

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS BIOACTIVOS:  
ÁCIDOS GRASOS, POLIFENOLES, TERPENOS Y TOCOFEROLES EN  
HOJAS DE PAICO [*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants]”**

**ANDRÉS ANTHONY FIGUEROA MERMA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**Lima-Perú**

**2021**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS BIOACTIVOS:  
ÁCIDOS GRASOS, POLIFENOLES, TERPENOS Y TOCOFEROLES  
EN HOJAS DE PAICO [*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin &  
Clemants]”**

Tesis para optar el título de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Sustentada por:

**ANDRÉS ANTHONY FIGUEROA MERMA**

Aprobada ante el siguiente jurado:

---

Mg. Sc. Beatriz Hatta Sakoda

**PRESIDENTE**

---

Dra. Ana C. Aguilar Galvez

**MIEMBRO**

---

PhD. Jenny del C. Valdez Arana

**MIEMBRO**

---

Dr. David C. Campos Gutiérrez

**ASESOR**

---

Dra. Rosana S. Chirinos Gallardo

**CO-ASESORA**

Lima-Perú

2021

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, Lucía Merma, la persona más importante en mi vida, por su incansable apoyo hacia sus 3 hijos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, el Dr. David Campos y la Dra. Rosana Chirinos, por permitirme ser parte de su prestigioso instituto y su invaluable guía en la ejecución de la presente investigación.

A la Dra. Ana Aguilar por la orientación en ciertos puntos de la presente tesis.

A Diego García por el constante despeje de dudas en las distintas metodologías.

A Cinthya Huamán y Adelayda Pardo (ambas personal del laboratorio) por su apoyo en las diversas fases de la parte experimental.

A Nataly Sánchez y Melissa García (FIAL) por su apoyo en una fase experimental.

A todos mis compañeros del IBT (Instituto de Biotecnología) por toda la ayuda brindada en algún momento: Sílfida, Paola, Sofía, Marianela, Johana, Maggy, Allinson, Félix.

Al Vicerrectorado de Investigación por el financiamiento económico para la realización de la presente tesis, ganado bajo el marco del 8° Concurso para subvención de tesis de pregrado UNALM 2018 - I Convocatoria.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. PAICO .....	3
2.1.1. GENERALIDADES Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	3
2.1.2. ORIGEN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	4
2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL .....	5
2.1.4. POSIBLES PROPIEDADES ASOCIADAS .....	5
2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	7
2.2.1. MÉTODO TEAC (TROLOX EQUIVALENTE ANTIOXIDANT CAPACITY) .....	8
2.2.2. MÉTODO ORAC (OXYGEN RADICAL ANTIOXIDANT CAPACITY) .....	9
2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	11
2.3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS .....	11
2.3.2. TERPENOS .....	16
2.3.3. ÁCIDOS GRASOS .....	19
2.3.4. TOCOFEROLES .....	22
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	29
3.2. MATERIA PRIMA .....	29
3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....	29
3.3.1 EQUIPOS .....	29
3.3.2. MATERIALES .....	27
3.3.3. REACTIVOS .....	28
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	29
3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD .....	29
3.4.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES .....	29
3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIANTE HIDROFÍLICA .....	30
3.4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	31
3.4.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS POR GC-MS .....	33

3.4.6. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR GC-FID .....	34
3.4.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TOCOFEROLES POR HPLC35	
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	35
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PAICO.....	38
4.1.1. HUMEDAD.....	38
4.1.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	38
4.1.3. CONTENIDO Y TIPOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	41
4.1.4. CONTENIDO Y TIPOS DE TERPENOS .....	47
4.1.5. CONTENIDO Y TIPOS DE ÁCIDOS GRASOS .....	53
4.1.6. CONTENIDO Y TIPOS DE TOCOFEROLES .....	55
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>62</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición proximal, minerales, vitaminas y otros compuestos en hojas de paico .....	6
Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos .....	12
Tabla 3: Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante hidrofílica TEAC y ORAC en hojas de paico.....	39
Tabla 4: Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la hoja del paico por LC-MS/MS qToF y su cuantificación por UPLC®-PDA.....	42
Tabla 5: Terpenos encontrados en hojas de paico .....	49
Tabla 6: Ácidos grasos presentes en hojas de paico.....	53
Tabla 7: Tocoferoles presentes en las hojas de paico.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin y Clemants.....	3
Figura 2. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.....	8
Figura 3. (a) Formación del radical ABTS <sup>•+</sup> , (b) reacción del catión radical ABTS <sup>•+</sup> con compuestos fenólicos.....	9
Figura 4. Mecanismo de oxidación ORAC .....	10
Figura 5. Estructura genérica de un flavonoide .....	13
Figura 6. Biosíntesis de compuestos fenólicos en las vías fosfato de pentosa, shikimato y fenilpropanoide en plantas.....	14
Figura 7. Estructura de los principales compuestos fenólicos de la familia de los flavonoles .....	16
Figura 8. Rutas de biosíntesis para la formación de los terpenos. A: Ruta mevalónica. B: Ruta no mevalónica. ....	18
Figura 9. Estructura de los principales terpenos en hojas de paico .....	19
Figura 10. Ruta biosintética de los ácidos grasos y triglicéridos en plantas. (a) Esquema de reacciones de síntesis de ácidos grasos. (b) Reacciones para la modificación de ácidos grasos en plantas y su ensamblaje en triacilglicerol.....	23
Figura 11. Diferencias estructurales en los tocoferoles .....	22
Figura 12. Biosíntesis de tocoferoles.....	24
Figura 13. Flujo de operaciones de acondicionamiento de arbustos de paico.....	37
Figura 14. Perfil cromatográfico a 320 nm de los principales compuestos fenólicos identificados en hojas de paico por medio del UPLC®-qToF/MS-MS .....	46
Figura 15. Perfil cromatográfico (GC-MS) de terpenos en hojas de paico .....	50
Figura 16. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en hojas de paico.....	54
Figura 17. Perfil cromatográfico de tocoferoles en hojas de paico .....	56



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES POR FOLIN-CIOCALTEU EN PAICO .....	78
ANEXO 2: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS ABTS Y ORAC EN HOJAS DE PAICO .....	78
ANEXO 3: CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS EN HOJAS DE PAICO .....	79
ANEXO 4: IDENTIFICACIÓN Y PORCENTAJE RELATIVO DE ÁCIDOS GRASOS EN HOJAS DE PAICO .....	79
ANEXO 5: CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN HOJAS DE PAICO .....	80

## RESUMEN

La *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, comúnmente denominada como paico, es una especie que se cree nativa de América tropical. A dicha hierba se le atribuyen diversas propiedades en la cultura milenaria. El presente estudio tuvo como principal objetivo caracterizar a los principales metabolitos de las hojas de paico, además de su respectiva capacidad antioxidante. El total de compuestos fenólicos evaluados espectrofotométricamente fue de 13.60 AGE (ácido gálico equivalente) / g base seca (bs); mientras que la capacidad antioxidante medida por los ensayos TEAC y ORAC fueron de 93.3 y 571  $\mu\text{mol}$  trolox equivalente (TE)/g bs, respectivamente. Mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS), 20 polifenoles fueron develados: un ácido vainílico, un derivado del ácido p-cumaroil-hexósido, tres derivados de quercetina-ramnósida, una quercitina derivada, dos derivados de kaempferol acetil-furanósido-ramnósido y doce derivados del kaempferol ramnósido. La cuantificación por UPLC®-PDA de los compuestos fenólicos totalizó 645.11 mg/100 g bs (de donde los ácidos fenólicos son 41.37 mg/100 g bs y flavonoides, 603.74 mg/100 g bs), destacando la alta cantidad de kaempferol sobre los demás compuestos. El análisis de metabolitos lipofílicos, reportó ácidos grasos importantes, siendo en orden de importancia: Linoleico > linolénico > palmítico > oleico (35.8; 35.4; 26.3 y 2.5 por ciento, respectivamente). Por su parte, se encontró  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol en cantidades de 28.78, 7.19, 7.96 y 3.27  $\mu\text{g/g}$  bs, respectivamente. Asimismo, del análisis de terpenos se encontró principalmente y en orden de importancia a:  $\alpha$ -terpineno, limoneno, *p*-cimeno, timol,  $\gamma$ -terpineno, carvacrol, isoascaridol y  $\alpha$ -pineno (1489.65; 313.1; 104.8; 49.4; 45.1; 22.9; 8.19 y 4.32 mg/100 g bs, respectivamente). Se concluye que, de acuerdo a los resultados obtenidos, las hojas de paico son una variada fuente de compuestos bioactivos: polifenoles, terpenos, ácidos grasos, tocoferoles y de importante actividad antioxidante (TEAC y ORAC), lo cual haría interesante su aplicación en diversas industrias.

Palabras clave: Paico, cromatografía líquida, cromatografía gaseosa, espectrometría de masas, compuestos fenólicos, terpenos

## ABSTRACT

*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, commonly referred to as paico, is a species believed to be native to tropical America. Various properties are attributed to this herb in ancient culture. The main objective of the present study was to characterize the main metabolites of paico leaves, in addition to their respective antioxidant capacity. The total of phenolic compounds evaluated spectrophotometrically was 13.60 AGE (gallic acid equivalent) / g dry base (bs); while the antioxidant capacity measured by the TEAC and ORAC tests were 93.3 and 571  $\mu\text{mol}$  trolox equivalent (TE) / g bs, respectively. By mass spectrometry (LC-MS / MS), 20 polyphenols were revealed: vanillic acid, a derivative of p-coumaroyl-hexoside acid, three quercetin-rhamnoside derivatives, a quercetin derivative, two derivatives of kaempferol acetyl-furanoside- rhamnoside and twelve derivatives of kaempferol rhamnoside. The quantification by UPLC®-PDA of the phenolic compounds totaled 645.11 mg / 100 g bs (of which the phenolic acids are 41.37 mg / 100 g bs and flavonoids, 603.74 mg / 100 g bs), highlighting the high amount of kaempferol over the other compounds. The analysis of lipophilic metabolites, reported important fatty acids, being in order of importance: Linoleic > linolenic > palmitic > oleic (35.8; 35.4; 26.3 and 2.5 percent, respectively). On the other hand,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol were found in amounts of 28.78, 7.19, 7.96 and 3.27  $\mu\text{g}$  / g bs, respectively. Likewise, the analysis of terpenes mainly found and in order of importance:  $\alpha$ -terpinene, limonene, p-cymene, thymol,  $\gamma$ -terpinene, carvacrol, isoascaridol and  $\alpha$ -pinene (1489.65; 313.1; 104.8; 49.4; 45.1; 22.9; 8.19 and 4.32 mg / 100 g bs, respectively). It is concluded that, according to the results obtained, paico leaves are a varied source of bioactive compounds: polyphenols, terpenes, fatty acids, tocopherols and of important antioxidant activity (TEAC and ORAC), which would make their application interesting in various industries.

**Keywords:** Paico, liquid chromatography, gas chromatography, mass spectrometry, phenolic compounds, terpenes

## I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el uso de las plantas medicinales ha ganado popularidad mundial. Muchos países utilizan la medicina tradicional como una alternativa debido a la desconfianza que genera la medicina sintética y las contraindicaciones graduales de su uso (Garza, 2014).

El paico es una planta aromática muy conocida como ingrediente de los chupes o caldos verdes en los Andes, principalmente en Cajamarca y la sierra norte; sin embargo, se encuentra en casi todo el Perú. Los beneficios de esta hierba van más allá de los conocidos en la cultura milenaria: Barros *et al.* (2013), menciona sus aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de gripe y resfriado; Gómez (2008), destaca su potencial bactericida, fungicida y nematocida; Hou *et al.* (2017), señalan el poder antiinflamatorio; García *et al.* (1997), indican actividad antiespasmódica; mientras que Villalobos-Delgado *et al.* (2016), le asignan un probado efecto antioxidante. Por otro lado, Villar (1982) y Abozaglo (1990), mencionan que la industria alimentaria ya ha utilizado esta materia prima en la formulación de un condimento y en un filtrante para infusión, respectivamente. La riqueza en compuestos bioactivos de esta planta (se cree que en polifenoles y terpenos), reafirman su potencial uso como aditivo alimentario. Ortega *et al.* (2014), aseguran que pueden utilizarse diferentes tecnologías, como nanoemulsiones, películas o recubrimientos comestibles, sistemas de encapsulación, entre otros, para aplicar los extractos de hierbas medicinales en matrices alimentarias.

Por otro lado, al consultar la bibliografía publicada sobre la capacidad antioxidante, los perfiles de compuestos fenólicos y la cuantificación de terpenos del paico sudamericano, la información es bastante limitada. Es por ello necesario realizar una investigación de base que identifique a los metabolitos presentes en estas hojas, para así identificar potencialidades de uso en diversas industrias como la alimentaria y la farmacéutica.

Por lo mencionado anteriormente, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar los compuestos bioactivos como: ácidos grasos, compuestos fenólicos, terpenos y tocoferoles utilizando técnicas cromatográficas y la espectrometría de masas en las hojas de paico. Además, determinar su capacidad antioxidante mediante ensayos *in vitro*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. PAICO

#### 2.1.1. GENERALIDADES Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El paico [*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants también citado en la literatura bajo el nombre científico de *Chenopodium ambrosioides* L.] es una hierba cosmopolita, a veces perennizante y crece sin necesidad de cultivo en el altiplano, valles y toda Sudamérica. Tiene como hábitat común los jardines, lados de las carreteras y pastizales (Busmann *et al.*, 2013; Abozaglo, 1904). Se puede apreciar la morfología de la planta en la Figura 1.



**Figura 1.** *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants

FUENTE: Mondragón (2009)

Según el sistema de clasificación APG IV (Angiosperm Phylogeny Group IV) (2016), la clasificación taxonómica del paico es la siguiente:

Reino: Plantae  
Phylum: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Caryophyllales  
Familia: Amaranthaceae  
Género: *Dysphania* R. Br.  
Especie: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants

Torres *et al.* (2003), resaltan los nombres comunes alternativos con los que se conoce al *D. ambrosioides*: en Perú, Chile y Argentina: paico macho; en Uruguay, quinoa; en Brasil, *Erva de Santa María* o *mastruz*; en México, Epazote; en E.U.A., *Worm grass* o *fit weed* y en Japón, Aritasou. En otras regiones se les denomina Amerikanischer wurmsamen (Alemania); Ansérine vermifuge (Francia) y Erva formigueira (Portugal) (Amorin, 1989; citado por León, 2009).

Es importante mencionar que la denominación del paico obedece en la actualidad (año 2020) a *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Angiosperm Phylogeny Group IV, 2016) desde el año 2002, cuando Mosyakin y Clemants redefinieron tanto al género *Chenopodium* L. y *Dysphania* R.Br., transfiriendo taxones de *Chenopodium* subgen. *Ambrosia* A.J. Scott al género *Dysphania* R.Br., siendo el paico uno de los involucrados (Mosyakin y Clemants, 2002). Por dicha razón, fue muy común encontrar la denominación del paico como *C. ambrosioides* (L.) en la literatura científica. Albuquerque *et al.* (2018), mencionan el uso de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants como sinonimia de *C. ambrosioides* (L.) en los escritos científicos.

### **2.1.2. ORIGEN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

El paico, según mencionan Miossi *et al.* (2012), es una especie oriunda de la América tropical, originaria probablemente de México; mientras que Abozaglo (1990), afirma que es una especie nativa de los andes naturalizada en casi todo el mundo.

Ibarra y Paredes (2013), mencionan que la *D. ambrosioides* es una hierba anual o perenne, erguida o incluso ascendente, fuertemente olorosa, de 40 cm a 1 m de alto, de tallo simple o ramificado y de inflorescencia dispuesta en panícula piramidal. Sus hojas se caracterizan por ser pecioladas, oblongas y lanceoladas, de 3 a 10 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho. Por su parte, Abozaglo (1990), expone que las hojas son perfectas y pequeñas, reunidas en glomérulos prestos en panojas terminales; mientras que sus flores son homoclamídeas y su cáliz está formado por 5 sépalos subherbáreos. Su semilla es horizontal o vertical, negra brillante y lisa de 0.6 a 0.8 mm.

El paico se adapta bien a terrenos arcillosos, arenosos, xerofíticos y subxerofíticos, cultivado con gran facilidad en diversos climas (tropicales, subtropicales, templados) pero en condiciones de abundante materia orgánica (Jaramillo *et al.*, 2012). Agrega Abozaglo (1990), que, a pesar de que el paico puede cultivarse en toda clase de suelos, se prefieren los francos a franco arenosos, siempre y cuando tengan un apropiado balance de fósforo y nitrógeno en los niveles de fertilización. Con respecto a la siembra, puede ser directa o indirecta, de donde se cree que la última es la más conveniente, realizándose el transplante al tener como mínimo 8 cm de altura (la plántula).

### **2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL**

Reyes *et al.* (2009), mencionan un alto contenido de calcio en las hojas de paico; sin embargo, la hierba no supone importantes cantidades de macronutrientes (proteínas, grasas, carbohidratos) ni de energía, tal y como se puede apreciar en la Tabla 1.

### **2.1.4. POSIBLES PROPIEDADES ASOCIADAS**

Barros *et al.* (2013), mencionan que el paico tiene diversas aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de gripe, en las enfermedades gastrointestinales y respiratorias, así como en los vómitos y la curación de ulceraciones en la piel. A su vez, Miossi *et al.* (2012), explican que los extractos y otros derivados de la planta son usualmente utilizados contra sífilis, sarampión y enfermedades intestinales. Hou *et al.* (2017), a su vez, mencionan una moderada actividad antiinflamatoria; mientras que Okuyama *et al.* (1993), demostraron el efecto analgésico y sedante. Por otro lado, Lima *et al.* (2011), explicaron que el extracto acuoso de las hojas de paico favoreció la cicatrización de heridas cutáneas abiertas en ratas; en tanto,



Jang *et al.* (2011), probaron la efectiva actividad antidiabética en ratas (hierba como extracto crudo). Asimismo, Nascimento *et al.* (2006), concluyen que el paico tiene un potente efecto antitumoral antes e incluso después de la implantación tumoral (*in vivo*) de Ehrlich. Los autores mencionados, sospechan que el efecto en cuestión está relacionado con las propiedades antioxidantes de la planta.

**Tabla 1: Composición proximal, minerales, vitaminas y otros compuestos en hojas de paico**

Componente (por 100 g de hojas frescas)	Unidad	Reyes <i>et al.</i> (2009)	Prakash <i>et al.</i> (1993)	Aborisade <i>et al.</i> (2017)
Energía	Kcal	54	N.D.	N.D.
Humedad	g	81.7	75.7	89.4
Proteína	g	5	6.4	3.2
Grasa total	g	1.1	N.D.	1.9
Carbohidratos totales	g	9.2	N.D.	4.6
Carbohidratos disponibles	g	5.4	N.D.	N.D.
Fibra cruda	g	2.1	N.D.	1.4
Fibra dietaria	g	3.8	N.D.	N.D.
Cenizas	g	3.0	N.D.	1.8
Calcio	mg	459.0	N.D.	N.D.
Fósforo	mg	65.0	N.D.	N.D.
Zinc	mg	1.1	N.D.	N.D.
Hierro	mg	6.3	N.D.	N.D.
Retinol	µg	674.0	N.D.	N.D.
Vitamina A (equivalentes totales)	µg	3.0	N.D.	N.D.
Tiamina	mg	0.11	N.D.	N.D.
Rivoflavina	mg	0.42	N.D.	N.D.
Niacina	mg	1.12	N.D.	N.D.
Vitamina C	mg	34.7	60.0	N.D.
Carotenoides	mg	N.D.	16.4	N.D.
Nitratos	mg	N.D.	370.0	N.D.
Oxalatos	mg	N.D.	3900.0	N.D.

N.D.: No determinado

El aceite esencial de *Ch. ambrosioides* L. presenta diversas bioactividades. Así, De Andrade *et al.* (2016) y Nunes *et al.* (2016), mencionan su acción antihelmíntica (particularmente contra *Ascaris lumbricoides*), antifúngica, ascaricida y antiparasitario (*Plasmodium*). A su vez, Kokanova-Nedialkova *et al.* (2009), explicaron que el extracto de la mencionada materia prima, mostró actividad contra bacterias Gram positivas; Torres *et al.* (2003), fueron

más específicos al comprobar la inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en dicho extracto. Gómez (2008), añade su actividad fungitóxica frente a diversas colonias.

El extracto de *C. ambrosioides* solo y en sinergia con lecitina y ácido cítrico tiene efectos similares a los de los antioxidantes comunes y podría aplicarse en la estabilización de compuestos insaturados en la industria alimentaria y farmacéutica (Puhaca *et al.*, 2000, citados por Kokanova-Nedialkova *et al.*, 2009).

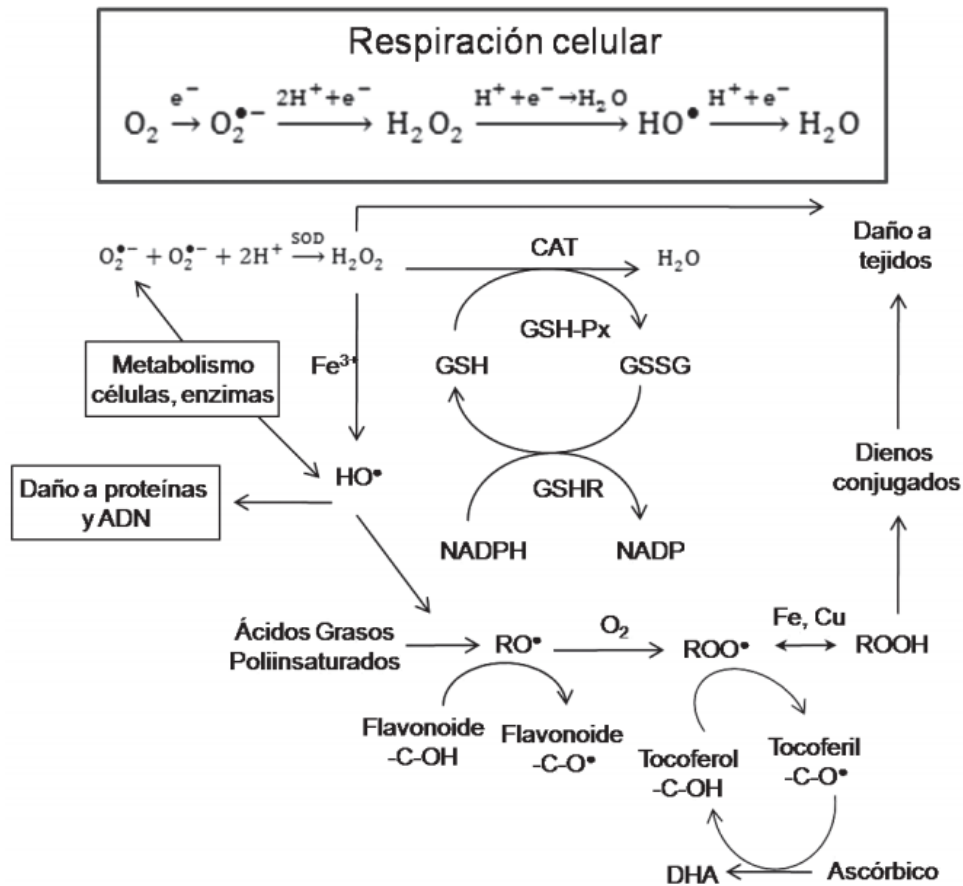
## 2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es un compuesto que forma parte de los alimentos de consumo frecuente, puede prevenir los efectos desfavorables de las especies reactivas sobre las funciones fisiológicas comunes que desempeñan los seres humanos (Coronado *et al.*, 2015).

Mercado *et al.* (2013), mencionan que la capacidad antioxidante de un alimento está definida por relaciones entre distintos compuestos con diferentes mecanismos de reacción. Por ello, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos se lleva a cabo comúnmente por distintos métodos complementarios, que evalúen variados mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-acido sulfónico). También se encuentran otros métodos como el ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).

Sabiendo lo que es la capacidad antioxidante y sus interacciones, resulta también importante conocer su mecanismo de acción protectora en las células. Así, en la Figura 2, se pueden observar los diferentes mecanismos de oxidación celular y sus principales sistemas antioxidante. En la parte superior se aprecia la reacción que sigue el oxígeno molecular hasta convertirse en agua. Los procesos celulares muestran la producción de radicales libres tales como el  $O_2^-$  (anión superóxido), el cual puede generar  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) por la enzima SOD (superóxido dismutasa) y posteriormente convertida a agua por la enzima catalasa. Otra vía para el  $H_2O_2$  es la conversión a  $HO^-$  (radical hidroxilo) protegiendo, de esta manera, los ácidos nucleicos, proteínas y AGPI (ácidos grasos poliinsaturados). El ataque a estos últimos (AGPI) puede producir radicales que interactúan con  $O_2$  (oxígeno) para formar radicales  $ROO^-$  (peroxilo), potenciales formadores de dienos conjugados

(compuestos más estables), capaces de atacar a los tejidos (González-Torres *et al.*, 2000). Dichos radicales nocivos se pueden estabilizar por los flavonoides y tocoferoles.



**Figura 2. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.**

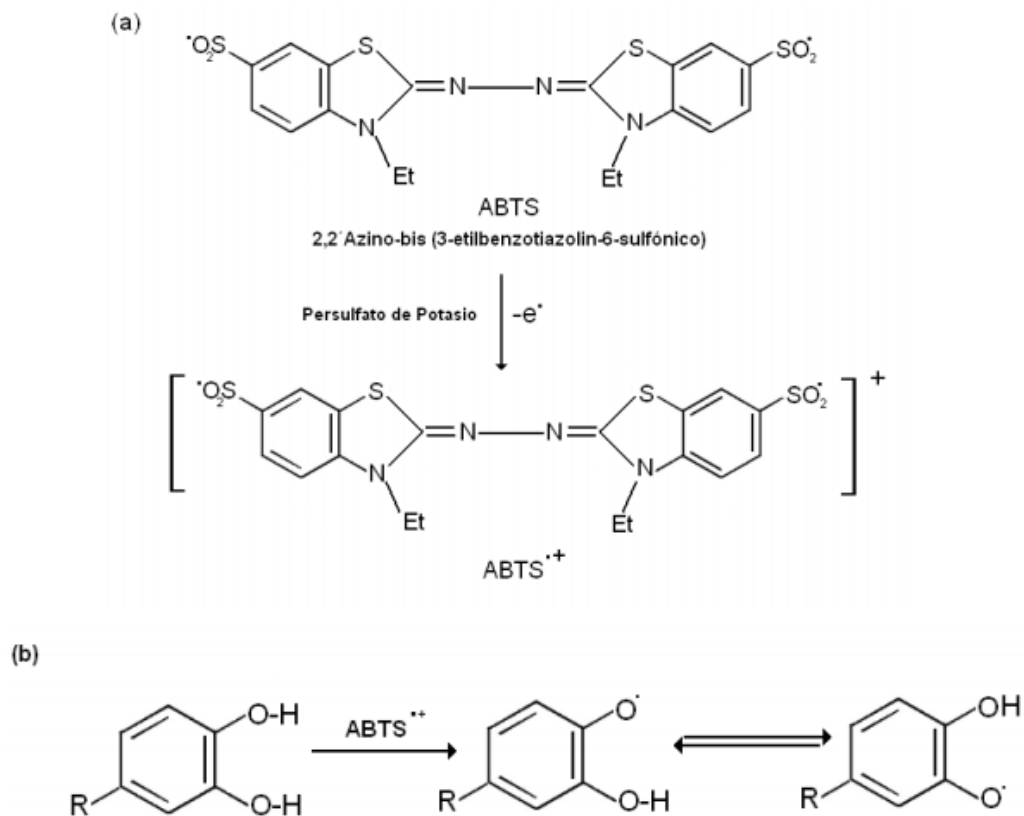
FUENTE: González-Torres *et al.* (2000)

Respecto a la actividad antioxidante, algunas plantas pueden presentar capacidad antioxidante más importante en sus hojas que en sus frutos. Ghareib *et al.* (2010), concluyeron que el extracto de hojas de *Chenopodium murale* muestra una mayor actividad antioxidante y un mayor contenido fenólico total en comparación a otros extractos utilizados en el crecimiento de tomates.

### 2.2.1. MÉTODO TEAC (TROLOX EQUIVALENTE ANTIOXIDANT CAPACITY)

Re *et al.* (1999), menciona que el método TEAC, se utiliza para la detección de la capacidad antioxidante como un ensayo de decoloración. El radical empleado es el mono catión preformado el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (conocido como

radical  $ABTS^{\cdot+}$ ) se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de donantes de hidrógenos (Figura 3).



**Figura 3. (a) Formación del radical  $ABTS^{\cdot+}$ , (b) reacción del catión radical  $ABTS^{\cdot+}$  con compuestos fenólicos**

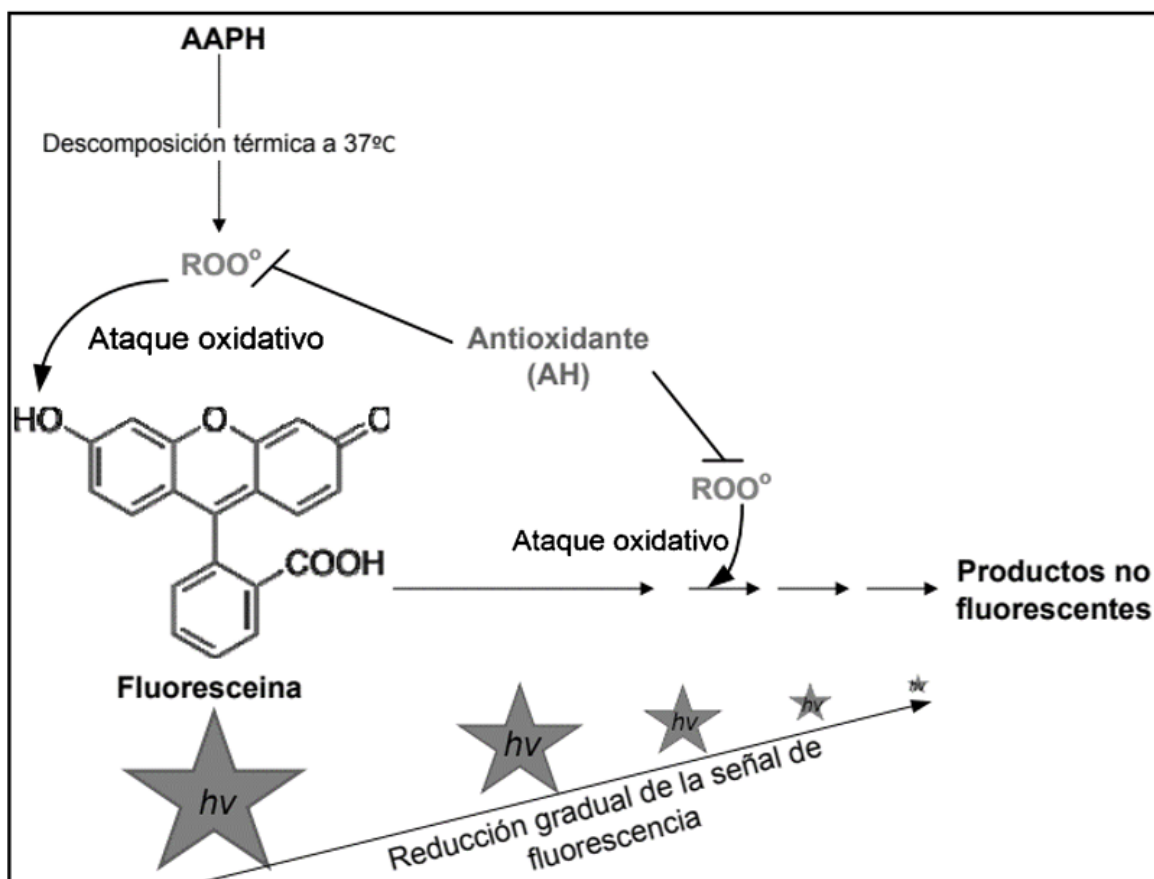
FUENTE: Santacruz (2011)

Citando algunos ejemplos de alimentos, las hojas de ciertas plantas como el culantro (*Coriandrum sativum*), perejil (*Petroselinum crispum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) obtuvieron una capacidad antioxidante TEAC de 7, 6.3, y 38.1 mmol TE/100 bs, respectivamente.

### 2.2.2. MÉTODO ORAC (OXYGEN RADICAL ANTIOXIDANT CAPACITY)

Zapata (2014), menciona que el método ORAC funciona bajo el mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) y consiste en un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peroxilo, el cual es relevante en la oxidación de lípidos en los alimentos. El generador de radicales libres es el AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propane)

dihydrochloride), según Magalhaes *et al.* (2008), produce radicales  $ROO^\ominus$ , los cuales oxidarán la fluoresceína. El antioxidante al retardar la oxidación, evita la pérdida de fluorescencia (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismo de oxidación ORAC**

FUENTE: Mujica (2011)

Citando algunos ejemplos de alimentos, Mercado *et al.* (2013) presentaron la capacidad antioxidante ORAC de algunas hierbas comúnmente consumidas: el culantro (*Coriandrum sativum*) con  $5.15 \cdot 10^{-3}$  mmol TE /100 g bh; el laurel (*Laurus nobilis*) 296 mmol de equivalente de TE/100 g bs; el romero (*Rosmarinus officinalis*) 0.029 mmol TE/100 g bh y el tomillo (Nombre científico) 1.8-22.3 mmol TE/100 g bs. Algo importante, es lo explicado por Prior y Cao (1999), quien relaciona al aumento del consumo de frutas y verduras a un aumento significativo de la capacidad antioxidante plasmática (medida en ORAC).

## **2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS**

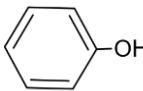
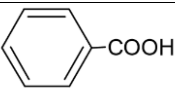
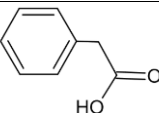

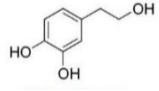
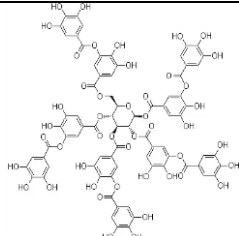
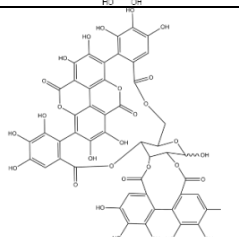
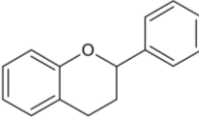
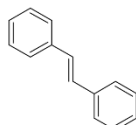
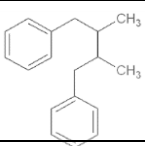
Los compuestos bioactivos son fitoquímicos, que los podemos encontrar en los alimentos, capaces de modular los procesos metabólicos efectuando una mejora en la salud. Incluyen una clase extremadamente heterogénea de moléculas (compuestos polifenólicos, carotenoides, tocoferoles, fitoesteroles y compuestos organosulfurados) con diferentes estructuras químicas (hidrófilas o lipófilas), distribución en la naturaleza, sitio de acción, efectividad antioxidante y acción específica biológica (Galanakis, 2017). Kris-Etherton *et al.* (2002) explican el papel de los compuestos bioactivos en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas importantes y sus mecanismos biológicos involucrados. Se les encuentran en frutas, verduras y granos enteros.

### **2.3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS**

Quiñones *et al.* (2012), exponen que los polifenoles se originan principalmente en las plantas, quienes los sintetizan en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario, siendo algunos indispensables para sus funciones fisiológicas. Ferrazzano *et al.* (2011), mencionan que dichos compuestos se forman en las plantas como producto de funciones defensivas para el fortalecimiento y reparación de la pared celular y actividades antimicrobianas y antifúngicas. Un claro ejemplo de dicha función protectora es la presencia de fitoalexinas: compuestos que se acumulan alrededor de una lesión en respuesta al crecimiento de patógenos en la planta. Harborne (1989), citado por Soto (2011), afirma que los polifenoles se pueden clasificar en función del número de carbono (Tabla 2).

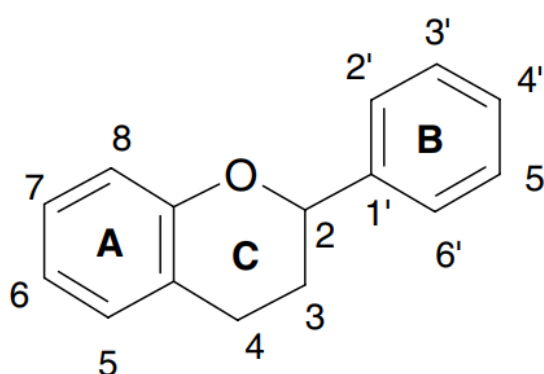
De todos los compuestos expuestos en la Tabla 2, los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos son considerados como principales polifenoles de la dieta (King y Young, 1999). Laghari *et al.* (2011), mencionan que los ácidos fenólicos son compuestos simples de la familia no flavonoide y han recibido atención especial en las últimas tres décadas debido a su rol putativo en la prevención de varias enfermedades humanas. Cartea *et al.* (2011), señalan lo abundantes que son los compuestos mencionados en las plantas (son utilizados también como mecanismo de defensa). Se cree que estos compuestos pueden encontrarse libremente (rara vez) o como componentes de polímeros vegetales (ésteres, glucósidos y complejos) (Laghari *et al.*, 2011). Por su lado, Peñarrieta *et al.* (2015), destacan la presencia de dos tipos de ácidos fenólicos en las plantas: ácidos hidroxibenzoicos e hidoxicinámicos.

**Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos**

Clase	Subclase	Esqueleto carbonado	Estructura básica	Ejemplos	Alimentos
<b>Fenoles simples</b>		C <sub>6</sub>		Cresol Timol Resorcinol	Tomates, Espárrago, Tomillo, Trigo, Avena
<b>Ácidos fenólicos</b>	Ácidos hidrozibenzoicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>		Ácido gálico Ácido vainílico Ácido siríngico	Castaña, Albahaca, Tomillo, Cerveza, Nueces, Aceitunas
	Ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>		Ácido homovainílico	Aceitunas, Vino tinto, Cerveza
	Ácido hidroxicinámicos	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>		Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido cumárico	Café, Tomates, Cerveza, Trigo
<b>Alcoholes fenólicos</b>		C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>		Hidroxitirosol tirosol	Aceite de oliva
<b>Taninos Hidrolizables</b>	Galotaninos	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub>		Ácido tánico	Té, Sidra, Fruta inmadura
	Elagitaninos	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>		Punicalagina	Granada
<b>Flavonoides</b>		C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>		Epicatequina Quercetina Apigenina Naringenina Cianidina Daidzeína	Cacao, Té verde, Alcaparras, Cebolla, Manzana, Mejorana, Orégano, Apio
<b>Estilbenos</b>		C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>		Resveratrol Pteroesstilbeno	Vino tinto, uva
<b>Lignan</b>		(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		Enterodiol Pinoresinol	Semillas de lino , Linaza, Sésamo, Avena, Aceite de oliva

FUENTE: Gómez (2015)

En el caso de los flavonoides, son el mayor grupo de fenólicos vegetales y representan más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos naturales (Harborne *et al.*, 1999, citados por Balasundram *et al.*, 2005). Hollman y Katan (1999), explican que la estructura de un flavonoide consiste en dos anillos aromáticos A y B, unidos por un anillo heterocíclico, C (Figura 5). Además, en la última fuente bibliográfica citada, se menciona que las variaciones de los patrones de sustitución al anillo C efectúa las principales clases de flavonoides: flavonoles, flavanoles (o catequinas), flavanonas, isoflavonas, flavonas, flavanonoles y antocianidinas. Agregan, Balasundram *et al.* (2005), que las sustituciones de los anillos A y B dan lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de flavonoides.



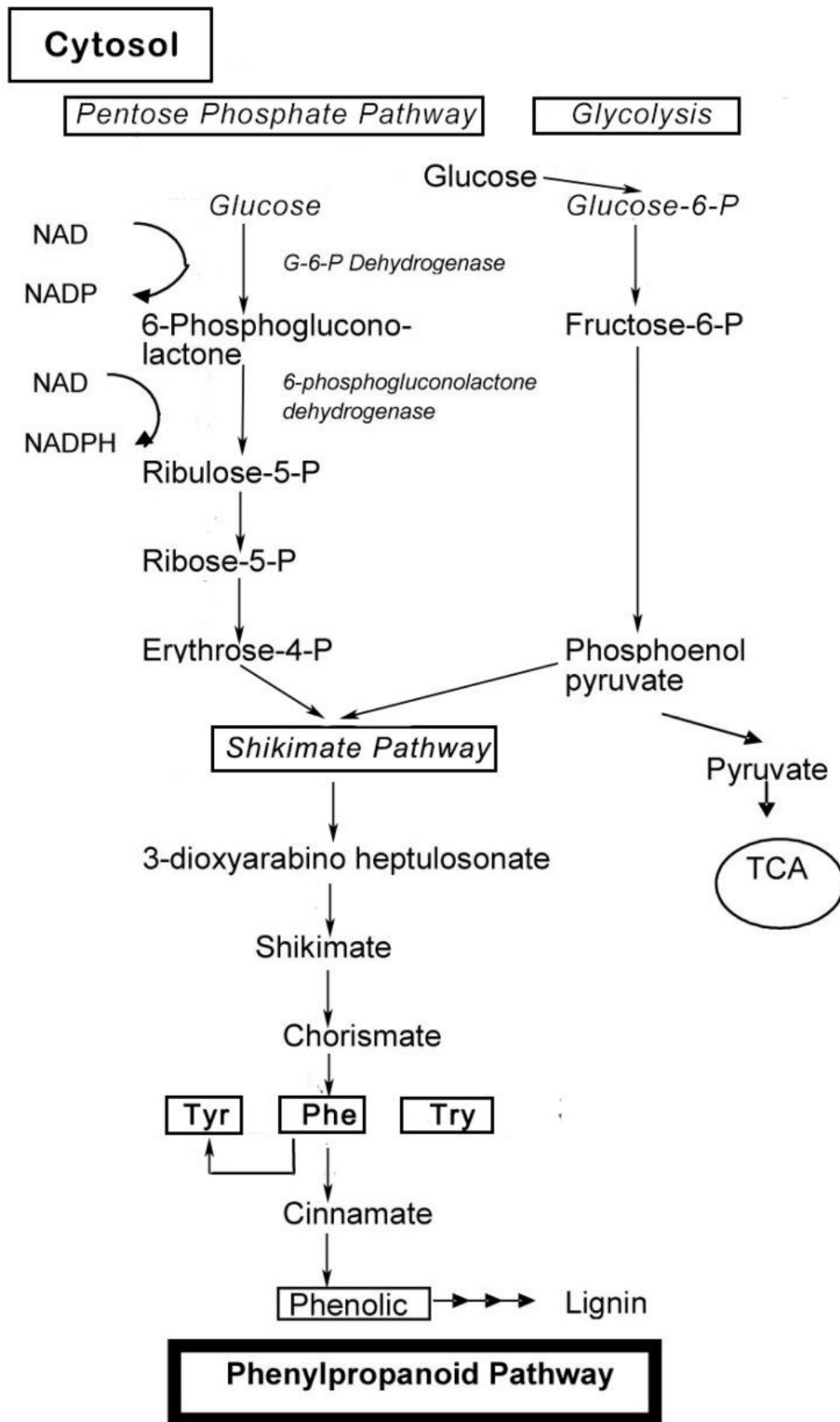
**Figura 5. Estructura genérica de un flavonoide**

FUENTE: Balasundram *et al.* (2005)

En las plantas, los compuestos fenólicos son metabolizados a partir del aminoácido L-fenilalanina (Figura 6) y, en algunos otros casos, de la L-tirosina. Tomando como génesis a estos compuestos, se sintetizan los ácidos hidroxicinámicos, los considerados ácidos de mayor distribución en los tejidos vegetales y encontrados esterificados con los ácidos quínico, shikímico y tartárico (Craft *et al.*, 2012).

Algunos estudios avalan la alta presencia de polifenoles en plantas. Gawlik-Dziki *et al.*, (2013) destacan en hojas de quinua (*Chenopodium quinoa*), compuestos como el ácido gálico (162.85 µg/g bs) y el ácido ferúlico 762.29 (µg/g bs). A su vez, Coaquira *et al.* (2017) cuantificaron los compuestos fenólicos en hojas de quinua en más de 2800 mg de AGE/100 g bh, resaltando que este valor supera a las hojas de espinaca, remolacha y quihuilla. En *Chenopodium murale*, se encontró contenidos de fenólicos totales más altos (3160 mg de AGE/100 g bh) (Ghareib *et al.*, 2010).





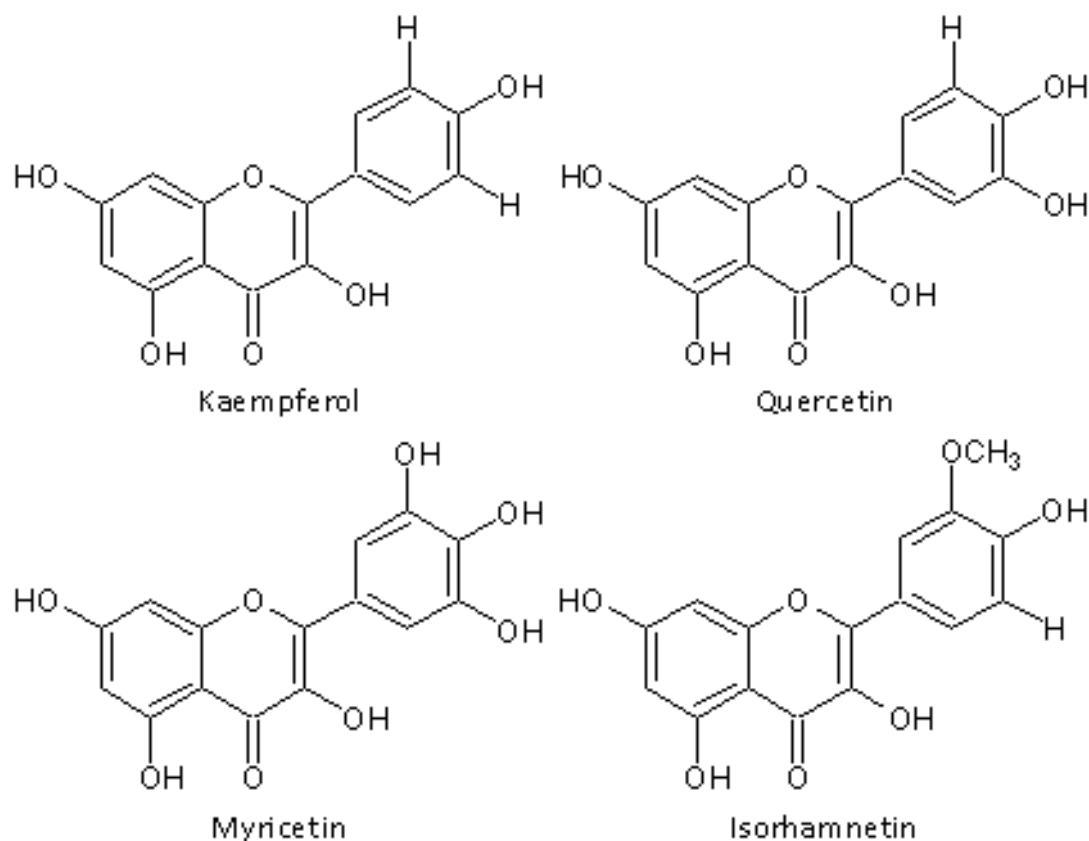
**Figura 6. Biosíntesis de compuestos fenólicos en las vías fosfato de pentosa, shikimato y fenilpropanoide en plantas**

FUENTE: Lin *et al.* (2016)

Respecto a los beneficios que presentan los compuestos fenólicos, Mercado (2013), resalta sus efectos tanto antioxidante, como antiinflamatorio y antihiper glucémico; mientras que Ferrazzano *et al.* (2011), insinúan que los flavonoides cuentan con un potencial anticariogénico. Nascimento *et al.* (2006), explican que el efecto sinérgico entre flavonoides y terpenoides de *C. ambrosioides*, es el responsable de su potente actividad antitumoral. Por su parte, Lin *et al.* (2016), refieren que los alimentos con un alto contenido de compuestos antioxidantes, reducirían la incidencia de ciertas enfermedades crónicas, como diabetes y enfermedades cardiovasculares, a través del manejo del estrés oxidativo. En un ejemplo más específico, Podolak *et al.* (2016), explican que el extracto de *Chenopodium hybridum* podría ser un agente de soporte potencial en la terapia del cáncer de próstata, debido a la presencia de polifenoles como la rutina, el kaempferol rutinósido y el hidroxibenzoico. De otro lado, es importante mencionar la conclusión de Nöthlings *et al.* (2007), quienes señalan que algunos flavonoides (kaempferol, quercitina y miricetina, los cuales se observan en la Figura 7), proporcionan un efecto preventivo contra el cáncer de páncreas; además, el kaempferol (flavonol) tiene efecto antirreabsortivo (reduce osteoporosis) (Arisawa *et al.*, 1971; citado por Almeida, 2013). A las hojas de *Chenopodium murale* (Ghareib *et al.*, 2010), también se les atribuye un importante beneficio: estimulador de la germinación en el crecimiento del tomate.

Sobre el efecto en la salud de los ácidos fenólicos, Peñarrieta *et al.* (2015), mencionan que algunos ácidos hidroxibenzoicos (ácido vainílico), presentan un efecto protector en el hígado. Cartea *et al.* (2011), añaden que los ácidos hidroxicinámicos son abundantes en las plantas y se utilizan como mecanismo de defensa, pudiendo ocurrir libremente o como componentes de polímeros vegetales; por su parte, Peñarrieta *et al.* (2015), destacan su actividad antigenotóxica celular.

Kokanova-Nedialkova *et al.*, (2009), hacen mención que la especie *Dysphania ambrosioides* tiene un mayor contenido de flavonoles con respecto a todos sus otros compuestos fenólicos. Sus flavonoles más notables son la quercitina, el kaempferol y la mirecitina; siendo las quercitinas glicosidadas predominantes en las hojas de varios vegetales. A su vez, agregan Lima *et al.* (2011) y Zohra *et al.* (2018) la presencia de kaempferol, isorhamnetin, miricetina y quercetina en *C. ambrosioides* L.



**Figura 7. Estructura de los principales compuestos fenólicos de la familia de los flavonoles**

FUENTE: Han *et al.* (2007)

### 2.3.2. TERPENOS

Los terpenos (también conocidos como terpenoides o isoprenoides) constituyen en las plantas un conjunto de metabolitos químicamente diversos y naturales asociados con el desarrollo de la fisiología, así como de las interacciones planta-herbívoro y planta-ambiente (mutualistas y antagónicas) (Mewalal, 2017). En base a estas moléculas, se establecen muchos productos interesantes que son ampliamente aplicados en el sector industrial como aromas, fragancias, especias y cosméticos (Singh y Sharma, 2015).

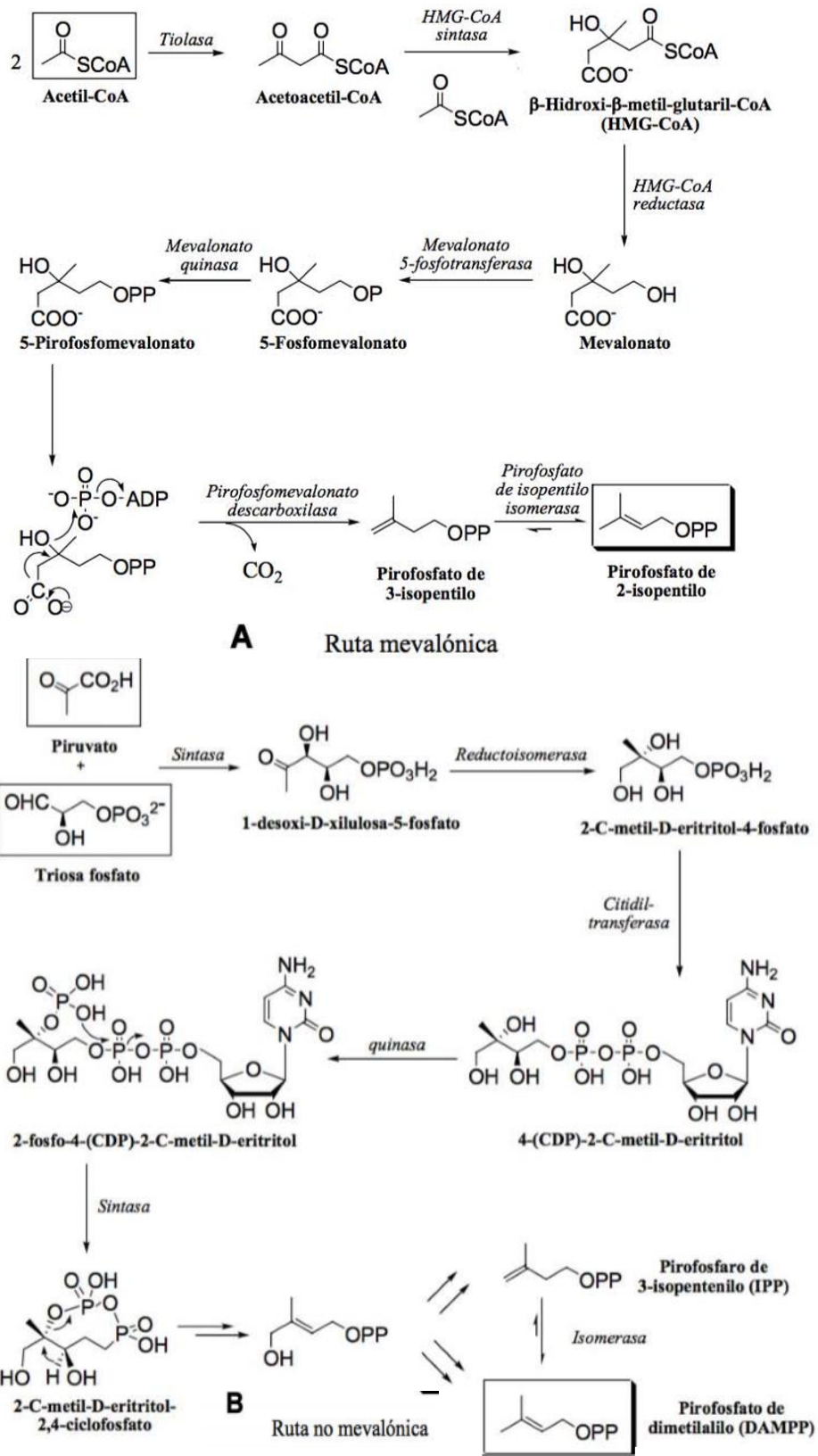
Porter *et al.* (1961), mencionan que, entre los terpenos más simples, se encuentran los monoterpenos, los compuestos con 10 átomos de carbono constituidos por dos unidades de isopreno y los sesquiterpenos que son compuestos con 15 unidades de carbono constituidos por tres unidades de isopreno. Valencia (1995), citado por Chacón (2003), indica que tanto los monoterpenos, como los sesquiterpenos pueden ser hidrocarbonados (terpenos

verdaderos) u oxigenados (terpenoides), estos últimos presentan grupos carboxilos, hidroxilos, carbonilos, función ester, cetona, etc. Asimismo, Mewalal, (2017), indica que estos compuestos se forman a partir del isopentenil difosfato (IPP) (y su isómero) y dimetilalil difosfato (DMAPP) a través de dos vías compartimentadas: el ácido mevalónico y la vía plastidial metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Figura 8).

Los terpenos se acumulan en las hojas de las plantas en respuesta a los ataques de microorganismos y de condiciones ambientales (radiación solar). En algunas especies de plantas, aquella función protectora lo realizan los diterpenos y sesquiterpenos (defensa directa). El mecanismo de defensa indirecta de las plantas, se da al liberar los terpenos al ambiente para atraer a los carnívoros defendiéndose, de esa manera, de los herbívoros (Posada, 2016).

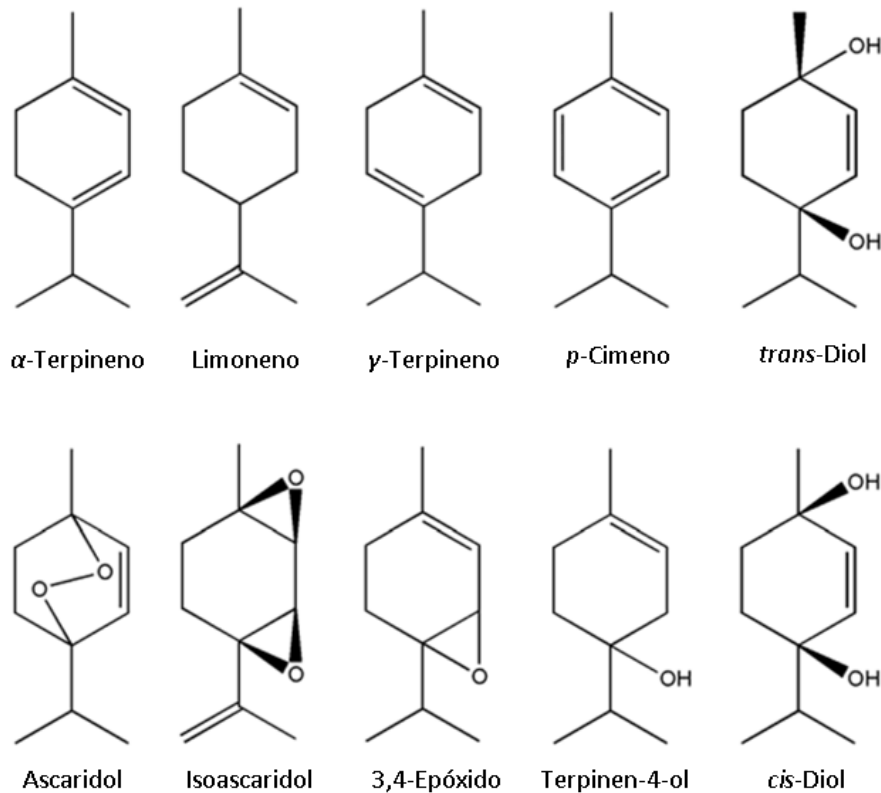
Respecto a sus propiedades, Kiyama (2017) y Ramos-Hryb *et al.* (2018), han mencionado que los terpenos son beneficiosos para la salud debido a sus efectos neuroprotectores, antiinflamatorios, anticancerígenos, antiviral y antimicrobiana. Se agrega que la actividad neuroprotectora, es también nombrada por Cho *et al.* (2017), ejemplificado en enfermedades como el *Alzheimer* (estudios *in vivo* e *in vitro*). Se ha sugerido que el borneol y el isoborneol son posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con el estrés oxidativo. Ortega-Ramírez *et al.* (2014), informan que algunos componentes de los aceites esenciales como el carvacrol y el p-cimeno (Figura 9), producen un efecto antimicrobiano contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus*.

En las hojas de paico de origen peruano, León (2009), menciona que los terpenos más abundantes son cineol, *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, cis-anetol, carvona, timol, y el ascaridol. Agrega Gómez (2008), que el ascaridol es el terpeno mayoritario en diversos estudios en paico, aunque su porcentaje es muy variable al igual que el del  $\alpha$ -terpineno. Esto se debe a que el último es el precursor del primero (producto de la oxidación del  $\alpha$ -terpineno).



**Figura 8. Rutas de biosíntesis para la formación de los terpenos. A: Ruta mevalónica. B: Ruta no mevalónica.**

FUENTE: Posada (2016)



**Figura 9. Estructura de los principales terpenos en hojas de paico**

FUENTE: Johnson y Croteau (1984) citados por Gómez (2008)

### 2.3.3. ÁCIDOS GRASOS

Velásquez (2006), menciona que los ácidos grasos son cadenas de carbonos de varias longitudes, que tienen en uno de los extremos un grupo carboxilo (ácido orgánico-COOH), y en el otro un metilo (-CH<sub>3</sub>), clasificándose como ácidos grasos saturados e insaturados. A su vez Ros *et al.* (2011), agregan que los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22 (siempre par).

Sobre su clasificación, los ácidos grasos saturados son una cadena lineal de átomos de carbono unidos por enlaces sencillos y sin dobles enlaces (Velásquez, 2006). Por otro lado, los ácidos grasos insaturados, contienen dobles enlaces entre sus átomos de carbono (C=C). Dentro de este grupo, se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), los cuales son componentes dietarios participativos en múltiples procesos fisiológicos. Dentro de los AGPICL, se encuentran dos grupos principales: los ácidos grasos

omega-3 ( $\omega$ -3) y omega-6 ( $\omega$ -6), los cuales son denominados ácidos grasos esenciales (AGE) para el ser humano, debido a la carencia enzimática para biosintetizarlos (Valenzuela *et al.*, 2011; Das, 2006). Por su alto grado de poliinsaturación, estos ácidos grasos aportan gran fluidez a las membranas, la cual es sustancial para que las proteínas de la membrana (canales iónicos, receptores, uniones comunicantes, receptores catalíticos, enzimas, estructuras formadoras de vesículas, etc.) puedan tener el movimiento que requieren sus funciones, ya sea en la superficie de las membranas o en el interior de la bicapa lipídica (Valenzuela y Nieto, 2003).

En la Figura 10 (a), se observa el esquema simplificado de reacciones de síntesis de ácidos grasos. En las plantas, la síntesis de ácidos grasos inicia con la desaturación en presencia de la enzima esteroil plastidial-ACP (*Acil Carrier Protein*). En la siguiente fase (elongación), tiene participación la tioesterasa de acil-ACP hasta la terminación, en donde los ácidos grasos libres se conectan con ésteres de CoA (Coenzima A) y, finalmente, forman, glicerolípidos (Thelen y Ohlrogge, 2002). Por otro lado, se aprecia en la Figura 10 (b), el proceso de modificación de ácidos grasos en plantas y su ensamblaje en triacilglicerol. Terminada la activación del acetil CoA, los ácidos grasos formados se pueden esterificar directamente al glicerol 3-fosfato para producir ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, diacilglicerol y triacilglicerol. Sin embargo, en la mayoría de plantas, el flujo principal de cadenas de acilo implica el movimiento a través de los grupos de fosfatidil colina donde se producen modificaciones, como la desaturación adicional y la hidroxilación (Thelen y Ohlrogge, 2002).

Respecto de los beneficios que representan, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) están relacionados con un mejor desarrollo cerebral (mayor fluidez en las membranas) fetal y cognoscitivo del recién nacido (Valenzuela y Nieto, 2003). Además, pueden reducir la concentración de triglicéridos en la sangre por medio de la oxidación de ácidos grasos por diversos mecanismos (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005) y controlar ciertas enfermedades como la diabetes mellitus y la obesidad, activando al PPARA (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha*) para estimular la oxidación de lípidos y disminuir la resistencia a la insulina (Thelen y Ohlrogge, 2002). Los AGPI pueden servir como agentes citotóxicos para ciertas células tumorales debido a su efecto antiinflamatorio, además de presentar efectos en la prevención de enfermedades cardiovasculares según lo explicado por Rodríguez-Cruz *et al.* (2005).

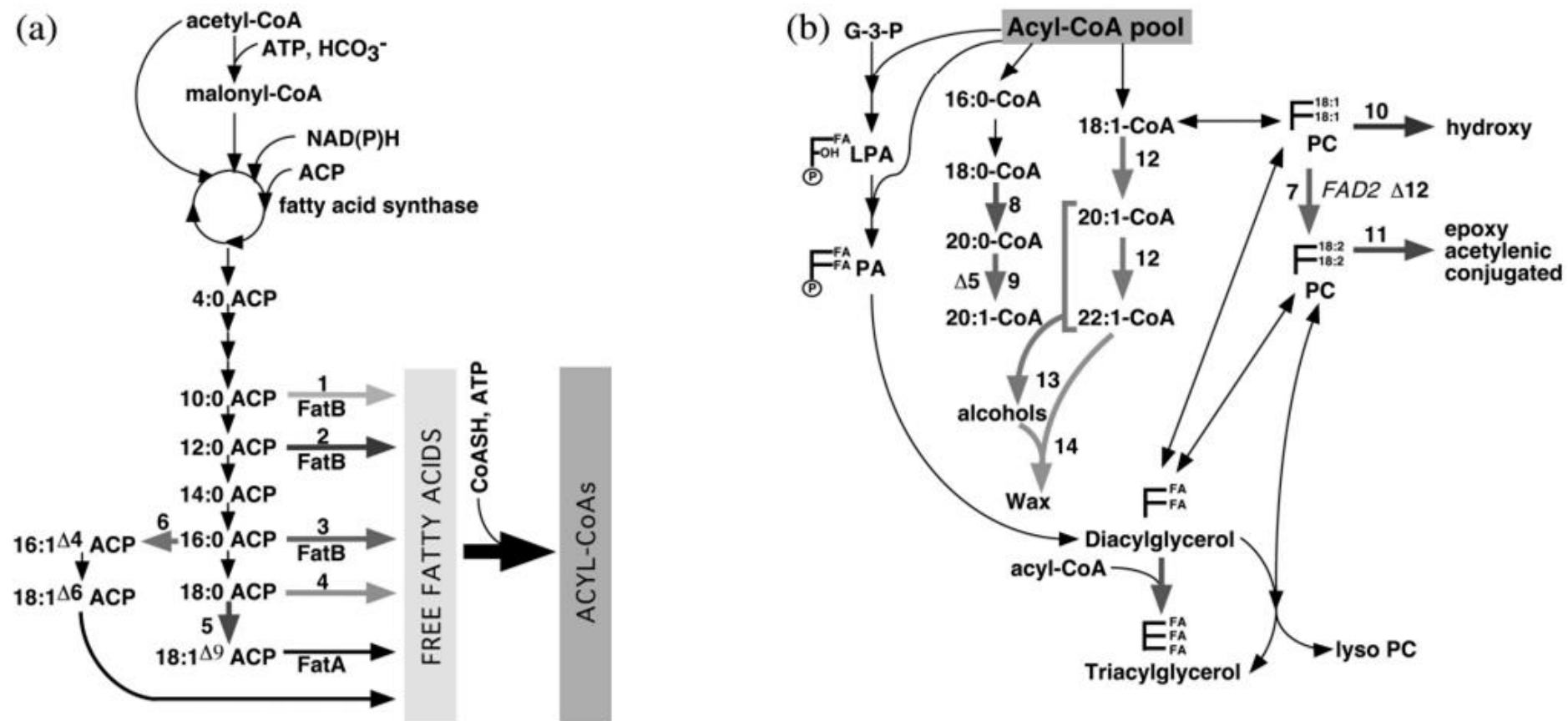


Figura 10. Ruta biosintética de los ácidos grasos y triglicéridos en plantas. (a) Esquema de reacciones de síntesis de ácidos grasos.

(b) Reacciones para la modificación de ácidos grasos en plantas y su ensamblaje en triacilglicéridos

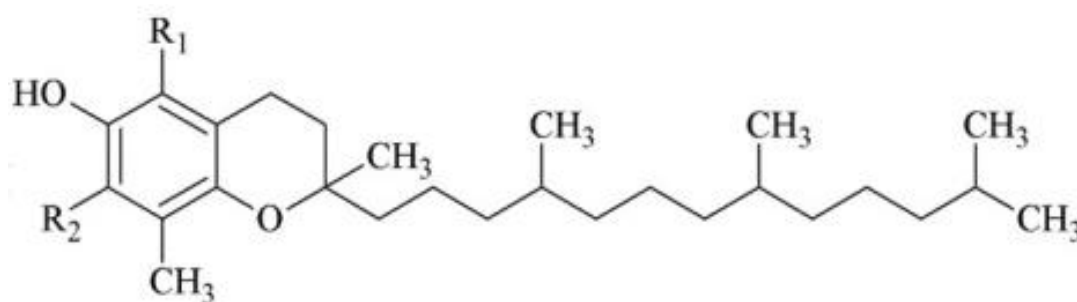
FUENTE: Thelen y Ohlrogge (2002)



Sobre la presencia del metabolito en mención dentro de especies relacionadas al paico, Guil y Rodríguez (1999), revelaron la presencia de distintos ácidos grasos en las hojas de diversas plantas silvestres comestibles (*Amaranthus viridis* L., *Chenopodium album* L., *Crithmum maritimum* L., *Plantago major* L., *Portulaca oleracea* L. y *Verbena officinalis* L). Se demostró que los ácidos grasos principales en dichas especies fueron el  $\omega$ -3 (alta concentración),  $\omega$ -6 y el palmítico. No obstante, Prakash *et al.* (1993), en un estudio sobre 11 distintas semillas del género *Chenopodium*, encontraron, a diferencia de Guil y Rodríguez (1999), un alto contenido de ácidos oleico.

### 2.3.4. TOCOFEROLES

Yang *et al.* (2011), mencionan que los tocoferoles comprenden la clase de vitamina E de los antioxidantes solubles en lípidos. Estas moléculas están compuestas por un grupo de cabeza de cromanol polar derivado de la vía shikimato, unida a una cola de hidrocarburo que proviene del isoprenoide. Dentro del grupo de vitamina E, existen cuatro formas en las plantas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . Dichas formas difieren en la cantidad y la posición de los residuos de metilo ubicado en la cabeza de cromanol (Figura 11).



Tocopherol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
$\alpha$ -	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -	CH <sub>3</sub>	H
$\gamma$ -	H	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -	H	H

**Figura 11. Diferencias estructurales en los tocoferoles**

FUENTE: Engelking (2016)

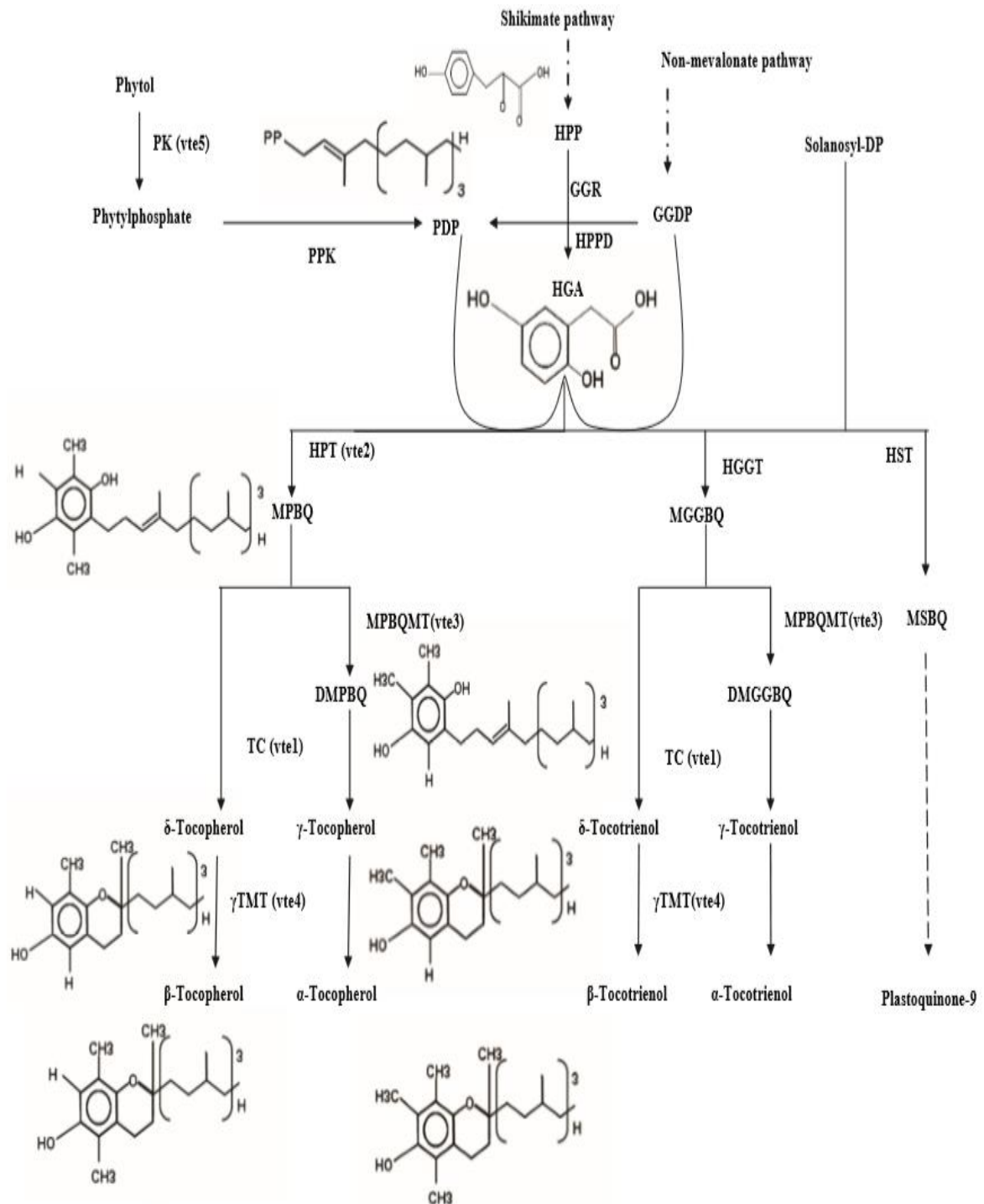
Los tocoferoles se pueden encontrar en semillas, frutas, raíces, tubérculos y, generalmente, siempre presentes en las partes verdes de las plantas superiores. El contenido y la composición de los tocoferoles varían ampliamente de acuerdo a la parte de la planta: la forma más abundante en las hojas es el  $\alpha$ -tocoferol, mientras que la estructura dominante en las semillas, es el  $\gamma$ -tocoferol (Fritsche *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2011).

La ruta biosintética de los tocoferoles puede observarse en la Figura 12. Abbasi (2007), explica que la molécula p-hidroxifenilpiruvato es convertido a homogentisato por medio de la enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (ruta shikimato). Mientras que el difosfato de geranil se une al mencionado homogentisato. Ambas rutas llegan a la formación del intermediario 2,3-dimetil-6-fetil-1, 4-benzoquinona (MPBQ), por la enzima transferasa. Consecutivamente, la MPBQ reaccionará hasta  $\beta$ -tocoferol o a 2,3-dimetil-6-fetil-1, 4-benzoquinona (DMPBQ) por la enzima tocoferol ciclasa, para llegar hasta  $\gamma$ -tocoferol. La primera metilación del  $\beta$ -tocoferol desencadena en  $\delta$ -tocoferol; mientras que de la segunda metilación de  $\gamma$ -tocoferol, se obtiene  $\alpha$ -tocoferol. Ambas reacciones por la enzima metiltransferasa.

La vitamina E actúa como un antioxidante que atrapa los radicales libres en las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas al reaccionar con los radicales libres de peróxido lipídico formados por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. El producto de oxidación final se conjuga en el hígado con un glucurónido y se excreta en la bilis (Engelking, 2016; Azzi, 2018). Su efectividad como antioxidante depende no solo de su reactividad contra los radicales nocivos, sino también de la naturaleza de su radical debido a la reubicación del electrón no apareado en el anillo de cromanol (Kagan *et al.*, 2003; citado por Barros, 2013). A su vez, Jukić *et al.* (2016), mencionan que la mayor actividad de la vitamina E es la del  $\alpha$ -tocoferol.

Entre los beneficios más importantes, la vitamina E ha demostrado su eficacia como un compuesto antiinflamatorio y estimulante inmunológico. También ha demostrado cierta eficacia en la protección contra la hepatoesteatosis no alcohólica. A nivel molecular, los tocoferoles y algunos de sus metabolitos han demostrado capacidad para regular la señalización celular y modular la transcripción de genes (Azzi, 2018). La Sociedad Alemana de Nutrición, establece que la cantidad diaria recomendada de vitamina E para un adulto

entre 25 y 51 años es de 14 mg/día (Fritsche *et al.*, 2017) y que la cantidad de grasa de la matriz alimentaria es un factor importante en su absorción (Lodge *et al.*, 2004).



**Figura 12. Biosíntesis de tocoferoles**

FUENTE: Abbasi (2007)

Entre los beneficios más importantes, la vitamina E ha demostrado su eficacia como un compuesto antiinflamatorio y estimulante inmunológico. También ha demostrado cierta eficacia en la protección contra la hepatoesteatosis no alcohólica. A nivel molecular, los tocoferoles y algunos de sus metabolitos han demostrado capacidad para regular la señalización celular y modular la transcripción de genes (Azzi, 2018). La Sociedad Alemana de Nutrición, establece que la cantidad diaria recomendada de vitamina E para un adulto entre 25 y 51 años es de 14 mg/día (Fritsche *et al.*, 2017) y que la cantidad de grasa de la matriz alimentaria es un factor importante en su absorción (Lodge *et al.*, 2004).

Haciendo comparación entre el paico y algunas hojas de otras plantas, se hará mención del contenido de tocoferoles reportado por algunos autores. Las hojas de repollo, lechuga, espinaca y papas reportaron valores de 17, 7.5, 30 y 70  $\mu\text{g/g}$  bs, resaltando que el  $\alpha$ -tocoferol se encuentra en un porcentaje de por lo menos el 95 por ciento, acompañado únicamente del  $\gamma$ -tocoferol con el porcentaje restante (Abbasi, 2007). Por otro lado, Ching y Mohamed (2001), mencionan que el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en las hojas de algunas especies de la familia Amaranthaceae como *Amaranthus spinosus* y *Amaranthus gangeticus* (relacionados estrechamente a las hojas de paico) se encuentra entre 1.75 y 2.66 mg/ 100 g bs.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT), área de Biotecnología Industrial y Bioprocesos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

Se utilizó un cultivo de hojas de paico proveniente de San Juan de Lurigancho-Lima, Departamento de Lima, colectada en el mes de agosto del 2018. Los arbustos de paico fueron identificados en el Herbario Augusto Weberbauer de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

#### **3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

##### **3.3.1 EQUIPOS**

- Agitador magnético (CAT, modelo M6, Alemania)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2140, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS, modelo Scout, China)
- Baño maría (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand, modelo ME2C, Germany)
- Centrífuga (Hettich, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Congeladora (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Centrífuga refrigerada (Hettich, modelo Mikro 220R, Alemania)
- Cromatógrafo de gases (Shimadzu, modelo GC-2010, Japón) con detector FID
- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Waters, modelo 2695, USA) con detector de arreglo de diodos (DAD) (Waters, modelo 2996, USA), detector de índice

- de refracción (Waters, modelo 2414, USA) y detector de fluorescencia (Waters, modelo 2475, USA)
- Espectrofotómetro (ThermoSpectronic, modelo Genesys 20 UV, USA)
  - Espectrómetro de masas, Cromatógrafo líquido de ultra performance (UHPLC) (Thermo Scientific, modelo UltiMate 3000, Alemania) acoplado a detector MS/MS (Thermo Scientific, modelo TSQ Quantum Access MAX, USA).
  - Espectrómetro de masas, Cromatógrafo de gases (TRACE 1310, Thermo Scientific, Italia) acoplado a detector MS/MS (TSQ 8000 Evo, Thermo Scientific, USA)
  - Equipo para purificación de agua MilliQ (Millipore, USA)
  - Estufa (Venticell, Modelo MMM MedcenterEinrichtungenGmbtl, Alemania)
  - Estufa a vacío (VWR, modelo 1400E-2, USA)
  - Evaporador centrífugo (Labconco, modelo Centrivap, USA)
  - Microcentrífuga (Hettich, modelo Rotina 420, Alemania)
  - Molino de laboratorio (IKA, modelo A11 basic, Alemania)
  - Lector de microplacas de fluorescencia (BioTek, modelo Synergy 2, USA)
  - Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea)
  - Rotavapor (Heidolph, modelo Laborotta 4000, Alemania)
  - Selladora de bolsas (Machintek, modelo KF-300H, USA)
  - Sistema de condensación para aceites esenciales (Tecsovidrio, Normax, Perú) con balón de 2 L (Tecsovidrio, Pyrex, Perú)
  - Sistema de extracción en fase sólida (Visiprep, modelo 57030-U, USA)
  - Ultracongelador (IlShin, modelo DF8517, Corea)
  - Vórtex (CAT, modelo VM2, Alemania)

### **3.3.2. MATERIALES**

- Cartuchos Sep-PakVac C18 (Waters, USA).
- Filtros Durapore 0.22 µm (Millipore, Brasil).
- Material de plástico: tubos para centrífuga, puntas para micropipeta y lo suficiente para los diversos ensayos.
- Material de vidrio: Probetas, pipetas graduadas, tubos de ensayo, frascos color ámbar, peras de decantación, matraz Erlenmeyer, etc.
- Micropipetas de 20-200 µL, 100-1000 µL y 500-5000 µL (Brand, Alemania).

### 3.3.3. REACTIVOS

- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) (Sigma-Aldrich, USA)
- ABTS (Acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico)) (Sigma-Aldrich, USA)
- Acetona (J.T. Baker, USA)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker, México)
- Alcohol etílico (J.T. Baker, USA)
- BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) (Sigma-Aldrich, USA)
- Carbonato de sodio (Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio (Merck, Alemania)
- Estándar methyl undecanoate U250 (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar de kaempferol K0133 (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar de quercitin Q4951 (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar de luteolin 72511 (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar de p-coumaric C9008 (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar p-cymene 30039 (Sigma-Aldrich, USA)
- Éter de petróleo (Sigma-Aldrich, USA)
- Folin- Ciocalteu 2 N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio diácido (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monoácido (Merck, Alemania)
- Fluoresceína, sal sódica (Sigma-Aldrich, USA)
- Hidróxido de potasio (Mallinckrodt, Suecia)
- Kit estándar FAMES 49453 (Supelco, USA)
- Kit Organic Acids 47264 (Sigma-Aldrich, USA)
- Kit estándar (Terpene Mix 1 DRE-GA09000272 y Terpene Mix 2 DRE-GA09000273) de terpenos (LGC, Alemania)
- Kit Tocopherol 00020329-001 (Sigma-Aldrich, USA)
- Metanol (grado HPLC J.T. Baker, Trinidad y Tobago)
- n-Hexano (grado HPLC J.T. Baker, USA)
- Sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Persulfato de potasio (Merck, Alemania)
- Trólox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich, USA)

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

La humedad se determinó por medio de secado en estufa a una presión de vacío 25 pulg Hg y a una temperatura de 95-100 °C, hasta obtener peso constante, según lo recomendado por el Método 934.01 (AOAC, 2016). Los resultados se expresaron en porcentaje y por diferencia de pesos se calculó la materia seca (base seca).

#### **3.4.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

##### **a. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

Para esta etapa, se procedió a eliminar los componentes lipofílicos presentes en las hojas de paico tal y como lo recomiendan Ziaková *et al.* (2003). Los compuestos fenólicos fueron extraídos según el método propuesto por Barros *et al.* (2013). Se pesó 1 gramo de paico (seco y molido) y se mezcló con 20 mL de n-hexano en agitación durante 1 hora. Seguidamente, se centrifugó el extracto a 2700 g por 5 minutos y se separó el n-hexano. Sobre el sólido centrifugado, se agregó 40 mL de una solución compuesta por etanol: agua: ácido clorhídrico (79:20:1 v/v/v), con agitación a 400 RPM por 1.5 horas, a temperatura ambiente. La mezcla homogenizada fue centrifugada a 2700 g por 10 minutos y luego se recuperó el sobrenadante (extracto hidrofílico) en un frasco ámbar para su posterior análisis, almacenándose con nitrógeno gaseoso y congelándose a -20 °C.

##### **b. CUANTIFICACIÓN**

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, propuesto por Singleton y Rossi (1965). Los compuestos fenólicos fueron determinados por reacción colorimétrica de 500 µL de extracto de hojas de paico con 250 µL el reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y 1250 µL de solución de carbonato de sodio 1.2 N. Se midió la absorbancia de la reacción a 755 nm luego de un reposo de 30 minutos en oscuridad. Se utilizó un blanco de agua destilada y el análisis se realizó por triplicado. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de muestra en base seca (mg AGE/g bs) tomando en cuenta una curva estándar con ácido gálico.



### 3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIANTE HIDROFÍLICA

Se determinó la capacidad antioxidante por los siguientes métodos:

#### a. MÉTODO TEAC

La capacidad antioxidante se determinó según el método descrito por Arnao *et al.* (2001). Se pesó 1 gramo de paico seco y molido, se desgrasó con 20 mL de n-hexano durante 1 hora, se centrifugó por 5 minutos a 2700 g. Sobre el sólido centrifugado, se agregó 40 mL de una solución de etanol: agua (80:20 v/v), con agitación a 400 RPM por 1.5 horas a temperatura ambiente. La mezcla homogenizada fue centrifugada nuevamente a 2700 g por 10 minutos, luego el sobrenadante (extracto hidrofílico) fue recuperado en un frasco ámbar para su posterior análisis, almacenándose con nitrógeno gaseoso y congelándose a -20 °C.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante, se hizo reaccionar 150  $\mu$ L de muestra (extracto hidrofílico) con 2850  $\mu$ L de la solución diluida de ABTS. Un blanco fue preparado con 150  $\mu$ L de etanol: agua (80:20 v/v). La mezcla se agitó y se dejó reaccionar por 60 minutos (tiempo óptimo de reacción para la muestra). Al concluir este tiempo, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm tanto de la muestra como del blanco. La capacidad antioxidante por el método TEAC fue estimada a partir de las absorbancias del blanco y de las muestras que fueron reemplazadas en curvas estándar de Trólox. El análisis se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol de Trólox equivalente por gramo en base seca ( $\mu$ mol TE/g bs).

#### b. MÉTODO ORAC

Se utilizó la fracción hidroalcohólica (también denominada hidrofílica) especificada y usada en el punto 3.4.2.a.

Para los análisis ORAC, se utilizó los procedimientos descritos por Ou *et al.* (2001) y Huang *et al.* (2005). Los ensayos de capacidad antioxidante se realizaron en una placa lectora de fluorescencia Synergy 2 Biotek. EL reactivo AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride), es el compuesto azo hidrosoluble empleado como generador de radicales

peroxilo. Se empleó como solución estándar al Trólox, además de la solución de fluoresceína.

Se procedió a trabajar con 25  $\mu$ L del blanco (buffer fosfato) o las muestras (diluidas) incubadas durante 10 minutos a 37 °C con 250  $\mu$ L de fluoresceína (55 nM) hasta la inyección de 25  $\mu$ L de solución de AAPH (153 nM). La fluorescencia fue medida a cada minuto durante un período de 50 minutos. Los filtros de fluorescencia fueron empleados a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 520 nm. Los valores de la capacidad antioxidante final fueron calculados usando el área que se observó bajo la declinación de las curvas y fueron expresados como  $\mu$ mol de Trólox equivalente por gramo de hojas en base seca ( $\mu$ mol TE/g bs). El análisis se realizó por triplicado.

### **3.4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

#### **a. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

Se utilizó la fracción hidroalcohólica (también denominada hidrofílica) especificada y usada en el acápite 3.4.2.a. Dicha fracción fue sometida a un proceso de extracción en fase sólida con el fin de separar los componentes no fenólicos. Cinco mL de la fracción hidroalcohólica fueron concentrados en rotavapor hasta obtener 1 mL de extracto (es decir, quedando sólo la fase acuosa). Se utilizó 500  $\mu$ L de extracto concentrado para la separación en cartuchos Sep-PakVac C18 de 6 mL de capacidad. Se empleó metanol grado LC-MS como solvente de arrastre de los compuestos fenólicos y agua MilliQ como solvente de elución. La primera elución fue con agua, la cual arrastró los componentes no fenólicos y se recogieron en un tubo de 15 mL de capacidad. Para separar los compuestos fenólicos del cartucho, se empleó metanol grado LC-MS, denominándosele a este producto extracto purificado. Este último extracto fue empleado para los análisis de identificación por espectrometría de masa (LC-qToF/MS-MS) así como para la cuantificación de los mismos empleando el análisis de UPLC®-PDA, utilizando para este último, los estándares de las agliconas del compuesto fenólico identificado previamente por espectrometría de masa.

## **b. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-qToF/MS-MS**

El extracto metanólico purificado y concentrado hasta aproximadamente 100 ppm de AGE/mL (p/v) fue utilizado para el análisis.

Para la identificación, se utilizó la metodología citada por Koley *et al.* (2017), la cual se desarrolló en modo negativo. El análisis se realizó en un Cromatógrafo Líquido Ultra Performance (UPLC®), acoplado a un qToF/MS-MS. El equipo fue operado con ionización por electrospray (ESI). Los parámetros fuente se establecieron de la siguiente manera: capilar 3kV, cono de muestreo 30V, cono de extracción 5V, temperatura de la fuente 120 °C, temperatura de desolvatación 300 ° C, flujo de gas de desolvatación 500 L/h y flujo de gas de cono 20 L/h. El spray de bloqueo y la referencia de leucina encefalina ( $m/z$  554.2670 en polaridad negativa) se utilizó para la corrección de masa con un caudal de 5  $\mu$ L/minuto a la concentración de 0.2  $\mu$ g/mL en un intervalo de 20 s. A 30°C, la separación cromatográfica se realizó en una columna Acquity UPLC® BEH C18 (Waters Corp, USA) (1.7  $\mu$ m, 100 mm x 2.1 mm ID). La fase móvil consistió en A: agua y B: acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 por ciento en ambos casos. Se usó un programa de gradiente con un caudal de 0.4 mL/min, con 0-0.5 min/90 por ciento de A, 4.5 min/50 por ciento de A, 4.5-8 min/50-2 por ciento de A, 8-11 min/2 por ciento de A, 11-11.5min / 2-90 por ciento de A, 12-15 min/90 por ciento de A. Con los datos obtenidos del espectrómetro, la identificación se apoyó del uso de la base de datos de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **c. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC®-PDA**

Se empleó el método reportado por Chirinos *et al.* (2008) adaptado para UPLC®. Los compuestos fenólicos se separaron en una columna Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> (Waters, USA) (1.7  $\mu$ m, 100 mm x 2.1 mm ID) con precolumna VanGuard BEH C<sub>18</sub> (Waters, USA) (1.7  $\mu$ m, 5 mm x 2.1 mm ID) a 30 °C. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L, la velocidad de flujo fue 0.2 mL/min y las eluciones fueron monitoreadas en un rango de longitud de onda de 200 a 700 nm. En el proceso de separación se aplicó un programa de elución en gradiente lineal con una fase móvil que contiene agua (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B): 98 por ciento de A durante dos minutos, luego disminuido paulatinamente a 93 por ciento al minuto 4, 88 por ciento al minuto 15, 74 por ciento al minuto 20, 45 por ciento al minuto 25 y 5 por

ciento al minuto 26, que fue continuado hasta el minuto 29. Los polifenoles detectados se identificaron comparando el tiempo de retención y los espectros de absorción (longitud de onda de máxima absorción) de los picos detectados en el extracto metanólico de paico con aquellos correspondientes a los estándares puros y a los obtenidos del análisis de la identificación del UPLC®-qToF/MS-MS. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante las curvas de calibración construidas con estándares puros (ácido *p*-cumárico, catequina, kaempferol y quercetina) y los resultados fueron expresados como mg por 100 g de muestra en base seca (bs).

### **3.4.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS POR GC-MS**

#### **a. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

Se extrajo el aceite esencial de las hojas de paico usando el método descrito por Zhu *et al.* (2012). Se utilizaron 120 gramos de paico seco sin moler (sólo triturado) que fue sometido a hidrodestilación con 1 L de agua utilizando un aparato de tipo Clevenger por 2 horas. Los líquidos condensados del proceso se separaron por medio de una pera de decantación, protegiéndolo de la luz. El aceite esencial fue tratado con sulfato de sodio anhidro con el fin de eliminar los restos de agua. Posteriormente, se vertió el contenido en un vial color ámbar y se congeló a -80 °C, hasta los respectivos análisis.

#### **b. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

Se utilizó la metodología citada por Zhu *et al.* (2012). El análisis se realizó por cromatografía de gases, donde los componentes del aceite esencial se identificaron en un espectrómetro de masas GC MS/MS. Se trabajó con una columna capilar TR-5MS (Termo Scientific, Australia) (0.5 µm, 30 m x 0.25 mm ID). El equipo trabajó bajo los siguientes parámetros: la temperatura inicial del horno se mantuvo a 60 °C durante 1 min y aumentó a 10 °C/min hasta 180 °C, donde se mantuvo durante 1 min. Luego se aumentó a 20 °C/min hasta 280 °C, permaneciendo durante 15 minutos. La temperatura del inyector se mantuvo a 270 °C. Las muestras (1µL) se inyectaron en modo Split 10. El gas portador fue helio a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Se escanearon espectros de 20 a 550 *m/z* a dos barridos/s. La temperatura de transferencia de línea fue de 250 °C, 70 eV. Los picos se identificaron mediante la base de datos NIST. Para la cuantificación, se hizo curvas de calibración con un

conjunto de estándares de terpenos (38 disponibles) y se procesaron mediante el programa Xcalibur (USA, 2012). Los resultados se expresaron en miligramos del terpeno por cada gramo de hojas de paico en base seca (mg/100 g bs).

### **3.4.6. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR GC-FID**

#### **a. EXTRACCIÓN Y METILACIÓN**

Se utilizó el método expuesto por Michotte (2009). Se inició con la etapa de metilación, por lo que se procedió a pesar en un tubo de 2 mL de solución de n-hexano con aceite de hojas de paico (obtenido previamente por extracción soxhlet con éter de petróleo por 6 horas a temperatura de aproximadamente 35 °C). A dicha solución, se le adicionó 10 mL de KOH 0.1M y el conjunto fue colocado en baño maría a 70 °C por una hora. Posteriormente, a la mezcla fría, se le adicionó 4 mL de una solución de HCl 1.2 N en MeOH, el conjunto se agitó y colocó en baño maría a 70 °C por 20 minutos.

La extracción se realizó adicionando 20 mL de n-hexano a los tubos fríos, así como 10 mL de agua MilliQ, y se agitó en un vortex por 1 minuto. Seguidamente, la mezcla se colocó en refrigeración a 4 °C durante una noche, luego de lo cual se observó la separación de dos fases. Se tomó 150 µL de la fase superior y se llevó a un volumen de 5 mL con n-hexano, adicionalmente a esta mezcla, se le agregó 0.5 mL del estándar interno C<sub>11</sub> (methyl undecanoato) a la concentración de 0.4 mg/mL. La muestra fue filtrada y colocada en un vial para el análisis en cromatógrafo de gases.

#### **b. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

El análisis de ácidos grasos, se realizó utilizando un cromatógrafo de gases GC 2010 marca Shimadzu con detector fotométrico de llama (FID) y como software se empleó el programa ZB-20-FAMES. El gas utilizado fue el hidrógeno que trabajó a una presión constante (200 kPa). La columna utilizada fue Zebron ZB-FAME (20 m x 0.18 mm x 0.15 µm). El gas portador que trabajó a presión constante fue helio a 1 mL/min. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: la inyección fue a split 100:1 a 250 °C, 1 µL. El detector FID se encontró a 260 °C. La temperatura inicial del horno fue de 80 °C por 1.5 min a 160 °C, luego

a 40 °C/min a 185 °C, sucesivamente a 5 °C/min a 260 °C hasta 30 °C/min. Los ácidos grasos de la muestra fueron identificados en función a los tiempos de retención, por comparación de estándares previamente inyectados. Los resultados fueron expresados como porcentaje de participación de cada ácido respecto al total (%).

### **3.4.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TOCOFEROLES POR HPLC**

Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Amaral *et al.* (2005). La identificación y cuantificación fue determinada por HPLC conectado a un detector de fluorescencia. Medio gramo (0.5 g) de hojas de paico secas y molidas se mezcló con 100 µL de solución de BHT (10 mg en 1 ml de n-hexano), 2 mL de etanol, 4 mL de n-hexano y 2 mL de solución saturada de NaCl. La mezcla se homogenizó por 1 minuto en un vórtex y posteriormente se centrifugó por 4 minutos a 4000 g y 4 °C. La fase superior se recolectó y la muestra fue re-extraída dos veces más con 4 mL de n-hexano. Los extractos fueron combinados y llevados a sequedad con nitrógeno gaseoso; y el residuo se reconstituyó con 2 mL de n-hexano. El extracto se secó con sulfato de sodio anhidro (0.5 g), se centrifugó a 4000 g por 20 minutos y el contenido se transfirió a un vial para el análisis HPLC. Dicha prueba fue realizada en una columna YMC-Pack Silica (3 µm x 250 x 4.6 mm). La fase móvil estuvo compuesta por n-hexano/2-propanol/ácido acético (1000/6/5, v/v/v) a un flujo de 1.4 mL/min bajo condiciones isocráticas. El detector de fluorescencia fue programado a 290 nm para la longitud de onda de excitación y 330 nm para la longitud de onda de emisión. Los tocoferoles fueron identificados y cuantificados por comparación del tiempo de retención con estándares ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol) previamente inyectados. Los resultados se expresaron en miligramos por 100 gramos en base seca ( $\mu\text{g/g}$  bs).

### **3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Se siguió el procedimiento, mostrado en la Figura 13, para el acondicionamiento de las hojas de paico frescas a hojas secas y molidas, las mismas que sirvieron como materia prima para la obtención de los diferentes extractos para la identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos detallados en el acápite 3.4. A continuación, se describen las operaciones seguidas.

**a. EXTRACCIÓN DE HOJAS**

Partiendo de los arbustos de paico, se procedió a separar las hojas realizando extracción manual entre el nudo de unión de las hojas a la rama del arbusto.

**b. SELECCIÓN Y LIMPIEZA**

La selección permitió trabajar con las hojas de paico que presentaron las mejores condiciones para la investigación, de tal modo que no tuviesen daños físicos ni microbiológicos. A las hojas seleccionadas, se les realizó limpieza superficial, la cual consistió en pasar una tela húmeda (trapo) sobre las hojas colocadas en mesas de acero inoxidable y, posteriormente, se secó dichas hojas con ayuda de una tela seca.

**c. SECADO**

El objetivo de esta operación fue evaporar el agua interna del tejido de las hojas de paico. Las hojas de paico fueron esparcidas en mesas de acero inoxidable protegidas de la radiación directa a temperatura ambiente por 7 días (secado 1) y posteriormente se secaron en estufa a 45 °C durante 6 horas (secado 2) hasta alcanzar la humedad del 7.9 por ciento.

**d. MOLIENDA**

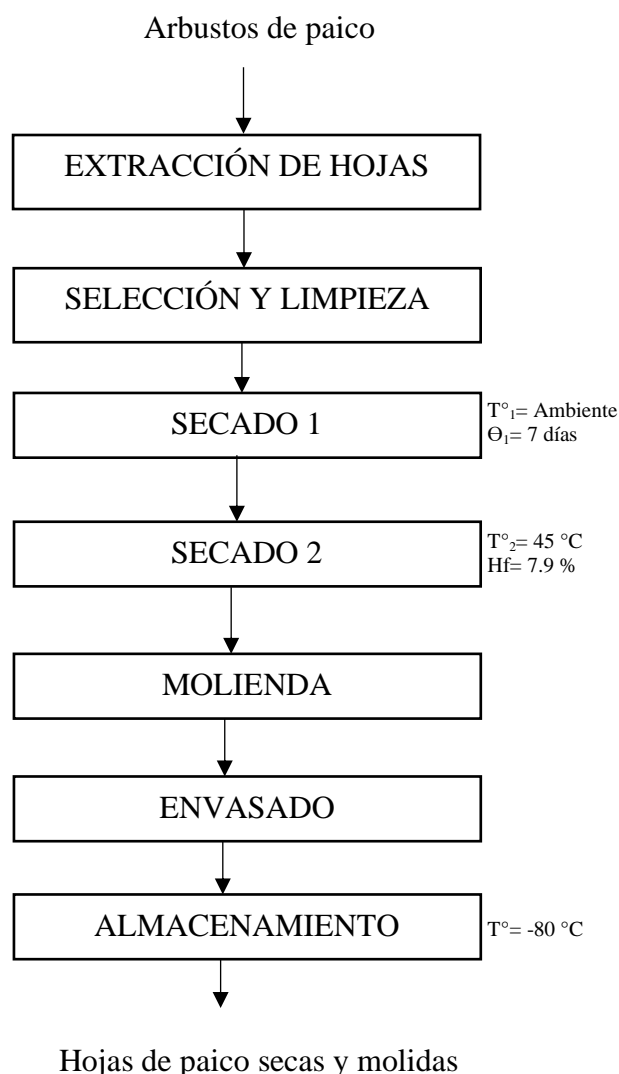
Una vez seca la muestra, se procedió a moler con un molino de laboratorio a fin de reducir el tamaño de partícula de las hojas secas hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .

**e. ENVASADO**

Se realizó en bolsas de polietileno de alta densidad con autocierre con el fin de proteger los compuestos bioactivos presentes en la materia prima, evitando al mínimo el oxígeno dentro del envase (se utilizaron 2 envases: primario y secundario). Dichos envases se sellaron (en la sección previa al autocierre) antes del almacenamiento.

## f. ALMACENAMIENTO

La muestra ya envasada se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta los respectivos análisis.



**Figura 13. Flujo de operaciones de acondicionamiento de arbustos de paico**

## 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis de compuestos bioactivos (cuantificación de ácidos grasos, compuestos fenólicos totales por espectrofotometría, compuestos fenólicos por cromatografía líquida, terpenos y tocoferoles) y capacidad antioxidante (ABTS y ORAC hidrofílicos) se realizaron con tres repeticiones provenientes de tres sub muestras diferentes. Se calculó el promedio aritmético y la desviación estándar del contenido.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PAICO**

#### **4.1.1. HUMEDAD**

La muestra fresca de hojas de paico obtuvo una humedad del 86.8 por ciento con una desviación estándar de 1.0 por ciento, experimentado en 3 repeticiones. La humedad característica de la muestra fresca sirve como referencia del estado inicial de la materia prima, en donde dicho porcentaje de humedad se encuentra cercano a lo reportado por Bukunmi *et al.* (2017), con 89.4 por ciento, pero mayor al que obtuvo Prakash *et al.* (1993), de 75.7 por ciento (hojas frescas de paico). Complementando con otras variedades del género *Chenopodium*, se ha reportado lo siguiente: 85.6 y 83.4 por ciento en *C. quinoa* variedades Salcedo y Altiplano, respectivamente (Chacaliaza-Rodríguez *et al.*, 2016). A su vez, Pradhan *et al.* (2015), obtuvieron 84.8 por ciento de humedad en hojas frescas de *Chenopodium album*.

#### **4.1.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

El valor de compuestos fenólicos totales (ver Anexo 1) y de las capacidades antioxidantes evaluadas (ver Anexo 2) por los métodos TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) y ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), determinados en las hojas de paico, se presentan en la Tabla 3. El contenido de compuestos fenólicos encontrado (13.6 mg AGE/g, bs) fue mayor al reportado por Villalobos-Delgado *et al.* (2016), quienes consideraron dos solventes de extracción para las hojas de paico: 1.31 mg AGE/g bs (medio acuoso-infusión) y 1.26 mg AGE/g bs (extracto etanólico al 100 por ciento).

**Tabla 3: Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante hidrofílica TEAC y ORAC en hojas de paico**

<b>Materia prima</b>	<b>Contenido de Compuestos Fenólicos Totales* (mg AGE/g bs)</b>	<b>Capacidad antioxidante TEAC* (μmol TE/g bs)</b>	<b>Capacidad antioxidante ORAC* (μmol TE/g bs)</b>
Paico	13.60 ± 0.17	93.3 ± 1.4	571.6 ± 5.8

\*Promedio ± desviación estándar (n=3)

Las diferencias en los resultados pueden deberse a diferentes factores como explican Zohra *et al.* (2018): los componentes bioactivos son recuperados de acuerdo a la polaridad del disolvente, el tiempo de extracción y la técnica de extracción. Los solventes muy hidrófilos son generalmente menos efectivos en la extracción de polifenoles (Wojcikowski *et al.*, 2007). Por su parte, Pandey y Gupta (2014), demuestran la eficiencia de utilizar solventes como el metanol en el arrastre de compuestos de naturaleza fenólica (en especial los flavonoides). Al utilizar un solvente acuoso (infusión), normalmente se obtiene un alto valor de polifenoles totales pero una extracción mínima de flavonoides; además de extraerse otros compuestos de naturaleza no-fenólica soluble en medios acuosos. Chen *et al.* (2015), mencionan que el agua puede arrastrar compuestos de capacidad reductora como ácidos orgánicos y azúcares, así como péptidos, entre otros. Cabe señalar que el método de cuantificación utilizado, donde se emplea el reactivo Folin-Ciocalteu, obedece a un mecanismo de oxidación/reducción, cuya respuesta puede variar de acuerdo a cómo los antioxidantes se comportan en las diferentes matrices alimenticias (Prior, 2005).

Se han reportado valores de compuestos fenólicos en mayor, igual a menor cantidad a la encontrada en hojas de paico: *Chenopodium botrys*, mostró valores de fenólicos totales en el rango de 27.77 a 71.25 mg AGE/g bs (Adji *et al.*, 2015); mientras que en *Chenopodium quinoa*, variedades Salcedo y Altiplano, se cuantificó 10.55 y 10.72 mg AGE/g bs, respectivamente (Chacaliaza-Rodríguez *et al.*, 2016). Otros arbustos de hojas verdes también denotan resultados para análisis el análisis en mención: *Vitex negundo* (3.07 mg AGE/g bs) y *Terminalia arjuna* (7.93 mg AGE/g bs) según Rajurkar y Hande (2011). Asimismo, el contenido de polifenoles totales en el género *Amaranthus* ha sido de 14.94 mg GAE/g bs (*A. hypochondriacus*) y 10.47 mg GAE/g bs (*A. caudatus*) (Li *et al.*, 2015).

Los resultados de las capacidades antioxidantes (CAOX) hidrofílicas de las hojas de paico se exponen en la Tabla 3. Se utilizó dos metodologías: TEAC y ORAC, por tener diferente mecanismo de reacción: transferencia de electrones y transferencia de protones, respectivamente según menciona Huet (2007). A su vez, Santacruz (2011), afirma que es necesario utilizar varios métodos de medida de CAOX para obtener un valor representativo de la muestra, abordando distintos mecanismos de reacción.

El valor obtenido de CAOX por el método TEAC, fue superior (93.3  $\mu\text{mol TE/g}$ , bs) a los reportados en hojas de *Chenopodium quinoa* variedades Salcedo y Altiplano, los que presentaron valores de 54.68 y 77.05  $\mu\text{mol TE/g}$  bs, respectivamente (Chacaliza-Rodríguez *et al.*, 2016). En una formulación de hierbas (70 por ciento de toronjil, 10 por ciento de ortiga, 10 por ciento de perejil y 10 por ciento de paico), según Beltrán *et al.* (2017), se obtuvo 5.51  $\mu\text{mol TE/g}$  bs de capacidad antioxidante TEAC, valor bastante menor al obtenido en la presente tesis. Por su parte, Speisky *et al.* (2006) consiguió una capacidad antioxidante (TEAC) de 166  $\mu\text{mol TE/g}$  bs en infusión de hojas de *C. ambrosioides*; mientras que Flores-Flores *et al.* (2019), reportó un valor de 227.2  $\mu\text{mol TE/g}$  bs en muestra liofilizada. Las dos últimas referencias mencionadas, presentaron mayores valores a los conseguidos en la presente investigación.

Entre las plantas utilizadas en infusiones (al igual que el paico), han sido estudiados: el laurel de la India (*Syzygium polyanthum*) que tiene un valor de CAOX TEAC de 197.4  $\mu\text{mol TE/g}$  bs (Yahaya *et al.*, 2019). Sin embargo, otras hierbas han expuesto reducidos niveles de CAOX en comparación a las hojas de paico: tomillo (*Thymus vulgaris* L.) con 0.39  $\mu\text{mol TE/g}$  bs (Wojdylo *et al.*, 2007); romero (*Rosmarinus officinalis*) con 0.39  $\mu\text{mol TE/g}$  bs y herniaria (*Herniaria glebra*) con 0.48  $\mu\text{mol TE/g}$  bs (Wojdylo *et al.*, 2007), donde se empleó como solvente de extracción el metanol al 80 por ciento (v/v).

Respecto a la CAOX ORAC, el presente estudio obtuvo un mayor valor (571.6  $\mu\text{mol TE/g}$  bs) que el reportado en otras especies del género *Amaranthus*: *A. hypochondriacus* (451.3  $\mu\text{mol TE/g}$  bs) y *A. caudatus* (378.3  $\mu\text{mol TE/g}$  bs) según Li *et al.* (2015). Algunas otras plantas medicinales como *Artemisia arborescens*, *Camellia sinensis*, *Ocimum basilicum*, *Olea europaea*, *Petroselinum crispum* (perejil), *Salvia officinalis* (salvia) y *Taraxacum officinale*, presentaron valores de CAOX ORAC de 261.1, 45.6, 314.5, 261.5, 445.0, 221.7 y 42.8  $\mu\text{mol TE/g}$  bs, respectivamente (Wojcikowski *et al.*, 2007). Todos los valores

referenciados en este párrafo, son menores al determinado en las hojas de paico de la presente tesis.

Comparando el CAO<sub>X</sub> ORAC en base húmeda (45.1 μmol TE/g bh) de *D. ambrosioides* del presente estudio, se observa que este fue mayor al conseguido en *Valerian officinalis* (15.82 μmol ET/g bh según Ninfali *et al.*, 2004) (valeriana) y *Rosmarinus officinalis* (2.9 μmol TE/g bh según Zheng & Wang, 2001) (romero).

#### 4.1.3. CONTENIDO Y TIPOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En la Tabla 4, se presentan los resultados de la identificación de los compuestos fenólicos de las hojas de paico realizado por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), así como la cuantificación de los mismos empleando UPLC®-PDA. Un total de 20 compuestos (Figura 14) fueron identificados, dentro de los que se encontraron principalmente a derivados del ácido *p*-cumárico, ácido vainílico, kaempferol y quercitina. La identificación de los polifenoles se realizó de acuerdo a los fragmentos moleculares (iones pseudo-moleculares) que fueron generados, la revisión de la literatura científica y la consulta de la base de datos de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Fang *et al.* (2002), indican que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas representa la técnica más popular utilizada para develar la complejidad de los compuestos fenólicos.

Respecto a la identificación de los polifenoles, se encontró que el pico 1 caracteriza tentativamente al ácido vainílico (ión molecular de  $m/z$  167.0344), en donde se cuenta con la presencia del fragmento  $m/z = 123$  ( $[M-H-CO_2]^-$ ), por pérdida de CO<sub>2</sub> (44 uma, unidades de masa atómica). Hossain *et al.* (2010), mencionan que la fragmentación de los ácidos fenólicos genera un patrón de fragmentación típico después de la disociación inducida por colisión, la cual es caracterizada por una pérdida común de una molécula de CO<sub>2</sub> (44 uma) del grupo carboxílico. Con respecto al fragmento de  $m/z = 139$  ( $[M-H-CO]^-$ ), este puede deberse a la fragmentación de CO (28 uma), la cual es típica de los fenoles y origina compuestos derivados del ciclopentadieno (Bajpai *et al.*, 2005).

**Tabla 4: Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la hoja del paico por LC-MS/MS qToF y su cuantificación por UPLC®-PDA**

Nº	TR (min)	$\Delta$ máx	Ion molecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	error (ppm)	Fórmula [M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos (% de abundancia)	Identificación	Promedio (mg/100 g bs)
1	6.56	278.5	167.0344	1.2	C8H7O4	123 (18 %), 139 (39 %), 167 (100 %)	Ácido vainílico	40.57 ± 0.48
2	8.37	309.5	325.0923	1.2	C15H17O8	119 (100 %), 163 (19 %)	Ácido <i>p</i> -cumaroil hexósido <sup>b</sup>	0.80 ± 0.19
3	16.26	327.4	741.1875	0.7	C32H37O20	741 (100 %), 595 (93 %), 301(87 %)	Quercetina-pentosil-ramnosil-hexósida	Tr
4	16.52	323.8	695.1824	0.1	C31H35O18	549 (100 %), 695 (68 %), 285 (11 %)	Kaempferol ramnosil-dipentósido	Tr.
5	17.12	347.2	695.1823	0.1	C31H35O18	695 (78 %), 549 (100 %), 285 (26 %)	Kaempferol ramnosil-dipentósido	4.77 ± 0.16
6	17.25	325	563.1406	0.9	C26H27O14	417 (17%), 431 (23 %), 285 (27 %), 255 (7 %)	Kaempferol ramnosil-pentósido	3.56 ± 0.13
7	17.38	313.1	739.2082	-0.5	C33H39O19	549 (100 %), 695 (58 %), 285 (4 %), 284 (20 %)	Kaempferol ramnósil-dipentósido	160.00 ± 1.96
8	17.47	309.5	739.2086	-0.7	C33H39O19	593 (32%), 431 (10%), 285 (28%)	Kaempferol diramnósido-hexósido	155.59 ± 3.76
9	17.59	321.4	593.1506	0.5	C27H29O15	593 (100 %), 301 (37 %), 447 (38 %)	Quercitina diramnósida	Tr
10	17.85	313.1	563.1401	0.2	C26H27O14	563 (100 %), 431 (41 %), 285 (43 %)	Kaempferol ramnosil-pentósido	Tr.
11	17.97	313.1	609.1456	0	C27H29O16	609 (100 %), 301 (35 %)	Quercitina ramnosil-hexósida	Tr.
12	18.23	313.1	725.1932	0.4	C32H37O19	284 (30 %), 285 (16 %), 463 (14 %), 431 (12 %)	Kaempferol pentosil-ramnosil-hexósido	Tr.
13	18.54	311.9	739.2086	-0.4	C33H39O19	285 (50 %), 593 (19 %), 431 (37 %)	Kaempferol diramnósil hexósido	13.91 ± 0.44
14	18.83	340.3	577.1628	1.6	C27H29O14	285 (42 %), 431 (36 %), 255 (2 %)	Kaempferol diramnósido	172.61 ± 1.99
15	19.03	342.6	563.1418	1.3	C26H27O14	285 (100 %), 431 (81 %), 255 (2%),	Kaempferol ramnosil-pentósido	34.37 ± 0.45
16	19.32	347.2	593.1506	0.5	C27H29O15	593 (100 %), 285 (69 %), 255 (10.76 %)	Kaempferol ramnosil-pentósido	9.96 ± 0.10
17	20.77	343.8	605.1558	1.6	C21H33O20	285(39 %), 431 (33 %), 430 (41%), 255 (4 %)	Kaempferol acetyl-furanósido-ramnósido	5.05 ± 0.33
18	21.08	343.8	605.1511	0.8	C28H29O15	285 (100 %), 431 (82 %), 255 (2 %)	Kaempferol acetyl-furanósido-ramnósido	16.43 ± 0.48
19	21.236	363.8	423.1423	-1.3	C24H23O7	423 (100 %), 301 (17 %), 300 (11 %)	Quercitina derivada	5.14 ± 0.14
20	22.49	365.2	647.1613	0.3	C30H31O16	431 (100 %), 285 (38 %), 284 (18 %)	Kaempferol ramnósido	63.73 ± 1.21
Total de compuestos fenólicos								645.11 ± 11.16

\*Promedio ± desviación estándar (n=3). <sup>a</sup>Cuantificado como ácido *p*-cumárico. Donde: Tr = Trazas (no cuantificado)

El pico 2 (ión molecular de  $m/z = 325.0923$ ), fue identificado tentativamente como ácido p-cumaroil hexósido por la presencia del fragmento  $m/z = 163$  ( $[M-H\text{-hexósido}]^-$ ), el cual podría deberse a la fragmentación de un hexósido (162 uma). Una posterior pérdida de  $\text{CO}_2$  (44 uma), originaría al fragmento  $m/z = 119$  ( $[M-H\text{-hexósido-CO}_2]^-$ ). Al respecto, mencionan Hossein *et al.* (2010), que los derivados del ácido p-cumaroil producen comúnmente iones de  $m/z = 163$  y 119. Barros *et al.* (2013), agregan que el fragmento  $m/z = 325$ , ha sido reportado anteriormente como un derivado del ácido p-cumárico.

El pico 3 (ión molecular de  $m/z = 741.1875$ ), fue denominado como quercetina-pentosil-ramnosil-hexósida debido, en primer lugar, a la alta presencia del fragmento  $m/z = 595$  ( $[M-H\text{-ramnosil}]^-$ ) por fraccionamiento del grupo ramnosil (146 uma) (Chen *et al.*, 2012). La subsecuente pérdida de 294 uma (132 uma del pentosil más 162 uma de un hexósido) deriva en la formación del fragmento  $m/z = 301$  ( $[M-H\text{-ramnosil-pentosil-hexósido}]^-$ ). A su vez, al pico 9 (ión molecular de  $m/z = 593.1506$ ), se le denominó quercitina diramnósida por la ruptura (pérdida) de dos moléculas de azúcar ramnosil (146 uma por cada una, 292 uma por el disacárido), resultando el fragmento de  $m/z = 301$  ( $[M-H\text{-ramnosil-ramnosil}]^-$ ). Por otro lado, el pico 11 (ión molecular de  $m/z = 609.1456$ ), fue identificado como quercitina ramnosil-hexósida, por la presencia del fragmento  $m/z = 301$  ( $[M-H\text{-ramnosil-hexósido}]^-$ ), el cual fue resultante de la escisión de un ramnosil (146 uma) y un hexósido (162 uma). En el caso del pico 19 (ión molecular de  $m/z = 423.1423$ ), se identificó tentativamente como derivado de quercitina por la presencia del fragmento  $m/z = 301$ , el cual es típico de este glucósido (Chen *et al.*, 2015). A este último resultado, se agrega que Vysochina (2010), citado por Podolak *et al.* (2016), reconoce la presencia de glucósidos de quercetina en las hojas de paico. Barros *et al.* (2013), por su parte, consiguieron identificar distintos derivados de quercitina, como la quercitina O-pentosil-ramnosil-hexósida y quercitina diramnósida, los cuales coinciden con los picos 3 y 9, respectivamente.

Los picos 4 (ión molecular de  $m/z = 695.1824$ ) y 5 (ión molecular de  $m/z = 695.1823$ ), se denominaron tentativamente como kaempferol ramnosil-dipentósido (en ambos casos). Dicha denominación se debe a la presencia de los fragmentos de  $m/z = 549$  ( $[M-H\text{-ramnosil}]^-$ ) y 285 ( $[M-H\text{-ramnosil-pentósil-pentosil}]^-$ ), los cuales estarían proviniendo de una pérdida de 146 uma del azúcar ramnosa y, posteriormente, una ruptura de 264 uma de un dipentósido (132 uma cada pentósido). A su vez, los picos 6 (ión molecular de  $m/z = 563.1406$ ), 10 (ión molecular de  $m/z = 563.1401$ ) y 15 (ión molecular de  $m/z = 563.1418$ )

fueron identificado como kaempferol ramnosil-pentósido por el fragmento  $m/z = 431$  ( $[M-H-pentosil]^-$ ), debido a la escisión de un pentosilo (132 uma); y una posterior formación de la fracción  $m/z = 285$  ( $[M-H-pentosil-ramnosil]^-$ ), por ruptura de un ramnosil (146 uma). Asimismo, el pico 16 (ión molecular de  $m/z = 593.1506$ ), fue identificado como kaempferol ramnosil-pentósido, al observarse el fragmento  $m/z = 285$  debido a la escisión de dos azúcares: un ramnósido (146 uma) y un hexósido (162 uma). El pico 7 (ión molecular de  $m/z = 739.2082$ ), denominado kaempferol ramnósil-dipentósido, posee el fragmento  $m/z = 695$  ( $[M-H-CO_2]^-$ ) debido a la pérdida de  $CO_2$  (44 uma) y una subsecuente fracción  $m/z = 549$  ( $[M-H-CO_2-ramnosil]^-$ ), por escisión de un ramnosil (146 uma). A lo anterior, sea agrega la presencia del fragmento  $m/z = 285$  ( $[M-H-CO_2-ramnosil-pentosil-pentosil]^-$ ), el cual deriva de la pérdida subsecuente de 264 uma del dipentósilo (132 uma cada pentósido) por escisión del mencionado fragmento  $m/z = 549$ . Por otro lado, se identificó como kaempferol diramnosil-hexósido a los picos 8 (ión molecular de  $m/z = 739.2086$ ) y 13 (ión molecular de  $m/z = 739.2086$ ), por la presencia de los fragmentos  $m/z = 593$  (pérdida de ramnosil, 146 uma),  $m/z = 431$  (escisión de ramnosil y un hexosil, totalizando pérdida de 308 uma) y  $m/z = 285$  (ruptura de ramnosil, hexosil y ramnosil, totalizando pérdida de 454 uma).

Se denominó kaempferol pentosil-ramnosil-hexósido al pico 12 (ión molecular de  $m/z = 725.1932$ ) debido, en primer lugar, a la presencia del fragmento  $m/z = 431$  ( $[M-H-pentosil-hexosil]^-$ ) por fraccionamiento total de 294 uma de los grupos pentosil (132 uma) y hexosil (162 uma). Consecutivamente, se pierden 146 uma (ramnosil) que deriva en la formación de la fracción  $m/z = 285$  ( $[M-H-pentosil-hexosil-ramnosil]^-$ ). A su vez, el pico 14 (ión molecular de  $m/z = 577.1628$ ), fue llamado kaempferol diramnósido por la escisión subsecuente de azúcar ramnosil (146 uma), resultando los fragmentos de  $m/z = 431$  (pérdida de un ramnosil,  $[M-H-ramnosil]^-$ ) y  $m/z = 285$  (pérdida de 2 ramnosil,  $[M-H-ramnosil-ramnosil]^-$ ). De otro lado, el compuesto de mayor tiempo de retención, es decir, el pico 20 (ión molecular de  $m/z = 647.1613$ ) fue designado como kaempferol ramnósido por la presencia del fragmento  $m/z = 431$ , el cual se desintegra a la consecutiva formación de la fracción  $m/z = 285$  por pérdida de un ramnosil (146 uma). Por último, los picos 17 y 18 (iones moleculares de  $m/z = 605.1558$  y  $605.1511$ , respectivamente), fueron denominados como kaempferol acetil-furanósido-ramnósido por la participación del fragmento  $m/z = 431$  ( $[M-H-acilfuranosil]^-$ ), el cual proviene de la pérdida de uno de los siguientes compuestos: acetil-arabinofuranósido (174 uma) y acetil-apiofuranosil (174 uma), no sabiéndose exactamente cuál de los dos es el compuesto escindido (Tselepi *et al.*, 2011). Asimismo, en

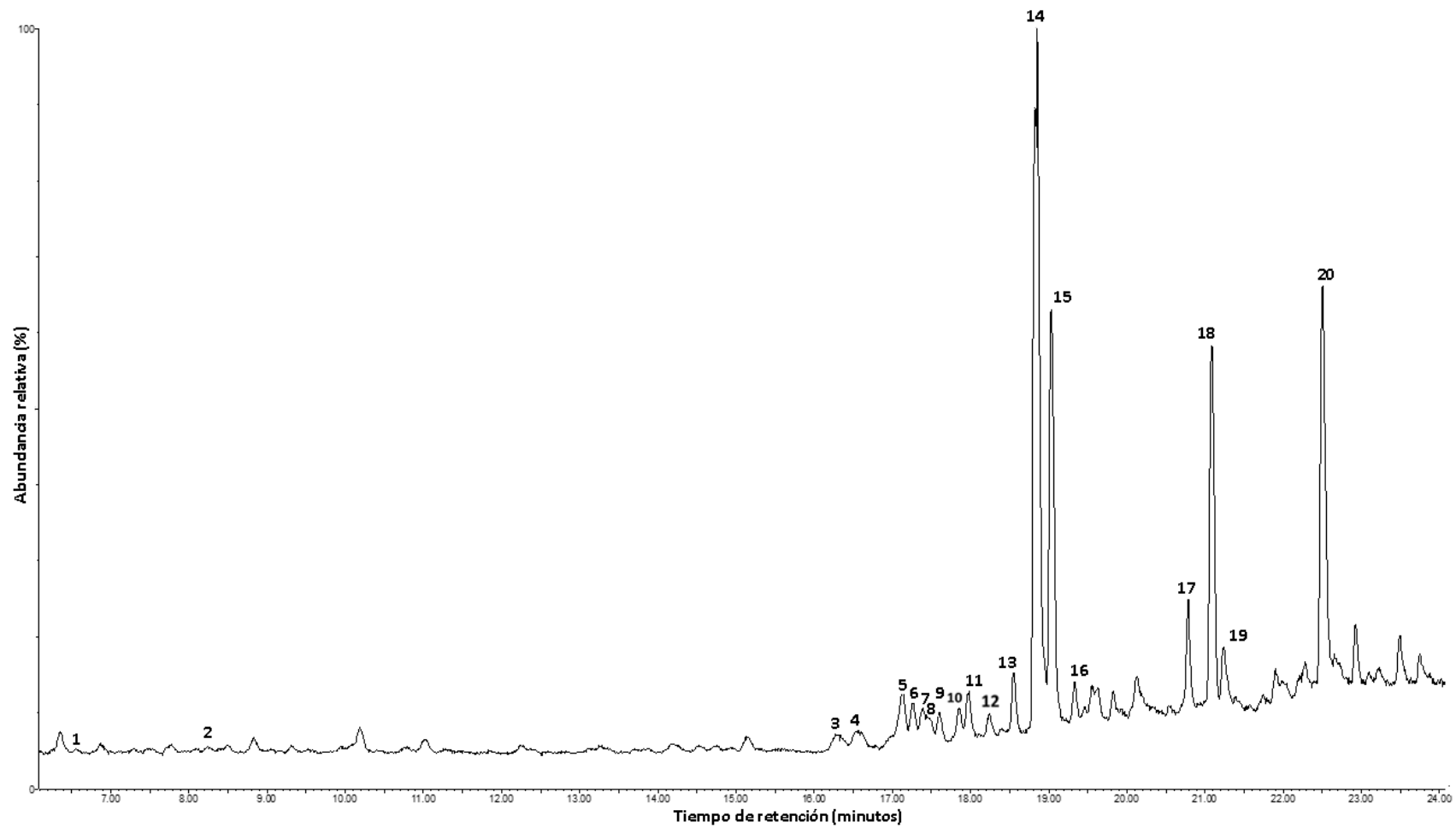
el pico 17 se observa una alta abundancia del fragmento de  $m/z = 430$  (producto de una escisión homolítica) a una intensidad del 41 por ciento, cuando debería sólo tener la fracción  $m/z = 431$  (producto de escisión heterolítica). Al respecto, Hvattum y Kerget (2002) mencionan que lo anterior puede deberse al total de sustituciones OH<sup>-</sup> (hidroxilos) en el anillo B del flavonoide o a la naturaleza (y posición) de la sustitución del azúcar.

Tanto los fragmentos de  $m/z = 285$  y  $255$  son característicos del kaempferol según diversas publicaciones (Chen *et al.*, 2015; Pietrzak *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Barros *et al.* (2013), pudieron identificar a diversos glucósidos de kaempferol como kaempferol diramnósido-hexósido, kaempferol pentosil-ramnosil-hexósido y kaempferol rutinósido; en donde este último compuesto también ha sido identificado en *C. hybridum* según Podolak *et al.* (2016). Se enfatiza que un fenómeno percibido en los derivados del kaempferol, es la relación del tiempo de retención con la glucosilación; en donde Harborne y Boardley (1984), explican que el aumento de la glucosilación reduce el tiempo de retención con el fin de que los triglicósidos eluyan antes que los diglicósidos y los diglicósidos antes que los monoglucósidos.

Los compuestos identificados por LC-MS/MS qToF, fueron cuantificados por UPLC®-PDA y los resultados se muestran en la Tabla 4. Se observa que de la cuantificación total de los compuestos fenólicos identificados (totalizados como 645.11 mg/100 g bs), los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) fueron (en cantidad) 41.4 mg/100 g bs (~ 6.4 por ciento), mientras que el total de flavonoides fueron los mayoritarios con 603.74 mg/100 g bs (~ 93.5 por ciento).

El total de compuestos fenólicos cuantificados en la presente investigación se encuentra menor a lo conseguido por Barros *et al.* (2013) de 822.33 mg/100 g bs en hojas de paico. Además, los autores señalan que los flavonoides participaron en un 93.4 por ciento, el cual es similar a lo obtenido en el presente estudio (93.6 por ciento). La literatura científica destaca la alta variedad de derivados de kaempferol en hojas de paico: kaempferol-3,7-diramnósido, kaempferol-3-ramnosilpiranosil, kaempferol ramnosilpiranosil-7- $\beta$ -xilopiranosido, kaempferol-7-ramnósido (Poonia y Upadhayay,





**Figura 14. Perfil cromatográfico a 320 nm de los principales compuestos fenólicos identificados en hojas de paico por medio del UPLC®-qToF/MS-MS**

2014; Vysochina, 2008). Por otro lado, Gawlik-Dziki *et al.* (2013), identificaron en las hojas de quinua (*Chenopodium quinoa*): kaempferol (4.6 mg/ 100 g bs), quercitina (0.7 mg/ 100 g bs) y ácido *p*-cumárico (33.31 mg/ 100 g bs), demostrando alta similitud con el perfil polifenólico de *D. ambrosioides* de la presente investigación.

En especies del género *Amaranthus* (*A. hypochondriacus* y *A. hypochondriacus*), se han detectado kaempferol (2.36 a 2.43 mg/100 bs) y ácido protocatéquico (13.57 a 17.68 mg/100 g bs). Sin embargo, los valores de kaempferol reportados por las últimas referencias bibliográficas, son bastante menores en comparación a los obtenidos en la presente tesis (total de kaempferol de 497.98 mg/100 bs). En hierbas aromáticas como el laurel (*Lauris nobilis*), se halló quercitina (3.2 mg/100 g bh) y kaempferol (4.8 mg/100 g bh); mientras que en el orégano (*Origanum vulgare*), se encontró quercitina (219 mg/100 g bh) y miricetina (21 mg/100 g bh) (Škerget *et al.*, 2005). Se agrega que Barros *et al.* (2013), hallaron la isorhamnetina, el cual es un compuesto que no fue encontrado en la presente investigación. Esto último puede ser debido a que las agliconas flavonoides pueden sufrir una degradación por oxidación, de tal manera que sus picos no se detecten, según explican Mbamalu *et al.* (2016).

#### **4.1.4. CONTENIDO Y TIPOS DE TERPENOS**

En la Figura 15 y la Tabla 5, se pueden apreciar la identificación y cuantificación de los 12 compuestos de naturaleza terpénica encontrados en las hojas de paico. Dicha identificación de los compuestos terpénicos se fundamenta en la comparación del espectro generado por el mecanismo de ionización de impacto electrónico de las moléculas de naturaleza terpénica con los espectros hallados en la base de datos NIST. Cabe mencionar que se decidió presentar la cuantificación expresada en mg/100 g bs (ver Anexo 3) y, también, como porcentaje de participación, dado que esta última forma de presentación es la única expuesta en la variada literatura científica sobre hojas de paico. La coincidente identificación de  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, terpinoleno, timol, carvacrol y al ascaridol por Jirovetz *et al.* (2000), indican la alta similitud de los resultados en el perfil de terpenos encontrados en la presente tesis.

Los resultados muestran (ver Figura 15) la alta presencia de monoterpenos hidrocarbonados (80.37 por ciento), en comparación a los monoterpenos oxigenados (18.05 por ciento). De

Andrade *et al.* (2016), obtuvo en la misma hierba aromática, hidrocarburos monoterpenos al 62.8 por ciento; mientras que Gbolade *et al.* (2010), consiguieron 76.89 por ciento (valor cercano). No obstante, Al-kaf *et al.* (2016), obtuvo cantidades muy distintas: monoterpenos oxigenados (85.3 por ciento) y monoterpenos hidrocarbonados (8.9 por ciento). Las diferencias presentadas con respecto a la literatura científica pueden deberse al origen geográfico, la técnica de extracción, el estado vegetativo de las hojas, la época de recolección de la planta, el método de secado e incluso la intensidad de la luz solar (Jaramillo *et al.*, 2012; Harraz *et al.*, 2014; León, 2009; Damasceno *et al.*, 2014). Por su parte, Nascimento *et al.* (2017), enfatizan en que los estímulos ambientales pueden redirigir las rutas metabólicas, causando biosíntesis de diferentes compuestos.

El pico 10 corresponde al isoascaridol (ión molecular de  $m/z = 168.08$ ), el cual cuenta con una reacción de primer orden de pérdida de  $C_3H_7$  (43 uma), resultando  $m/z = 43$  a alta intensidad (Zhang *et al.*, 2008). La subsecuente pérdida de  $H_2$  (2 uma), hace común encontrar también al fragmento de  $m/z = 41$ . Lo anterior concuerda con los resultados conseguidos. Se han encontrado isómeros del isoascaridol: cis-isoascaridol (1.1-6.4 por ciento) (más dominante en la naturaleza), trans-ascaridole (1-2 por ciento) y trans-isoascaridole (1-2 por ciento) en hojas de paico (Dembitsky *et al.*, 2008). Por su parte, Al-kaf *et al.* (2016), obtuvieron (en hojas de paico) isoascaridol al 27.7 por ciento y ascaridol al 54.2 por ciento; los cuales representan valores bajos y se ven relacionados a la presencia de  $\alpha$ -terpineno (compuesto génesis del ascaridol) y su sensibilidad al calor (Kasali *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2011; Alitonou *et al.*, 2012; Damasceno *et al.*, 2014). Algunos estudios, como el de Damasceno *et al.* (2014), mencionan la ligera variabilidad del ascaridol respecto a su época de cosecha (8.6 a 9.5 por ciento, en 3 estaciones); mientras que Muhayimana *et al.* (2011), explican que la ruta biosintética de dicho compuesto puede cambiar de acuerdo a la etapa de crecimiento de la planta o la naturaleza del suelo. A esto último, se añade que el modo de extracción de su aceite esencial se dio por asistencia de microondas, método que enriquece su cantidad de ascaridol (Muhayimana *et al.*, 2011).

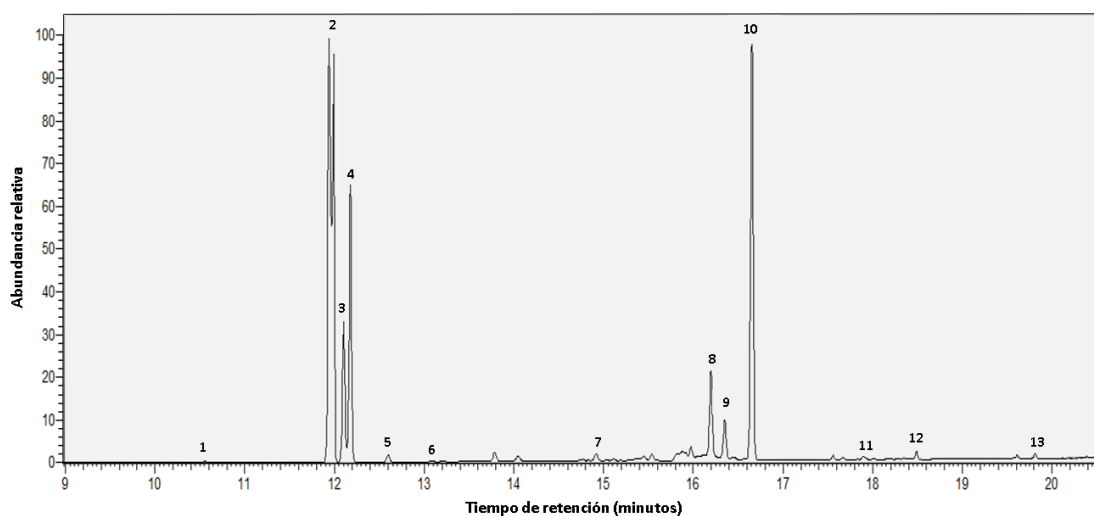
**Tabla 5: Terpenos encontrados en hojas de paico**

N°	TR (min)	Fórmula	Ion molecular (m/z)	Fragmentos (% de abundancia)	Identificación	Porcentaje de participación (%)	Cuantificación* (mg/100 g bs)
1	10.55	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.09	93 (100%), 91 (69%), 77 (41%), 79 (37%), 28 (32%), 39 (27%)	α-pineno	0.43	4.32 ± 0.56
2	11.93	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.10	93 (100 %), 121 (97%), 91 (80%), 77 (52%), 79 (44%)	α -terpineno	63.26	1489.65 ± 222.12
3	12.11	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134.08	119 (100 %), 91 (46%), 134 (26%), 117 (23%), 77 (14%)	p-cimeno	6.84	104.87 ± 12.49
4	12.16	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.11	67 (100%), 93 (71%), 79 (54%), 39 (46%), 53 (38%)	Limoneno	9.84	313.13 ± 18.67
5	12.59	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.10	93 (100%), 91 (89%), 77 (52%), 79 (34%), 41 (28%)	γ-terpineno	0.15	4.51 ± 0.54
6	13.07	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.08	93 (100%), 91 (85%), 121 (70%), 77 (63%), 79 (61%)	Terpinoleno	Tr	Tr
7	14.91	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.04	95 (100%), 110 (19%)	Borneol	Tr	Tr
8	16.18	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150.10	135 (100%), 91 (39%), 150 (26%), 115 (24%)	Timol <sup>a</sup>	5.05	49.47 ± 6.27
9	16.33	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150.10	135 (100%), 91 (40%), 150 (32%), 77 (24%), 107 (23%)	Carvacrol <sup>a</sup>	3.02	22.90 ± 1.8
10	16.64	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	168.08	43 (100%), 41 (57%), 97 (47%)	Isoascaridol <sup>b</sup>	9.98	8.19 ± 0.9
11	18.34	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.09	93 (100%), 80 (35%), 121 (20%), 147 (19%)	Humuleno	Tr	Tr
12	19.8	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222.04	95 (100%), 150 (72%), 151 (51%)	Cedrol	Tr	Tr
Monoterpenos hidrocarbonados (picos 1, 2, 3, 4, 5 y 6)							1916.48 ± 254.38
Monoterpenos oxigenados (picos 7, 8, 9 y 10)							80.57 ± 8.97
Sesquiterpenos hidrocarbonados (pico 11)							Tr
Sesquiterpenos oxigenados (pico 12)							Tr
Total							1997.05 ± 263.35

\*Promedio ± desviación estándar (n=3). <sup>a</sup>Cuantificado como cariofileno. <sup>b</sup>Cuantificado como borneol. Tr: Trazas (menor a 0.1%)

La identificación del pico 2 ( $\alpha$ -terpineno) (ión molecular de  $m/z = 136.10$ ), se da por la alta intensidad relativa del fragmento  $m/z = 121$  (primer proceso de fragmentación) debido a la pérdida de  $\text{CH}_3$  (15 uma); además de la presencia de la fracción  $m/z = 93$ , después de la pérdida de  $\text{C}_3\text{H}_7$  (43 uma). La alta intensidad de los dos fragmentos antes mencionados son indicadores importantes para la correcta identificación del terpeno (Thao *et al.*, 2014). El porcentaje del  $\alpha$ -terpineno es cercano al reportado por Jirovetz *et al.* (2000) de 65.4 por ciento en paico de la India. A su vez, Jaramillo *et al.* (2012), mencionan que el compuesto mayoritario encontrado en aceite esencial de paico es el  $\alpha$ -terpineno (60.3 por ciento). Por otro lado, el estudio de Alitonou *et al.* (2012), demostró la variabilidad de del terpeno en cuestión (de 48.9 por ciento hasta 63.7 por ciento), de acuerdo al mes de recolección (diciembre a febrero). Por su parte, Damasceno *et al.* (2014), agregan que el  $\alpha$ -terpineno es el componente principal del aceite esencial de *C. ambrosioides* nativo de Nigeria, Ruanda, Colombia, Camerún e India.

Respecto a la identificación del  $\gamma$ -terpineno (pico 5), se realizó por el fragmento de  $m/z = 93$ , el cual es típico después de la disociación que da como resultado la pérdida de  $\text{C}_3\text{H}_7$  (43 uma), llegando incluso a  $m/z = 91$  (por pérdida de  $\text{H}_2$ , es decir, 2 uma) (Tani, 2012). Gbolade *et al.* (2010), obtuvieron una concentración cercana al 0.8 por ciento en hojas de *C. ambrosioides*, mientras que en el presente estudio la participación fue de 0.15 por ciento



**Figura 15. Perfil cromatográfico (GC-MS) de terpenos en hojas de paico**

El pico 4 obedece a la identificación del limoneno (ión molecular de  $m/z = 136.11$ ). Benavides *et al.* (2010), afirman que el fragmento  $m/z = 67$  (propio del catión ciclopenteno) es el más abundante en el compuesto en mención y que se debe a la apertura del anillo aromático y las pérdidas de grupos metilenos. Asimismo, El-Kareem *et al.* (2015), validan lo antes expuesto, debido a la ruptura de  $C_5H_9$  (69 uma), resultado la fracción  $m/z = 67$ . Además, se hace mención que el fragmento  $m/z = 93$  pierde  $CH_2$ , formando, por el proceso Diels-Alder, al fragmento de  $m/z = 79$  (Benavides *et al.*, 2010). El limoneno es un terpeno encontrado ampliamente en hojas del género *Chenopodium*: *C. murale* (27.5 por ciento), *C. polyspermum* (24.2 por ciento); *C. album* (23.2 por ciento).; *C. urbicum* (10.9 por ciento) (Dembitsky *et al.*, 2008). Sagrero-Nieves y Bartley (2015), mencionan que el limoneno es el compuesto principal (32.5 por ciento) en el aceite esencial de *C. ambrosioides* que crece en Brasil, comprobándose la variedad composicional terpénica de acuerdo a la geografía. Por último, sólo el valor (4 por ciento) ejecutado con extracción de arrastre por vapor, reportado por Torres *et al.* (2003), mostró cercanía al obtenido en el presente estudio; sin embargo, también explican que el porcentaje de este compuesto aumenta drásticamente desde 4 hasta 32.5 por ciento desde el verano hasta el otoño. Por dicha razón, no es extraño encontrar una cantidad importante de limoneno en los resultados del presente estudio.

El pico 3 (*p*-cimeno) (ión molecular de  $m/z = 134.08$ ), se identificó por la presencia del fragmento de  $m/z = 119$ , con pérdida (primera reacción de fragmentación) de  $CH_3$  (15 uma); teniendo también al fragmento  $m/z = 91$ , como consecuencia de la ruptura de  $C_3H_7$  (43 uma) del ión molecular. Ambos fragmentos mencionados (y su alta presencia en el *p*-cimeno) coinciden con los expuestos por Kari *et al.* (2018). Dicho terpeno se encontró a valores próximos al 4.83 y 8.92 por ciento obtenidos por Nascimento *et al.*, (2017) y Cabrera (2017) en *C. ambrosioides*, respectivamente. Sin embargo, porcentajes más altos también han sido reportados: 12.7 (Chu *et al.*, 2010), 15.3 (Muhayimana *et al.*, 2011), 15 (Damasceno *et al.*, 2014) y 14.5 (Soares *et al.*, 2017) en hojas de paico proveniente de China, Ruanda, Camerún y Brasil, correspondientemente. Por su parte, Boutkhil *et al.* (2013), recalcan el efecto de las condiciones climáticas y el agua disponible en el suelo pueden modificar el metabolismo secundario vegetal y, consecuentemente, la composición de los aceites esenciales.

La identificación del pico 1 recae en el  $\alpha$ -pineno (ión molecular de  $m/z = 136.09$ ). El-Kareem *et al.* (2015), exponen que la fragmentación del  $\alpha$ -pineno produce un patrón de fragmentación de  $m/z = 93$ , el cual es típico después de la disociación y que da como

resultado la pérdida de  $C_3H_7$  (43 uma). Además, por la subsecuente escisión de  $H_2$ , es común encontrar al fragmento de  $m/z = 91$  a una intensidad alta, lo cual coincide con los resultados expresados en la Tabla 5. Los mismos autores mencionan que los fragmentos típicos de este compuesto, son los de  $m/z$  igual a 91, 77 y 79. Por último, el contenido  $\alpha$ -pineno encontrado en el presente estudio, estuvo cercano al resultado de Zhu *et al.* (2012), de 1.3 por ciento. Este terpeno no compromete cantidades porcentuales importantes.

El carvacrol (pico 9) (ión molecular de  $m/z = 150.10$ ) fue identificado por medio de su fragmento de  $m/z = 107$ , el cual es característico después de la pérdida de  $C_3H_7$  (43 uma) en reacción de primera fragmentación (Kumar *et al.*, 2016). La reconfirmación del compuesto se dio por comparación con la biblioteca de espectro de masas estándar (biblioteca NIST). Este compuesto presentó un porcentaje traza (menor a 0.1 por ciento) de participación; a su vez, Boutkhil *et al.* (2013), consiguieron dilucidar el compuesto en un porcentaje del 1.4 por ciento.

El compuesto identificado como terpinoleno (pico 6) (ión molecular de  $m/z = 136.08$ ), se pudo identificar dada la abundancia del fragmento de  $m/z = 93$ , típico después de la disociación del primer proceso de fragmentación que da como resultando la pérdida de  $C_3H_7$  (43 uma) (El-Kareem *et al.*, 2015). La reconfirmación del compuesto se dio por comparación con la biblioteca de espectro de masas estándar (biblioteca NIST).

El borneol obedece a la identificación realizada en el pico 7 (ión molecular de  $m/z = 154.04$ ). Zhang *et al.* (2008), mencionan que el fragmento característico de este terpeno es el de  $m/z = 95$ , el cual queda por la subsecuente pérdida de  $H_2O$  (18 uma) y  $C_3H_5$  (41 uma). Los autores mencionan también que el fragmento  $m/z = 110$  es propio del compuesto y se da por ruptura de  $H_2O$  (18 uma) y  $C_2H_2$  (26 uma). Dichas reacciones obedecen al primer proceso de fragmentación.

El pico 8 se identificó como timol (ión molecular de  $m/z = 150.10$ ). Según Kumar *et al.* (2016), el fragmento más importante de dicho terpeno es  $m/z = 135$ , el cual se debe a la pérdida de  $OH^-$  (17 uma) y ruptura de un doble enlace, lo que agrega 2 unidades de hidrógenos (2 uma). Los mismos autores mencionan a los fragmentos de  $m/z$  de 115 y 91 como los más comunes en dicho compuesto.

El humuleno (pico 11, ión molecular de  $m/z = 204.09$ ), se identificó por medio del fragmento característico de  $m/z = 147$ , el cual resulta de la pérdida de  $C_4H_7$  (43 uma) según lo explicado por Rimetz-Planchon *et al.* (2011). La reconfirmación del compuesto se dio por comparación con la biblioteca de espectro de masas estándar (biblioteca NIST).

El pico 12 (ión molecular de  $m/z 222.04$ ) se denominó cedrol por la presencia del fragmento  $m/z = 95$ , el cual queda por las continuas pérdidas de diferentes radicales (hidroxilo y alquilos) los cuales totalizan  $C_8H_{15}O$  (127 uma) según explican Zhang *et al.* (2008).

Algo importante que acotar es el estudio ejecutado por León (2009), en paico peruano, donde el  $\alpha$ -felandreno fue el compuesto principal (43 por ciento); sin embargo, no fue determinado en el aceite esencial del presente estudio. Ello puede deberse a que algunos terpenos se encuentran en una alta concentración en estaciones de verano y se reducen drásticamente (a un valor indetectable) en estación de otoño e invierno (Torres *et al.*, 2003).

#### 4.1.5. CONTENIDO Y TIPOS DE ÁCIDOS GRASOS

Se lograron distinguir 4 principales ácidos grasos, los cuales se exponen en la Tabla 6, en donde los tiempos de retención (Figura 16) aumentan a mayor número de carbonos de la cadena del ácido graso (Lima *et al.*, 1965).

**Tabla 6: Ácidos grasos presentes en hojas de paico**

Ácido graso	Porcentaje relativo* (%)
Ácido palmítico (C16:0)	26.33 ± 0.53
Ácido oleico (C18:1)	2.51 ± 0.25
Ácido linoleico (C18:2)	35.79 ± 0.60
Ácido linolénico (C18:3)	35.36 ± 0.18
Ácidos Grasos Saturados	26.33 ± 0.53
Ácidos Grasos Monoinsaturados	2.51 ± 0.25
Ácidos Grasos Poliinsaturados	71.16 ± 0.78

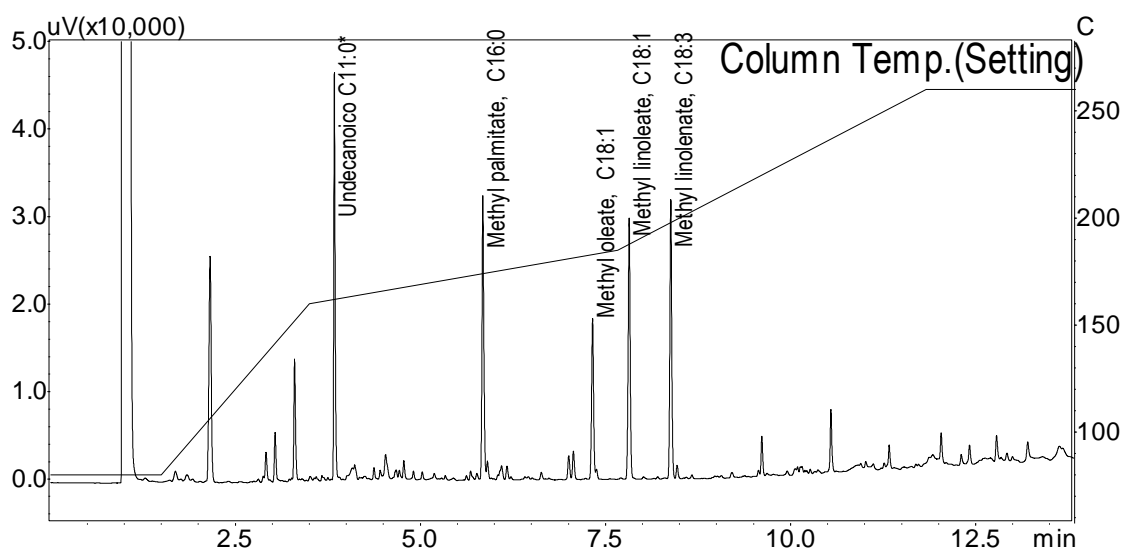
\*Promedio ± desviación estándar (n=3)

Los resultados de la presente tesis son coincidentes con los expuesto por Guerrero y Torija (1997); Koiwai *et al.* (1982) y Guil-Guerrero y Rodríguez-García (1998), quienes detectaron



sólo 4 ácidos grasos (palmítico, oleico, linoleico y linolénico) en partes aéreas del género *Chenopodium*. A su vez, Barros *et al.* (2013), agregan que el porcentaje total de PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acids*) en *C. ambrosioides* es de 68.44 por ciento, el cual es un valor cercano a la presente tesis (ver Anexo 4). Asimismo, los mencionados últimos autores detectan coincidentemente, aunque en diferentes proporciones, a los ácidos linolénico (48.54 por ciento), linoleico (19.23 por ciento), oleico (6.9 por ciento) y palmítico (14.16 por ciento).

Algunas hojas de algunas plantas del género *Chenopodium* (*C. album*, *C. murale*, *C. opulifolium*) presentaron valores de entre 33.0 al 44.8 por ciento de ácido linolénico, 9.62 al 16.82 por ciento de ácido linoleico, 2.8 al 6.9 por ciento de ácido oleico y 15.1 al 16.8 por ciento de ácido palmítico (Guerrero y Torija, 1997). Mientras que algunas *Amaranthus* (*A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. tricolor*, *A. viridis*) obtuvieron entre 40.8-59.5 por ciento de ácido linolénico, 10.3-14.9 por ciento de ácido linoleico, 3.3-6.7 por ciento de ácido oleico y de 6.1-10.4 por ciento de ácido palmítico (Tang *et al.*, 2014). Tanto en los géneros *Amaranthus* y *Chenopodium*, es el ácido linolénico el de mayor variabilidad.



**Figura 16. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en hojas de paico**

Las explicaciones por las cuales los porcentajes de ácidos grasos de la presente investigación no coinciden con las referencias literarias pueden ser diversas. Los tejidos vegetales silvestres proporcionan PUFA en mayor nivel que las hierbas plantadas intencionalmente (Mei *et al.*, 2015), en donde dichas moléculas obedecen a la actividad de la enzima

desaturasa. Dicha enzima en mención se expresa por los genes FAD2 (conversión a ácidos grasos dienoicos: ácido linoleico, por ejemplo) y por el FAD3 (conversión a ácidos grasos trienoicos: ácido linolénico, por ejemplo), teniendo como función la resistencia de las plantas tanto al frío como a la sal. Las mencionadas enzimas son muy susceptibles a la alteración (aumento de actividad) por las bajas temperaturas y la intensificación de luz (Dar *et al.*, 2017). Acota, Hawke (1957), citado por Lima *et al.* (1965), que el contenido de PUFA es mayor en plantas de nuevo crecimiento (jóvenes).

#### 4.1.6. CONTENIDO Y TIPOS DE TOCOFEROLES

Se presenta el perfil de tocoferoles por HPLC en la Figura 17 y su cuantificación en la Tabla 7.

Se pudo identificar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol en las hojas de paico. La cuantificación en  $\beta$ - y  $\delta$ -tocoferol presentados en el estudio (Figura 17), son similares a los reportados por Barros *et al.* (2013), en hojas de *C. ambrosioides*: 5.6 y 1.3  $\mu\text{g/g}$  bs, respectivamente. No obstante, el contenido de  $\gamma$ -tocoferol (22.8  $\mu\text{g/g}$  bs) citado por el último autor, fue mayor al encontrado en el análisis; sin embargo, el valor de  $\alpha$ -tocoferol (2023.4  $\mu\text{g/g}$  bs) de la referencia bibliográfica resulta ser casi 70 veces más a lo obtenido de  $\alpha$ -tocoferol en la presente tesis (ver Anexo 5). La referencia menciona que la recolección de las plantas (hojas de paico) fue en un ambiente silvestre y se secó por liofilización (factor importante).

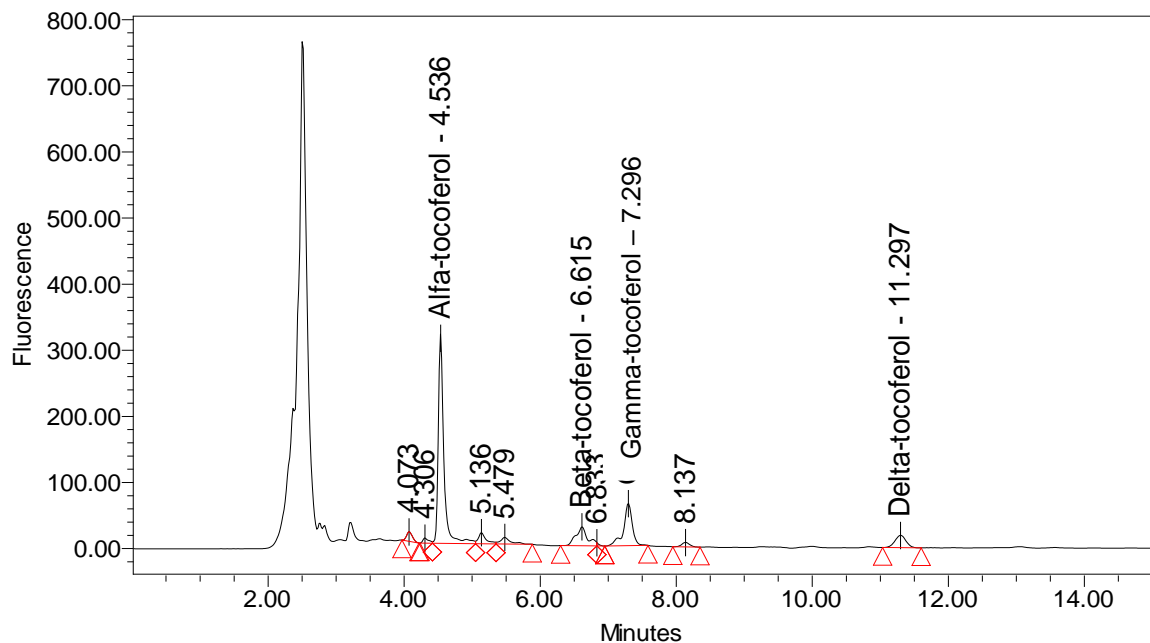
**Tabla 7: Tocoferoles presentes en las hojas de paico**

Tocoferol	Contenido* ( $\mu\text{g/g}$ bs)
$\alpha$ -tocoferol	$28.78 \pm 1.46$
$\beta$ -tocoferol	$7.19 \pm 1.46$
$\gamma$ -tocoferol	$7.96 \pm 1.46$
$\delta$ -tocoferol	$3.27 \pm 0.23$

\*Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

Šircelj *et al.* (2010), citado por Šircelj *et al.* (2018), mencionan que el contenido foliar del tocoferol aumenta con la edad de la hoja. Mientras que, Antognoni *et al.* (2008), agregan que el desarrollo de las plantas en condiciones adversas (limitada fuente de agua y radiación solar), provoca un incremento notable en diversos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol, debido

a su función en el mantenimiento de la membrana de los tilacoides. Los últimos autores profundizan en que la actividad de la enzima TAT (*Tyrosine Amino Transferase*), usada en *A. caudatus*, es otro factor a considerar, debido a que un aumento en la actividad enzimática, se relaciona con un mayor contenido de dicho  $\alpha$ -tocoferol. Asimismo, la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) es muy sensible a la oxidación (acelerada por el calor), luz ultravioleta, humedad y los minerales traza (Ewing, 2007; citado por Riaz *et al.*, 2009), de donde se sospecha que el método de secado (el análisis se realizó en hojas secas según el procedimiento de la Figura 13) utilizado pudo ser un factor trascendental para la baja concentración de dicho compuesto.



**Figura 17. Perfil cromatográfico de tocoferoles en hojas de paico**

Tang *et al.* (2014), ha reportado los cuatro tocoferoles en cuestión ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol) en diversas especies del género *Chenopodium* y *Amaranthus*, hallando que el  $\alpha$ -tocoferol representa entre el 72-75 por ciento de los tocoferoles totales; mientras que en la presente tesis sólo representa el 60 por ciento.

En otras especies estrechamente relacionadas al *C. ambrosioides*, se pudo encontrar valores de  $\alpha$ -tocoferol relativamente cercanos al presentado en este estudio: *Amaranthus hypochondriacus* (16.24  $\mu\text{g/g}$  bs), *Amaranthus tricolor* (32.71  $\mu\text{g/g}$  bs); *Chenopodium formasanum* (5.79  $\mu\text{g/g}$  bs) y *C. quinoa* (44.71  $\mu\text{g/g}$  bs) (Tang *et al.*, 2014). Las tres especies en cuestión presentaron valores de entre 1.02-6.38  $\mu\text{g/g}$  bs, 1.02-17.57  $\mu\text{g/g}$  bs, 1.53-2.15

$\mu\text{g/g}$  bs en  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocolerol, respectivamente. Sin embargo, Antognoni *et al.* (2008), mencionan una baja (y casi indetectable) proporción de estos últimos tres tocoferoles en especies de los géneros *Amaranthus* y *Chenopodium*.

## V. CONCLUSIONES

- El total de compuestos fenólicos determinados en hojas de paico por el método de Folin- Ciocalteau fue de 13.60 AGE/ g bs; mientras que las capacidades antioxidantes TEAC y ORAC fueron de 93.3 y 571.6  $\mu\text{mol TE/g bs}$ , respectivamente.
- Se identificaron un total de 20 compuestos fenólicos principales: ácido vainílico (1), derivado del ácido *p*-cumaroil-hexósido (1), glucósidos y derivados de flavonoles: derivados de quercetina-ramnósida (3), quercitina derivada (1), kaempferol acetil-furanósido-ramnósido (2) y derivados del kaempferol ramnósido (12). La cuantificación por UPLC®-PDA de todos los compuestos fenólicos identificados fue de 645.11 mg/100 g bs (en total), en donde los ácidos fenólicos correspondieron a 41.37 mg/100 g bs (6.4 por ciento del total); mientras que los flavonoides fueron de 603.74 mg/100 g bs (93.5 por ciento del total).
- Los 4 principales grupos de terpenos fueron los siguientes: monoterpenos hidrocarbonados ( $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno y terpinoleno) con 1916.48 (mg/100 g bs); monoterpenos oxigenados (borneol, timol, carvacrol, isoascaridol) con 80.57 mg/100 g bs; mientras que el sesquiterpeno hidrocarbonado (humuleno) y sesquiterpeno oxigenado (cedrol), se encontraron en cantidades trazas (menor al 0.1 por ciento)
- Se encontraron cuatro ácidos grasos en las hojas de paico: ácido palmítico (26.33 por ciento), ácido oleico (2.51 por ciento), ácido linoleico (35.79 por ciento) y ácido linolénico (35.36 por ciento). Así también, se halló  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol en las hojas de paico en concentraciones de 28.78, 7.19, 7.96 y 3.27  $\mu\text{g/g bs}$ , respectivamente

## VI. RECOMENDACIONES

- Complementar la identificación de los compuestos fenólicos, así como de los terpenos, con otras técnicas espectroscópicas como UV (*Ultra Violet*) y NMR (*Nuclear Resonance Magnetic*) para la correcta estereoquímica de los componentes del aglicón de los glucósidos fenólicos.
- Caracterizar el perfil de terpenos en paico siguiendo diferentes métodos de extracción (hidrodestilación, arrastre con vapor y microondas) del aceite esencial de hojas frescas como secas.
- Analizar multifuncionalmente a los metabolitos del paico por medio de extracciones sucesivas de todos los compuestos bioactivos posibles, optimizando el uso de materia prima.
- Evaluar la influencia de condiciones de estrés biótico y/o abiótico en el paico y su efecto sobre el contenido y perfil de los compuestos bioactivos evaluados, así como de las características antioxidantes evaluadas.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, A. (2007). Functional analysis of tocopherol biosynthesis in plants (Tesis Doctorado, Universidad de Erlangen-Núremberg). Recuperado de <https://dnb.info/984228748/34>
- Aborisade, A.; Adetutu, A.; Owoade, A. (2017). Phytochemical and Proximate Analysis of Some Medicinal Leaves. *Revista Clinical Medicine Research*, 6 (6): 209-214. Doi: 10.11648/j.cmr.20170606.16
- Abozaglo, A.M. (1994). El cultivo del paico (*Chenopodium ambrosioides*) (Tesis Ingeniería). UNALM, Lima, Perú.
- Acosta, L. (2006). Plantas medicinales - oportunidades y perspectivas de mercado (en línea, blog). *Herbotecnia*. Recuperado de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-012.html>
- Adji, L.; Karapandzova, M.; Jovanova, B.; Stefkov, G.; Cvetkovikj, I.; Kadifkova, T.; Kulevanova, S. (2015). Antioxidative potential of *Chenopodium botrys* L. (Amaranthaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 61(2):3-10. Doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2015.61.02.001
- Albuquerque, U.; Patil, U.; Máthé, A. (2018). *Medicinal and Aromatic Plants of South America*. 1St edition. Mosonmagyaróvár, Hungary. Recuperado de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-024-1552-0>
- Alitonou, G.; Sessou, P.; Tchobo, P., Noudogbessi, J. (2012). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 2(8):58-66. Recuperado de [https://agritrop.cirad.fr/565217/1/document\\_565217.pdf](https://agritrop.cirad.fr/565217/1/document_565217.pdf)
- Al-Kaf, A.; Ann Crouch, R.; Denkert, A.; Saeed, O. (2016). Chemical composition and biological activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* from Yemen. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(1):20-22. Recuperado de <https://aromaticplant.org/assets/chenopodium-ambrosioidesajeonp-2016-41-20-22.pdf>

- Almeida, J. (2013). Avaliação do potencial antioxidante e osteoindutor do extrato do mastruz (Tesis de Maestría, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil). Recuperado de <http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/bitstream/tede/1950/1/PDF%20-%20Jessica%20Maria%20de%20Melo%20Almeida.pdf>
- Amaral, J.; Casal, S.; Torres, D.; Seabra, R.; Oliveira, B. (2005). Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. The Japan Society for Analytical Chemistry. *Analytical Sciences* 21: 1545-1548. Doi: 10.2116/analsci.21.1545
- Antognoni, F.; Faudale, M.; Poli, F.; Biondi, S. (2008). Methyl jasmonate differentially affects tocopherol content and tyrosine amino transferase activity in cultured cells of *Amaranthus caudatus* and *Chenopodium quinoa*. *Plant Biology*, 11(2):161–169. Doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00110.x
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). (2016). Official methods of analysis of AOAC International. 20 Th edition. Washington DC.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Revista Botánica de la Sociedad Linneana*, 181:1-20. Doi: <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Arnao, M.; Cano, A. y Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry*, 73(2):239-244. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61:92–103. Doi: 10.1016/j.mam.2017.06.004
- Bajpai, L.; Varshney, M.; Seubert, C.; Stevens, S.; Johnson, J.; Yost, R.; Dennis, D. (2005). Mass spectral fragmentation of the intravenous anesthetic propofol and structurally related phenols. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(6):814–824. Doi: 10.1016/j.jasms.2005.02.009
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191–203. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barros, L.; Pereira, E.; Calhelha, R.; Dueñas, M.; Carvalho, A.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4):1732-1740. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>



- Beltrán, E.; Matute, E.; Andrade, M.; Rubio, D. (2017). Efecto de la Radiación UV-C en la Flora Nativa y Capacidad Antioxidante de la Mezcla para Té Compuesto por Toronjil, Ortiga, Perejil y Paico Provenientes de Cotacachi - Ecuador. *Revista Politécnica*, 39(1). Recuperado de <https://revistapolitecnica.epn.edu.ec/images/revista/volumen39/tomo1/816.pdf>
- Benavides, O.; Villota, J.; Tovar, D. (2010). Caracterización del aceite esencial presente en las hojas de *Phyllanthus nodiflorus* (L.) Greene (OROZUL). *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1(12):57-64. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-71072010000100008&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-71072010000100008&script=sci_abstract&tlng=pt)
- Boutkhil, S.; El Idrissi, M.; Amechrouq, A.; Chbicheb, A.; Chakir, S.; & EL Badaoui, K. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Acta Botanica Gallica*, 156(2): 201–209. Doi: <https://doi.org/10.1080/12538078.2009.10516151>
- Bukunmi, A.; Adetutu, A.; Olusoji, A. (2017). Phytochemical and Proximate Analysis of Some Medicinal Leaves. *Clinical Medicine Research*. 6(6):209-214. Doi: [10.11648/j.cmr.20170606.16](https://doi.org/10.11648/j.cmr.20170606.16)
- Bussmann, R.; Vega, C.; Téllez, C.; Monigatti, M. (2013). Uso de plantas medicinales en los andes norte del Perú. Trujillo, Perú. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Rainer\\_Bussmann/publication/329028899\\_Uso\\_de\\_plantas\\_medicinales\\_en\\_los\\_Andes\\_norte\\_del\\_Peru/links/5bf1b193299bf1124fdc0a05/Uso-de-plantas-medicinales-en-los-Andes-norte-del-Peru.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rainer_Bussmann/publication/329028899_Uso_de_plantas_medicinales_en_los_Andes_norte_del_Peru/links/5bf1b193299bf1124fdc0a05/Uso-de-plantas-medicinales-en-los-Andes-norte-del-Peru.pdf)
- Cabrera, Y. (2017). Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) de la provincia de Loja (Tesis Lic., Univ. Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador). Recuperado de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/17495>
- Cartea, M.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 15: 251-280. Doi: [10.3390/molecules16010251](https://doi.org/10.3390/molecules16010251)
- Chacaliza-Rodríguez, L.; Espinoza-Begazo, G.; Ramos-Escudero, F.; Servan, K. (2016). *Research Journal of Medicinal Plant*, 10(8): 450-456. Doi: <https://doi.org/10.3923/rjmp.2016.450.456>
- Chacón, T. (2003). Características del aceite esencial de palo rosa (*Aniba roseodora* Ducke) obtenido por dos métodos de destilación (Tesis ingeniería). UNALM, Lima, Perú.

- Chen, Y.; Yu, H.; Wu, H.; Pan, Y.; Wang, K.; Jin, Y.; Zhang, C. (2015). Characterization and Quantification by LC MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules*, 20:18352-18366. Doi: 10.3390/molecules201018352
- Chirinos, R; Campos, D; Costa, N; Arbizu, C; Pedreschi, R; Larondelle, Y. (2008). Phenolic profiles of Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 106:1285-1298. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.024>
- Cho K.; Lim, Y.; Lee K.; Lee, J; Lee, J.H.; Lee, I. (2017). Terpenes from Forests and Human Health (en línea). *Journal Toxicological Research*, 33(2):97-106. Doi: 10.5487/TR.2017.33.2.097
- Chu, S.; Hu, J.; Liu, Z. (2010). Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag Sci*. 67:714–71.
- Coaquira, J.; Bustinza, L.; Silva, R.; Corimayhua, A. (2017). Extraction of total phenolic compounds of peruvian quinoa leaves (*Chenopodium quinoa* Willd.). Conferencia llvada a caboo en el 12 Simposio Latino Americano de Ciencia de Alimentos. Brasil. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/321061760\\_EXTRACTION\\_OF\\_TOTAL\\_PHENOLIC\\_COMPOUNDS\\_OF\\_PERUVIAN\\_QUINOA\\_LEAVES\\_Chenopodium\\_quinoa\\_Willd](https://www.researchgate.net/publication/321061760_EXTRACTION_OF_TOTAL_PHENOLIC_COMPOUNDS_OF_PERUVIAN_QUINOA_LEAVES_Chenopodium_quinoa_Willd)
- Coronado, M.; Vega, S.; Gutiérrez, R.; Vásquez, M.; Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2):206-212. Doi:10.4067/s0717-75182015000200014
- Craft, B; Kerrihard, AL; Amarowicz, R; Pegg, R. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Journal of Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety*, 11:148-173. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>
- Damasceno, R.; Moraes, M.; Assunção, M.; Lira, L. (2014). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. grown in Recife-PE, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacia* 95:855-866. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/303709849\\_Chemical\\_composition\\_of\\_the\\_essential\\_oil\\_from\\_leaves\\_of\\_Chenopodium\\_ambrosioides\\_L\\_grown\\_in\\_Recife-PE\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/303709849_Chemical_composition_of_the_essential_oil_from_leaves_of_Chenopodium_ambrosioides_L_grown_in_Recife-PE_Brazil)

- Dar, A.; Choudhury, A.; Kancharla, P.; Arumugam, N. (2017). The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Frontiers in Plant Science*, 8:1789. Doi: 10.3389/fpls.2017.01789
- Das, U. (2006). Essential Fatty acids - a review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7:467-482. Doi: 10.2174/138920106779116856
- De Andrade, J. Graças, M.; Batista, L.; De Castro, E.; Teixeira, M.; Ferreira, M. (2016). Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. *Revista Acta Scientiarum* 38(2):139-147. Doi: 0.4025/actascibiols.v38i2.28303
- De la Rosa, L.; Álvarez-Parrilla, E.; García-Fajardo, J. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 22: 1-13. Doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179>
- Dembitsky, V.; Shkrob, I.; Hanus, L. (2008). Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 152(2):209-15. Doi: 10.5507/bp.2008.032
- El-Kareem, M.; El Fattah, M.; Mohamed, E.; El-monem, E.; El-Khateeb, A. (2016). Application of GC/EIMS in Combination with Semi-Empirical Calculations for Identification and Investigation of Some Volatile Components in Basil Essential Oil. *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, 71(9):2155-2161. Doi: 10.4236/ijamsc.2016.41002
- Engelking, L. R. (2015). *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. Academic Press. 3ra. Ed. Recuperado de [https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780123848529/01~Front\\_Matter.pdf](https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780123848529/01~Front_Matter.pdf)
- Fang, N.; Yu, S.; Prior, R. (2002). LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3579–3585. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf0201327>
- Ferrazzano, G.; Amato, I.; Ingenito, A.; Zarrelli, A.; Pinto, G.; Pollio, A. (2011). Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Journal Molecules*, 16: 1486-1507. Doi: 10.3390/molecules16021486
- Flores-Flores, J.; López-Rodríguez, B.; Hernández-López, D.; Guzmán-Maldonado, S. (2019). Caracterización fenólica y capacidad antioxidante de plantas de uso

- medicinal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4:834-840. Doi: <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1493>
- Frete, F. (2010). Plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de producción comercial. Unidad de Comunicaciones del Programa Paraguay Vende, Paraguay. 59 p. Recuperado de <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1006489>
- Fritsche, S.; Wang, X.; Jung, C. (2017). Recent Advances in our Understanding of Tocopherol Biosynthesis in Plants: An Overview of Key Genes, Functions, and Breeding of Vitamin E Improved Crops. *Antioxidants (Basel)*, 6(4): 99. Doi: 10.3390/antiox6040099
- Galanakis, C. (2017). Chapter 1. Introduction. Editorial Elsevier. 1 ed. *Nutraceutical and Functional Food Components*. London, United Kingdom. Recuperado de <https://www.elsevier.com/books/nutraceutical-and-functional-food-components/galanakis/978-0-12-805257-0>
- García, R.; Lemus, I.; Rivera, P.; Erazo, S. (1997). Biological and chemical study of paico (*Chenopodium chilense*, Chenopodiaceae). *Journal of Ethnopharmacol* 57(2):85-88. Doi: 10.1016/s0378-8741(97)00049-4
- Garza, J. (2014). Evaluación de la actividad antiprotozoaria de plantas con antecedentes etnobotánicos en México (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México). Recuperado de <https://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/16684>
- Gawlik-Dziki, U.; Swieca, M.; Sulkowski, M.; Dziki, D.; Baraniak, B.; Czyz, J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts in vitro study. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 57:154-160. Doi: 10.1016/j.fct.2013.03.023
- Gbolade, A.; Tira-Picos, V.; Noguera, J. (2010). Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* herb essential oil from Nigeria, 46(4):654-655. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9704-4>
- Ghareib, H.; Abdelhamed, M.; Ibrahim, O. (2010). Antioxidative effects of the acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. *Journal Weed Biology and Management*, 10:64-72. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2010.00368.x>
- Gómez, J. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y*

- Aromáticas, 7(1):3-9. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85670103>
- Gómez, M. (2015). Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos (Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/33529/1/T36516.pdf>
- González-Torres, M.; Betancourt-Rule, M.; Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Revista Bioquímica*, 25(1):3-9. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/576/57611797001.pdf>
- Guerrero, J.; Torija, M. (1997). Nutritional composition of leaves of *Chenopodium* species (*C. album*L., *C. murale*L. and *C. opulifolium*Shraeder). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 48(5):321–327. Doi: <https://doi.org/10.3109/09637489709028578>
- Guil, J. Torija, M.; Giménez, J.; Rodríguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 719(1):229-235. Doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00414-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00414-9)
- Guil-Guerrero, J.; Rodríguez-García, I. (1999). Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants. *European Food Research and Technology*, 209(5):313–316. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002170050501>
- Han, X.; Shen, T.; Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int International Journal of Molecular Sciences*, 8(9): 950–988. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3871896/#>
- Harborne, J.; Boardley, M. (1984). Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates. *Journal of Chromatography A*, 299: 377–385. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97853-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97853-7)
- Harraz, F.; Hammoda, H.; Ghazouly, M.; Farag, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Research*, 29(9): 879–882. Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.988714>
- Hollman, P. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81:842-852. Doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.900>
- Hollman, P.; Katan, M. (1999). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radical Research*, 31:75-80. Doi. 10.1080/10715769900301351

- Hossain, M.; Rai, D.; Brunton, N.; Martin-Diana, A.; Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of Phenolics Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (19):10576–10581. Doi: 10.1021/jf102042g
- Huang, D; Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huet, C. (2017). Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas (Tesis Licenciatura, Universidad Complutense, Madrid, España). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/54713/>
- Hvattum, E.; Ekeberg, D. (2002). Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 38(1):43–49. Doi: 10.1002/jms.398
- Ibarra, M.; Paredes, E. (2013). Eficacia antibacteriana in vitro de marco y paico en una formulación cosmética (Tesis ingeniería, Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Ecuador). Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6007>
- Jang, M.; Mee, S. & Ku, D. (2011). Antidiabetic effect of *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Phytopharmacology* 1(2):12-15. Recuperado de <http://inforesights.com/phytopharmacology/files/3.pdf>
- Jaramillo, B.; Duarte, E.; Degado, W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(1):54-64.
- Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Fleischacker, W.; Vijay, K. (2012). Analysis of the essential oil of the leaves of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* (L.) A. Gray from India. *Sci Pharm*. 68(1):123-128.
- Jukić, M.; Kraljić, K.; Škevin, D. (2016). Tocopherols: Chemical Structure, Bioactivity, and Variability in Croatian Virgin Olive Oils. *Products from Olive Tree*. Chapter 17. 317-329.
- Kari, E., Miettinen, P., Yli-Pirilä, P., Virtanen, A., & Faiola, C. L. (2018). PTR-ToF-MS product ion distributions and humidity-dependence of biogenic volatile organic compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*. 430 (2018):87–97.
- Kasali, A.; Ekundayo, O.; Paul, C.; König, W.; Eshilokun, W.; Ige, B. (2006). 1,2:3,4-Diepoxy-p-menthane and 1,4-Epoxy-p-menth-2-ene: Rare Monoterpenoids from the

- Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var *ambrosioides* Leaves. *Journal of Essential Oil Research* 18(1):13-15.
- King, A. & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemical. *Journal of the American Dietetic Association*. 99:213-218.
- Kiyama, R. (2017). Estrogenic terpenes and terpenoids: pathways, functions and applications. *European Journal of Pharmacology* 815(15):405-415.
- Koiwai, A.; Suzuki, F.; Matsuzaki, T.; Kawashima, N. (1982). The Fatty Acid Composition of Seeds and Leaves of *Nicotiana glauca* Species. *Phytochemistry*. 22(6):1409-1412.
- Kokanova-Nedialkova, Z.; Nedialkov, P. & D Nikolov, S. (2009). The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Journal of Pharmacognosy Reviews* 3(6): 280–306.
- Koley, T.; Khan, Z.; Oulkar, D.; Singh, B.; Maurya, A.; Singh, B.; Banerjee, K. (2017). High resolution LC-MS characterization of phenolic compounds and the evaluation of antioxidant properties of a tropical purple radish genotype. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Kris-Etherton, P.; Hecker, D.; Bonanome, A.; Coval, S.; Binkoski, A.; Hilpert, K.; Griel, A.; Etherton, T. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*. 113 (9): 71-88.
- Kumar, M.; Branton, A.; Trivedi, D.; Nayak, G.; Panda, P.; Jana, S. (2016). Mass Spectrometric Analysis of Isotopic Abundance Ratio in Biofield Energy Treated Thymol. *World Journal of Applied Chemistry*. 1(1):1-8.
- Laghari, A.; Memon, S.; Nelofar, A.; Khan, K.; Yasmin, A. (2011). Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Journal Food Chemistry*. Vol. 126(4):1850-1855.
- Lemańska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zieliński, R.; Soffers, A.; Rietjens, I. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(7):869–881.
- León, Z. (2009). Estudio de la extracción y determinación de la composición química del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides* L.). *Revista Ciencia y Tecnología* 12(1):6-12.
- Li, H.; Deng, Z.; Liu, R.; Zhu, H.; Draves, J.; Marcone, M. 2015. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and

- stalk extracts of three *Amaranthus* species. *Journal of Food Composition and Analysis*. 37(2015):75–81.
- Lima, E.; Sousa, K.; Richardson da Silva, L.; Sena, C.; Soares, L.; Matins, A.; Sousa, I. (2011). Cicatrización de heridas con la utilización del extracto de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) y cobertura secundaria estéril de gasa en ratas. *Revista do ConScientiae Saúde* 10(3):441-448.
- Lima, I. H., T. Richardson and M. A. Stahmann. (1965). Fatty acids in some leaf protein concentrates. *J. Agr. Food Chem.* 13(2):143-145.
- Lin D.; Xiao M.; Zhao J.; Li Z.; Xing B.; Li X.; Kong M.; Li L.; Zhang Q.; Liu Y.; Chen H.; Qin W.; Wu H.; Chen, S. (2016). An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Journal Molecules*. Vol. 21(10): 1374.
- Lin, L.; Yang, Q.; Zhao, K.; Zhao, M. (2018). Identification of the free phenolic profile of Adlay bran by UPLC-QTOF-MS/MS and inhibitory mechanisms of phenolic acids against xanthine oxidase. *Food Chemistry* 253:108–118.
- Lodge, J.; Hall, W.; Jeanes, Y.; Proteggente, A. (2004). Physiological Factors Influencing Vitamin E Biokinetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031(1):60–73. Doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1331.006>
- Magalhaes, L; Segundo, M; Reis, S; Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613:1-19. Doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047
- March, R. & Miao, X. (2004). A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*. 231(2-3):157–167. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.10.008>
- Mbamalu, O.; Antunes, E., Silosini, N., Samsodien, H.; Syce, J. (2016). HPLC Determination of Selected Flavonoid Glycosides and their Corresponding Aglycones in *Sutherlandia frutescens* Materials. *Medicinal & Aromatic Plants*, 5(3):246. Doi: 10.4172/2167-0412.1000246
- Mei, C.; Michaud, M.; Cussac, M.; Albrieux, C.; Gros, V.; Maréchal, E.; Rébeillé, F. (2015). Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. *Scientific Reports*. 6(1). Doi: 10.1038/srep15207
- Mercado, G.; De la rosa, L.; Wall, A.; López, J. y Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México.



- Revista de Nutrición Hospitalaria. 28(1):36-46. Doi: <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Mewalal, M.; Rai, D.; Kainer, D.; Chen, F.; Külheim, C.; Peter, G.; Tuskan, G. (2017). Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Journal of Trends in Biotechnology*, 35(3):227-240. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>
- Michotte, D. (2009). Etude de la stabilité oxydative de l'huile de lin en présence de composés phénoliques naturels (Tesis Bioingeniería en Agronomía, Université Catholique de Louvain, Lovaina, Bélgica). Recuperado de <https://www.escavador.com/sobre/9795118/damien-michotte>
- Miossi, V.; Vidal, A.; Tebaldi de Queiroz, V.; Fontes, P.; Pratisoli, D. (2012). Composição química e avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* no controle de *Frankliniella schultzei*. *Revista do Enciclopédia Biosfera*, 8(15):2450-2458. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2371/237138297017.pdf>
- Mosyakin, S. & Clemants, S. (2002). New nomenclatural combinations in *Dysphania* R. Br. (*Chenopodiaceae*): taxa occurring in North America. *Ukrainian Botanical Journal*. 59(4):380–385. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/272417640\\_New\\_nomenclatural\\_combinations\\_in\\_Dysphania\\_RBr\\_Chenopodiaceae\\_Taxa\\_occurring\\_in\\_North\\_America](https://www.researchgate.net/publication/272417640_New_nomenclatural_combinations_in_Dysphania_RBr_Chenopodiaceae_Taxa_occurring_in_North_America)
- Muhayimana, A.; Chalchat, J.; Garry, R. (1998). Chemical Composition of Essential Oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda. *Journal of Essential Oil Research*. 10(6):690–692. Doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9701011>
- Mujica, E. (2011). Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España). Recuperado de <https://repositorio.uam.es/handle/10486/10785>
- Nascimento, F.; Cruz, G.; Pereira, P.; Maciel M.; Silva, L.; Azevedo, A.; Barroqueiro, E.; Guerra, R. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Journal Life Sciences*, 78(22):2650-2653. Doi: [10.1016/j.lfs.2005.10.006](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.006)
- Nascimento, J.; Barros, A.; Porfirio, G.; Vidl, A.; Cardoso, L.; Freire, I. (2017). Extrato etanólico e óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no controle de *Ancylostoma* spp. de cães. *Ciências Agrárias*, 38(4): 1947-1953. Doi: [10.5433/1679-0359.2017v38n4p1947](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1947)

- Ninfali, p.; Mea, G.; Giorgini, S.; Rocchi, M.; Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*, 93:257–266. Doi: 10.1079/bjn20041327
- Nöthlings, U.; Murphy, S.; Wilkens L.; Henderson, B.; Kolonel, L. (2007). Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 166(8):924-931. Doi: 10.1093/aje/kwm172
- Nunes, D.; Silva, T.; Silva, A.; Ribeiro, B.; Ferreira, A.; Mendonça, A.; Nassar, R.; Romero, C.; Nicolete, R.; Fernandes, R. (2016). Potencial antipalúdico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitology Research*, 115(11):4327–4334. Doi: 10.1007/s00436-016-5216-x
- Okuyama, E.; Umeyama, K.; Saito, Y.; Yamazaki, M.; Satake, M. (1993). Ascaridole as a pharmacologically active principle of "Paico," a medicinal Peruvian plant. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 41(7):1309–1311. Doi:10.1248/cpb.41.1309
- Ortega-Ramirez, L.; Rodriguez-Garcia, I.; Leyva, J.; Cruz-Valenzuela, M.; Silva-Espinoza, B.; Gonzáles-Aguilar, G.; Siddiqui, W.; Ayala-Zavala, J. (2014). Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *Journal of Food Science*, 79(2):R129–R137. Doi:10.1111/1750-3841.12341
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619-4626. Doi: 10.1021/jf010586o
- Pandey, S.; Gupta, R. (2014). Screening of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Chenopodium album* (Bathua). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(3):1-9. Recuperado de [https://www.phytojournal.com/vol3Issue3/Issue\\_sep\\_2014/21.11.pdf](https://www.phytojournal.com/vol3Issue3/Issue_sep_2014/21.11.pdf)
- Peñarrieta, M.; Tejada, L.; Mollinedo, P.; Vila, J.; Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2):68-81. Recuperado de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0250-54602014000200006](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006)
- Pietrzak, W.; Nowak, R.; Gawlik-Dziki, U.; Lemieszek, M.; Rzeski, W. (2017). LC-ESI-MS/MS Identification of Biologically Active Phenolic Compounds in Mistletoe

- Berry Extracts from Different Host Trees. *Molecules*, 22(4):624. Doi: 10.3390/molecules22040624
- Pino, J.; Marbot, R.; Rea, I. (2014). Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 15:213-214. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712118>
- Podolak, I.; Olech, M.; Galanty, A.; Zaluski D.; Grabowska, K.; Sobolewska, D.; Michalik, M.; Nowak, R. (2016). Flavonoid and phenolic acid profile by LC-MS/MS and biological activity of crude extracts from *Chenopodium hybridum* aerial parts. *Journal Natural Product Research*. Vol. 130(15):1766-70. Doi: 10.1080/14786419.2015.1136908
- Poonia, A.; Upadhayay, A. (2014). *Chenopodium album* Linn: review of nutritive value and biological properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7):3977–3985. Doi: 10.1007/s13197-014-1553-x
- Porter, J. W. & Spurgeon, S. L. (1961). Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. *Annual Review of Biochemistry*, 30(1), 525–548. Doi:10.1146/annurev.bi.30.070161.002521
- Posada, J. (2016). Mecanismos de reacción y biogénesis de terpenos con posible actividad sobre receptores opioides (Tesis doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México). Recuperado de <http://rdu.iquimica.unam.mx/handle/20.500.12214/558>
- Pradhan, S.; Manivannan, S.; Tamang, J. (2015). Proximate, mineral composition and antioxidant properties of some wild leafy vegetables. *Journal of scientific and industrial research*, 74(3):155-159. Recuperado de <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/30726>
- Prakash, D.; Nath, P.; Pal, M. (1993). Composition, Variation of Nutritional Contents in Leaves, Seed Protein, Fat and Fatty Acid Profile of *Chenopodium* Species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(2), 203–205. Doi:10.1002/jsfa.2740620214
- Prior, R.; Cao, G. (1999). Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220(4):255–261. Doi:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-44.x

- Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10):4290–4302. Doi:10.1021/jf0502698
- Quiñonez, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 27(1):76-89. Recuperado de [http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n1/09\\_revision\\_08.pdf](http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n1/09_revision_08.pdf)
- Hou, S.Q.; Li, Y.H.; Huang, X.Z.; Li, R.; Lu, H.; Tian, K.; Ruan, R.; Li, Y.K. (2017). Polyol monoterpenes isolated from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Natural Product research*, 31(21):2467–2472. Doi: 10.1080/14786419.2017.1314278.
- Rajurkar, N.; Hande, S. (2011). Estimation of Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Some Selected Traditional Indian Medicinal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73 (2): 146-151. Doi: 10.4103/0250-474x.91574
- Ramos-Hryb, A.; Cunha, M.; Kaster, M.; Rodrigues, A. (2018). Chapter 6: Natural Polyphenols and Terpenoids for Depression Treatment: Current Status. Ed. Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/321074822\\_Natural\\_Polyphenols\\_and\\_Terpenoids\\_for\\_Depression\\_Treatment\\_Current\\_Status](https://www.researchgate.net/publication/321074822_Natural_Polyphenols_and_Terpenoids_for_Depression_Treatment_Current_Status)
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10):1231–1237. Doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Reyes, M.; Gómez-Sánchez, I.; Espinoza, C.; Brasvo, F.; Ganoza, L. (2009). *Tablas Peruanas de Composición de Alimentos*. Ministerio de Salud del Perú, Perú. Recuperado de <https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla%20de%20Alimentos.pdf>
- Riaz, M. N., Asif, M., & Ali, R. (2009). Stability of Vitamins during Extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4):361–368. Doi: 10.1080/10408390802067290
- Rimetz-Planchon, J., Dhooghe, F., Schoon, N., Vanhaecke, F., & Amelynck, C. (2011). MS/MS studies on the selective on-line detection of sesquiterpenes using a Flowing Afterglow–Tandem Mass Spectrometer (FA-TMS). *Atmospheric Measurement Techniques*, 4(4):669–681. Doi: <https://doi.org/10.5194/amt-4-669-2011>

- Rodríguez–Cruz, M.; Tovar, A.; Del Prado, M.; Torres, N. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de investigación clínica*, 57(3):457-472. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/ric/v57n3/v57n3a10.pdf>
- Ros, G.; Martínez, C.; Valencia, J. (2011). Biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena corta: mecanismos de absorción. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 24:125-134. Recuperado de <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/9453>
- Sagrero-Nieves, L.; Bartley, J. (2015). Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 221–223. Doi:10.1080/10412905.1995.9698506
- Singh, B.; Sharma, R. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *Journal 3 Biotech*, 5(2): 129–151. Doi:10.1007/s13205-014-0220-2
- Singleton, V.; Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158. Recuperado de <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Šircelj, H.; Mikulic-Petkosek, M.; Veberic, R.; Hudina, M.; Slatnar, A. (2018). Lipophilic antioxidants in edible weeds from agricultural areas. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(1):1-10. Doi. 10.3906/tar-1707-25
- Škerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hraš, A.; Simonič, M.; Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89(2):191–198. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025>
- Soares, M.; Dias, H.; Vieira, T.; De Souza, M.; Cruz, A.; Badoco, F.; Crotti, A. (2017). Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). *Chemistry & Biodiversity*. 14(8). Doi: 10.1002/cbdv.201700149
- Ching, L. & Mohamed, S. (2001). Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6):3101–3105. doi:10.1021/jf000891u
- Soto, M.; Moure, A.; Dominguez, H.; Parajo, J. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105(1):1-27. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010>

- Speisky, H.; Rocco, C.; Crrasco, C.; Lissi, E.; López-Alarcón, C. (2006). Antioxidant Screening of Medicinal Herbal Teas. *Phytotherapy Research*, 20(6):462–467. Doi:10.1002/ptr.1878
- Tang, T.; Li, X.; Chen, P.; Zhang, B.; Hernandez, M.; Zhang, H.; Marcones, M.; Liu, R.; Tsao, R. (2014). Lipids, Tocopherols, and Carotenoids in Leaves of Amaranth and Quinoa Cultivars and a New Approach to Overall Evaluation of Nutritional Quality Traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(52), 12610–12619. Doi:10.1021/jf5046377
- Tani, A. (2012). Fragmentation and Reaction Rate Constants of Terpenoids Determined by Proton Transfer Reaction-mass Spectrometry. *Environment Control in Biology*, 51(1):23–29. Doi:10.2525/ecb.51.23
- Thao, N.; Kashiwagi, T.; Sawamura, M. (2007). Characterization by GC–MS of Vietnamese Citrus Species and Hybrids Based on the Isotope Ratio of Monoterpene Hydrocarbons. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9):2155–2161. Doi:10.1271/bbb.70069
- Thelen, J.; Ohlrogge, J. (2002). Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering*, 4(1):12–21. Doi:10.1006/mben.2001.0204
- Torres, A.; Ricciardi, G.; Agrelo, A.; Ricciardi, A. & Bandoni, A. (2003). Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (Paico). *FACENA*, 19:27-32. Recuperado de <http://exa.unne.edu.ar/revisfacena/19/27-32.pdf>
- Tselepi, M.; Papachristou, E.; Emmanouilidi, A.; Angelis, A.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, A.; Liadaki, K. (2011). Catalytic inhibition of eukaryotic topoisomerases I and II by flavonol glycosides extracted from *Vicia faba* and *Lotus edulis*. *Journal of Natural Products*. 74(11): 2362–2370. Doi: 10.1021/np200292u
- Ugás, R. (2014). 40 nuevas y viejas verduras para diversificar tu alimentación y nutrírte mejor. Recuperado de <http://www.lamolina.edu.pe/hortalizas/Agroeco/40Verduras.pdf>
- Valenzuela, A. & Nieto, S. (2003). Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista Chilena de Pediatría*, 74(2):149-157. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062003000200002>
- Valenzuela, R.; Tapia, G.; González, M.; Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista Chilena de Nutrición*, 38(3):356–367. Doi:10.4067/s0717-75182011000300011

- Van Den Berg, R.; Haenen, G.; Van Den Berg, H. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70:391-395. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00092-3)
- Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de Alimentación Saludable*. 1ra. Edición. Editorial Universidad de Antioquia. 619 p.
- Villalobos-Delgado, L.; Ramírez, D.; Salazar, A.; González, E.; Ramírez, J. (2016). Efecto antioxidante de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) en carne molida cruda. *Journal of Nacameh*, 10(2):35-48. Doi: [http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v10n2/Nacameh\\_v10n2p35\\_VillalobosD-et-al.pdf](http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v10n2/Nacameh_v10n2p35_VillalobosD-et-al.pdf)
- Villar, J. (1982). *Deshidratación comparativa por aire caliente y liofilización de un condimento a base de muña, huacatay y paico (Tesis ingeniería)*. UNALM, Lima, Perú.
- Vysochina, G. (2010). Flavonoids of the *Chenopodium* L. Genus of World Flora. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 36(7):787–792. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1068162010070010>
- Wan, W.; Abu, N., Mohd, N.; Almajano, M. (2019). Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Malaysian Herbs as Components of Active Packaging Film in Beef Patties. *Antioxidants (Basel)*, 8(7):204. Doi: 10.3390/antiox8070204
- Wojcikowski, W.; Stevenson, L.; Leach, D.; Wohlmuth, H.; Gobe, G. (2007). Antioxidant Capacity of 55 Medicinal Herbs Traditionally Used to Treat the Urinary System: A Comparison Using a Sequential Three-Solvent Extraction Process. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(1):103–110. Doi:10.1089/acm.2006.6122
- Wojdylo, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105:940-949. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Yang, W.; Cahoon, R.; Hunter, S.; Zhang, C.; Han, J.; Borgschulte, T.; Cahoon, R. (2011). Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *The Plant Journal*, 65(2):206–217. Doi:10.1111/j.1365-313x.2010.04417.x
- Zapata, S.; Pedrahita, A.; Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígenos (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Revista de Perspectivas*

- en *Nutrición Humana*, 16(1):25-36. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v16n1/v16n1a3.pdf>
- Zhang, R.; Liu, C.; Huang, T.; Wang, N; Mi, S. (2008). In Vitro Characterization of Borneol Metabolites by GC--MS Upon Incubation with Rat Liver Microsomes. *Journal of Chromatographic Science*, 46(5): 419–423. Doi: 10.1093/chromsci/46.5.419
- Zheng, W. & Wang, Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11):5165–5170. Doi:10.1021/jf010697n
- Zhu, W.; Zhao, K.; Chu, S.; Liu, Z. (2012). Evaluation of Essential Oil and its Three Main Active Ingredients of Chinese *Chenopodium ambrosioides* (Family: Chenopodiaceae) against *Blattella germanica*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 6(2):90–97. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547299/>
- Ziaková, A.; Brandsteterová, E.; Blahová, E. (2003). Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2):271–275. Doi:10.1016/s0021-9673(02)01712-0
- Zohra, T.; Ovais, M.; Talha, A.; Qasim, M.; Ayaz, M.; Zabta, K. (2018). Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Natural Product Research*, 1–7. Doi:10.1080/14786419.2018.1437428



## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES POR FOLIN-CIOCALTEU EN PAICO

Tabla de resultados para el contenido de Compuestos Fenólicos Totales

Compuesto	Repetición	Contenido	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/g bs)	R1	13.41	0.17	1.28
	R2	13.75		
	R3	13.64		

### ANEXO 2: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS ABTS Y ORAC EN HOJAS DE PAICO

Tabla de resultados para Capacidad Antioxidante (ABTS y ORAC)

Análisis	Repetición	Contenido ( $\mu\text{mol ET/g bs}$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS)	R1	94.31	1.40	1.50
	R2	91.71		
	R3	93.92		
Capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC)	R1	578.347	5.85	1.02
	R2	567.855		
	R3	568.619		

### ANEXO 3: CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS EN HOJAS DE PAICO

Tabla de resultados para el contenido de Terpenos

	Concentración (mg/100 g bs)			DE	Promedio	CV
	R1	R2	R3			
p-cymene	94.14	101.88	118.58	12.49	104.87	11.91
Alpha pinene	3.68	4.53	4.73	0.56	4.32	12.94
Alpha terpinene	1260.73	1503.94	1704.28	222.12	1489.65	14.91
Limonene	331.53	313.66	294.20	18.67	313.13	5.96
Gamma						
terpinene	3.91	4.68	4.94	0.54	4.51	11.86
Tymol	45.24	46.50	56.68	6.27	49.47	12.67
Carvacrol	21.84	21.89	24.98	1.80	22.90	7.86
Isoascaridol	7.17	8.55	8.86	0.90	8.19	10.97

### ANEXO 4: IDENTIFICACIÓN Y PORCENTAJE RELATIVO DE ÁCIDOS GRASOS EN HOJAS DE PAICO

Tabla de resultados para el contenido de Ácidos Grasos

Ácido graso	Porcentaje relativo (%)				Desviación estándar	Coeficiente de Variabilidad (%)
	R1	R2	R3	Promedio		
Ácido palmítico (C16:0)	25.96	26.71	26.22	26.30	0.38	1.45
Ácido oleico (C18:1)	2.34	2.69	2.37	2.47	0.20	7.93
Ácido linoleico (C18:2)	36.21	35.36	36.58	36.05	0.62	1.73
Ácido linolénico (C18:3)	35.49	35.24	35.84	35.52	0.30	0.85

## ANEXO 5: CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN HOJAS DE PAICO

Tabla de resultados para el contenido de Tocoferoles

Tocoferol	Contenido (ug/g bs)				Desviación estándar	Coeficiente de variabilidad (%)
	R1	R2	R3	Promedio		
$\alpha$ -Tocoferol	28.63	30.30	27.40	28.78	1.46	5.06
$\beta$ -Tocoferol	6.70	7.18	7.70	7.19	0.50	6.95
$\gamma$ -Tocoferol	8.55	7.48	7.85	7.96	0.54	6.81
$\delta$ -Tocoferol	3.34	3.01	3.46	3.27	0.23	7.14