



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS CRUDOS
DE HOJA DE *Vasconcellea candicans* (A. GRAY) A. DC 1864 "MITO"

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Donayre Aguilar, Rodrigo Augusto

Asesora:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Jurado:

Lopez Bulnes, Jorge Luis

Saez Flores, Gloria Maria

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Lima - Perú

2022

Referencia:

Donayre, R. (2022). *Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos crudos de hoja de Vasconcellea candicans (a. Gray) a. DC 1864 "mito"*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6319>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS CRUDOS DE

HOJA DE *Vasconcellea candicans* (A. GRAY) A. DC 1864 “MITO”

Línea de investigación:

Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Donayre Aguilar Rodrigo Augusto

Asesora:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor
(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Jurado:

Lopez Bulnes, Jorge Luis
Saez Flores, Gloria Maria
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Lima - Perú

2022

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	6
	1.1. Descripción y formulación del problema	7
	1.1.1. Formulación del problema general	7
	1.1.2. Formulación de los problemas específicos	8
	1.2. Antecedentes.....	8
	1.3. Objetivos.....	9
	1.3.1. Objetivo general	9
	1.3.2. Objetivos específicos	10
	1.4. Justificación	10
	1.5. Hipótesis	11
II.	MARCO TEÓRICO	12
	2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	12
	2.1.1. Generalidades de <i>Vasconcellea candicans</i>	12
	2.1.2. Origen y distribución	12
	2.1.3. Característica, utilidad y demanda.....	12
	2.1.4. Aspecto antioxidante	13
	2.1.5. Potencial antimicrobiano	15
III.	MÉTODO.....	16
	3.1. Tipo de investigación.....	16
	3.2. Ámbito temporal y espacial	16
	3.3. Variables	17
	3.3.1. Variables dependientes	17
	3.3.2. Variables independientes	17
	3.4. Población y muestra.....	17
	3.5. Instrumentos	17
	3.5.1. Dispositivos	17
	3.5.2. Programas	18
	3.5.3. Muestra biológica	18
	3.6. Procedimiento	18

3.6.1. Preparación y almacenamiento de extracto crudo de hojas frescas de mito.....	18
3.6.2. Determinación de proteínas de extracto crudo de hoja de mito	19
3.6.3. Presencia de compuestos fenólicos.....	19
3.6.4. Cuantificación de polifenoles totales.....	21
3.6.5. Tolerancia microbiana a los extractos	21
3.7. Análisis de datos	24
3.8. Consideraciones éticas.....	25
IV. RESULTADOS	26
4.1. Preparación y almacenamiento de extracto crudo de hojas frescas de mito.....	26
4.2. Determinación de proteínas	26
4.3. Presencia de compuestos fenólicos.....	27
4.4. Cuantificación de polifenoles totales.....	28
4.5. Curva de crecimiento y tolerancia microbiana frente a los extractos	29
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS	42
IX. ANEXOS.....	47

RESUMEN

La demanda del consumidor en busca de antioxidantes naturales que eviten la oxidación de los alimentos y por ende su degradación, es cada día mayor; por lo que el objetivo de esta tesis fue evaluar si los extractos crudos de la hoja de *Vasconcellea candicans* o «Mito», poseía capacidad antioxidante y antibacteriana. La metodología que utilizamos fue maceración de la hoja de Mito en diferentes solventes (agua, etanol y metanol), cuyos extractos sirvieron para cuantificar fenoles totales con Folin-Cicateleau; y evaluar la capacidad antibacteriana con el *Acetobacter sp.* y con un microorganismo de contraste (*Saccharomyces cerevisiae*). Los resultados obtenidos de antioxidantes “polifenoles”, expresados en mg/g de materia seca, fueron de 36.34 para el extracto acuoso; 23.61 para el etanólico y de 5.01 para el metanólico. El crecimiento bacteriano expresando porcentualmente fue 100 para el extracto acuoso, 90 para etanólico y 86 para el metanólico. Por lo que concluimos que, el extracto acuoso posee la mayor capacidad antioxidante y el extracto metanólico la mayor capacidad antibacteriana.

Palabras clave: extracto hoja de Mito, antioxidante, antimicrobiano.

ABSTRACT

Consumer demand in search of natural antioxidants that prevent the oxidation of food and therefore its degradation is increasing every day; hence, the objective of this thesis was to evaluate whether the crude extracts of the *Vasconcellea candicans* leaf or «Mito», had antioxidant and antimicrobial capacity. The methodology we used was maceration of the Mito leaf in different solvents (water, ethanol, and methanol), whose extracts served to quantify total phenols with Folin-Cicateleau, and evaluate the antibacterial capacity with the microorganisms *Acetobacter* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. The results obtained in mg/g of dry matter were 36.34 for the aqueous extract; 23.61 for the ethanolic and 5.01mg for the methanolic of "polyphenol" antioxidants. The bacterial growth expressing percentage was 100 for the aqueous extract, 90 for ethanolic, and 86 for the methanolic. Therefore, we conclude that the aqueous extract has the highest antioxidant capacity and the methanolic extract has the highest antibacterial capacity.

Keywords: Mito leaf extract, antioxidant, antimicrobial.

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos ya sean de consumo directo o procesados, cuando no se encuentran sujetos a procesos de conservación, presentan cambios bioquímicos que causan la reducción de su vida útil, ya sea por la acción de microorganismos, actividades metabólicas u oxidación, resultando ser un problema con el cual se enfrenta constantemente las industrias de alimentos, afectando características fisicoquímicas, organolépticas y nutricionales de los alimentos, por lo que el uso de antioxidantes está más que justificado para evitar, inhibir o retrasar su oxidación además de que en muchos de los casos también sirven como controladores de microorganismos (Alvines, 2019).

Sin embargo, los antioxidantes que en la actualidad son más recurrentemente usados son sintéticos, de los cuales algunos tienen cuestionamientos respecto a su seguridad a con la salud del consumidor (Marcano y Masahisa, 2018); por lo que la aplicación de antioxidantes naturales es una opción. A pesar de ello, a nivel industrial no está del todo establecido, debido a que muchos de estos antioxidantes presentan una baja razón de eficiencia/costo.

Por otro lado, los antioxidantes naturales no solo son una alternativa emergente para la industria alimentaria, sino que también aportan de manera significativa en la salud del consumidor (Coronado et al., 2015); además, su aplicación industrial al igual que un antioxidante sintético puede lograr abarcar el control microbiológico del alimento al que se le aplique, por lo que la búsqueda del antioxidante capaz de competir con uno sintético no cesa.

En consecuencia, en la búsqueda de antioxidantes naturales, el presente trabajo decidió tomar como candidato a un integrante de la familia de las caricaceas (*Vasconcellea candidans*), debido a que representantes de la misma familia habían presentado características antioxidante y antimicrobiana deseadas. Además de apoyar al conocimiento de este arbusto que se encuentra en peligro crítico.

1.1. Descripción y formulación del problema

Desde un principio la industria alimentaria se encontró con el problema de la oxidación de los alimentos, para lo cual utilizaron antioxidantes naturales, que no fueron suficientes para la amplia gama de alimentos que se produce (Laboratorios Vitafor, 2017). En la actualidad, el uso de antioxidantes sintéticos, cumplen un rol importante, debido a que evitan la oxidación de los alimentos y con ello su pérdida de color, aroma y sabor (Valenzuela et al., 2003). Sin embargo, de acuerdo a Marcano y Masahisa (2018), dicha práctica se ha puesto en tela de juicio por parte de los consumidores debido a sus posibles repercusiones en la salud humana ya que su uso no solo puede causar efectos de intoxicación aguda, cuando se supera su nivel de ingesta diaria; sino que también puede causar enfermedades hepáticas, circulatorias y hasta cáncer con el tiempo (Chávez y Garmilla, 1964).

Por otro lado, los antioxidantes naturales además de beneficiar a la industria alimentaria, aportan beneficios a la salud del consumidor, como es el hecho de evitar el estrés oxidativo en las células animales, evitando la alteración del metabolismo de las mitocondrias causando la muerte celular, la cual es un índice de envejecimiento; además que se ha documentado que el cuerpo humano al enfrentarse a un envejecimiento natural, pierde capacidad antioxidante, resultando en cambios degenerativos del sistema inmune y por ende en enfermedades como cataratas, Alzheimer, Parkinson, enfermedades hepáticas o problemas cardiovasculares, siendo necesario para esto el consumo de antioxidantes exógenos (Coronado et al., 2015), por lo que la búsqueda de antioxidantes naturales es una necesidad para la industria, así como para mantener la calidad de vida de sus consumidores.

1.1.1. Formulación del Problema general

¿Las hojas, de la planta de “mito” tienen componentes con capacidad antioxidante y antibacteriana que podrían ser utilizados como aditivos naturales en la industria alimentaria?

1.1.2. *Formulación de los Problemas específicos*

- ¿Los componentes de las hojas de “mito” extraídos con metanol, etanol y agua tienen capacidad antioxidante?
- ¿Los componentes de las hojas de “mito” extraídos con metanol, etanol y agua tienen capacidad antibacteriana?

1.2. Antecedentes

Tal como lo mencionan Punetha y Prakash (2019), todas las plantas poseen biometabolitos que resultan ser antioxidantes, en especial aquellos que provienen de metabolitos secundarios, los que en muchos casos son potencialmente aplicables a la industria farmacológica y alimentaria. Estos investigadores, al estudiar la composición química *in-vitro* y el potencial antioxidante de *Asparagus racemosus* en los extractos metanólicos, encontraron compuestos bioactivos que podían eliminar radicales libres (buen antioxidante frente al ácido ascórbico) y tenían un mayor poder reductor que el ácido gálico, además de ser mejor quelante de metales que el EDTA.

Varios de los integrantes de la familia Caricaceae, tienen capacidad antioxidante y citotóxica. Husin et al. (2019) y Jarisarapurin et al. (2019), estudiaron la especie *Carica papaya*, concluyendo que tanto la hoja como la pulpa del fruto inmaduro poseían capacidad antioxidante y citotóxica, probablemente aplicable en el área de la salud, debido a que demostraron que su capacidad antioxidante disminuía la desestabilización del factor eritroide, por lo que podría ser usado como nutracéutico. Rahayu y Lestari (2019) estudiaron a *Carica pubescens* tomando como analitos tallos y hojas, extractándolos con metanol, acetato de etilo y cloroformo, concluyendo que los extractos metanólicos son los que poseen mayor actividad antioxidante, esto debido a que se trata de un disolvente polar iónico o prótido, con gran afinidad a compuestos orgánicos.

El género *Vasconcellea* también perteneciente a la familia de las Caricaceae, presenta estudios relacionados a la extracción de compuestos bioactivo; por ejemplo, Uribe et al. (2015) y Gálvez et al. (2019) trabajaron con las hojas de *Vasconcellea pubescens* haciendo extracciones de compuestos bioactivos con distintos métodos; siendo más eficiente el método de Alta Presión Hidrostática (APH) (Uribe et al., 2015). Sin embargo, en la retención de biometabolitos, el método de extracción al vacío fue mejor, ya que logro retener ácido ascórbico en gran proporción, además de grupos fenólicos (Gálvez et al., 2019). Gracias a estas investigaciones, se puede concluir que la *Vasconcellea pubescens* posee un moderado potencial antioxidante.

Otro trabajo relacionado a la especie *Vasconcellea pubescens* fue el realizado por Vega et al. (2020), quienes obtuvieron extractos metanólicos y etanólico de la fruta y observaron que existía una correlación entre la actividad antioxidante (DPPH) y los compuestos bioactivos, los cuales poseen capacidades antibacterianas contra *E. coli* y *B. cereus*; y por ende, concluyen que los extractos secos del fruto de la papaya puede ser un buen candidato para el desarrollo de conservantes naturales debido a que posee capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Los resultados de estos estudios muestran el potencial del género *Vasconcellea* como antioxidante y antibacteriano, lo que abre las puertas para su estudio en otras especies integrantes del mismo género.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos crudos: acuoso, etanólico y metanólico, de la hoja de *Vasconcellea candicans* (mito) para considerar su uso en la industria.

1.3.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar la capacidad antioxidante de extractos crudos (acuoso, etanólico y metanólico) de la hoja de *Vasconcellea candicans* (mito) para considerar su uso en la industria.
- Determinar la capacidad antibacteriana de extractos crudos (acuoso, etanólico y metanólico) de la hoja de *Vasconcellea candicans* (mito) usando *Acetobacter sp.* y un microorganismo de contraste (*Saccharomyces cerevisiae*), para considera su uso en la industria.

1.4. **Justificación**

Los aditivos antioxidantes sintéticos, pueden causar reacciones adversas en un organismo, si éste los consume de manera continua en un largo periodo de tiempo (Ibáñez et al., 2003); o si este consumo supera los niveles de ingesta aceptables (IDA), las cuales representan una cantidad admisible de consumo de dichos aditivos, sin que represente un riesgo apreciable en la salud (Benford, 2000). A pesar de ello, estudios realizados en la última década, han demostrado que existe una relación en cuanto al estado de salud, envejecimiento físico y el consumo de antioxidantes artificiales y naturales, siendo los antioxidantes naturales los que demuestran tener efectos positivos para la salud (Coronado et al., 2015).

Los antioxidantes naturales contribuyen eficazmente a la industria alimentaria y a conservar la salud (Reyes et al., 2011); por lo que actualmente se trata de remplazar la mayor cantidad de aditivos artificiales por una mayor cantidad de aditivos derivados de fuentes naturales, aprovechando los metabolitos secundarios que las plantas producen y que podrían ser potenciales antioxidantes como los compuestos polifenólicos que poseen capacidad antioxidante y antibacteriana (Stashenko et al., 2003). De acuerdo a Laboratorios Vitafor (2017), la oxidación de los alimentos puede deberse a la exposición prolongada al oxígeno y

metales de especies reactivas o por efecto de microorganismos oxidantes. Es por ello, que en el presente trabajo podemos indicar lo siguiente:

1.5. Hipótesis

- **H_a:** Los extractos crudos de la hoja de *Vasconcellea candicans* (mito) poseen capacidad antioxidante y/o antibacteriana que permiten su uso en la industria.
- **H₀:** Los extractos crudos de la hoja de *Vasconcellea candicans* (mito) no poseen capacidad antioxidante y/o antibacteriana que permiten su uso en la industria.

La correspondiente Matriz de Consistencia se puede revisar en el Anexo A.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. Generalidades de *Vasconcellea candicans*

A continuación, se presenta la ubicación taxonómica de la especie *Vasconcellea candicans*, ordenadas de acuerdo al sistema de clasificación APG IV (2016).

ANGIOSPERMAE

Clase: Eudicots

Orden: Brassicales

Familia: Caricaceae

Género: *Vasconcellea*

Vasconcellea candicans (A. Gray) A. DC

Nombres comunes en Perú: chuncay (kichiwa), sozoranga, toronche chicope, Papaya andina, Mito.

Categorización: Especies amenazadas de flora silvestre del Perú como en Peligro Crítico (CR) según el D.S. 043-2006-AG.

2.1.2. Origen y distribución

Se encuentra distribuida desde la Provincia de Loja (Ecuador), hasta el Departamento de Tacna (Perú), en los bosques secos, riberas de ríos, laderas de las vertientes occidentales andinas, y las lomas costeras, entre 0 a 3,000 m.s.n.m., en los departamentos peruanos de Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Ica, Lima, La Libertad, Moquegua, Piura y Tacna (Belli, 2018).

2.1.3. Característica, utilidad y demanda

Se le reconoce por ser un arbusto aromático con frutos típicos de la familia Caricaceae, de pulpa tierna, succulentos, de buen gusto, con fragancia intensa; rica en proteínas y mayormente consumida por su efecto positivos ante malestares y enfermedades digestivas y hepáticas (Belli, 2018).

Los pobladores del distrito San Pedro de Casta en Huarochirí reciben un ingreso anual neto potencial, producido por la venta de *Vasconcellea candicans* que es inferior al ingreso neto de la mayoría de los cultivos tradicionales de dicha provincia, a pesar de ello existe una gran demanda que no se puede satisfacer debido a que no hay un manejo agrícola de la producción de “mito”, los que son recolectados en estado silvestre para consumo familiar y micro comercialización, principalmente en mercados locales y en menor porcentaje para ser enviados al Mercado Mayorista de Productores de Frutas de Lima, donde son pocas las personas que conocen la especie, ignorando que este fruto es agradable, de gran aporte nutricional y que tiene propiedades medicinales (Portuguez, 2008).

2.1.4. Aspecto Antioxidante

Los antioxidantes, en cuanto a su utilización en los organismos animales, se clasifican en exógenos o endógenos. Los endógenos se caracterizan por ser producidos por el mismo organismo mientras que los exógenos son todas aquellas moléculas bioactivas que, al ser consumidas sirven como antioxidantes para el organismo porque evitan el estrés oxidativo (acumulación de radicales libres, que no logran ser neutralizados por los antioxidantes endógenos del organismo) y con ello el organismo evade múltiples enfermedades causadas por dicho estrés (Avello y Sualsky, 2006).

En industrias alimentarias los antioxidantes cumplen un rol muy importante que es prevenir la oxidación de los alimentos y con ello la pérdida de color, sabor y aromas, además de servir como defensor de múltiples microorganismos que echarían a perder los productos (Armenteros et al., 2012). A partir de ello se pueden clasificar a los antioxidantes alimentarios en primarios y secundarios, estos últimos se ocupan de impedir o disminuir la formación de radicales libres, utilizando quelantes de metales como el EDTA (ácido etilen-diaminico-tetracético) o el ácido cítrico; en cambio los antioxidantes primarios son conocidos como los erradicadores de radicales libres, y son principalmente compuestos fenólicos, que al donar un electrón a un radical libre forman productos estables (Ordóñez et al., 1998); por lo que la presente investigación está centrada en este punto.

2.1.4.1. Antioxidantes naturales. En su gran mayoría son producto de metabolitos secundarios de las plantas como los compuestos fenólicos, terpenos, alcaloides y glucósidos. Específicamente se trata de los compuestos fenólicos, los cuales son derivados de las rutas del ácido malónico y shikímico, y están integradas por cumarinas, flavonoides, taninos, antocianinas y saponinas (Ávalos y Pérez, 2009); siendo considerados exógenos para organismos animales, cumpliendo una función positiva para la salud cuando se consumen (Avello et al., 2006).

2.1.4.2. Antioxidantes sintéticos. Su potencial antioxidante es superior al de los antioxidantes de origen natural, por lo que su uso es altamente comercial en todas las industrias; generalmente estos son quelantes de metales inestables y pueden ser muy variables según el rubro al que se desee aplicar, uno de los más famosos en la industria alimentaria son los llamado aditivos E-#, que participan como conservantes, antioxidantes y antimicrobianos. A pesar de todas las ventajas que tiene sobre los aditivos naturales, los antioxidantes sintéticos logran provocar daño- a la salud, además de mostrar relación directa con el envejecimiento celular (Coronado et al., 2015).

2.1.4.3. Capacidad antioxidante. Es la capacidad que tiene un compuesto de demostrar reactividad en contra de los procesos de oxidación, la cual se ve reflejado por los polifenoles presentes en las plantas o en derivados de ellas (Londoño, 2012).

2.1.4.4. Actividad antioxidante. Describe la dinámica inicial que tiene un compuesto para revertir o disminuir el efecto oxidativo de un compuesto afectado, dicha dinámica es influida por la estructura química del compuesto antioxidante (Vicente, 2019).

2.1.5. Potencial antimicrobiano

Los metabolitos secundarios de las plantas, presentan actividad antioxidante, pero además antimicrobiana; así, los flavonoides, saponinas, fenoles y quinonas, son utilizados como posibles soluciones a infecciones bacterianas en el ámbito clínico y también en la industria alimentaria, en ambos casos previniendo y corrigiendo la posible contaminación y enfermedades. Por ejemplo, para prevenir o corregir el ranciamiento de las carnes se utilizaba fenoles de betarraga y frutas, y en la actualidad dicha corrección se realiza con el ácido ascórbico sintético que resulta ser más eficiente a menores concentraciones (Balbuena, 2012).

A pesar de ello, los estudios de la última década indican que los antioxidantes naturales resultan ser tan o igual de eficientes en sinergia con una buena cadena de frío, por lo que en la industria cárnica se está comenzando a tomar como una opción cada vez más aceptada. Debido a su eficiencia como antioxidante y antimicrobiano, muchos de estos antioxidantes naturales podrían ser beneficiosos para la salud del consumidor (Armenteros et al., 2012).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Esta investigación es *pura o teórica*, porque tiene el objetivo de analizar una variable no investigada previamente con el propósito de ampliar las posibilidades en aditivos naturales antioxidantes de la industria alimentaria. Es *Explicativa*, porque permitirá aumentar los conocimientos sobre la existencia de la capacidad antioxidante y/o antibacteriana a partir de extractos crudos de hoja de “mito”, sin ahondar de forma cuantitativa en los compuestos que producen dicha capacidad. Es: *Cuantitativa*, debido a que proporcionará datos que se analizarán estadísticamente para cuantificar el problema y obtener informaciones concluyentes con el propósito de la investigación y *Cualitativa*, debido a que se evaluará la presencia algunos grupos de fenoles en los extractos.

Además, es una investigación *Experimental*, debida a que se trabaja con tres extractos de hoja de mito, cuantificando su capacidad antioxidante y/o antibacteriana, en condiciones científicamente aceptable. También es *Hipotético - Deductiva*, debido a que, a partir de los resultados de los extractos brutos de la hoja de “mito”, podremos deducir la capacidad antioxidante y/o antibacteriana que este tiene y según el período temporal es *Transversal*, debido a que se evaluará la capacidad antioxidante y/o antibacteriana de los extractos de la hoja de mito durante un periodo de tiempo determinado.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo tuvo como ubicación la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM) / Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (SL10LA105).

Este trabajo se inició en enero del 2020, y por problemas de COVID-19, se ha extendido hasta marzo del 2022, durante el cual se realizó el trabajo experimental y redacción.

3.3. Variables

3.3.1. Variables dependientes

- Concentración mínima inhibitoria
- Concentración de polifenoles totales presentes en los diferentes extractos de *Vasconcellea candicans* (acuoso, etanólico y metanólico)

3.3.2. Variables independientes

- Concentraciones de los diferentes extractos de *Vasconcellea candicans* (acuoso, etanólico y metanólico)
- Concentraciones de Metabisulfito de potasio (MBK)

3.4. Población y muestra

La población fue de 164,2 gramos de pulverizado de hoja seca (108 hojas de mito), de las Lomas Piedra de Batan, del Distrito de Santo Domingo de Olleros, Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima – Perú.

La muestra fue dos gramos de pulverizado de hoja para cada agente extractor (agua, metanol y etanol).

3.5. Instrumentos

3.5.1. Dispositivos

3.5.1.1. Espectrofotómetro (Shimadzu/ UV-1700, 2007). Utilizado para la recolección de datos de proteínas por metodología de Bradford (1976), método de Folin-Ciocalteu, medición de turbidez para curvas de crecimiento en bacterias y levaduras.

3.5.1.2. Balanza Analítica (Adam/RS232, 0 g a 120 g \pm 0.0001 g AE4382559, 2011).

Permite la recolección de datos de peso de hojas secas y extractos secos.

3.5.1.3. Termohigrómetro (BOECO-Htc2, -50 °C ~ + 70 °C \pm 0.1, 10% ~ 99% RH \pm 5). Utilizado para la recolección de datos de temperatura ambiental y humedad en la conservación de los extractos.

3.5.1.4. Microscopio Binocular (Olympus CH30, 1996). Permite la recolección de datos en conteo de microorganismos, con ayuda de cámara de New-Bauer.

3.5.2. Programas

Image J (NIH/1.8.0 (172)), permite la recolección de datos de espectro porcentual de los enfrentamientos de los microorganismos con los extractos y metabisulfito de potasio.

3.5.3. Muestra biológica

Acetobacter sp. Proveniente de *Mycoderma aceti* (Madre de vinagre), y *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA PDM).

3.6. Procedimiento**3.6.1. Preparación y almacenamiento de extracto crudo de hojas frescas de mito**

Se hicieron dimensiones métricas y se pesó a cada una de las hojas frescas de mito, para luego ser lavadas con el siguiente protocolo: se las sumergió en hipoclorito de sodio al 1.5% (v/v con agua corriente estéril) por diez minutos, se enjuagaron dos veces en agua corriente estéril y finalmente con agua destilada. Para el secado se retiró las nervaduras foliares y el resto se colocó en horno de secado a 40 °C por 48 horas. El proceso de pulverización de las hojas secas se realizó con la ayuda del Blender y luego el molinillo (marca Bosch), para obtener de mayor a menor tamaño de partículas.

La maceración del pulverizado de hojas se realizó por triplicado en tres Erlenmeyer (taponados con torundas de algodón, papel aluminio y parafilm) con 50 ml de cada solvente (metanol, etanol y agua) que portaban 2 gramos de pulverizado de hojas contenidos en un capuchón de papel filtro previamente armado. El extractante acuoso se colocó en frío (4.5 ± 1.4 °C / $64.2 \pm 2.9\%$ de humedad) y los extractantes alcohólicos a temperatura ambiente (26.1 ± 1.5 °C / $65.3 \pm 2.4\%$ de humedad) por 72 horas. Pasado el tiempo mencionado se los alícuota en viales (1.5 ml/ vial) con tapa rosca y dentro de una caja para viales se los puso en refrigeración (4.5 ± 1.4 °C / $64.2 \pm 2.9\%$ de humedad), hasta su uso (ver Anexo B).

3.6.2. Determinación de proteínas de extracto crudo de hoja de mito

Para la determinación de proteínas se utilizó la metodología de Bradford (Bradford, 1976) para los tres extractos, ambas tuvieron una curva de calibración basada en Albumina bovina (BSA-A7906-106 SIGMA) que fueron leída en Espectrofotómetro a 540 nm y 595 nm, respectivamente. Dichas curvas sirvieron para extrapolar la concentración de proteínas que poseían los extractos de hoja de mito.

3.6.3. Presencia de compuestos fenólicos

Para la detección de compuestos fenólicos se tomó las metodologías de Shivata (Shinoda / ensayo de cloruro de hierro), ensayo de cloruro de magnesio para presencia de flavonoides o chalconas, ensayo con gelatina para la detección de taninos, prueba de espuma para saponinas, ensayo de etanol e hidróxido de sodio para quinonas, ensayo con reactivo de Hager para alcaloides, ensayo de Colina para fenolatos, betacianinas, antocianinas y ensayo de ácido sulfúrico para carotenos; cada una de estas pruebas se realizó por duplicado para mermar el error.

3.6.3.1. Ensayo de cloruro de hierro. Se añadió 2 gotas de cloruro férrico a 0.5 ml de muestra. La aparición de un color verde negruzco indica la presencia de compuestos fenólicos.

3.6.3.2. Ensayo con gelatina. A 1 ml de muestra se le añadió 5 gotas de gelatina vegetal al 1% (polímeros proteicos), esperando que al corto tiempo o casi inmediatamente se precipiten y formen conglomerados, lo que indicaría positivo para taninos.

3.6.3.3. Prueba de la espuma. A 0.1 gramos de muestra se le añadió 10 ml de agua destilada y se la mantuvo en baño María por 1 minuto, posteriormente se agitó vigorosamente; la presencia de saponinas, debe observarse como una columna de espuma que perdure, y mida por lo menos 3 cm.

3.6.3.4. Ensayo de etanol e hidróxido de sodio. De 10 microlitros de muestra se coloca 200 microlitros de etanol y 400 microlitros de NaOH al 5%; la coloración amarilla, demuestra presencia de quinonas.

3.6.3.5. Ensayo con reactivo de Hager. A 0.5 ml de muestra se le colocó 0.7 ml de ácido clorhídrico al 1%, se le calentó levemente a 50 °C por unos leves segundos, para ponerle 3 gotas del reactivo Hager; se debe formar un precipitado color amarillo o naranja para demostrar presencia de alcaloides.

3.6.3.6. Ensayo de ácido sulfúrico. A 1 ml de muestra se le adicionó 1 ml de cloroformo, posteriormente se adicionó el ácido sulfúrico concentrado por gotas hasta completar 3 ml. El compuesto debe virar a un color marrón azulado, esto indica la presencia de carotenoides, los resultados pueden variar dependiendo de la concentración de éstos.

3.6.3.7. Ensayo de cloruro de magnesio. A 1 ml de muestra se añadió 1 mililitro de cloruro de magnesio al 10%, se observa que la solución adquiere una débil coloración naranja al principio, conforme va reaccionando la coloración naranja se va intensificando, lo que indica la presencia de flavonoides, en caso disiparse el color se trataría de chalconas.

3.6.3.8. Ensayo de colina. A continuación, se detallan la adición de álcali y la reacidificación correspondiente.

A. Adición de álcali: NaOH 20%. A 1 ml de muestra se le añadió 5 gotas de hidróxido de sodio al 20%, la decoloración lenta de violeta, azul, verde y amarillo indica fenolatos alcalinos. Una decoloración rápida a amarillo es para el caso de betacianina.

B. Reacidificación HCl 1N. A la solución anterior se le añadió 1 ml de ácido clorhídrico 1.0 N. La regeneración del color rojo o anaranjado oscuro indica la presencia de antocianinas.

3.6.4. Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu (la curva de calibración fue a partir de ácido gálico cuya lectura se tomó a 760 nm en espectrofotómetro). Se recomienda hacer lecturas con muestras a concentraciones cercanas de los 400 mg/l, para lo cual se decidió extraer una alícuota de 1 ml filtrada con trompitos IsoLab de 45µm, en una placa Petri previamente pesada y colocarla en estufa a 40 °C hasta su secado, se tomó su peso y se calculó su concentración a partir de él, de esta manera se calculó las diluciones necesarias para realizar la medición y extrapolación de la concentración de polifenoles totales de cada una de las muestras.

3.6.5. Tolerancia microbiana a los extractos

Para evaluar la tolerancia antibacteriana se utilizó *Acetobacter sp.* como microorganismo de ensayo y *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo de contraste (dos organismos muy usados en la industria de alimentos). Los márgenes de tolerancia microbiana se establecieron a partir de las concentraciones de extractos hallada previamente y tomando en cuenta la tolerancia máxima que se sugiere de metabisulfito de potasio para el organismo *Saccharomyces sp.* como punto de referencia. También fue necesario desarrollar una curva de crecimiento para cada organismo debido a que la evaluación de tolerancia fue medida desde el punto medio de la zona logarítmica de la curva de crecimiento.

3.6.5.1. Aislamiento de microorganismos. A continuación, se detallan los procedimientos correspondientes para los dos microorganismos usados en la investigación.

A. *Saccharomyces cerevisiae*. Se tomó un grano de *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA PDM) diluyéndolo en un mililitro de TSB al 3% dentro de un tubo de ensayo e incubándolo por 1 hora a 25 °C para su activación, luego fue sembrado en Agar Sabouraud e incubado a temperatura ambiente (26.1 ± 0.5 °C) por 72 horas. Después se observó el crecimiento de colonias vigorosas y se escogieron dos colonias grandes, estas fueron diluidas cada una en 25 ml de TSB al 3% dentro de un Erlenmeyer y se pusieron en agitación a 130 rpm dentro de un agitador orbital por 18 horas, posteriormente fueron usadas como madre, la cual se guardó en frascos Ependorfs tapa rosca de 1.5 ml dentro de una frío-caja para realizar la curva de crecimiento y las pruebas de tolerancia de los extractos de hoja de mito.

B. *Acetobacter sp.* Para la obtención de *Acetobacter sp.* se utilizó el biofilm *Mycoderma aceti* (madre de vinagre), el cual está organizado por levaduras variadas y diferentes bacterias acéticas, donde *Acetobacter sp.* se encuentra en mayor proporción. Para su aislamiento fue necesario triturar una pequeña porción de *Mycoderma aceti* e incubarla a temperatura ambiente por 12 horas en 2 ml de TSB; pasado el tiempo se hizo una siembra en TSA y se incubó a temperatura ambiente por 24 horas donde se observó la presencia de algunas levaduras y de 2 colonias de bacterias aparentemente distintas a las cuales se las decidió llamar L (lisas) y R (rugosas) por sus características morfológicas. Cada tipo de bacteria fue aislada en TSA y luego de 24 horas de incubación, se siguió el protocolo de identificación para *Acetobacter sp.* planteado por Gonzales et al. (2019) el cual consta en cumplir con ser bacterias del tipo cocabacilos (bacilos cortos) *Gram*, distribuidos en diada o en cadena, resistente a un medio selectivo formulado por los autores anteriormente mencionados, catalasa positiva, fermentación de glucosa positivo y motilidad positiva.

Una vez identificado al organismo *Acetobacter sp.* se procedió a hacer una resiembra de esta, para luego extraer 2 colonias vigorosas y utilizarlas como madre, siendo procesadas de la misma manera que *Saccharomyces cerevisiae*.

3.6.5.2. Curva de crecimiento. Para dar inicio a la curva de crecimiento de los organismos planteados fue necesario fijar un punto de inicio cuantificable, por lo que se hicieron 3 diluciones consecutivas de 10^{-2} ; 10^{-4} y 10^{-6} para cada organismo, seleccionando la dilución con menor cantidad de organismos fácilmente contables en cámara de New-Bauer. Se identificó la dilución 10^{-4} , como la óptima para el inicio de la curva de crecimiento, se tomó la muestra madre de cada microorganismo y se procedió a hacer la respectiva dilución con TSB hasta llegar a la fracción previamente determinada, alicuotándose en 18 tubos tapa rosca estériles a razón de 2 ml por tubo para *Acetobacter sp.* y 20 tubos para *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente en oscilador orbital a 130 rpm; las medidas para desarrollar la curva de crecimiento fueron realizadas con espectrofotómetro a 625 nm y el conteo de organismos se realizó en la cámara de New-Bauer, la recolección de datos fue en intervalos de 40 minutos en el caso de *Acetobacter sp.* y de 1 hora en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.6.5.3. Tolerancia microbiana. Conociendo la concentración de los extractos de hoja de mito y la concentración máxima recomendada de metabisulfito de potasio (MBK) que es de 300 μ g/ml, se utilizó para todos los extractos las siguientes diluciones: 300, 200, 100, 50, 30, 3, 0.75, 0.46 y 0.11 μ g/ml.

Para realizar el enfrentamiento de extractos o MBK vs microorganismos, fue necesario usar el siguiente diagrama de diluciones mostrado en la tabla 1.

Tabla 1

Diagrama de dilución para el enfrentamiento de Extractos vs Microorganismos

Diluciones	Volumen usado (ml)
Principal	
Medio / Bacterias 0.5 ± 0.03 MF	0.5
Muestra a evaluar	0.5
Secundaria	
TSB	0.45
Muestra (Extracto/MBK)	0.05

Nota. Los extractos agregados presentan las concentraciones necesarias para poder obtener como concentración total las planteadas con anterioridad.

Todas las diluciones se depositaron en frascos Eppendorf tapa rosca y se realizaron por triplicado para ambos microorganismos, los cuales fueron enfrentados con los extractos cuando estaban en el punto medio de sus respectivas curvas de crecimiento. Para la lectura de los resultados, las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente sin agitación por 2.5 horas para luego ser leídas en el espectrofotómetro a 625 nm, para cuantificar en la cámara de New-Bauer y por método colorimétrico con adición de Rojo de Fenol. Adicional a ello se sembró en TSB para *Acetobacter sp.* y en Sabouroud para *Saccharomyces cerevisiae* por medio de hisopado una muestra de las diluciones 300, 30 y 0.11 $\mu\text{g/ml}$ para observar crecimiento o ausencia de estos organismos.

3.7. Análisis de datos

El procesamiento descriptivo de datos se visualizará mediante los estadísticos descriptivos como parámetros de la distribución de datos (\bar{X} , S, S2, Me, etc.). Para el análisis inferencial se empleará un Análisis de Varianza (Anova - *One Way*) para saber si hay variación

entre tratamientos y, en caso se obtenga un contraste significativo, se usará un *post-hoc* de Games-Howell para comparaciones múltiples y encontrar los mejores grupos de tratamiento.

3.8. Consideraciones éticas

Las hojas colectadas de *Vasconcellea candicans*, fueron de forma manual y sin depredar la planta. La certificación de la especie fue realizada por la Mg. María Isabel La Torre Acuy, jefa del herbario UNFV (ver Anexo C).

IV. RESULTADOS

4.1. Preparación y almacenamiento de extracto crudo de hojas frescas de mito

Con el propósito de documentar los parámetros de la hoja de mito que fue procesada se tomaron medidas longitudinales a las muestras y medida metrológica a el producto final (el pulverizado de hoja); las siguientes medidas se expresan en la tabla 2.

Tabla 2

Tamaño promedio de las hojas de Mito utilizadas y peso total de la masa fresca y seca

Parámetros	Hoja de mito	
	Hoja fresca	Hoja seca
Largo (cm)	16.9722 ± 2.1755	-
Ancho (cm)	16.9722 ± 2.1755	-
Peso total (g)	386.4387	164.1918

4.2. Determinación de proteínas

Se evaluó la concentración de proteínas en las hojas deshidratadas-pulverizadas, para posteriormente relacionarlas con los resultados de tolerancia bacteriana, lo cual se pudo estandarizar mediante las curvas de calibración de Bradford (tabla 3 y figura1).

Tabla 3

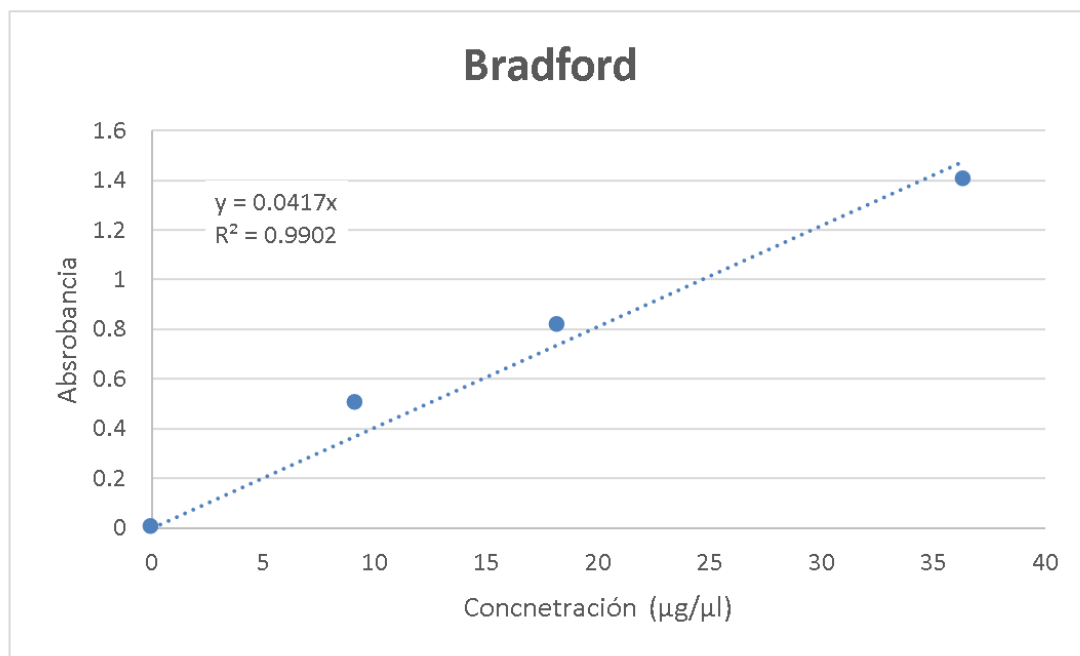
Concentración de proteínas de los extractos de hoja de mito desecada y pulverizada

Tipo de extracto	Concentración de proteínas (µg/µl)
E – AC	13.5689
E – ET	7.2914
E – ME	17.5839

Nota. Extracto (E); acuoso (AC); etanólico (ET); metanólico (ME).

Figura 1

Curvas de calibración de albumina sérica bovina obtenida mediante la metodología de Bradford (1976)



4.3. Presencia de compuestos fenólicos

Se evaluó la presencia de compuestos fenólicos como evidencia de la capacidad antioxidante que poseen los diferentes extractos de la hoja de Mito, para ellos se expone en la tabla 4 las diferentes familias de compuestos fenólicos encontradas en cada uno de los extractos realizados.

Tabla 4

Valoración cualitativa de compuestos fenólicos en los diferentes extractos de hoja de mito

Tipo de Extracto	Compuestos fenólicos						
	Chalconas	Taninos	Quinonas	Carotenoides	Betacianinas	Saponinas	Alcaloides
E – AC					X	X	X
XE – ET		X	X				
E – ME	X	X	X	X			

Nota. Extracto (E); acuoso (AC); etanólico (ET); metanólico (ME). X = Presencia.

4.4. Cuantificación de polifenoles totales

A continuación, en la figura 2 y tabla 5, se muestran los resultados obtenidos a partir de la metodología de Folin-Cicalteau (Vernon et al., 1974), para determinar la concentración de polifenoles totales, con el objetivo de reforzar los resultados de la tabla 4; las cuales evidencian la capacidad que tienen los extractos para actuar como antioxidantes.

Figura 2

Curva de calibración para polifenoles totales a base de Acido Gálico

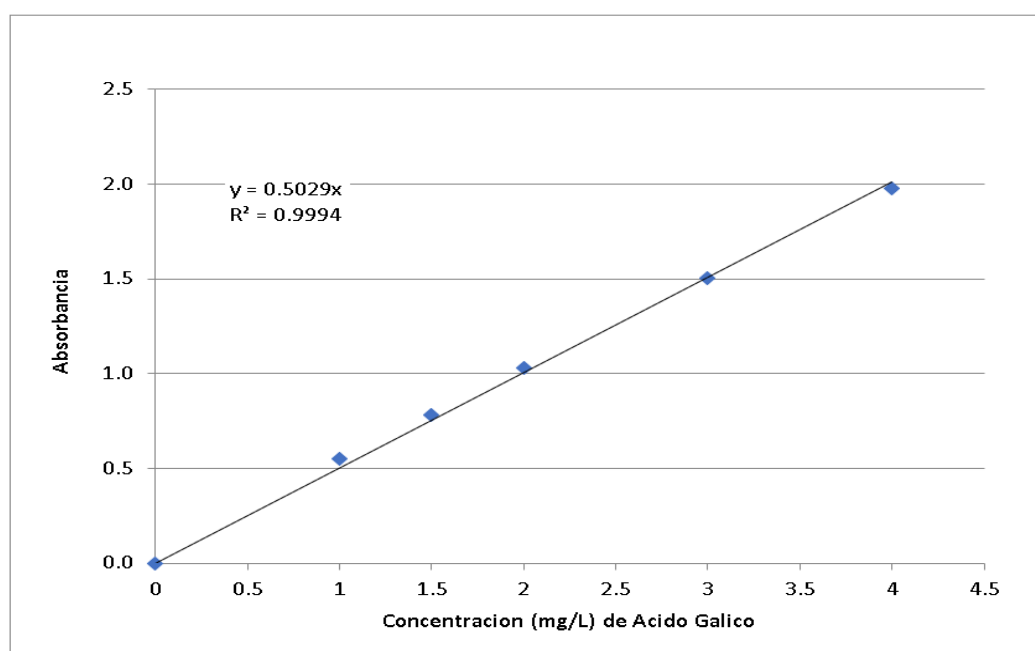


Tabla 5

Concentración de fenoles totales (FT) en escala de ácido gálico

Muestras	Concentración de fenoles totales (FT)	
	Extracto crudo ($\mu\text{g/ml}$)	Materia seca (mg/g)
E – AC	162.458	36.345
XE – ET	513.343	23.613
E – ME	294.691	5.009

Nota. Extracto (E); acuoso (AC); etanólico (ET); metanólico (ME).

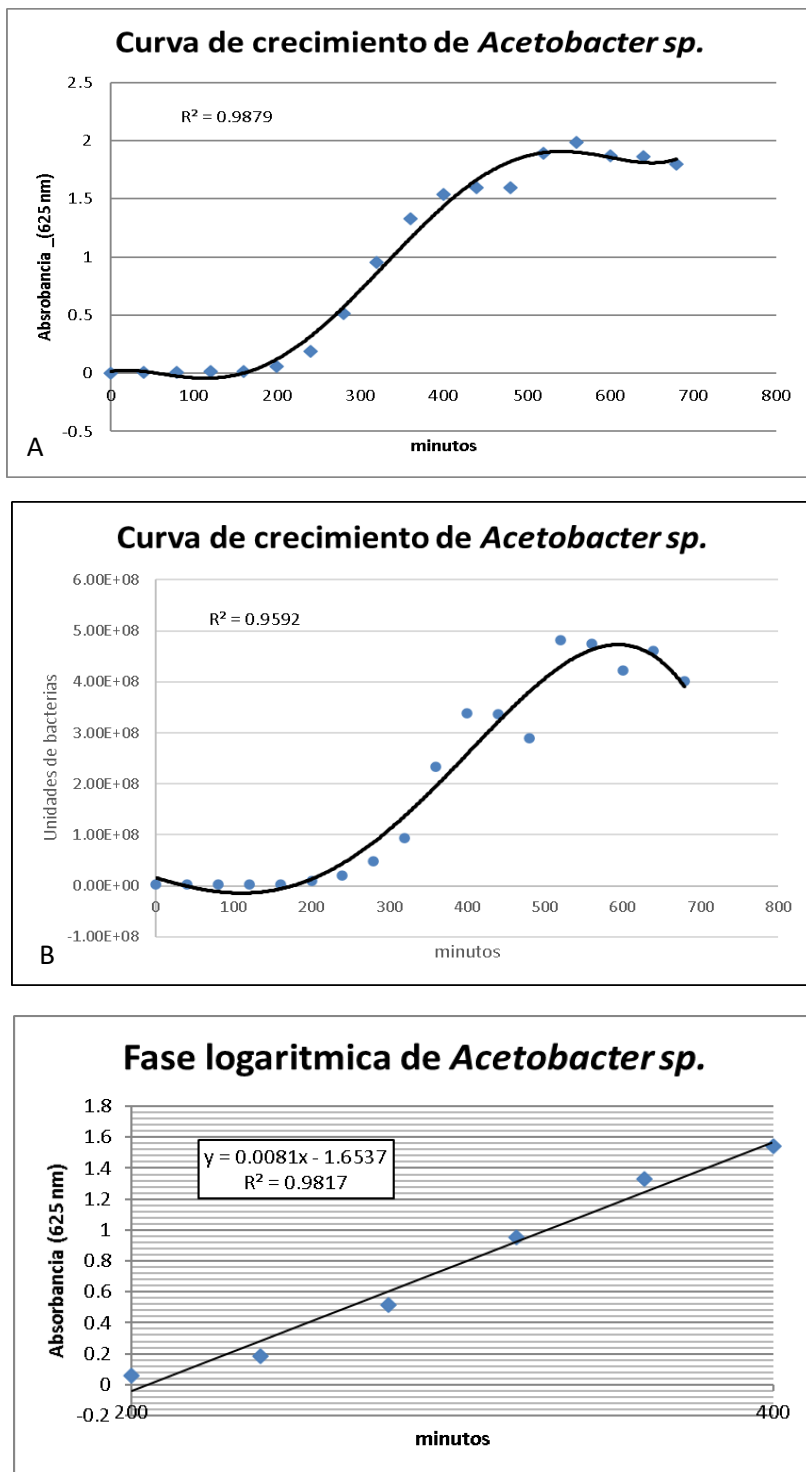
4.5. Curva de crecimiento y tolerancia microbiana frente a los extractos

Para la realización del ensayo de tolerancia microbiana ante los diferentes extractos de la hoja de mito, fue necesario la realización de las curvas de crecimiento de cada microorganismo (figura 3 y 4), enfatizando su fase logarítmica como punto de partida para el enfrentamiento con las diferentes concentraciones de cada extracto de hoja de mito (tablas 6 y 7).

Los resultados de la tolerancia microbiana son dependientes a tres parámetros de cuantificación: absorbancia por espectrofotometría, cuantificación de organismos por mililitro a través de cámara de Neubauer y Unidades Colorimétricas usando la cuantificación del rojo de fenol a través del programa *Image J*.

Figura 3

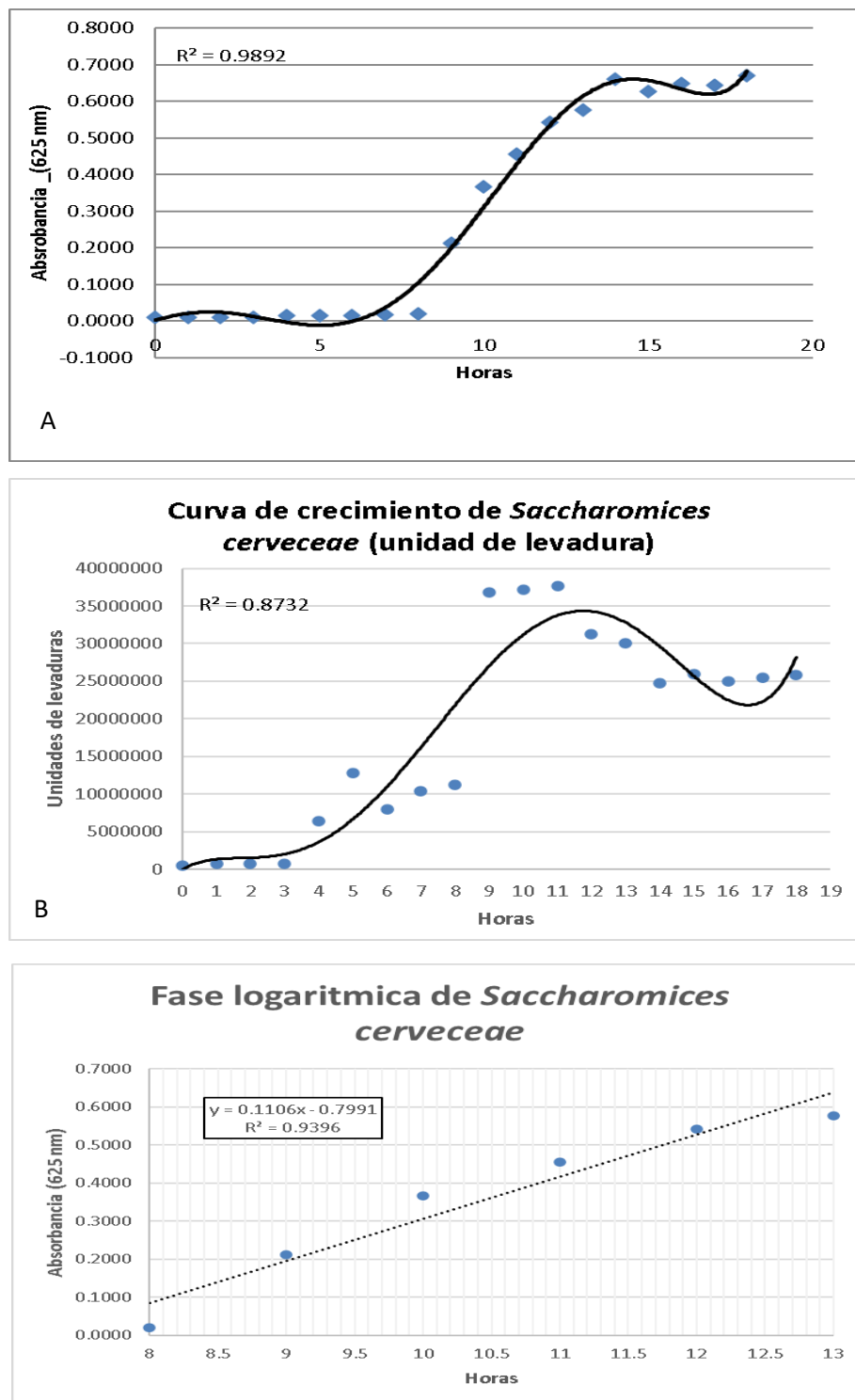
Curva de crecimiento y fase logarítmica de Acetobacter sp



Nota. Gráfico A (curva de crecimiento hallada por turbidimetría en espectrofotómetro a 625 nm), Gráfico B (curva de crecimiento hallada por conteo en cámara de Neubauer).

Figura 4

Curva de crecimiento y fase logarítmica de Saccharomyces cerevisiae



Nota. Gráfico A (curva de crecimiento hallada por turbidimetría en espectrofotómetro a 625nm), Gráfico B (curva de crecimiento hallada por conteo en cámara de Neubauer).

Tabla 6

Resultados porcentuales homogeneizados de tolerancia de Acetobacter sp. y Saccharomyces cerevisiae frente a las diferentes concentraciones de los extractos

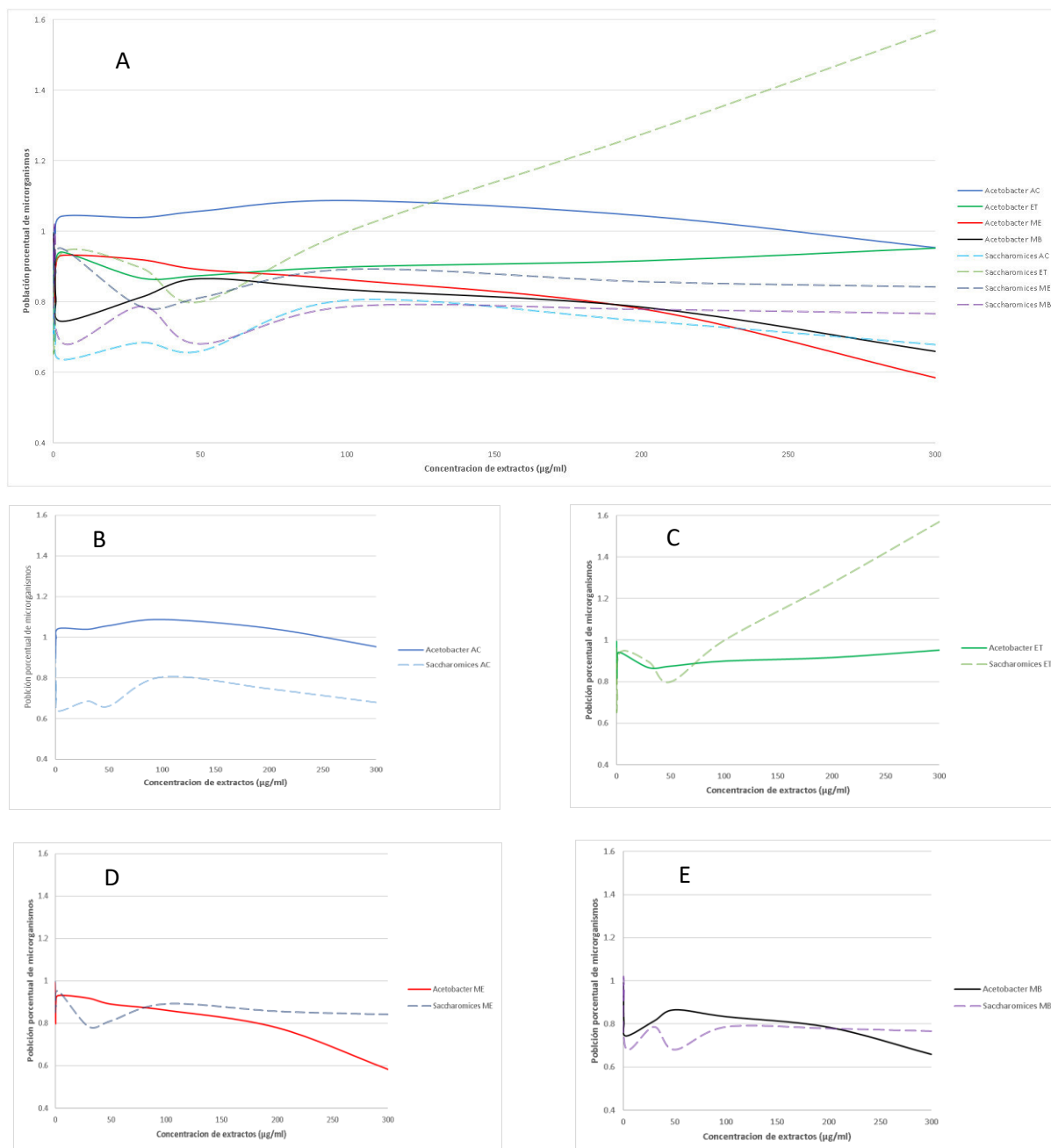
CON	Acetobacter				Saccharomyces			
	AC	ET	ME	MB	AC	ET	ME	MB
300	0.953	0.952	0.584	0.659	0.679	1.569	0.842	0.766
200	1.044	0.915	0.780	0.785	0.746	1.274	0.857	0.779
100	1.087	0.898	0.863	0.835	0.804	0.999	0.892	0.786
50	1.057	0.874	0.892	0.866	0.660	0.800	0.812	0.680
30	1.039	0.866	0.920	0.814	0.685	0.896	0.786	0.787
3	1.043	0.940	0.932	0.745	0.636	0.940	0.951	0.684
0.75	0.994	0.903	0.900	0.812	0.701	0.713	0.880	0.981
0.45761	1.009	0.815	0.800	0.922	0.789	0.675	0.884	1.020
0.11440	0.897	0.845	0.964	0.955	0.696	0.655	0.855	0.908
0	0.974	0.993	0.993	0.991	0.956	0.961	0.996	0.983

Nota. Extracto acuoso (AC); etanólico (ET); metanólico (ME); metabisulfito de potasio (MB); concentración de los extractos (CON).

Los resultados se presentan de manera porcentual (figuras 5, 6, 7 y 8), los tres parámetros (absorbancia por espectrofotometría, cuantificación de organismos por mililitro a través de cámara de Neubauer y Unidades colorimétricas usando la cuantificación del rojo de fenol a través del programa *Image J*, fueron acoplados a través de una media porcentual total homogeneizada (se utilizó una escala individual para ambos organismos, representada por los diferentes extractos).

Figura 5

Grafica general e individual del enfrentamiento de *Saccharomyces cerevisiae* vs *Acetobacter* sp. ante la tolerancia de los extractos de hoja de mito

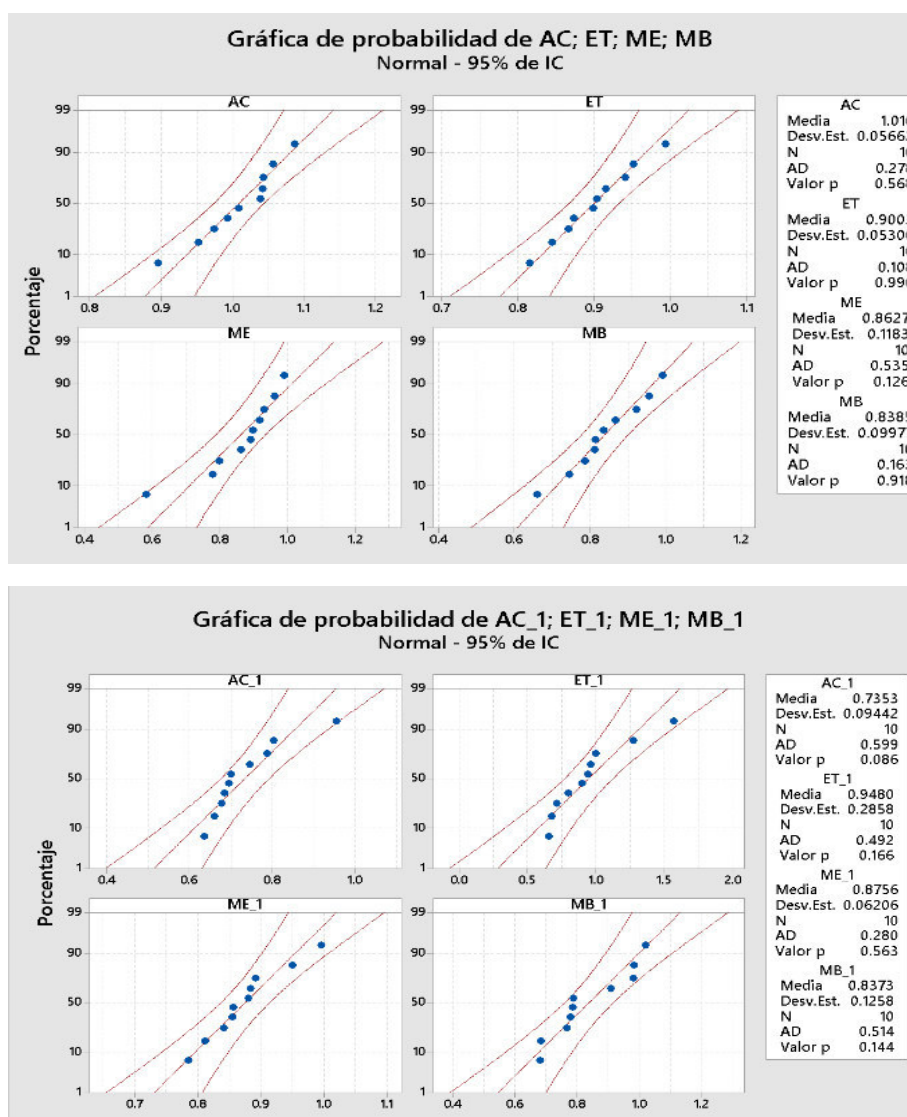


Nota. Gráfico A (tolerancia microbiana ante los extractos experimentales de hoja de mito, resultados porcentuales); Gráfico B (tolerancia de *Acetobacter* sp. vs. *Saccharomyces cerevisiae* al extracto acuoso de la hoja de mito); Gráfico C (tolerancia de *Acetobacter* sp. vs. *Saccharomyces cerevisiae* al extracto etanólico de la hoja de mito); Gráfico D (tolerancia de

Acetobacter sp. vs. *Saccharomyces cerevisiae* al extracto metanólico de la hoja de mito; Gráfico E (tolerancia de *Acetobacter* sp. vs. *Saccharomyces cerevisiae* al metabisulfito de potasio).

Figura 6

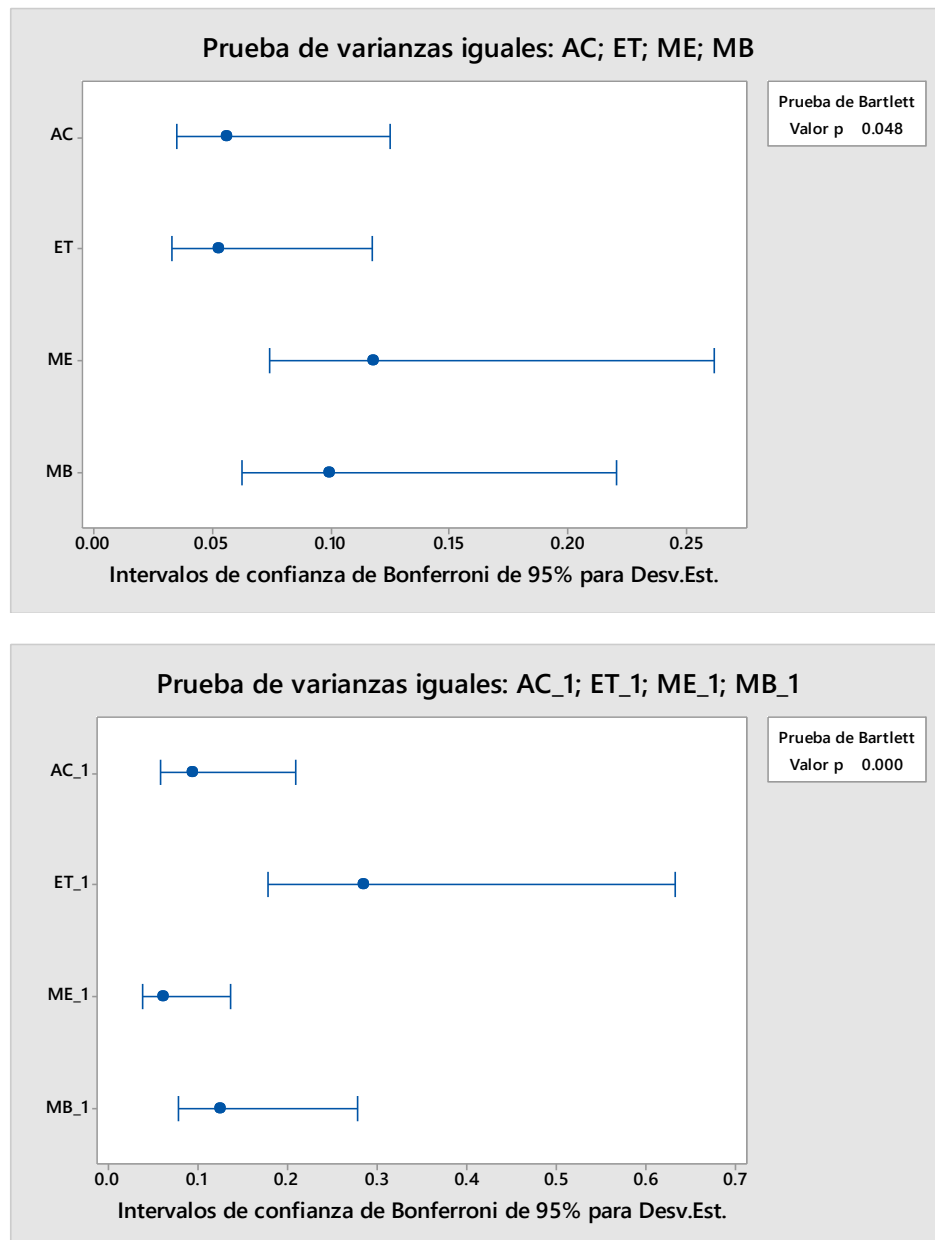
Prueba de normalidad de los resultados homogeneizado de tolerancia de Acetobacter sp. y Saccharomyces cerevisiae ante los extractos de hoja de mito



Nota. AC, ET, ME y MB hacen referencia a los diferentes extractos, a los que se enfrenta *Acetobacter* sp. AC_1, ET_1, ME_1 y MB_1 hacen referencia a los diferentes extractos, a los que se enfrenta *Saccharomyces cerevisiae*. Los datos presentan distribución normal.

Figura 7

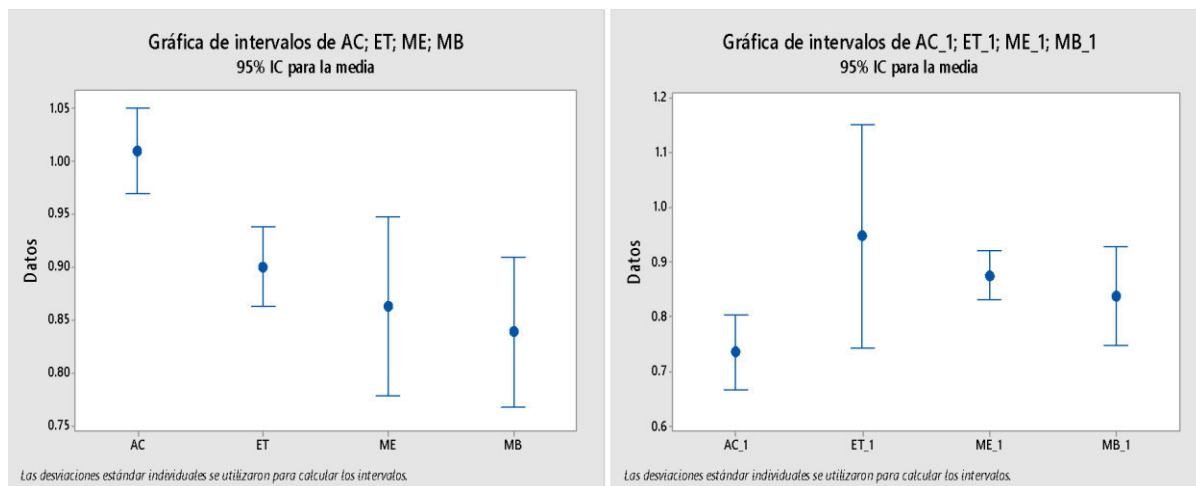
Prueba de homogeneidad de varianzas de los resultados homogeneizado de tolerancia de Acetobacter sp. y Saccharomyces cerevisiae ante los extractos de hoja de mito



Nota. Existe diferencia estadística significativa para cada tratamiento (extractos de hoja de mito) y cada organismo con el que fueron enfrentados.

Figura 8

Prueba de igualdad de tendencia central de los resultados homogeneizado de tolerancia de *Acetobacter sp.* y *Saccharomyces cerevisiae* ante los extractos de hoja de mito



Nota. Se requiere de prueba *post-hoc*, para hallar la mejor tendencia para el tratamiento.

Tabla 7

Prueba *post Hoc* (Games-Howell) para los resultados homogeneizados de tolerancia de *Acetobacter sp.* y *Saccharomyces cerevisiae* ante los extractos de hoja de mito

Factor	<i>Acetobacter sp.</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	N	Media	Agrupación	N	Media	Agrupación
AC	10	1.0097	A	10	0.948	A
ET	10	0.9003	B	10	0.8756	A
ME	10	0.8627	B	10	0.8373	A
MB	10	0.8385	B	10	0.7353	A

Nota. La letra "A" de agrupación representa la categoría superior del tratamiento, en este caso representa un mayor porcentaje de tolerancia del organismo ante los extractos, lo contrario representa la letra "B".

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La concentración de compuestos fenólicos totales de *Vasconcellea candicans* del extracto metanólico obtenido por maceración fue de 212.9 mg en escala de ácido gálico por cada 100 g de peso fresco de hoja de mito (adaptando nuestros resultados a materia húmeda, ya que los nuestros eran de materia seca); mientras que, Uribe et al. (2015) utilizando el extracto metanólico de la papaya chilena (*Vasconcellea pubescens*) obtenido por extracción de ultrasonido de alta presión hidrostática fue de 129.1 mg en escala de ácido gálico por cada 100 g de peso fresco del fruto de papaya. Sin embargo, Simirgiotis et al. (2009) en su extracto metanólico encontraron 2 310 mg en escala de ácido gálico por cada 100 g de peso fresco del fruto de papaya chilena, utilizando el procesamiento de la muestra por liofilización (método que permite retener mayor cantidad de metabolitos y características de un analito). Lo cual nos indica que extraer con metanol, pero con tres métodos diferentes las concentraciones van a variar, aparentemente siendo más eficiente usar el método por liofilización.

Como observamos diferentes autores han obtenido concentraciones superiores a la de la presente investigación, sin embargo, nuestros resultados demostraron que los antioxidantes extraídos con los extractos etanólico y acuosos poseían mayor extracción de compuestos fenólicos totales por gramo de materia seca lo que favorece que sea posible utilizarlo en los alimentos con seguridad; además, Sochor et al. (2010) afirman que existe una fuerte relación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de un alimento por lo que podemos afirmar que la presencia de fenoles totales en nuestros extractos de hoja de “mito” confirma su capacidad antioxidante.

El efecto inhibitor del crecimiento para las bacterias *Acetobacter sp.* a partir del enfrentamiento con el extracto etanólico fue positivo en la presente investigación; sin embargo, Emeruwa (1982) quien realizó extractos etanólicos de epicarpio, endocarpio, semillas y hojas

de *Carica papaya* determinaron tener efectos antibacterianos en todos sus extractos exceptuando en el extracto de hojas, además ellos utilizaron como medio de comparación diferentes antibióticos como penicilina y tetraciclina, de las cuales *Carica papaya* demostró tener un efecto superior en el caso de penicilina y equitativo con tetraciclina, al igual que en la presente investigación donde se usó como control el metabisulfito de potasio, y a partir del cual se demostró que el extracto etanólico de hoja de mito presentaba un efecto antibacteriano equitativo. De manera similar Vega et al. (2020) demostraron que los compuestos bioactivos de los extractos metanólico y etanólico la fruta de *Vasconcellea pubescens* posee capacidad antibacteriana, aunque en ningún caso superior a su control que fue ciprofloxacina, siendo mayor el extracto etanólico.

La presencia de taninos fue detectada en los extractos etanólico y metanólico, sin embargo, estuvo ausente en el extracto acuoso, resultados que coinciden con lo mencionado por Olivas et al. (2015), quienes afirman que el contenido de taninos hidrolizables (extractables con compuestos polares y ligeramente apolares) es muy limitada dentro de los alimentos y en especial de los Galotataninos quienes son particularmente polares, por lo que es coherente que tanto en su investigación como en la presente investigación haya ausencia de estos compuestos fenólicos en los extractos acuosos, por lo que es ampliamente probable que los taninos hidrolizables que detectamos sean del tipo de elagitaninos; sin embargo, mencionan que la detección de ambos tipos de taninos hidrolizable podría verse incrementada si la extracción se produce en frío y con una atmosfera modificada.

La extracción de los metabolitos secundarios de la hoja de “mito” por medio de maceración con tres solventes (metanol, etanol y agua), sirvieron para detectar saponinas, betacianinas, alcaloides, taninos, quinonas, chalconas y carotenoides; sin embargo, la maceración con agua no logró retener a los taninos o la cantidad -necesaria para ser detectada por el ensayo de cloruro de hierro aplicado. Así, Min et al. (2019), utilizando la metodología

de ultrasonido logró extraer metabolitos como saponinas, terpenoides y flavonoides, de la pepa de la papaya "*Carica papaya*" pero en ninguno de sus extractos, taninos, esto debido a que su metodología contenía un tamizaje químico que pudo haber retenido dicho compuesto, al igual que en nuestra presente investigación pudo haberse visto limitada por las metodologías empleadas.

Las concentraciones de polifenoles totales (PFT) encontrada en la presente investigación fue dependiente del solvente utilizado, siendo el extracto acuoso el que mayor cantidad de polifenoles totales pudo retener por gramo de materia seca (36.35 mg PFT /g), seguido por el extracto etanólico (23.61 mg PFT/g) y finalmente el extracto metanólico (5.01 mg PFT/g), datos que concuerdan con lo obtenido por Min et al (2019) quienes a partir de la semilla de *Carica papaya* y utilizando extractantes iguales a los de la presente investigación, aunque con diferente metodología (ultrasonido), coincidieron en que el mejor extractante para retener polifenoles totales es el acuoso (195 mg PFT/g), seguido del etanólico (148 mg PFT/g) y finalmente el metanólico (106 mg PFT/g), indicando que la actividad antioxidante es proporcional a su capacidad de polifenoles totales extraídas.

En la presente investigación la concentración de proteínas fue dependiente al solvente utilizado, siendo el extracto metanólico el que mayor concentración proteica presento seguido del acuoso y finalmente el extracto etanólico; sin embargo, no se puede determinar si estas proteínas son capaces de actuar como antioxidantes, tal cual afirman Gallegos et al. (2013) quienes mencionan que las proteínas vegetales pueden formar proteínas antioxidantes a partir de una digestión, ya sea por enzimas exógenas o endógenas (papaína, pepsina, tripsina) o por fermentación microbiana.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de hoja de mito presentó la mayor concentración de polifenoles totales por gramo de materia seca, considerándolo el mejor antioxidante.
- El extracto metanólico de hoja de mito posee la mejor capacidad antimicrobiana.
- El extracto etanólico de hoja de mito es el mejor bacteriostático.

VII. RECOMENDACIONES

- A partir de la presente investigación se recomienda poner a prueba los efectos antimicrobianos y antioxidantes en productos reales durante su proceso de producción, en especial bebidas, como vinos o cervezas, además de evaluar si tiene consecuencias en las características organolépticas del producto final.
- Se recomienda la evaluación de los extractos analizados en la presente investigación, logrando retirar totalmente el solvente, pudiéndose realizar con la metodología de liofilización.
- Debido a que los extractos de la presente investigación poseen diferentes concentraciones proteicas y sabiendo que estas también pueden tener capacidades antioxidantes, si son activadas; se recomienda comprobar su capacidad antioxidante de las proteínas al ser activadas con enzimas (preferentemente de origen animal “pepsina y tripsina”) para conocer si estas proteínas pueden poseer capacidades antioxidantes también al ser ingeridas por el consumidor (beneficiando la salud).

VIII. REFERENCIAS

- Alvines, A. (2019). *Antioxidantes artificiales en la industria alimentaria*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional UNT. <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/12304/ALVINES%20DAVALOS%2c%20ALEJANDRA%20FIORELLA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.
- Armenteros, M., Ventanas, S., Esteves, M. y Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarnes*, 1(207), 63-73.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494, 161-165.
- Balbuena, V. (2012). Evaluation of the antimicrobial effect of flavonoids obtained from the extracts of leaves of *Tamarindus Indica Lin*. *Multimed*, 16(1), 1-14.
- Belli, V. (2018). *Estudio etnobotánico y morfológico de "Mito" Vasconcellea Candicans con énfasis en plántulas*, [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3754>
- Benford, A. (2000). Cell wall disassembly. *Functional Plant Biology*, 5(1), 15-119.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chávez, A. y Garmilla, M. (1964). Aditivos y sustancias extrañas en los alimentos: su importancia en salud pública. *Salud pública de México*, 6(2), 313-317.

- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, L., Vásquez, M. y Radilla C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Gallegos, S., Guerrero, L., Corzo, L. y Martínez, A. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. *OmniaScience*, 4(1), 111-122.
- Gálvez, A., Poblete, J., Fuentes, I., Uribe, E., Sainz, C. y Pasten, A. (2019). Chemical and bioactive characterization of papaya (*Vasconcellea pubescens*) under different drying technologies: evaluation of antioxidant and antidiabetic potential. *Food Measure*, 13(1), 1980-1990. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00117-4>
- Gonzales, S., Vázquez, D., Espinosa, J. y Gomes, R. (2019). Estudio comparativo de la microbiota aislada del Hongo Kombucha y su uso en la elaboración de alimentos fermentados para Síndrome metabólico. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 237–247.
- Husin, F., Ya'akob, H., Rashid, S. y Shahar, S. (2019). Cytotoxicity study and antioxidant activity of crude extracts and fractions from *Carica Papaya* Leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(1),1-6.
- Ibáñez, F., Torre, P. e Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios, área de nutrición y bromatología. Universidad Pública de Navarra. <http://cegicep.com/wp-content/uploads/2017/02/Aditivos-alimentarios-2003.pdf>
- Jarisarapurin, W., Sanrattana, W., Chularojmontri, L., Kunchana, K. y Wattanapitayakul, S. (2019). Antioxidant properties of unripe carica papaya fruit extract and its protective effects against endothelial oxidative stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(2019), 3-15.
- Emeruwa, A. (1982). Antibacterial substance from carica papaya fruit extract. *Journal of Natural Products*, 45(2), 123–127. <https://doi.org/10.1021/np50020a002>

Laboratorios Vitafor, Argentina. (14 de junio 2017). Antioxidantes. [Diapositiva].

DocPlayer <https://docplayer.es/18525962-Laboratorios-vitafor-s-r-l-antioxidantes-linea-laox-antioxidantes.html>

Londoño, J. (2012), Antioxidants: biological relevance and methods to measure their activity. *Corporación Universitaria Lasallista*, 22(7), 130-162.

Marcano, D. y Masahisa, H. (2018). *Fitoquímica orgánica*. (3^a ed.). Universidad Central de Venezuela.

Min, H., Anuar, A., Farzana, A., Hasyierah, N. y Rahayu, A. (2019). Optimization studies by ultrasound assisted solvent extraction and screening of phenolic compounds in papaya seeds. *Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 1(8): 8-16.

Olivas, F., Wall, A., Gonzales, G., López, J., Álvarez, E., De la Rosa, L. y Ramos, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud., *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66.

Ordóñez, J., Cambero, M., Fernández, L., García, M. L., García de Fernando, G., de La Hoz, L. y Selgas, M. (1998). *Tecnología de los alimentos, Volumen I: componentes de los alimentos y procesos*. Editorial Síntesis.

Portuguez, H. (2008). *Inventario florístico y evaluación de la producción frutícola de Carica candicans Gray en Casta-Huarochirí*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Punetha, L. y Prakash, O. (2019). Chemical composition and *in vitro* antioxidant potential of pili and safed shatavar (*Asparagus Racemosus*). *Pharma Innovation*, 8(10), 153-158.

Rahayu, S. y Lestari, S. (2019, 16 de abril). *Earth and environmental science* [sesión de conferencia]. Ciclo de Conferencias, Malang, Indonesia.

- Reyes, A., Galicia, M. y Carrillo, M. (2011). Antioxidantes: la magia de lo natural. *Tlatemoani*, 8(1), 10-16.
- Simirgiotis, M., Caligari, P. y Shmeda, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 1(15), 775-784.
- Sochor, J., Zitka, O., Skutkova, H., Pavlik, D., Babula, P., Krska, B., Horna, A., Adam, V. Provaznik, I. y Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15(9), 6285-6305.
- Stashenko, E., Jaramillo, B. y Martínez, J. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Academia Colombiana de Ciencias*, 27(105), 579-597.
- Uribe, E., Delgadillo, A., Vicuña, C., Fuentes, I. y Bravo, L. (2015). Extraction techniques for bioactive compounds and antioxidant capacity determination of Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) fruit. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 1- 8.
- Valenzuela, A., Nieto, S. y Sanhuesa, J. (2003). Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA)*, 53(3), 295-303.
- Vega, A., Stucken, K., Cantuarias, C., Lamas, F., García, V. y Pasten A. (2020). Antimicrobial properties of papaya (*Vasconcellea pubescens*) subjected to low-temperature vacuum dehydration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67(1), 1-37. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102563>

Vernon, L., Singleton, R., Rudolf, O. y Rosa, M. (1974). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods In Enzymology*, 299(1), 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Vicente, M. (2019). *Determinación de capacidad antioxidante y fenoles totales en frutos de vitis vinifera l. "vid", del valle de Cañete*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión]. Repositorio Institucional UNJFSC. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/3069>

IX. ANEXOS

Anexo A. Matriz de consistencia

PROBLEMA DETECTADO	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS
<p>Desde un principio la industria alimentaria se encontró con el problema de la oxidación de los alimentos, para la cual dieron solución con el uso de antioxidantes naturales, pero estos fueron insuficientes para la amplia gama de alimentos que se producía. Por lo que, en la actualidad, el uso de aditivos sintéticos antioxidantes cumple son importantes en la industria alimentaria, debido a que evita la oxidación de los alimentos y con ello su pérdida de color, aromas y gusto; A pesar de ello recientemente su uso, se ha puesto en tela de juicio por parte de los consumidores, debido a sus efectos en contra de la salud humana.</p>	<p>Los aditivos antioxidantes sintéticos, pueden causar reacciones adversas en un organismo, si éste los consume de manera continua en un largo periodo de tiempo o si este consumo supera los niveles de ingesta aceptables (IDA), las cuales representan una cantidad admisible de consumo de dichos aditivos, sin que represente un “riesgo apreciable en la salud”, a pesar de ello, estudios realizados en la última década, han demostrado que existe una relación en cuanto al estado de salud, envejecimiento físico y el consumo de antioxidantes artificiales y naturales, siendo los antioxidantes naturales los que demuestran tener efectos positivos para la salud.</p>	<p>Objetivo general:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluar la capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos crudos: acuoso, etanólico y metanólico, de la hoja de <i>Vasconcellea candicans</i> (mito) para considerar su uso en la industria. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ha: Los extractos crudos de la hoja de Mito poseen capacidad antioxidante y/o antibacteriana que permitirían su uso en la industria. - Ho: Los extractos crudos de la hoja de Mito no poseen capacidad antioxidante y/o antibacteriana que permitirían su uso en la industria.

«continuación»

	<p>Además, de contribuir eficazmente a la industria alimentaria, también lo hacen a la salud; por lo que actualmente se trata de remplazar la mayor cantidad de aditivos artificiales por mayor cantidad de aditivos derivados de fuentes naturales, aprovechando los metabolitos secundarios que las plantas producen y que podrían ser potenciales antioxidantes como los compuestos poli fenólicos, que engloban muchos de estos, además de medir su capacidad antioxidante y antibacteriana, debido a que la oxidación de los alimentos puede deberse a la exposición prolongada al oxígeno y metales de especies reactivas o por efecto de microorganismos oxidantes.</p>	<p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar la capacidad antioxidante de extractos crudos (acuoso, etanólico y metanólico) de la hoja de <i>Vasconcellea candicans</i> (mito) para considerar su uso en la industria. - Determinar la capacidad antibacteriana de extractos crudos (acuoso, etanólico y metanólico) de la hoja de <i>Vasconcellea candicans</i> (mito) usando <i>Acetobacter</i> sp. y un microorganismo de contraste (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), para considera su uso en la industria. 	
--	--	--	--

Anexo B. Procesamiento y maceración de las hojas de mito



Nota. A: capuchones de papel filtro 5C; B: pulverizador; C: hoja de mito pulverizada; D: Blender disgregador de hojas secas de mito; E: etanol; F: metanol; G: macerado etanólico de hoja de mito; H: macerado metanólico de hoja de mito; I: macerado acuoso de hoja de mito.

Anexo C. Certificado de reconocimiento de *Vasconcellea candicans* A.Gay



Universidad Nacional
Federico Villarreal

**Facultad de Ciencias
Naturales y Matemática**

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"



HERBARIO UFV

El Agustino, 05 de julio del 2022

Mg.

Gutierrez Roman Ana Isabel Flor

Investigadora UNFV

Presente. –

Estimada, según las fotografías enviadas por su persona el 03.07.21, las imágenes muestran hojas grandes, poco lobadas, con el haz verde oscuro y el envés revestido de un tomento blanco. Frutos verdes rugosos con 4 a 5 ranuras prominentes^{1,2,3}. Por lo que las características morfológicas de las hojas y el fruto corresponden a la siguiente especie:

Nombre común	Nombre científico	Familia
Mito, papaya andina ²	<i>Vasconcellea candicans</i> A. Gay	Caricaceae

Referentes de consulta.

¹ <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2700865>

² <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242469>

³ <https://www.tropicos.org/name/6100034>

Esperamos pueda depositar su material en nuestras instalaciones, sin otro particular se adjunta la firma de la jefa del Herbario UFV.

Atentamente,

Mg. MARÍA ISABEL LA TORRE ACUY

JEFA DEL HERBARIO UFV

LABORATORIOS DE BOTÁNICA FCCNM

SL10LA97-SL10LA104