methods in the evaluation of antioxidants activity from degreased chia seeds extracts. *LWT*, *95*, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.080>
- Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, *67*, 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.072>
- Lima, I. G., Rebouças, N. C., Ribeiro, R. de T. M., & Loiola, M. I. B. (2020). Flora do Ceará, Brasil: Phyllanthaceae. *Rodriguésia*, *71*(February). <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071007>
- Luo, Y., Teng, Z., & Wang, Q. (2012). Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(3), 836–843. <https://doi.org/10.1021/jf204194z>

- Manne, A. A., Vinay Viswanath, K., Ajay Kumar, G., Mangamuri, U., & Podha, S. (2020). Pterocarpus marsupium Roxb. heartwood extract synthesized chitosan nanoparticles and its biomedical applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00033-x>
- Mazumder, A., Mahato, A., & Mazumder, R. (2006). Antimicrobial potentiality of Phyllanthus amarus against drug resistant pathogens. *Natural Product Research*, 20(4), 323–326. <https://doi.org/10.1080/14786410600650404>
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., Díaz, J. A. L., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 36–46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Mohammed, A., & Abdullah, A. (2019). Scanning Electron Microscopy ( SEM ): A Review. *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX*, 77–85.
- MubarakAli, D., LewisOscar, F., Gopinath, V., Alharbi, N. S., Alharbi, S. A., & Thajuddin, N. (2018). An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. *Microbial Pathogenesis*, 114, 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.043>
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L. C., Rendón, M. R., Patricia-Chaparro, M., & Otálvaro-Álvarez, Á. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (Campomanesia lineatifolia). *Revista CENIC Ciencias Químicas Número Especial*, 46, 38–46. <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>
- Muzzalupo, I., Badolati, G., Chiappetta, A., Picci, N., & Muzzalupo, R. (2020). In vitro Antifungal Activity of Olive (Olea europaea) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00151>
- Nikule, H. A., Nitnaware, K. M., Chambhare, M. R., Kadam, N. S., Borde, M. Y., & Nikam, T. D. (2020). In-vitro propagation, callus culture and bioactive lignan production in

- Phyllanthus tenellus Roxb: a new source of phyllanthin, hypophyllanthin and phyltetralin. In *Scientific Reports* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67637-8>
- Oluwafemi, F., & Debiri, F. (2008). Antimicrobial effect of Phyllanthus amarus and Parquetina nigrescens on Salmonella typhi. *African Journal Biomedical Research*, 11(2), 215–219. <https://doi.org/10.4314/ajbr.v11i2.50712>
- Onyebuchi, C., & Kavaz, D. (2019). Chitosan and N, N, N-trimethyl chitosan nanoparticle encapsulation of ocimum gratissimum essential oil: Optimised synthesis, in vitro release and bioactivity. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7707–7727. <https://doi.org/10.2147/IJN.S220202>
- Patel, J. R., Tripathi, P., Sharma, V., Chauhan, N. S., & Dixit, V. K. (2011). Phyllanthus amarus: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 286–313. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.040>
- Patel, V., Srivatava, S., & Kumar, S. (2021). Comparative Profiling of Four Lignans Phyllanthin, Hypophyllanthin, Nirtetralin and Niranthin in Nine. *JAOAC Int*, 104(2), 485–497.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2015). *Introduction to Spectroscopy* (5th ed.). Cengage Learning.
- Pérez-cabeza, S. B., Angarita, N. M., Cervantes, M., & Barón-rodríguez, M. A. (2017). Evaluación del potencial antioxidante en extracto de espinaca por voltamperometría cíclica Evaluation of antioxidant potential in a spinach extract by cyclic voltammetry Avaliação do potencial antioxidante no extrato de espinafre por voltametria cíclica. *Rev.Ion*, 30(2), 99–105.
- Roengrit, T., Wannanon, P., Prasertsri, P., Kanpetta, Y., Sripanidkulchai, B., Wattanathorn, J., & Leelayuwat, N. (2015). Antioxidant effect of Phyllanthus amarus after moderate-intensity exercise in sedentary males : a randomized crossover (double-blind) study. *Journal of Physical Therapy Science*, 27(4), 2–7. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.1181>
- Roumy, V., Ruiz, L., Ruiz Macedo, J. C., Gutierrez-Choquevilca, A. L., Samaille, J., Encinas,

- L. A., Mesia, W. R., Ricopa Cotrina, H. E., Rivière, C., Sahpaz, S., Bordage, S., Garçon, G., Dubuisson, J., Anthérieu, S., Seron, K., & Hennebelle, T. (2020). Viral hepatitis in the Peruvian Amazon: Ethnomedical context and phytomedical resource. *Journal of Ethnopharmacology*, 255(March), 112735. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112735>
- Sahyon, H. A., & Al-Harbi, S. A. (2020). Antimicrobial, anticancer and antioxidant activities of nano-heart of Phoenix dactylifera tree extract loaded chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 1230–1241. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.224>
- Saravanakumar, K., Chelliah, R., MubarakAli, D., Jeevithan, E., Oh, D. H., Kathiresan, K., & Wang, M. H. (2018). Fungal enzyme-mediated synthesis of chitosan nanoparticles and its biocompatibility, antioxidant and bactericidal properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1542–1549. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.198>
- Sen, A., & Batra, A. (2013). The study of in vitro and in vivo antioxidant activity and total phenolic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 1–6. <http://www.ijppsjournal.com/Vol5Issue3/6199.pdf>
- Servat-Medina, L., González-Gómez, A., Reyes-Ortega, F., Sousa, I. M. O., Queiroz, N. de C. A., Zago, P. M. W., Jorge, M. P., Monteiro, K. M., de Carvalho, J. E., San Román, J., & Foglio, M. A. (2015). Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as Arrabidaea chica standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3897–3909. <https://doi.org/10.2147/IJN.S83705>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed.). Wiley Interscience.
- Soltanzadeh, M., Peighambardoust, S. H., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Chitosan nanoparticles as a promising nanomaterial for encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a natural source of antioxidants. *Nanomaterials*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/nano11061439>

- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Lakshmana Perumalsamy, P. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 217–220. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00345-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00345-7)
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Sturm, S., & Seger, C. (2012). Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography-mass spectrometry hyphenations: Curious option or powerful and complementary routine tool? *Journal of Chromatography A*, 1259, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.032>
- Verma, S., Sharma, H., & Garg, M. (2014). Phyllanthus Amarus: A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2), 18–22.
- Wardani, G., Mahmiah, & Sudjarwo, S. A. (2018). In vitro antibacterial activity of chitosan nanoparticles against mycobacterium tuberculosis. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 162–166. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.27>
- Yashvardhini, N., Samiksha, & Jha, D. K. (2021). Pharmacological intervention of various Indian medicinal plants in combating COVID-19 infection. *Biomedical Research and Therapy*, 8(7), 4461–4475. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i7.685>
- Yingyuen, P., Sukrong, S., & Phisalaphong, M. (2020). Isolation, separation and purification of rutin from Banana leaves (*Musa balbisiana*). *Industrial Crops and Products*, 149(March), 112307. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112307>
- Yisimayili, Z., Guo, X., Liu, H., Xu, Z., Abdulla, R., Akber Aisa, H., & Huang, C. (2019). Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.013>
- Zhang, L., & Kosaraju, S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of

polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7), 2956–2966.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033>

Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X., & Zou, G. (2008). Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 891–897. <https://doi.org/10.1002/app.26402>

## ANEXOS

### Anexo N° 1

Identificación botánica del *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster.



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA "ALBERTO CAZORLA TALLERÍ"

## CONSTANCIA

El Encargado del Laboratorio de Botánica Aplicada y Herbario de Plantas Medicinales HEPLAME de la Facultad de Ciencias y Filosofía deja constancia que:

Ha recibido de la Mg. Fiorella Acuña Iribarren, Tesista de Doctorado de la Facultad de Estomatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, dos muestras de especies vegetales, una introducida al Perú y sembrada en la Región Ancash llamada "Manzanilla" y otra especie proveniente de la Región Loreto, llamada "Chanca piedra", para su determinación Taxonómica. El resultado del estudio sistemático de las muestras es el siguiente:

1. Nombre vernacular: "Manzanilla".  
Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida (Dicotiledónea).  
Orden: ASTERALES.  
Familia: ASTERACEAE.  
Género: *Matricaria*  
Especie: *Matricaria chamomilla* L. (= *Matricaria recutita* L.)
2. Nombre vernacular: "Chanca piedra".  
Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida (Dicotiledónea).  
Orden: MALPIGHIALES.  
Familia: PHYLLANTHACEAE (=EUPHORBIACEAE).  
Género: *Phyllanthus*  
Especie: *Phyllanthus stipulatus* (Raf.) Webster.

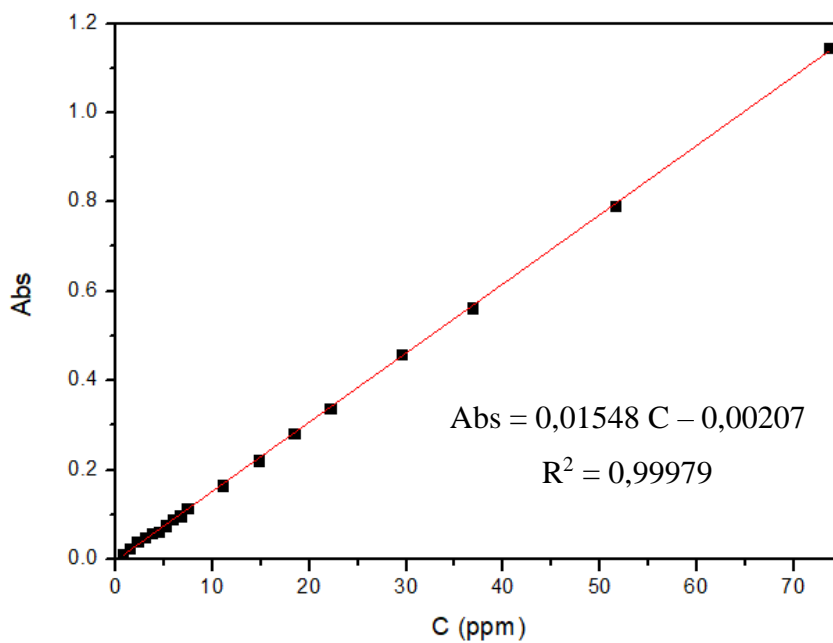
Se expide el presente documento a solicitud del interesado para los fines que considere convenientes.

Lima, 21 de Abril del 2017.

  
Blgo. Camilo Díaz Santibañez  
CBP: 3795.

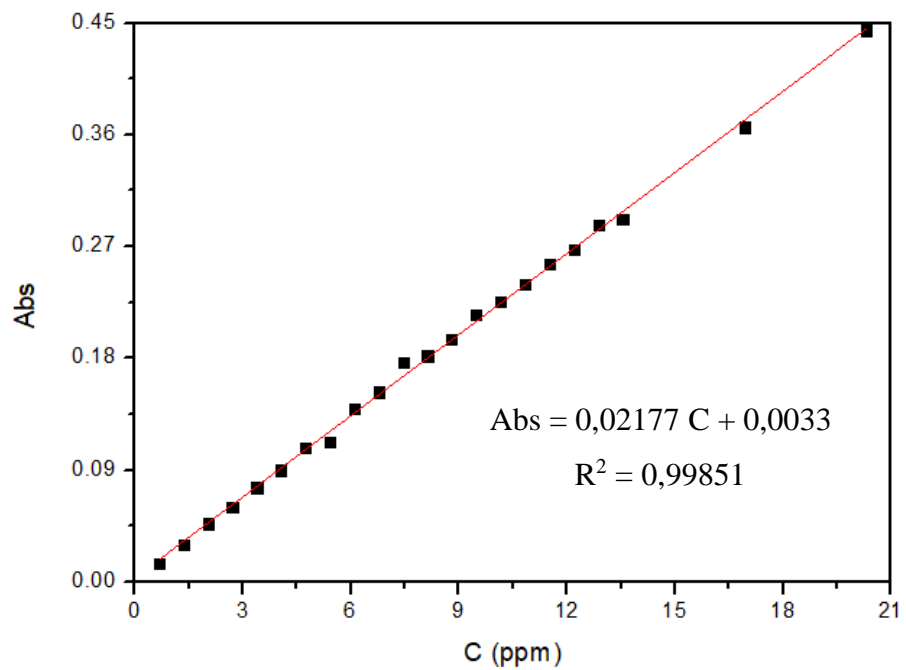
## Anexo N° 2

Curva de calibración del EBO de 0,7 a 73,7 ppm en agua ultrapura.



## Anexo N° 3

Curva de calibración del BUT 0,6 a 20,3 ppm en agua ultrapura.

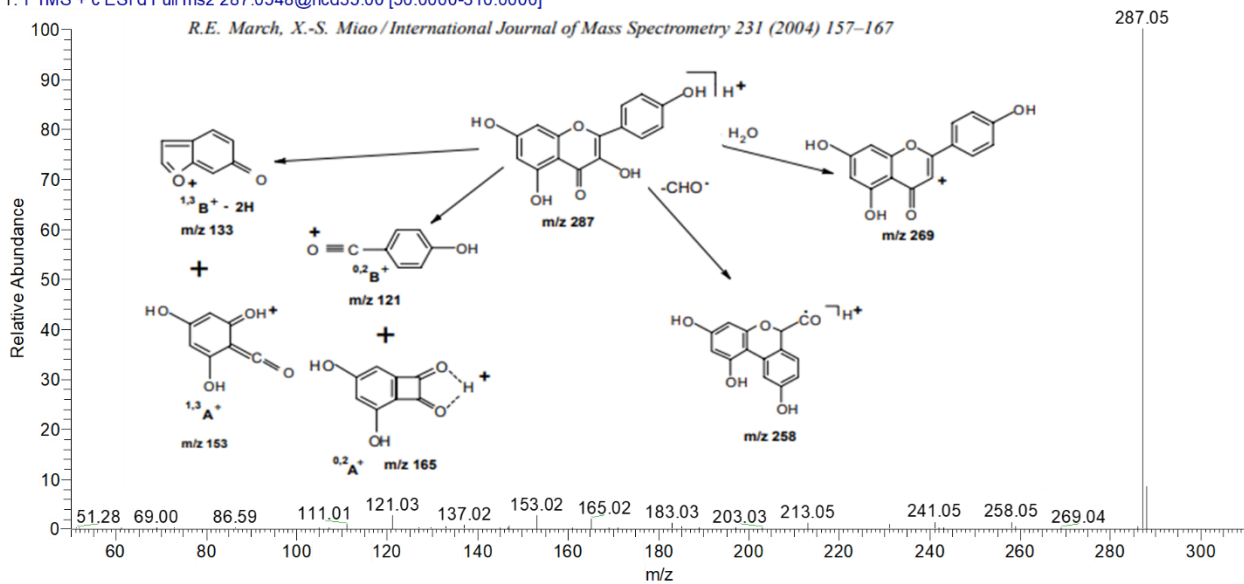




## Anexo N° 4

### Espectro de masas de kaempferol.

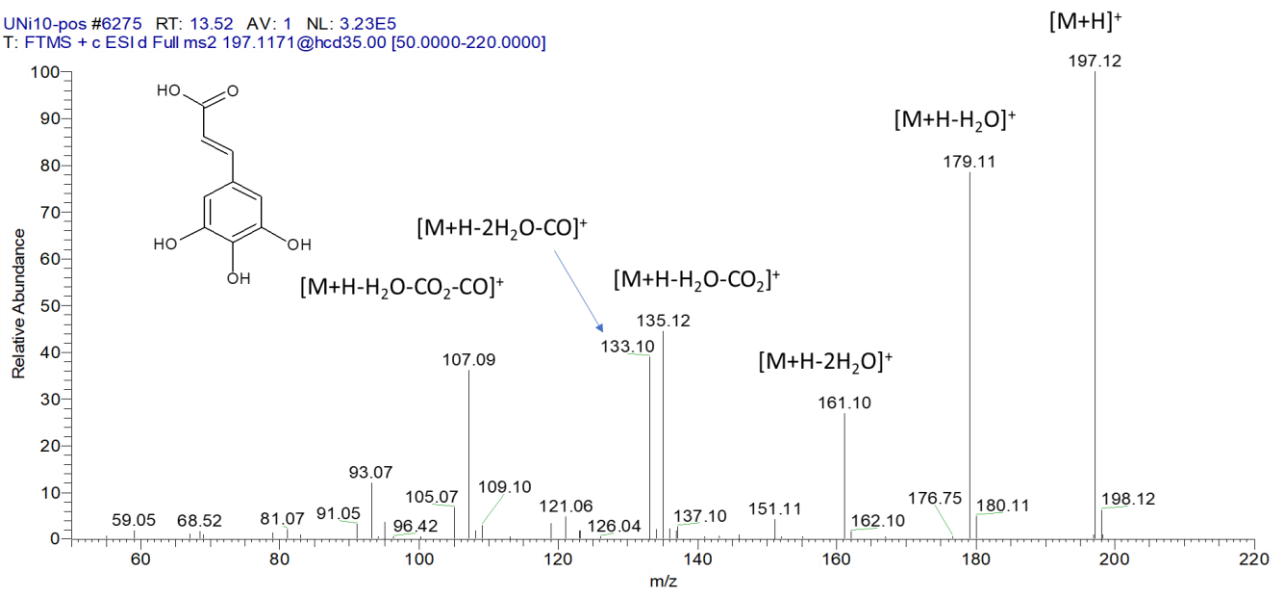
UNi10-pos #7373 RT: 15.82 AV: 1 NL: 9.15E5  
T: FTMS + c ESI d Full ms2 287.0548@hcd35.00 [50.0000-310.0000]



## Anexo N° 5

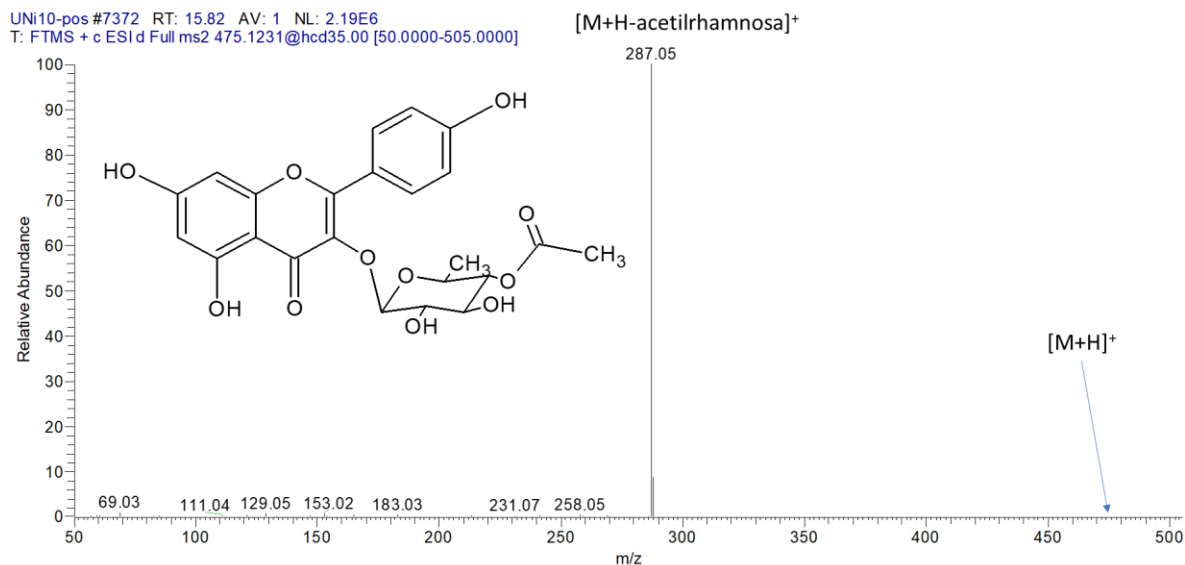
### Espectro de masas de ácido trihidroxicinámico.

UNi10-pos #6275 RT: 13.52 AV: 1 NL: 3.23E5  
T: FTMS + c ESI d Full ms2 197.1171@hcd35.00 [50.0000-220.0000]



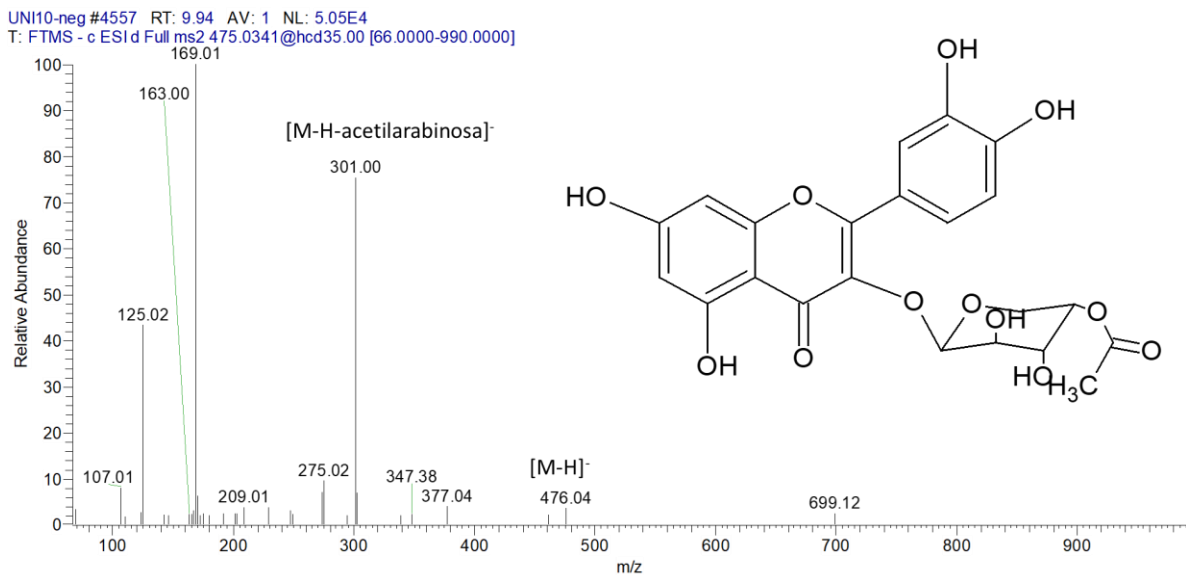
## Anexo N° 6

### Espectro de masas de kaempferol-O-acetilramnosido.



## Anexo N° 7

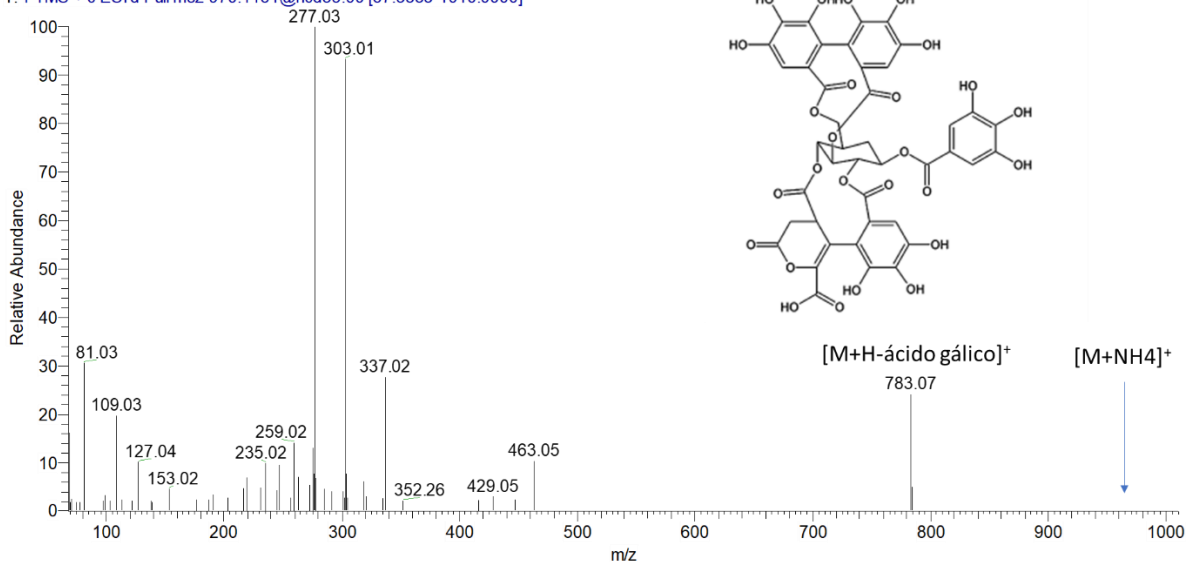
### Espectro de masas de quercetina acetilarabinosa.



## Anexo N° 8

### Espectro de masas de filantusina A.

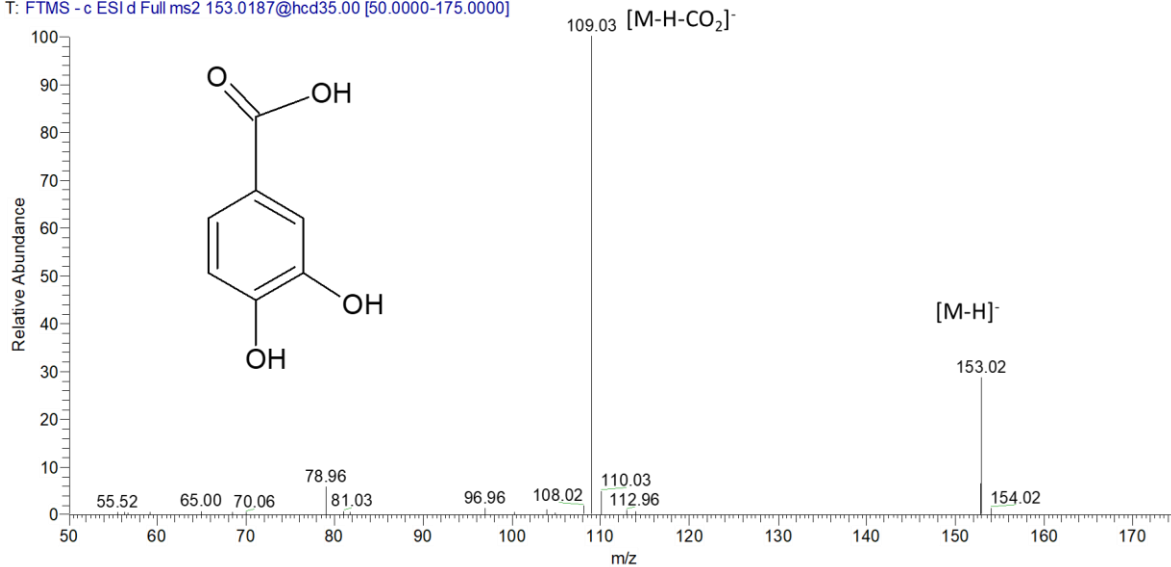
UNi10-pos #4981 RT: 10.80 AV: 1 NL: 5.83E4  
T: FTMS + c ESI d Full ms2 970.1151@hcd35.00 [67.3333-1010.0000]



## Anexo N° 9

### Espectro de masas de ácido protocatecuico.

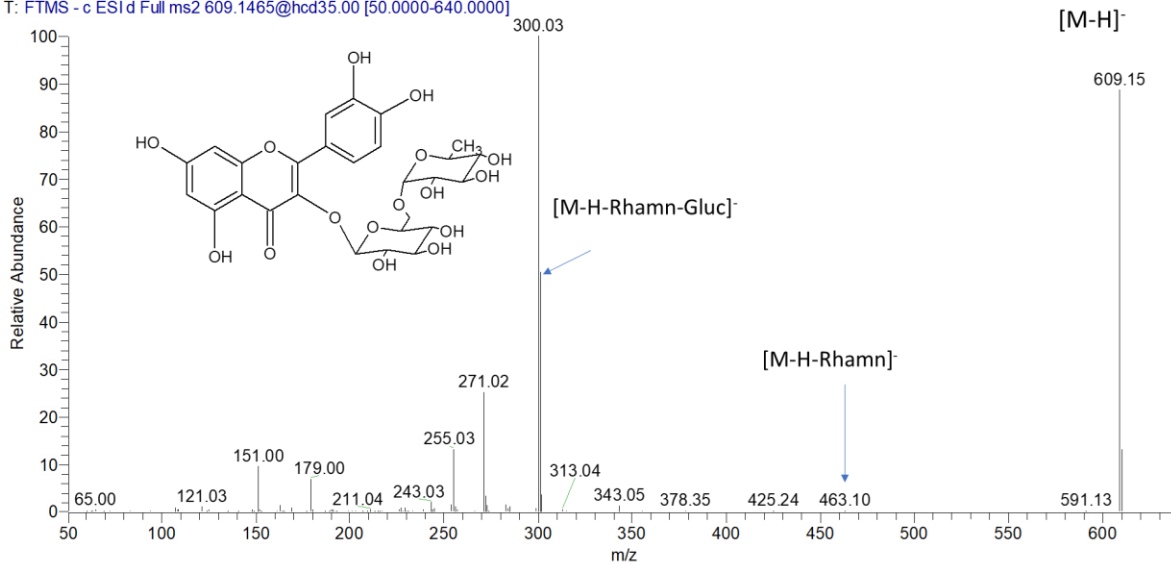
UNi12-neg #1722 RT: 3.92 AV: 1 NL: 2.76E5  
T: FTMS - c ESI d Full ms2 153.0187@hcd35.00 [50.0000-175.0000]



## Anexo N° 10

### Espectro de masas de rutina.

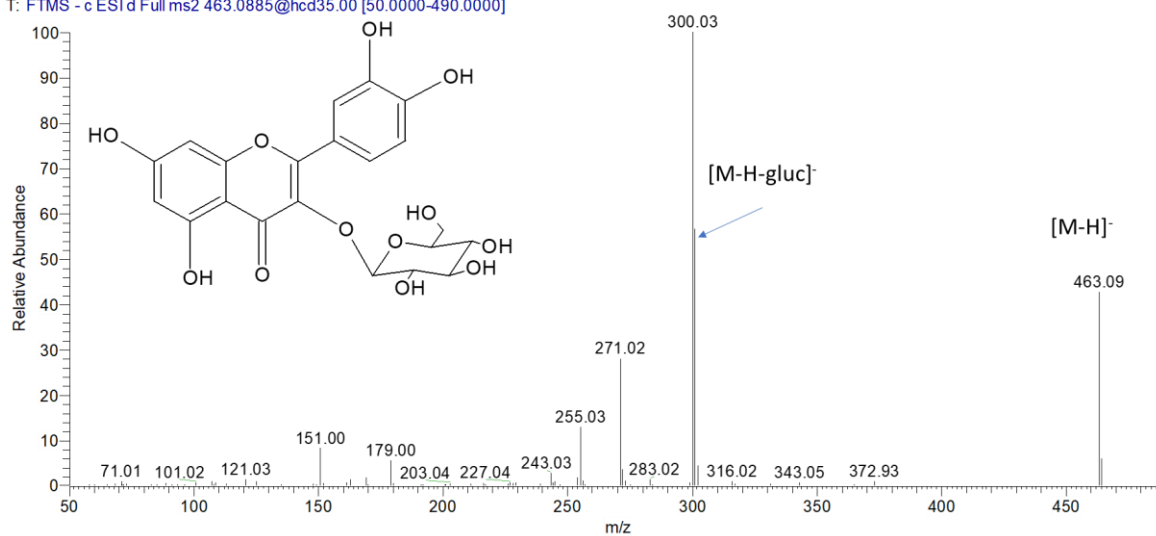
UN112-neg #5640 RT: 12.27 AV: 1 NL: 1.90E6  
T: FTMS - c ESI d Full ms2 609.1465@hcd35.00 [50.0000-640.0000]



## Anexo N° 11

### Espectro de masas de quercetina-O-glicosilada.

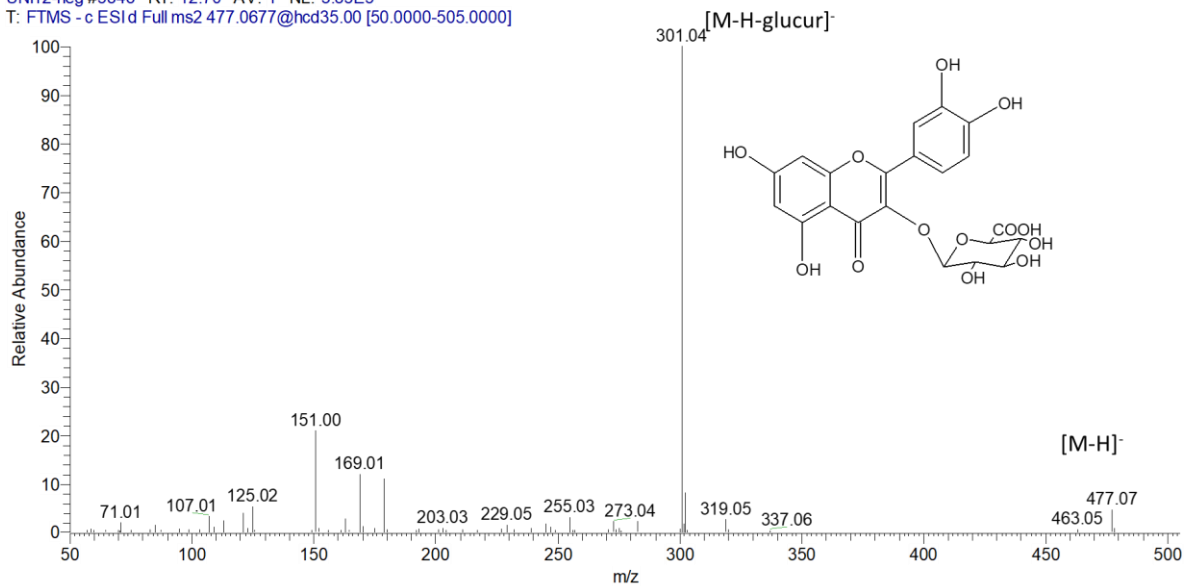
UN112-neg #5845 RT: 12.70 AV: 1 NL: 9.42E5  
T: FTMS - c ESI d Full ms2 463.0885@hcd35.00 [50.0000-490.0000]



## Anexo N° 12

### Espectro de masas de quercetina-O-glucurónico.

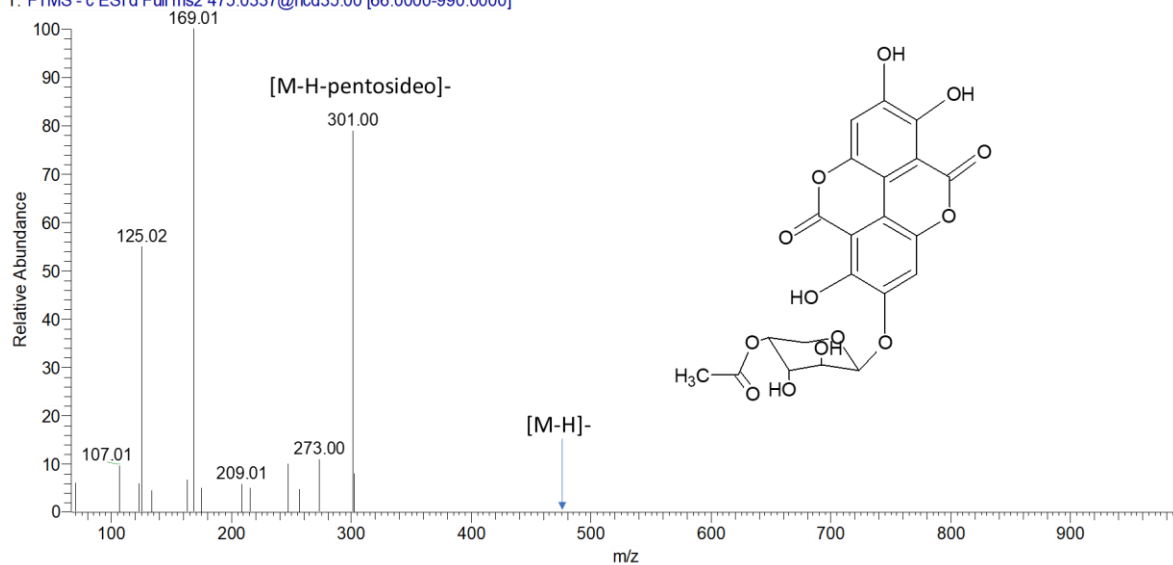
UN12-neg #5846 RT: 12.70 AV: 1 NL: 3.85E5  
T: FTMS - c ESI d Full ms2 477.0677@hcd35.00 [50.0000-505.0000]



## Anexo N° 13

### Espectro de masas de ácido elálgico acetilxilosi.

UN12-neg #2426 RT: 5.42 AV: 1 NL: 2.09E4  
T: FTMS - c ESI d Full ms2 475.0337@hcd35.00 [66.0000-990.0000]



## Anexo N° 14

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del ácido elágico

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>2H: H-5, H-5'</b>	7.60	7.51
<b>2H: OH-4a, OH-8a</b>	8.80	--
<b>2H: OH-3a, OH-7a</b>	12.10	--

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C1, C1'</b>	113.60	114.09
<b>C2, C2'</b>	136.80	137.65
<b>C3, C3'</b>	140.38	140.53
<b>C4, C4'</b>	148,74	148.50
<b>C5, C5'</b>	111.54	111.72
<b>C6, C6'</b>	108.80	108.87
<b>C1'', C2''</b>	161.28	161.59

NMR 1H (400 MHz – CHD2OD/DMSO-d5, ppm); NMR 13C (100 MHz – CD3OD/DMSO-d6, ppm) (Da Silva et al., 2008)

## Anexo N° 15

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Kaempferol

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>3-OH</b>	12.49	--
<b>7-OH</b>	10.80	--
<b>5-OH</b>	10.12	--
<b>4'-OH</b>	9.42	--
<b>H6'</b>	8.06	--
<b>H2'</b>	8.03	--
<b>H5'</b>	6.95	6.95
<b>H3'</b>	6.92	6.93
<b>H8</b>	6.44	6.38
<b>H6</b>	6.19	6.23

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C2</b>	156.65	153.32
<b>C3</b>	136.13	137.65
<b>C4</b>	176.38	177.97
<b>C5</b>	164.36	165.74
<b>C6</b>	98.67	98.33
<b>C7</b>	161.18	161.59
<b>C8</b>	93.95	94.08
<b>C9</b>	147.29	147.35
<b>C10</b>	103.52	103.28
<b>C1'</b>	122014	122.20
<b>C2'</b>	129.98	129.33
<b>C3'</b>	115.91	115.61
<b>C4'</b>	159.66	153.32
<b>C5'</b>	115.91	115.61
<b>C6'</b>	129.98	129.33

1H NMR y 13C NMR, 300 MHz NMR in DMSO-d6 (Deng et al., 2019)

## Anexo N° 16

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Ácido trihidroxicinámico

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<i>Trans</i> - CH=CHCOOH	6.08 (J= 15)	6.23
Ar H-2', 6', 2H	6.55	6.57
<i>Trans</i> - CH=CHCOOH	7.30 (J= 16)	7.26

<sup>1</sup>HNMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  
([Dhammaraj et al., 2015](#))

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C2', C6'</b>	107.5	108.23
<b>C2</b>	115.2	115.61
<b>C4'</b>	124.6	124.39
<b>C1'</b>	136.2	137.65
<b>C3</b>	145.0	145.34
<b>C3', C5'</b>	146.2	146.17
<b>C1</b>	168.0	168.65

## Anexo N° 17

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Kaempferol-O-acetilramnosido

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>H6</b>	6.27	6.24
<b>H8</b>	6.47	6.38
<b>H3', H5'</b>	7.05 (J=8.6)	7.07
<b>H2', H6'</b>	7.82 (J=8.6)	7.82
<b>H1''</b>	5.54	5.51
<b>H2''</b>	4.25	4.19
<b>H3''</b>	3.87 (J= 9.8, 3.4)	3.86
<b>H4''</b>	4.83 (J= 9.8)	4.95
<b>H5''</b>	3.42 (J= 10.3, 6.1)	3.39
<b>H6''</b>	0.78 (J= 6.1)	0.83
<b>H4'' Ac</b>	1.99	2.00

<sup>1</sup>HNMR (500 MHz, acetona-d<sub>6</sub>), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz acetona-d<sub>6</sub>) (Masuda et al., 1991)

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)		$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C2</b>	158.2	156.32	<b>C1''</b>	102.3	102.57
<b>C3</b>	135.4	137.65	<b>C2''</b>	71.5	71.38
<b>C4</b>	179.1	177.97	<b>C3''</b>	69.8	69.56
<b>C4a</b>	105.4	103.28	<b>C4''</b>	74.5	75.01
<b>C5</b>	163.2	162.80	<b>C5''</b>	69.0	68.55
<b>C6</b>	100.0	99.32	<b>C6''</b>	17.6	17.57
<b>C7</b>	166.3	166.34	<b>-COMe</b>	20.9	20.34
<b>C8</b>	94.8	95.14	<b>-COMe</b>	170.8	170.25
<b>C8a</b>	158.4	161.59			
<b>C1'</b>	122.4	122.54			
<b>C2', 6'</b>	131.7	131.20			
<b>C3', 5'</b>	116.4	116.82			
<b>C4'</b>	161.2	161.59			

## Anexo N° 18

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Quercetina acetilarabinosa

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>H2'</b>	7.49 (J=2.1)	7.51
<b>H6'</b>	7.47 (J= 8.4, 2.1)	7.44
<b>H5'</b>	6.88 (J=8.3)	6.88
<b>H8</b>	6.34 (J=2.0)	6.38
<b>H6</b>	6.17	6.23
<b>H1''</b>	5.61	5.57
<b>H2''</b>	5.33 (J=3.1)	5.33
<b>H3''</b>	4.05 (J=6.3; 3.1)	4.05
<b>H4''</b>	3.88 (J=7.7)	3.88
<b>H5''a</b>	3.52 (J=14.0, 3.5)	3.52
<b>H5''b</b>	3.48 (J=14.0; 4.9)	3.48
<b>MeCOO</b>	2.08	2.09

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)		$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C4</b>	179.6	177.97	<b>C1''</b>	107.0	108.23
<b>MeCO</b>	171.8	170.25	<b>C10</b>	105.7	103.28
<b>C7</b>	165.9	165.74	<b>C6</b>	99.8	99.32
<b>C5</b>	163.0	162.80	<b>C8</b>	94.8	95.14
<b>C2</b>	159.2	161.59	<b>C4''</b>	87.3	91.77
<b>C9</b>	158.4	161.59	<b>C2''</b>	85.6	84.32
<b>C4'</b>	149.8	149.54	<b>C3''</b>	76.7	76.91
<b>C3'</b>	146.3	146.31	<b>C5''</b>	61.9	61.81
<b>C3</b>	134.7	137.65	<b>MeCO</b>	20.7	20.34
<b>C1'</b>	123.1	124.39			
<b>C6'</b>	122.9	122.54			
<b>C2'</b>	116.8	116.82			
<b>C5'</b>	116.4	117.29			

<sup>1</sup>HNMR y <sup>13</sup>CNMR ((D5)pyridine) (Wang et al., 2006)

## Anexo N° 19

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Filantusina A

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>Glucosa: H1</b>	6.30	6.23
<b>H2</b>	5.42	5.42
<b>H3</b>	5.64	5.57
<b>H4</b>	5.23	5.20
<b>H5</b>	4.55 (t, 8.5)	4.51
<b>H6</b>	4.79 (t, 11.5)	4.95 (1.55)
<b>Galloyl: H2,6</b>	7.14	7.12
<b>HHDP: H3</b>	7.05	7.07
<b>Anillo D: H3</b>	7.17	7.13
<b>Anillo E: H4'</b>	3.46 (d, 7.0)	3.48
<b>H5'</b>	3.20 (dd, 7.0, 16.5)	3.17

<sup>1</sup>HNMR 500 MHz, Acetona- d<sub>6</sub>- D<sub>2</sub>O.  
(Yoshida et al., 1992)



## Anexo N° 20

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del 1-O-galloyl-3,6-hexahidroxidifenoil-glucoyranosida

Hidrogeno	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>Glucosa 1</b>	6.363	6.36
<b>2</b>	3.987	3.99
<b>3</b>	4.810	4.81
<b>4</b>	4.466	4.47
<b>5</b>	4.518	4.52
<b>6 a</b>	4.154	4.16
<b>6 b</b>	4.965	4.97
<b>G-2,6</b>	7.055	7.06
<b>A-3</b>	6.692	6.69
<b>B-3'</b>	6.992	6.99

<sup>1</sup>HNMR y <sup>13</sup>C NMR ( 500 MHz CD<sub>3</sub>OD)  
(Sudjaroen et al., 2012)

Carbono	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>Glucosa 1</b>	95.07	95.84	<b>A-3</b>	110.26	109.86
<b>2</b>	69.45	69.28	<b>A-4</b>	145.66	145.68
<b>3</b>	71.58	71.71	<b>A-5</b>	138.29	138.55
<b>4</b>	62.49	62.24	<b>A-6</b>	145.48	145.48
<b>5</b>	76.22	76.44	<b>A-7</b>	168.58	168.15
<b>6</b>	65.04	65.57	<b>Anillo B-1'</b>	116.82	116.33
<b>Galloyl G-1</b>	120.66	120.54	<b>B-2'</b>	125.55	123.97
<b>G-2,6</b>	111.03	112.63	<b>B-3'</b>	108.36	108.26
<b>G-3,5</b>	146.42	146.70	<b>B-4'</b>	146.04	146.70
<b>G-4</b>	140.45	139.68	<b>B-5'</b>	137.76	137.26
<b>G-7</b>	166.73	166.84	<b>B-6'</b>	145.39	145.48
<b>Anillo A-1</b>	117.31	117.53	<b>B-7'</b>	170.17	173.79
<b>A-2</b>	125.49	123.97			

## Anexo N° 21

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Ácido protocatechuico

Hidrogeno	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>H1</b>	7.40 (J=8.0; 2.0, H6)	7.21
<b>H2</b>	7.42	7.43
<b>H3</b>	6.76 (J= 8.0; H5)	6.75

<sup>1</sup>HNMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), <sup>13</sup>C NMR ( 150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Erukainure et al., 2017)

	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C1</b>	123.7	123.97
<b>C2</b>	117.7	117.79
<b>C3</b>	145.8	145.79
<b>C4</b>	150.8	152.49
<b>C5</b>	115.5	115.61
<b>C6</b>	123.6	123.97
<b>CO</b>	170.5	168.15

## Anexo N° 22

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Rutina

Posición H	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición H	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>Aglicona</b>			<b>Rhamnosa</b>		
<b>6</b>	6.23 (1H, d, J=2.1)	6.21	<b>1'''</b>	4.54 (1H, d, J = 1.5)	4.54
<b>8</b>	6.42 (1H, d, J = 2.1)	6.42	<b>2'''</b>	3.65	3.65
<b>2'</b>	7.69 (1H, d, J = 2.0)	--	<b>3'''</b>	3.55	3.55
<b>5'</b>	6.89 (1H, d, J = 8.4)	6.89	<b>4'''</b>	3.30	3.30
<b>6'</b>	7.65 (1H, dd, J = 2.0, 8.4)	--	<b>5'''</b>	3.46	3.46
<b>Gluc</b>			<b>6'''</b>	1.14 (3H, d, J = 6.2)	1.14
<b>1''</b>	5.12 (1H, d, J = 7.7)	5.13			
<b>2''</b>	3.49	3.50			
<b>3''</b>	3.31	3.30			
<b>4''</b>	3.29	3.30			
<b>5''</b>	3.43	3.43			
<b>6''</b>	3.81	3.81			

<sup>1</sup>H NMR a 600 MHz en CD<sub>3</sub>OD (Al-Majmaie et al., 2018)

Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>Aglicona</b>			<b>4'</b>	150.4	152.49	<b>3'''</b>	72.4	72.44
<b>2</b>	159.5	159.43	<b>5'</b>	116.2	116.25	<b>4'''</b>	74.1	73.74
<b>3</b>	135.7	135.63	<b>6'</b>	123.7	123.97	<b>5'''</b>	69.8	69.98
<b>4</b>	179.5	173.79	<b>Gluc</b>			<b>6'''</b>	18.0	18.71
<b>5</b>	163.2	163.95	<b>1''</b>	104.8	104.21			
<b>6</b>	100.0	98.13	<b>2''</b>	75.9	75.87			
<b>7</b>	166.2	166.84	<b>3''</b>	77.4	77.61			
<b>8</b>	95.0	95.84	<b>4''</b>	71.5	71.71			
<b>9</b>	159.5	159.43	<b>5''</b>	78.3	77.61			
<b>10</b>	105.7	104.21	<b>6''</b>	68.7	68.12			
<b>1'</b>	123.2	123.17	<b>Rhamnosa</b>					
<b>2'</b>	117.8	117.79	<b>1'''</b>	102.5	102.06			
<b>3'</b>	146.0	146.70	<b>2'''</b>	72.2	72.04			

<sup>13</sup>C NMR a 150 MHz en CD<sub>3</sub>OD (Al-Majmaie et al., 2018)

## Anexo N° 23

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Quercetina-O-glicosilada

Posición H	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
5	6.28 (d, 2.1)	6.28	2	156.7 (s)	152.49	5'	115.7 (d)	115.61
7	6.31 (d, 2.1)	6.35	3	135.8 (s)	135.63	6'	122.1 (d)	122.31
3'	7.63(d, 2.0)	--	4	176.5 (s)	173.79	glucoside		
5'	6.89 (d, 8.0)	6.89	5	161.2 (s)	159.43	1''	100.1 (d)	102.06
6'	7.57 (dd, 8.1,2.1)	--	6	99.6 (d)	98.13	2''	74.1 (d)	74.91
glucoside			7	162.1 (s)	163.95	3''	77.5 (d)	77.61
1''	5.65 (d,7.3)	5.45	8	94.2 (d)	95.84	4''	70.1 (d)	70.37
2''	3.35 (dd)	3.35	9	156.6 (s)	152.49	5''	76.3 (d)	76.44
3''	3.45 (d)	3.45	10	107.2 (s)	108.26	6''	61.4 (t)	61.29
4''	3.41 (t)	3.41	1'	122.4 (s)	122.31			
5''	3.30 (m)	3.30	2'	115.6 (d)	115.61			
6''	3.38 (dd)	3.38	3'	145.6 (s)	145.68			
			4'	148.2 (s)	148.43			

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) and <sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (Panda & Kar, 2007)

## Anexo N° 24

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Quercetina-O-glucurónido

Posición H	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	Posición C	$\delta_{ref}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
2'	7.70	--	4	177.2	173.79	10	103.8	104.21
6'	7.59 (dd, 2.0, 8.4)	7.43	6''	170.0	168.15	1''	101.6	102.06
5'	6.83 (d, 1.5)	6.83	7	164.2	164.28	6	98.7	98.13
8	6.36	6.36	5	161.1	163.95	8	94.2	95.84
6	6.18 (d, 1.5)	6.18	2	156.5	159.43	3''	76.0	76.44
1''	5.31 (d, 7.3)	5.30	9	156.2	159.43	2''	75.5	75.40
5''	3.74 (d, 9.0)	3.74	4'	148.4	148.43	5''	73.8	73.74
2'' 3'' 4''	3.61	3.61	3'	144.8	144.87	4''	71.3	71.71
			3	133.2	135.36			
			6'	121.3	122.31			
			1'	120.7	120.60			
			5'	116.5	116.33			
			2'	115.2	115.09			

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (Yoon et al., 2014)

## Anexo N° 25

Tabla de comparación de los desplazamientos de los espectros de RMN1H y RMN13C del Ácido elágico acetilxilosi

Posición H	$\delta_{\text{ref}}$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
5	7.64	--
1'	5.02 (3.7)	5.02
2', 3'	4.3- 3.2	4.30 – 3.22
4'	4.87	4.87
5'	7.44	7.43
Acetyl-	2.07	2.04

<sup>1</sup>H RMN 300 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub> (Zafrilla et al., 2001)