

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR

TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA
GUTIÉRREZ CHIAPAS



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SEP

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

CON EL TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS
DE CHINCUYA (*ANNONA PURPUREA* L.) BIOFERTILIZADAS”**

MEDIANTE:

OPCION I

(TESIS PROFESIONAL)

DIRECTOR: DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS 7 DE OCTUBRE

INDICE

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	4
2.1	Chincuya (<i>Annona purpurea</i>)	4
2.1.1.	Descripción botánica	5
2.1.1.1	Calidad física y de germinación	6
2.1.1.2	Hábitat	7
2.1.1.3	Cultivo	7
2.1.1.4	Clasificación taxonómica	8
2.1.1.5	Fotoquímica de la familia annonáceae	8
2.1.2	Actividad antiradical	8
2.2	Compuestos polifenólicos	8
2.2.1	Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos	9
2.2.1.1	Ácidos fenólicos	9
2.2.1.2	Flavonoides	10
2.3	Determinación de compuestos polifenólicos	13
2.4	Radicales libres	16
2.4.1	Antioxidantes	19
2.4.2	Determinación de la capacidad antiradical	20
2.5	Vermicomposta	23
2.6	Roca fosfórica	25
2.6.1	El fósforo en el sistema suelo-planta	28
3.	Justificación	30
4.	Objetivos	31
4.1	Generales	31
4.2	Específicos	31
5.	Materiales y métodos	32
5.1	Material vegetal	32
5.2	Obtención de extractos	32
5.3	Análisis cuantitativo de compuestos polifenólicos	32
5.3.1	Estimación de fenoles totales	33

5.3.2	Estimación de flavonoides	33
5.3.3	Estimación de flavanonas	33
5.4	Actividad antiradical de extracto de <i>annona purpurea</i> mediante el radical DPPH (<i>2,2-difenil-1-picril-hidrazilo</i>)	34
5.5	Análisis estadístico	34
6	Resultados y discusión	35
6.1	Análisis fitoquímico cuantitativo de extracto de <i>Annona purpurea</i>	35
6.1.1	Estimación del contenido de fenoles totales	35
6.1.2	Estimación del contenido de flavonoides	36
6.2	Actividad antiradical de extracto de <i>Annona purpurea</i> (método del DPPH)	36
7	Conclusiones	41
8	Recomendaciones	42
9	Bibliografía	44
	Anexo	60

LISTA DE FIGURA

		4
Figura 1	Fruto y hojas de <i>Annonapurpurea</i> L.	
Figura 2	Diferentes estados de germinación en semillas de <i>Annona purpurea</i> .	5
Figura 3	Ácidos Fenólicos: Benzoicos (hidroxibenzoicos), cinnámicos (hidroxicinámicos) y derivados (estilbenos).	8
Figura 4	Esqueleto común difenil-pirano de flavonoides (Burdaand Oleszek, 2001).	9
Figura 5	Síntesis de naringenina; precursor de algunos grupos de flavonoides (Dewick, 2009).	11
Figura 6	Forma glucosilada de flavonoides (Dewick, 2009).	12
Figura 7	Complejos formados entre un flavonoide y el AlCl ₃ .	15
Figura 8	Eliminación del radical peroxil mediante su reacción con BHT	20
Figura 9	Fundamento del método del radical DPPH•	21
Figura 10	Estabilidad del radical fenoxil.	22
Figura 11	Grafica de análisis de varianza de comparación de medias de concentración de fenoles totales.	34
Figura 12	Grafica de análisis de varianza de comparación de medias de concentración de flavonoides totales.	35
Figura 13	Grafica Análisis de varianza de comparación de medias de porcentaje de inhibición antiradical por el método DPPH.	3 6

Lista de cuadros

Cuadro 1	Especies del genero <i>Annona</i> en el estado de Chiapas.	3
Cuadro 2	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno: importancia biológica	17

1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres, especies capaces de existir de forma independiente con uno o más electrones no apareados, y ciertas especies no radicales, caracterizadas por ser agentes oxidantes y/o fácilmente convertidos en radicales son conocidas con el termino de especies reactivas (ER). Algunos ejemplos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN respectivamente) son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH), el radical peroxilo (RO_2^{\cdot}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}), y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Halliwell, 2006). En organismos vivos las especies reactivas se pueden generar por mecanismos endógenos como la fuga mitocondrial, la explosión respiratoria, reacciones enzimáticas, reacciones de auto-oxidación, y por mecanismos exógenos como el humo de cigarrillo, la polución, la luz UV, las radiaciones de ionización y los xenobióticos. Debido a que los radicales libres usualmente son moléculas que, por la alta reactividad que les confiere su electrón desapareado, pueden reaccionar de una forma indiscriminada dañando cualquier componente celular, el cuerpo humano cuenta con un amplio sistema de defensa antioxidante (Young and Woodside, 2001). Las principales defensas antioxidantes contra los radicales libres son la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión (GSH), la GSH peroxidasa, la glutatión reductasa, la catalasa, y los nutrimentos antioxidantes (Fang et al. 2002).

Cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante, se genera una condición conocida como estrés oxidativo (EO). El EO se ha asociado con el daño a un amplio rango de moléculas que incluye los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estos daños finalmente se manifiestan en el desarrollo de varios desordenes de salud, tales como trastornos neurológicos, la aterosclerosis, condiciones inflamatorias, ciertos canceres, y el proceso del envejecimiento (Lobo et al. 2010).

En la industria alimenticia, cosmética y terapéutica, los antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitoulueno (BHT) se han utilizado ampliamente.

Sin embargo, algunas propiedades físicas indeseadas, como sus altas volatilidades y la inestabilidad a altas temperaturas así como la naturaleza carcinogénica de algunos de ellos, han desviado la atención de la industria hacia otra clase de antioxidantes.

El uso de antioxidantes provenientes de fuentes naturales ha tomado mayor importancia en la actualidad debido a que son de bajo costo, tienen una alta compatibilidad con la ingesta dietaria y no presentan efectos perjudiciales dentro del cuerpo humano (Lobo et al. 2010). Los antioxidantes naturales provenientes de la dieta que más se han estudiado son las vitaminas C, A, E y los carotenoides. Aparte de ellos, también se han estudiado otras sustancias que provienen de las plantas, dentro de los que se encuentran los polifenoles, los cuales representan una amplia variedad de moléculas que incluyen fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y lignanos (Pietta, 2010).

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituye un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Martínez et al. 2002).

El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller and Slebodzinska, 1993). Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, etcétera. (Narayama et al. 2001)

Las plantas medicinales juegan un papel fundamental en el cuidado de la salud de las culturas antiguas y modernas. Muchas plantas con potencial antioxidante poseen flavonoides y compuestos fenólicos. Algunas plantas han sido investigadas para buscar su potencial antioxidante.

Se ha encontrado que las hojas, raíces, corteza y hasta los frutos y semillas de algunas anonáceas contienen muchas sustancias químicas activas como acetogeninas, alcaloides, terpenos, flavonoides y aceites con propiedades insecticidas y medicinales (Kotkar et al. 2002; Pinto et al. 2005; Khaleqzaman and Sultana, 2006) Un análisis fitoquímico de la planta de *Annona purpurea* L. reveló la presencia de flavonoides y compuestos polifenólicos que están en los principales compuestos fitoquímicos. La pulpa de algunas anonas poseen proteínas, ácidos grasos, fibra, carbohidratos, minerales y vitaminas importantes para la dieta humana (Pinto et al. 2005).

2. Antecedentes

2.1 Chincuya (*Annona purpurea* L.)

La familia Annonaceae es una de las más grandes del orden Magnoliales, con alrededor de 2300 especies, distribuidas en 28 géneros (Orellana and Martínez, 2002; Escribano et al. 2004; Escribano et al. 2008). Tres géneros contienen especies con frutos comestibles. Dentro de estos se encuentra *Annona*, que contiene alrededor de 119 especies, la mayoría de las cuales son de distribución neotropical (Gentry, 1993; Escribano et al. 2004; Pinto et al. 2005). Las anonas son frutas tropicales y subtropicales nativas de Centro y Sur América (Bridg, 2001).

El herbario Nacional de México (Mexu) confiere un registro de 11 especies del género *Annona* para el estado de Chiapas; lo cual representa el 10% del total reportado para América (cuadro 1) (González- Esquinca, 1997)

Cuadro 1. Especies del genero *Annona* en el estado de Chiapas.

Especie	
<i>Annonacherimolia</i>	Chirimoya
<i>A.Diversifolia</i>	Papausa
<i>A.Globiflora</i>	
<i>A.Holosericae</i>	
<i>A.Lutescens</i>	Annona amarilla
<i>A.macrophyllata</i>	
<i>A.muricata</i>	Guanábana
<i>A.purpurea</i>	Chincuya
<i>A.reticulata</i>	Annona colorada
<i>A.scleroderma</i>	Annona de monte
<i>A.spraguei</i>	Chincuya de llano

Géneros de la misma familia como: *Cymbopetalum*, *Desmopsis*, *Guatteria*, *Malmea*, *Rollinea* y *Xilopia*, se encuentran también en la flora nativa del estado (Martínez, 1979; Breedlove, 1986)

2.1.1 Descripción botánica

El árbol es de pequeño a mediano de 6 a 10 metros de altura, con tronco corto de 45 cm de diámetro y ramas extendidas. Las hojas caducifolias alternadas, peciolos cortos, onduladas, de oblongo elípticas u oblongo lanceoladas a oblongo ovulado, de 20 a 30 cm de largo y de 10 a 14 cm de ancho, agudecidas en el ápice vellosidad de color café en ambas superficies y con prominentes venas en el envés. Flores fuertemente perfumadas, las cuales emergen con las hojas nuevas, son solitarias, succulentas, largas, cónicas, usualmente envueltas al principio por un par de brácteas; están cubiertas en la base por una vellosidad rojiza, cáliz dividido en tres partes, y tiene 3 pétalos exteriores muy gruesos con vellosidad café en la parte externa, con moteado amarillento y purpura, tres pequeños, delgados pétalos interiores, de color crema blanco en la parte de afuera, y purpura por dentro (Morton, 1987).

El fruto es grueso, ovoide en su periodo temprano, de 15 a 20 cm de ancho, protuberancias cónicas, cada una con curvatura en gancho, la pulpa es agradablemente aromática, sugestiva al mango, abundante de amarillo a anaranjado, blanca fibrosa y dulce. Numerosas semillas, ovaladas de 2.5- 3cm de largo, de café oscuro, cada una encerrada en una delgada membrana (Morton, 1987).



Figura 1. Fruto y hojas de *Annona purpurea* L.

2.1.1.1 Calidad física y de germinación

Calidad física. La cantidad promedio de semillas por kilogramo es de 1000. El porcentaje de germinación en semillas frescas varía de 30 a 40%.

La semilla tiene una viabilidad mediana. Germinación: la germinación es epigea y fanerocotilar y se inicia a 20 a 30 días después de la siembra

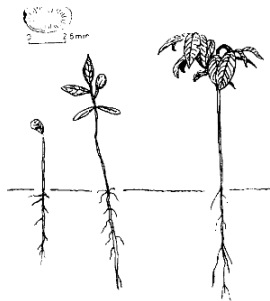


Figura 2. Diferentes estados de germinación en semillas de *Annona purpurea*.

Sexualidad Hermafrodita. Presenta protoginia, las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas; existe un período de 36 a 48 horas durante el cual se encuentran maduras ambas estructuras sexuales.

Distribución. Se distribuye en las tierras bajas del trópico. Altitud: 1,000 a 1,800 metros. Estados: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Querétaro, Tabasco, Veracruz, Yucatán, y parte de Centro América.

2.1.1.2 Hábitat

Prospera mejor en climas cálidos y húmedos. Crece en suelos con buen drenaje. Suelos: arenoso, limoso, arcilloso, arenisca. Se desarrolla en un PH ligeramente ácido de 5.5 a 6.5.

2.1.1.3 Cultivo

Las anonas se pueden propagar a partir de semilla, pero con frecuencia la variación entre los distintos árboles de la misma especie es grande. Las formas selectas se propagan normalmente por medio de injerto o estacas, la propagación asexual es más recomendable, porque se garantizan plantas con la misma identidad genética, con una mejor producción, y calidad de los frutos. Se les puede injertar en patrones de la misma especie, aunque en unos cuantos casos los injertos crecen mejor en patrones de otras especies (Ochse, 1986).

La distancia usual de siembra es más o menos de 5 a 6 metros puesto que los árboles se pueden adaptar fácilmente a formas arbustivas con una ligera poda.

Las plantas de anona tienden a formar muchas ramas, razón por la que se recomiendan durante los primeros tres años de establecimiento del cultivo podas de formación dejando de 3 a 4 ramas que formaran la estructura del árbol. Posterior a cada cosecha es recomendable una poda de mantenimiento para eliminar ramas dañadas y ramas que presenten una mala posición en la estructura del árbol.

Los árboles entran en producción más o menos al tercer año de su establecimiento. En muchos casos los árboles responden favorablemente a la aplicación de fertilizantes, dependiendo del tipo de suelo y del fertilizante a aplicar. Se debe proporcionar riego durante los periodos prolongados de sequía, para evitar la pérdida de follaje y consecuentemente de frutos. Cuando el árbol está en la fase de floración, todos los carpelos deben polinizarse para producir frutas bien formadas y llenas.

El incremento de tamaño y peso del fruto es proporcional al número de pistilos fertilizados (Cruz, 2002;Ochse, 1986).

2.1.1.4 Clasificación taxonómica (según Cronquist, citado por Jones 1987

Reino *Plantae*

División *Magnoliophyta*

Clase *Magnoliopsida(dicotiledóneas)*

Subclase *Magnolidae*

Orden *Magnoliales*

Familia *Annonaceae*

Genero *Annona*

Nombre científico *Annona purpurea* L.

Nombre común Chincuya

2.1.1.5 Fitoquímica de la familia *annonaceae*

Annonaceae es químicamente una de las familias de plantas tropicales menos estudiadas; hasta 1982 se tenían contabilizadas 320 metabolitos secundarios (destacando los alcaloides isoquinolinicos) aislados de 150 especies pertenecientes a 41 géneros (Leboeuf et al. 1982).

Sin embargo el descubrimiento de las acetogeninas provoco un renovado interés hacia esta familia, en particular y debido a las actividades biológicas que se desarrollan, estos compuestos son hoy una de las clases de productos naturales más estudiadas (Soog-Kim et al. 1998).

2.2 Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios en las plantas, con variadas estructuras químicas y actividad (Martínez-Valverde et al. 2000). Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relaciona con el consumo de alimentos vegetales.

En los vegetales, son metabolitos esenciales para el crecimiento, reproducción y como agentes protectores frente a la acción de patógenos (secretados como mecanismo de defensa) y los pigmentos como atrayentes de polinizadores (Dirzo, 1985; Martínez-Valverde et al. 2000; Martínez, 2010).

En los alimentos están directamente relacionados a la calidad sensorial de los productos alimenticios vegetales, tanto frescos como procesados. Contribuyen a las pigmentaciones de todos los vegetales, siendo las antocianinas responsables de las coloraciones roja, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y sus productos. Por otro lado, los taninos condensados o proantocianidinas son los que se asocian con la astringencia que presentan muchas frutas comestibles antes de la maduración, además del sabor característico que le da a los vinos, en los que contribuye con el sabor amargo y a la apreciación organoléptica de los mismos, pudiendo distinguir a un vino tinto de uno blanco.

2.2.1 Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos

La clasificación de los polifenoles está basada en la distinción entre compuestos no flavonoides (ácidos fenólicos, fenoles simples e hidroxicinámicos) y flavonoides, siendo los últimos quienes poseen una estructura más compleja; poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$.

2.2.1.1 Ácidos fenólicos

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos están caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos, es decir, están formados por un esqueleto carbonado C_6-C_3 ; esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, que a su vez se dividen en ácidos benzoicos (ácido gálico) (C_6-C_1) y ácidos cinámicos (ácidos cinámico, caféico y cumárico) quienes portan una cadena lateral insaturada (C_6-C_3), pero también incluyen a otros derivados fenólicos como los estilbenos (Figura 3). La reactividad de este tipo de molécula es debida tanto a la presencia de la función fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrógeno, presenta un carácter ácido, como al núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrofilias (Flanzy, 2003).

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos y derivados, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos condensados o proantocianidinas.

Pueden estar también en formas conjugadas (glucósidos) con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático;

Forma más común de hallar a esta clase de compuestos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los azúcares más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucurónico y galacturónico. Aunque también pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos o ácidos orgánicos (ácidos fenil-acéticos), aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos.

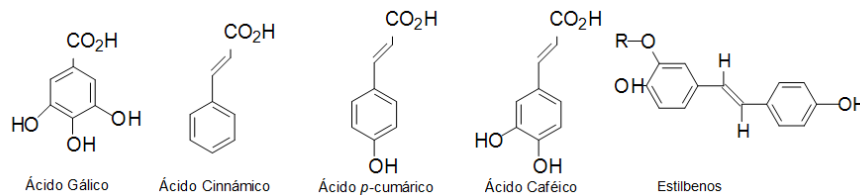


Figura 3. Ácidos Fenólicos: Benzoicos (hidroxibenzoicos), cinámicos (hidroxicinámicos) y derivados (estilbenos).

Los polifenoles cumplen ciertas funciones en los alimentos, incluyendo color y astringencia. La astringencia en frutos inmaduros se relaciona con los compuestos tánicos; grupo diverso de moléculas con pesos cercanos a 3000 Da que se forman de ácidos carbocíclicos, fenólicos y azúcares (Fennema, 2000). Suelen agruparse de acuerdo a su estructura química (Flanzy, 2003), aunque también a su forma de extracción (Martínez, 2010).

El segundo grupo de los polifenoles está integrado por los flavonoides; familia más amplia entre los polifenoles, con cerca de 5000 diferentes compuestos (Martínez-Valverde et al. 2000).

2.2.1.2 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*; amarillo) constituyen el grupo más importante dentro de la clasificación de los polifenoles. Son sustancias de origen vegetal que se hallan en forma libre (aglucona) o glucosilada en el líquido vacuolar, cloroplastos y membranas celulares.

Son responsables de la coloración (rojo, azul y amarillo) en flores y en las hojas en otoño, y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos UV, la contaminación ambiental y contra depredadores (Martínez-Flórez, 2002).

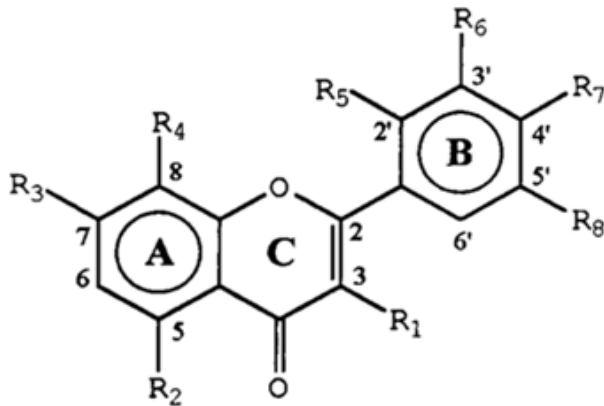


Figura 4. Esqueleto común difenil-pirano de flavonoides (Burdaand Oleszek, 2001).

Fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Györgyi, quien en 1930 aisló la citrina de la cáscara de limón; sustancia que regulaba la permeabilidad de los capilares. En un principio, los flavonoides fueron denominados como *vitamina P* (por permeabilidad), hecho que no pudo comprobarse y alrededor de 1950 se abandonó dicha denominación (Martínez-Flórez, 2002).

Su estructura está formada por un esqueleto difenil-pirano ($C_6-C_3-C_6$); dos anillos (**A** y **B**) que provienen ya sea de la ruta del acetato o la del shikimato, unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (**C**) (Figura 4).

Hasta ahora, esta familia incluye 13 tipos de flavonoides: chalconas, dihidrochalconas, uronas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles (flavononoles), flavanonas, flavanoles, flavonodiolos o leucoantocianidinas (4-flavanoles y 3,4-flavanodiolos), antocianidinas (antocianodiolos), isoflavonoides, biflavonoides y proantocianidinas o taninos condensados (Pérez-Trueba, 2003);

algunos de estos grupos tienen como precursor a la naringenina, que a su vez proviene de una chalcona formada por la elongación del ácido 4-hidroxicinámico y 3 unidades de malonil-CoA (Figura 5) (Dewick, 2009).

Las diferencias entre grupos es debida al grado de oxidación (sustituyentes -OH), naturaleza y número de alquilaciones, sustituyentes glucósidos y el grado de polimerización de la estructura carbonada.

Estructuras más complejas de estos compuestos forman polímeros conocidos como taninos, las cuales se clasifican ya sea como 'taninos condensados' o 'taninos hidrolizables'.

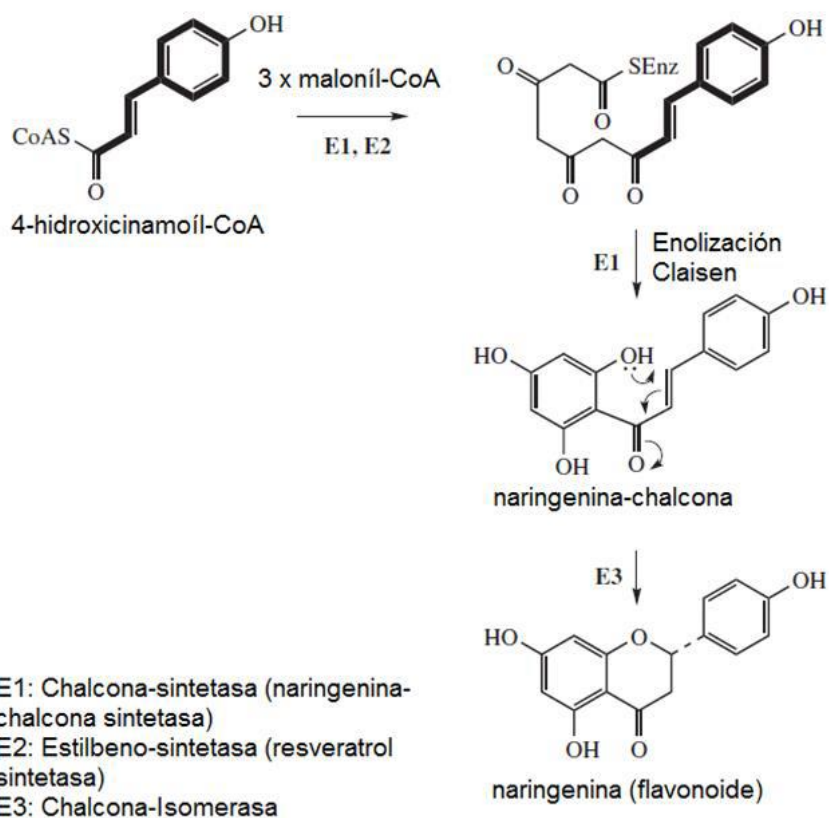


Figura 5. Síntesis de naringenina; precursor de algunos grupos de flavonoides (Dewick, 2009).

Ambos grupos pueden ser hidrolizados, la diferencia radica en los productos de diferente índole que se genera al hidrolizar cada uno.

En las plantas superiores, los flavonoides se hallan comúnmente en su forma glucosídica, esto quiere decir que están ligados con uno o más azúcares a un grupo hidroxilo (*O-glucósidos*) o directamente a uno de los carbonos del esqueleto común (*C-glucósidos*), lo que los hace solubles en agua, solventes orgánicos y mezclas alcohólico-acuosas (Martínez-Valverde et al. 2000; Andersen and Markham, 2006).

Ejemplos de flavonoides glucosilados son la rutina, en la que un disacárido [3-O-rutinoso o ramnosil-(α 1 \rightarrow 6)-glucosa] se une a la quercetina, y la naringina en el que el disacárido (7-O-neohesperidosa) se une a la naringenina (Figura 6)

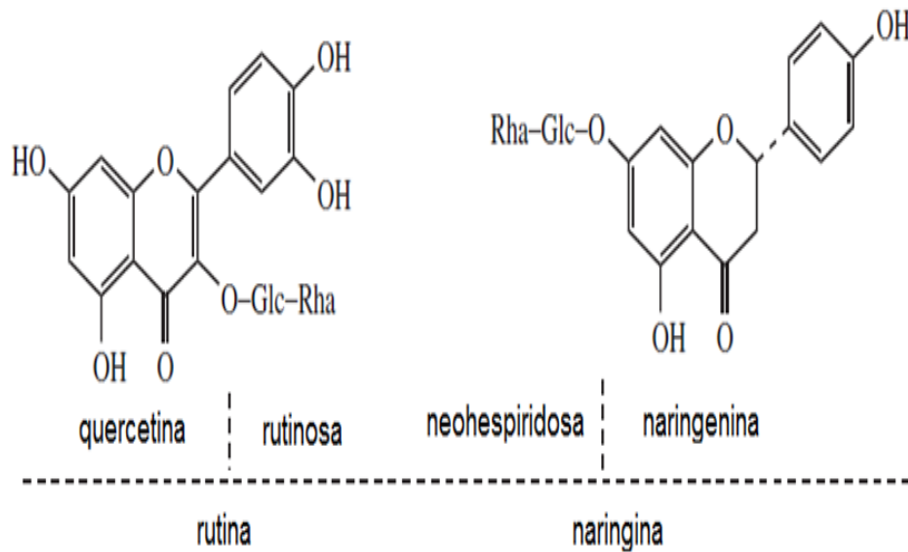


Figura 6. Forma glucosilada de flavonoides (Dewick, 2009).

El grado de saturación es lo que define las características que presentan todos los compuestos fenólicos. Su solubilidad está definida por el tipo de sustituyentes en la cadena carbonada;

es más soluble en su forma glucosilada que en la respectiva aglucona. Además, estudios han revelado que su actividad antioxidante y antirradical depende también de ello; grupos hidroxilo libres en posición C-3 dan a los flavonoles elevada actividad antioxidante, mientras que el doble enlace en C2-C3 y sustituyentes -OH libres en C-3' aumentan las características antirradicales (Burda and Oleszek, 2001).

2.3 Determinación de compuestos polifenólicos

Para la identificación de estos compuestos, muchos autores citan el uso de equipos avanzados como son el cromatógrafo de gases o el de líquidos de alta resolución. Estos equipos son costosos, pero precisos y confiables. Sin embargo, el uso de técnicas colorimétricas es de uso común en la fase inicial de un estudio fitoquímico, sobre todo si se trata de determinar concentraciones totales de familias de compuestos.

Para la elucidación de estructuras y cuantificación de estos compuestos se requiere el uso de variadas técnicas.

Por ejemplo, para el análisis de polifenoles en propóleo se ha empleado métodos colorimétricos, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (CG), espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (Chang et al. 2002); de esta manera, en los últimos años la mayoría de trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en dichos métodos cromatográficos. El equipo más empleado para separar y cuantificar estos compuestos es el HPLC (Martínez, 2010). Por supuesto, existe una amplia variedad de soportes y fases móviles disponibles, tanto para flavonoides, proantocianidinas, ácidos benzoicos y otros. Para su separación, las columnas más utilizadas son las de fase reversa C₁₈ (C₁₈: cadena lineal de 18 carbonos que componen la resina que se compacta en la columna) y fase normal de sílice, y como detectores habituales el UV/Vis con arreglo de diodos (DAD) y UV-fluorescencia, entre otros. La separación por HPLC muchas veces va acoplada con una caracterización estructural, para lo cual es necesaria la espectrometría de masas que varía de acuerdo a la fuente de ionización que se utilice. El espectrómetro de masas con ionizador por electro espray (ESI-MS)

fue empleado por Figueirinha et al. (2008) para la caracterización de flavonoides y otros polifenoles en extractos de *C. citratus*, utilizando también un detector con arreglo de fotodiodos (PDA), identificaron flavonoides O- y C-glucosilados, ácidos fenólicos, entre otros. Peñarrie7ta et al. (2007)

Emplearon cromatografía líquida usando una columna de fase reversa con un detector de arreglo de diodos UV-Vis (HPLC-DAD) para purificar compuestos fenólicos en alimentos.

Esta metodología es habitualmente empleada en la identificación y cuantificación de polifenoles presentes en sistemas acuoso-orgánicos de alimentos sólidos o bebidas. Sin embargo, la cuantificación de taninos condensados o proantocianidinas de alto peso molecular y polifenoles hidrolizables, principales compuestos polifenólicos presentes en los residuos de extracción, se ha basado hasta ahora en el empleo de métodos espectrofotométricos (Martínez, 2010). Así, la técnica colorimétrica empleada para determinar compuestos polifenólicos, se basa en la reacción que se da entre las estructuras que posean un anillo aromático y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1999), nombre con el cual se denomina la técnica. Los resultados suelen expresarse comparándose con un estándar como el ácido gálico, tánico o algún ácido benzoico similar, dependiendo la muestra analizada. El método se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, mezcla formada por óxido de tungsteno y molibdeno. El producto reducido del reactivo genera un complejo con coloración azul que presenta un pico de máxima absorción a 765 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de los fenoles que reaccionan. El desarrollo de color tras la reacción es lento, pero el proceso se puede acelerar mediante el calentamiento de la mezcla, sin embargo, si el calentamiento es excesivo la pérdida de coloración es inevitable, provocando que los resultados sean difíciles de reproducir (Waterhouse, 2002).

El método colorimétrico con tricloruro de aluminio (AlCl_3) y el de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH) fue empleado por Chang et al. (2002) para la determinación complementaria de flavonoides.

El tricloruro de aluminio forma complejos ácidos estables con el grupo ceto en C-4 o en grupos hidroxil libres en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, y aunque también puede reaccionar con el grupo hidroxilo C-5 de flavanonas, las absorbencias de los complejos generados son casi insignificantes.

Además, el tricloruro forma complejos ácido-lábiles con los grupos orto-dihidroxilo en los anillos A o B de los flavonoides; estos complejos muestran un máximo de absorberencia entre 415-440 nm; producto del efecto batocrómico del complejo con tricloruro de aluminio (Figura 7).

Los flavonoides en general poseen una coloración amarilla, cuya intensidad está relacionada al pH de la solución; mientras más básica sea ésta, la coloración será más intensa; característica que se aprovecha en su determinación. Una característica de los flavonoides que es de gran utilidad en su análisis, es la presencia del anillo aromático. Éste es un excelente cromóforo, y por consiguiente, absorbe en la región UV del espectro electromagnético, proveyéndonos de valiosa información estructural, con lo que se distingue el tipo de fenol y grado de oxidación en su estructura (Andersen and Markham, 2006).

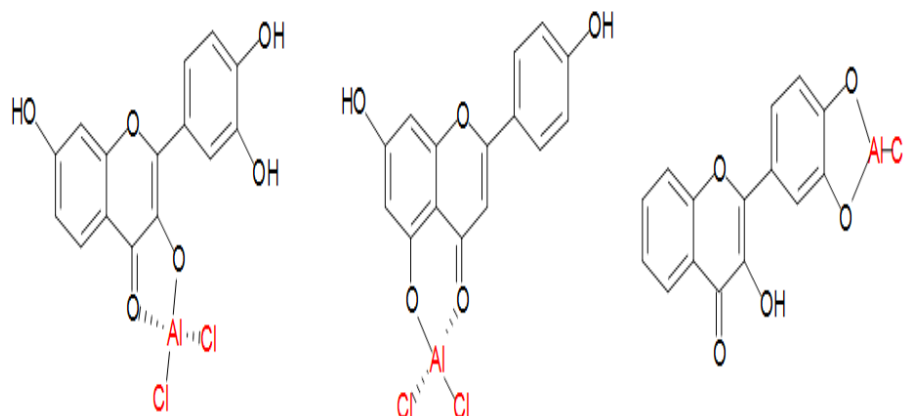


Figura 7. Complejos formados entre un flavonoide y el AlCl₃.

2.4 Radicales libres

Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones no apareados en los orbitales externos. Se forman por pérdida (oxidación) o ganancia (reducción) de un electrón, o cuando se rompe una unión covalente entre dos átomos.

Independientemente del mecanismo de formación, ese electrón desapareado desestabiliza al átomo, ya que aumenta su contenido energético; dándole la propiedad reactiva que lo caracteriza. Para pasar a un estado menos energético, el radical busca su estabilidad aceptando o cediendo el electrón que provoca su estado reactivo; dicho proceso lo logra reaccionando con casi cualquier molécula que esté cerca, causando la desestabilización de la segunda molécula, y por ende la formación de otro radical, generándose así una reacción en cadena.

En los sistemas biológicos, los radicales existentes son variables. Mediante el metabolismo celular se producen ER y ERO por reacciones químicas, acción enzimática o por efecto de las radiaciones ionizantes (Venereo, 2002), además de factores externos como la radiación solar (Rayos UVA-B), contaminación ambiental, el tabaco y la alimentación (productos ricos en grasas saturadas). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen a todas las moléculas derivadas del oxígeno, a los radicales y no radicales.

Las principales ERO o sustancias pro-oxidantes se resumen en el Cuadro 2 (Venereo, 2002; Devasagayam et al. 2004; Cabrera Silva et al. 2006; Benezet et al. 2008).

El daño en el organismo es producido cuando existe un estrés oxidativo; desequilibrio entre pro-oxidantes (RS y RNO) y antioxidantes (vitaminas, carotenos, polifenoles, trazas metálicas, etc.), esto significa que la velocidad de eliminación de radicales es mucho menor a la velocidad de su producción. El estrés oxidativo trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, es un mecanismo de daño celular que se asocia con la fisiopatología primaria o la evolución creciente de enfermedades y síndromes de interés médico-social (Venereo, 2002).

Entre los daños que pueden generar los RL y ERO están: alteraciones al ADN celular, produciendo mutaciones, inactivan enzimas, pueden expresar proteínas alteradas y realizan peroxidaciones de los lípidos de la membrana celular (Cabrera-Silva et al. 2006), incluso pueden provocar necrosis como respuesta inmune en un tejido vegetal infectado (Benezet et al. 2008).

Cuadro 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno: importancia biológica (editado de Devasagayam et al. 2004).

Especie Reactiva	Símbolo	Vida media (s)	Actividad y Efectos
Especies Reactivas del Oxígeno (ERO)			
Superóxido	O_2^-	10-6 s	Se genera en la mitocondria, en el sistema vascular entre otros.
Radical hidroxilo	$.OH$	10-9 s	Altamente reactivo, se produce por la alta ingesta de hierro y ciertas condiciones del cuerpo.
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Estable	Se forma mediante varias reacciones y como producto secundario destaca el radical $.OH$.
Radical peróxido	$ROO\cdot$	1	Reactivo, formado a partir del daño oxidativo a lípidos, proteínas, ADN, azúcares, etc.
Hidroperóxidos orgánicos	$ROOH$	Estable	Reacciones con iones de ciertos metales para producir nuevas especies reactivas.

Oxígeno singulete	$1O_2$	10-6 s	Muy reactivo, productos de la de la fotosíntesis y ciertas reacciones químicas.
Ozono	O_3	1	Presente como contaminante en la atmosfera, reactivo frente a varias moléculas, produce $1O_2$.
Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN)			
Óxido nítrico	$NO\cdot$	1	Neurotransmisor y regulador de la presión sanguínea. Productor de oxidantes durante estados patológicos del organismo.
Peroxinitrito	$ONOO-$	10-3 s	Producto de $NO\cdot$ y del superóxido. Muy reactivo.
Ácido peroxinitroso	$ONOOH$	Relativamente estable	Forma protonada de $ONOO-$
Nitrito (dióxido de nitrógeno)	NO_2	1	Producto de la contaminación ambiental

Para contrarrestar el daño producido, el organismo cuenta con mecanismos que atrapan y eliminan o mitigan la reactividad y daño que pueden causar los

radicales. Mediante procesos enzimáticos, el anión superóxido (O_2^-) es transformado a peróxido de hidrógeno con ayuda de la superóxidodismutasa, quien actúa como primera línea de defensa del organismo. Otras enzimas como la ascorbatoperoxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa, desintoxican al organismo produciendo agua mediante la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado en la primera fase, ya que tanto a concentraciones elevadas de éste, como el producto de su fotólisis por radiación UV, llevan a un estrés oxidativo.

Además de los mecanismos enzimáticos, las células cuentan con elementos que proveen actividad antioxidante/antirradical. Las vitaminas, ciertos metales, carotenos y otros actúan frente a la reacción en cadena generada por las ERO y los RL. Mediante la dieta, nuestro organismo puede proveerse de otros compuestos que presentan actividad antioxidante, mitigando así el daño celular y la proliferación de ciertos padecimientos.

2.4.1 Antioxidantes

Un compuesto antioxidante, es cualquier sustancia capaz de neutralizar a los radicales libres y sus reacciones (Devasagayam et al. 2004). Impiden que otras moléculas se unan al oxígeno al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las ERO que con el resto de moléculas presentes en un ambiente determinado (Durán and Padilla, 1993) y su acción se puede realizar tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Compuestos como los ácidos fenólicos y flavonoides actúan como eliminadores (*Scavengers*) de radicales libres como los peróxidos, hidroperóxidos o peroxilos (producto de la oxidación de lípidos) con el fin de mantener el equilibrio pro-oxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Durán and Padilla, 1993; Venereo, 2002; Vidal, 2008). Las fuentes principales de antioxidantes son los granos, frutas y vegetales. Los antioxidantes naturales protegen al organismo, mientras los agregados químicos protegen de la degeneración o rancidez a los alimentos.

Se denominan suplementos antioxidantes a las vitaminas (carotenos, vitaminas A, E y C), polifenoles, enzimas (catalasas, peroxidasas y dismutasa superperoxidasas) y minerales necesarios para que el sitio activo enzimático lleve a cabo la catálisis (selenio, magnesio, zinc y cobre, entre otros) (Benezzer et al. 2008; Vidal, 2008).

En los alimentos es de uso común los antioxidantes sintéticos, los más empleados son el ter-butilhidroxitolueno (BHT), el ter-butilhidroxianisol (BHA) y la terbutilhidroquinona (TBHQ); existen estudios que han demostrado la poca seguridad para su consumo humano (Durán and Padilla, 1993). El mecanismo de protección de los alimentos con el uso de BHT se fundamenta en que el BHT en pequeñas cantidades, reacciona con dos moléculas de radicales peróxido, convirtiéndolas en sustancias mucho menos activas (Figura 8).

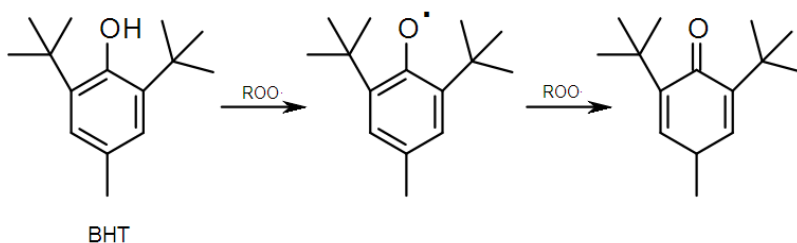


Figura 8. Eliminación del radical peroxil mediante su reacción con BHT (Durán and Padilla, 1993).

2.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante y antirradical

Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante y antirradical total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Kuskoski et al. 2005). Además de la importancia del fundamento, cuando se elige emplear un método para determinar dicha actividad hay que tomar en cuenta otros factores como el pH de la solución prueba, así como las características de la muestra; si es hidrofílica o hidrofóbica, incluso los elementos trazas que puede contener la muestra (en el caso de extractos vegetales).

(Dawidowicz and Olszowy, 2010), analizaron algunas variables que pueden afectar la determinación de la actividad antioxidante empleando el método del blanqueamiento del β -caroteno, medido a 470 nm. De acuerdo a este estudio, variables como el pH, el volumen de muestra, así como metales trazas y el tipo de solvente pueden afectar la determinación, mientras que variables de otro tipo afectan la determinación de la actividad antirradical empleando el método del DPPH (Molyneux, 2004). Aunque el tipo de solvente no afecta la determinación de la actividad antirradical con el último método, variables como el pH de la solución ha sido muy criticado, ya que suele omitirse dicho efecto (Molyneux, 2004; Sharma and Bhat, 2009).

El método del β -caroteno-ácido linoleico es uno de los más populares para la determinación de la actividad antioxidante (Dawidowicz and Olszowy, 2010), y se fundamenta en la cinética de decoloración del β -caroteno debido a los productos de degradación del ácido linoleico (radicales peroxilo) mediante el uso de altas temperaturas (>45 °C) (Kulisic et al. 2004; Duarte-Almeida et al. 2006; Dawidowicz and Olszowy, 2010). La actividad antioxidante se determina comparando dos reacciones competitivas (cinéticas), una en ausencia del antioxidante (control) y otra con el empleo de uno (muestra: extracto o estándar). La actividad antioxidante se suele expresar como el porcentaje de actividad de una muestra frente a un control (Burda and Oleszek, 2001; Kulisic et al. 2004; Dawidowicz and Olszowy, 2010).

El método habitualmente empleado para determinar la actividad antirradical es con el uso del radical estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH \cdot : α , α -difenil- β -picril-hidrazilo). La molécula posee un electrón desapareado, el cual puede resonar sobre toda la molécula proporcionándole estabilidad, a diferencia de otros radicales (Molyneux, 2004). Presenta una coloración violeta-púrpura y posee una banda de absorción entre 515-517 nm. Cuando una solución (alcohólica) del radical se mezcla con una sustancia con la habilidad de donar átomos de hidrógeno,

el radical DPPH• pasa a su estado reducido no radical: 2,2-difenil-picril-hidrazina (Figura 9), sufriendo pérdida de coloración; de violeta púrpura a amarillo-pálido.

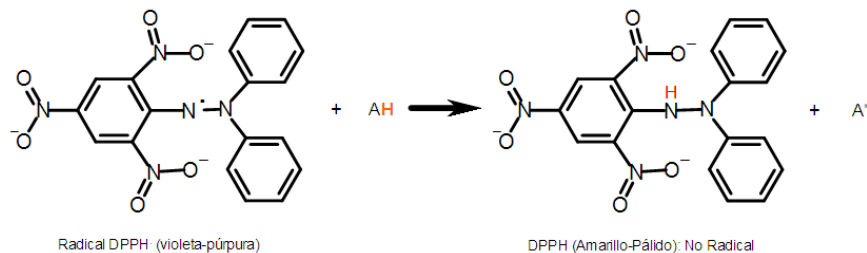


Figura 9. Fundamento del método del radical DPPH- (Molyneux, 2004).

Un antirradical (AH) actúa mediante el mecanismo de la Figura 9, cediendo un átomo de hidrógeno a un radical. La molécula antirradical ahora se vuelve un radical, pero como característica debida a su estructura, se estabiliza por resonancia y detiene la reacción en cadena (Figura 10), evitando la propagación del proceso.

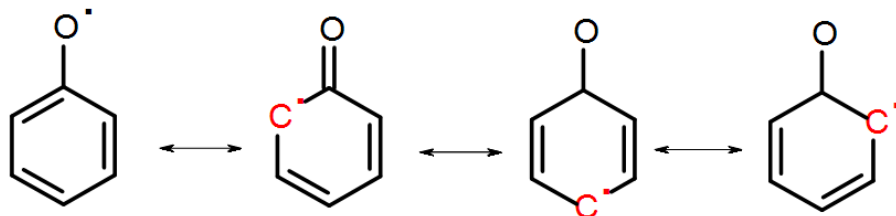


Figura 10. Estabilidad del radical fenoxil.

Métodos espectrofotométricos como el ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico), DPPH, DMPD (diclorhidrato de N,N-dimetil-*p*-fenilalanina), FRAP (poder antioxidante reductor férrico), ORAC (*Oxygen radical asborption capacity*), inhibición de la enzima xantina oxidasa (Cheel et al. 2005) y TBARS (*thiobarbituricacid reactive substances*) se han empleado para determinar la actividad antirradical y antioxidante (según el caso) de muestras vegetales,

extractos, pulpas y otros (Szöllosi and Varga, 2002; Kulisic et al. 2004; Kuskoski et al. 2005; Thaipong et al. 2006; Ferreira et al. 2007).

Thaipong et al. (2006) discuten la correlación entre los métodos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC, obteniendo resultados similares y alta reproducibilidad con el método FRAP, por otro lado, Kuskoski et al. (2005) emplearon los métodos ABTS, DPPH y DMPD para determinar la actividad de pulpas de frutos congelados, obteniendo resultados poco reproducibles con el DMPD y buenos resultados con el del ABTS; este último se caracteriza por su rapidez y aplicación a compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos, variable muy importante en la elección de un método.

Se debe tener en cuenta que para determinar la capacidad antioxidante y antirradical se debe emplear más de un método, además la adaptación del método *in vitro* a *in vivo* puede tener serios inconvenientes.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada sólo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del ambiente donde se desarrolla. En el caso de los extractos vegetales, los compuestos interactúan entre sí, pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski et al. 2005; Pereira et al. 2009).

2.5 Vermicomposta

La palabra composta proviene del latín componere, juntar; por lo tanto composta es la reunión de un conjunto de restos orgánicos que sufren un proceso de fermentación y da un producto de color marrón oscuro, con olor a humus.

Este abono orgánico resultante contiene materia orgánica (parte de la cual es semejante al humus de la tierra), así como nutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y otros oligoelementos necesarios para la vida de las plantas. Es un producto con vida, con una gran variedad y densidad de microorganismos que sintetizan enzimas, vitaminas, hormonas, etc. y que repercuten favorablemente en el equilibrio biótico del suelo.

Esta técnica fue iniciada por Sir Alfred Howar en la India en 1925, quien procesaba residuos orgánicos como basuras, pajas y hojas, con capas alternadas con estiércol y fango cloacal. Este proceso tiene diversidad de variantes, pero siempre manteniendo el mismo principio; el proceso fue modificado por el Consejo de

Investigación Agronómicas de la India para acelerar la acción aerobia y reducir los malos olores.

La composta realizada con basuras debe dar un producto de grano fino, no debe llevar materiales inertes como vidrio y plástico, y ha de estar pasteurizado para no contener gérmenes patógenos, ni semillas sin germinar. Debido a su materia orgánica y al humus que se deriva de ella, la composta posee la facultad de enmendar las características físicas del suelo: contribuyendo a la estabilidad de las estructuras de sus agregados (los suelos compactados se sueltan bajo la acción de la materia orgánica y los suelos arenosos se compactan por la misma acción), aumentando la capacidad de retención de agua; mejorando su porosidad, lo que facilita su aireación.

La acción química de la composta se manifiesta por su capacidad de intercambio catiónico superior a la de cualquier arcilla, suministra directamente a las plantas los tres elementos básicos N, P, K y hace una importante aportación de oligoelementos tales como hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, etc. Además, por efecto de su oxidación lenta, produce gas carbónico, que contribuye a solubilizar algunos elementos minerales del suelo, facilitando su asimilación por las plantas.

La actividad biológica del suelo se ve favorecida por el aporte de un número importante de bacterias que se encuentran en la composta, pero es sobre todo su riqueza en materia orgánica lo que favorece el desarrollo de los microorganismos del mismo suelo, que con su actividad estimulan el crecimiento vegetal, especialmente para las raíces. Esta acción biológica favorece la descomposición de los componentes minerales insolubles, como los fosfatos, que son necesarios para el desarrollo de las plantas; y el nitrógeno soluble, que puede desaparecer fácilmente por lixiviación, es transformado en nitrógeno orgánico en el cuerpo de los microorganismos. De forma que cuando éstos mueren, quedan de nuevo disponibles para las raíces de las plantas y mientras tanto es menos probable que se pierdan por lixiviación o como amoníaco en el aire.

El compostaje y el vermicompostaje (lombricompostaje) son procesos aeróbicos de transformación de residuos orgánicos, animales y vegetales, que ocurren constantemente en la naturaleza bajo la acción de lombrices, bacterias y hongos

de la materia orgánica. El aprovechamiento de estos residuos orgánicos cobra cada día mayor importancia como medio eficiente de reciclaje racional de nutrientes, que ayuda al crecimiento de las plantas y devuelven al suelo muchos de los elementos extraídos durante el proceso productivo.

Así mismo, mejoran las características físicas y previenen la erosión del suelo, reducen la dependencia de insumos externos de alto costo económico y ambiental, enfocado a una agricultura sostenible, en donde se disminuye y elimina el empleo de agroquímicos a fin de proteger el ambiente, la salud animal y humana.

La fracción líquida que se obtiene del proceso de compostaje del estiércol se conoce como lixiviados de composta, extractos de composta y té de composta y presenta como ventaja una densidad más uniforme. Los lixiviados de composta se producen directamente de las pilas, son ricos en elementos nutritivos y contienen microorganismos y se caracterizan por una coloración negruzca. Los lixiviados han sido considerados, tradicionalmente, como un fertilizante líquido orgánico.

Además, estos materiales están siendo utilizados para el control de plagas y enfermedades, puesto que tienen una gran abundancia y diversidad de microorganismos benéficos, por lo que no son considerados pesticidas. Otros contienen químicos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de hongos; dada la gran variedad de lixiviados es muy difícil determinar el número de microorganismos benéficos presentes. La composición física de los residuos sólidos vegetales de tipo agroindustrial y agropecuario,

se deben aprovechar para disminuir en gran medida la presión sobre el medio ambiente como soporte de actividades antrópicas; y con ello, estos se reincorporarán en forma de nutrientes para fertilidad de los suelos agrícolas, así como una alternativa de control biológico de plagas y enfermedades de los mismos, disminuyendo el uso y aplicación de agroquímicos. Este aprovechamiento conduce de manera directa a la disminución de impactos ambientales y sociales generados, en especial, en el componente de disposición final, lo cual es competencia de la gestión y manejo ambiental.

2.6 Roca fosfórica

Roca fosfórica es un nombre colectivo utilizado para denominar todos los minerales que contienen fosfatos. Las rocas fosfóricas constituyen un recurso natural finito, no renovable y los depósitos geológicos de diferente origen se encuentran en todo el mundo. En la actualidad son explotados pocos yacimientos de roca fosfórica y cerca del 90 por ciento de la producción mundial es utilizada por la industria para la fabricación de fertilizantes fosfatados, mientras que el resto se emplea para la producción de alimentos para animales, detergentes y otros productos químicos.

Sin embargo, muchos yacimientos de roca fosfórica que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales no son explotados.

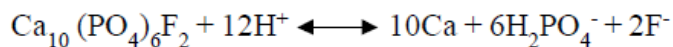
Una razón es que las características de estas rocas fosfóricas, si bien son adecuadas para la aplicación directa, no reúnen las normas de calidad requeridas para producir fertilizantes fosfatados solubles en agua utilizando la tecnología convencional de procesamiento industrial. Otra razón es que los depósitos son demasiado pequeños para justificar las inversiones necesarias para su explotación minera y procesamiento.

Las rocas fosfóricas son la materia prima básica para la producción de los fertilizantes fosfatados. El compuesto fosfatado en las rocas fosfóricas es algún tipo de apatita. Según el origen del depósito de la roca fosfórica y su historia geológica, las apatitas pueden presentar propiedades físicas, químicas y cristalográficas diferentes. Con las rocas fosfóricas se hallan asociados grupos definidos de minerales accesorios de diversos orígenes y edades geológicas. Por lo tanto, es imperativo establecer procedimientos simples para la caracterización normalizada de las rocas fosfóricas, definir las normas de calidad para fines de la aplicación directa y luego clasificarlas. Las fuentes de roca fosfórica de calidad conocida pueden ser utilizadas como materiales de referencia para los fines de comparación.

Las características mineralógicas, químicas y texturales de los minerales de fosfatos y sus concentrados determinan: i) su conveniencia para los diversos tipos de procesos de «beneficio» o enriquecimiento para mejorar la calidad de los

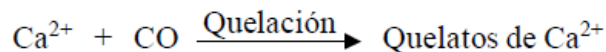
minerales y eliminar las impurezas, ii) su adecuación a los varios tipos de procesamiento químico y, iii) su capacidad para ser utilizada como roca fosfórica para la aplicación directa. Los factores más importantes en su evaluación para la aplicación directa son: el grado o ley, la conveniencia para el beneficio y la reactividad de la apatita. Una matriz completa de caracterización basada en la integración de todos los datos obtenidos por varios métodos analíticos determina el potencial de beneficio y los mejores usos posibles de la roca fosfórica en la producción de los fertilizantes fosfatados solubles o como fertilizante de aplicación directa.

La aplicación de roca fosfórica al suelo como fuente de fósforo requiere de un ambiente apropiado que facilite el proceso de disolución de la misma, este proceso ha sido descrito, por Khasawneh y Doll (1978) de acuerdo a la siguiente ecuación:



De acuerdo a esta ecuación la disolución de la roca puede ser favorecida por la remoción de los productos de disolución, en particular los iones calcio y fosfato, o bien por la suplencia de protones.

En este orden de ideas se ha sugerido que la aplicación de diversos materiales orgánicos, el estiércol de diversos orígenes, entre éstos, en forma conjunta a la roca fosfórica (RF) permite incrementar los niveles de fósforo liberados por ésta, con relación a eso (He et al. 1997) muestran resultados según los cuales la solubilidad de la roca se incrementó notablemente con la aplicación de celulosa; efecto que sería posible cuando se incorpora estiércol de bovino dado sus elevados contenidos de celulosa. Una de las teorías propuestas para explicar tal efecto supone que, el calcio liberado por la roca durante su proceso de disolución puede ser quelatado por los compuestos orgánicos (CO) gracias a grupos funcionales o aniones como el citrato y el oxalato (Chien, 1979; Tan, 1986). La reacción general sería la siguiente:



En el caso de la materia orgánica (MO) estable del suelo, la fracción correspondiente a los ácidos fúlvicos es,

en gran medida, responsable de los procesos de quelación. Este mecanismo, sea mediado por la MO estable o por productos orgánicos de incorporación reciente, permite “eliminar” del sistema uno de los productos de la reacción de disolución de la RF, ello conducirá a un desplazamiento de los equilibrios y en consecuencia al incremento de la disolución de la misma. La producción de este fenómeno requiere, según estimaciones hechas, periodos de dos a cuatro semanas (Chien, 1979).

Otro enfoque importante es aquel que sostiene que es la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, durante las primeras etapas de descomposición de los CO añadidos (Baziramakenga and Simard, 1998), la responsable del incremento del proceso de disolución. En este caso se considera que los mencionados ácidos suministran los H⁺ necesarios para el ataque de fosfatos altamente insolubles tales como la RF (Fox et al., 1990; Gerke et al., 2000). Es evidente que existe la posibilidad de que ambos fenómenos ocurran y que el predominio de uno u otro dependerá de la combinación de suelo, clima y CO incorporados, así como de las características de la roca utilizada. Existe, no obstante otro enfoque, que de acuerdo a nuestro punto de vista no ha sido considerado, y es el hecho de que el estiércol constituye un inóculo rico en un gran número de cepas bacterianas que han sido señaladas como solubilizadoras de fósforo, tal es el caso de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Xanthomonas* (Sahn and Jana, 2000).

2.6.1 El fósforo en el sistema suelo-planta

El fósforo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza y ocurre conjuntamente con el nitrógeno y el potasio como constituyente primario de los seres vivos, vegetales y animales. El fósforo posee una serie de funciones en el metabolismo vegetal y es uno de los nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Desempeña funciones estructurales en las macromoléculas como los ácidos nucleicos y de transferencia de la energía en los procesos metabólicos de biosíntesis y degradación. A diferencia de los nitratos

y sulfatos, los fosfatos no son reducidos en la planta y permanecen en su forma más altamente oxidada (Marschner, 1993).

El fósforo es absorbido principalmente durante el crecimiento vegetativo y luego la mayoría del fósforo absorbido es movilizado a los frutos y semillas durante las etapas reproductivas. Las plantas con deficiencias de fósforo tienen un crecimiento retardado (reducción del crecimiento celular y de la expansión foliar así como de la fotosíntesis y de la respiración) y a menudo presentan un color verde oscuro (más alta concentración de clorofila) y rojizo (aumento de la formación de antocianinas).

Se ha indicado que el nivel de abastecimiento de fósforo durante los estados reproductivos regula el fraccionamiento entre las hojas y los órganos reproductivos, siendo este efecto esencial para las leguminosas fijadoras de nitrógeno (Marschner, 1993).

Este elemento nutritivo es absorbido por las plantas a partir de la solución suelo como aniones ortofosfato monovalente (H_2PO_4) y divalente (HPO_4), cada uno representando un 50 por ciento del fósforo total en la solución a un pH cercano a la neutralidad (pH 6-7). A un pH entre 4 y 6, el anión ortofosfato monovalente (H_2PO_4) representa casi el 100 por ciento del fósforo total en la solución. A un pH 8, el anión monovalente (H_2PO_4) constituye el 20 por ciento y el divalente (HPO_4) el 80 por ciento del fósforo total en la solución (Black, 1968).

La físico-química del fósforo en los suelos minerales es bastante compleja debido a la ocurrencia de una serie de reacciones simultáneas e instantáneas tales como solubilización, precipitación, adsorción (retención), desorción y oxido-reducción.

Los compuestos solubles del fósforo presentan reactividad muy alta, solubilidad baja y movilidad reducida. La mineralización e inmovilización son procesos importantes del ciclo del fósforo en los suelos con alto contenido de materia orgánica (Black, 1968).

Cuando se aplica al suelo un fertilizante fosfatado soluble en agua, este reacciona rápidamente con los compuestos del suelo. Los productos resultantes son compuestos de fósforo menos solubles y el fósforo que es adsorbido sobre las

partículas coloidales del suelo (FAO, 1984). Una pequeña concentración de fósforo en la solución del suelo es por lo general adecuada para el desarrollo normal de las plantas.

3. JUSTIFICACIÓN

Con la finalidad de aprovechar los recursos naturales como alternativa de salud, se han realizado diversos estudios para la obtención de antioxidantes debido a su gran uso en la industria alimentaria como la cosmética frente a antioxidantes artificiales cuyos efectos secundarios han producidos diversos problemas como daño a la salud, por ende la necesidad de búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento o cura de las variadas dolencias humanas en cuestión de salud. Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres, se ha demostrado en plantas al tener condiciones de nutrimentos como nitrógeno y fósforo aumenta la producción de polifenoles y a su vez se busca alternativas de sustituir a los fertilizantes por biofertilizantes que tengan una sustentabilidad con el medio ambiente, que los agricultores tengan alternativas de cultivo diferentes a los tradicionales. Es necesario promover el uso de abonos orgánicos, algunos de los cuales pueden ser producidos por los mismos agricultores y otros pueden ser adquiridos a bajo costo.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de la biofertilización con roca fosfórica y vermicomposta sobre la capacidad antioxidante y antirradical de los extractos metanólicos de hojas de chincuya (*Annona purpurea*L).

4.1.1 Específicos

- Determinar la concentración de fenoles totales y flavonoides presentes en extractos metanólicos de hojas de chincuya (*Annona purpurea*L).

- Evaluar la capacidad de captura de radicales libres de los extractos de hojas de planta chincuya (*Annona purpurea*L) empleando el DDPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

Fue colectado en el invernadero del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Las plantas fueron removidas del suelo para su secado en donde posteriormente se separó las hojas del tallo; para su secado las hojas se colocaron bajo sombra a una temperatura promedio de 35°C y para obtener una humedad mínima fueron expuestas al sol durante 6h.

En el muestreo, se descartó cualquier hoja que estuviera maltratada, seca o contaminada con algún tipo de microorganismo. Las hojas colectadas poseían una coloración verde característica, sin ningún tipo de magulladura. Las hojas fueron molidas hasta un tamaño de partícula de 1 mm aproximadamente.

5.2 Obtención de extracto metanólico

El extracto crudo se obtuvo al macerar 1 gr de hojas secas en 20 mL de metanol durante dos horas a 25°C en un baño ultrasónico.

Posteriormente se centrifugo a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C para eliminar los sólidos, el sobrenadante fue concentrado en un rotavapor(<40 °C) para eliminar el exceso de solvente. El extracto se resuspendió en 2mL de metanol y se almaceno a -20° C.

5.3 Análisis cuantitativo de compuestos polifenolicos

5.3.1 Estimación de fenoles

El análisis del contenido polifenólico total se determinó de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (Singleton et al. 1999), empleando ácido gálico como estándar. Una alícuota 0.1 mL de muestra se transfirió a un tubo de ensaye junto a 4.2 mL de agua destilada y 0.5 mL de Folin-Ciocalteu, la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto y se añaden 1 mL de carbonato de sodio al 20% y 4.2mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo dos horas en oscuridad a temperatura ambiente, para luego leer absorbencia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000.

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca de chincuya (mg EAG/g extracto) empleando una curva estándar de ácido gálico de 0.0 a 1000mg·mL⁻¹ (ANEXO IV).

5.3.2 Estimación de Flavonoides

El análisis del contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (Chang et al. 2002).Una alícuota de 0.5 mL de muestra se mezcló con 1.5 mL de EtOH al 95% y 100 µL de tricloruro de aluminio (AlCl₃ 6·H₂O) al 10%, Luego de agitar se agregó 100 µL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo 30 minutos para luego medir su absorbencia a 415 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000.

El volumen de tricloruro de aluminio fue reemplazado por agua destilada en la preparación del blanco. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de hoja seca de chincuya(mg EQ/g de extracto) empleando una curva estándar de quercetina de 0.0 a 100 µg·mL⁻¹ (ANEXO V).

5.3.3 Estimación de flavanonas.

La cuantificación de flavanonas se realizó con el método colorimétrico de 2,4-Dinitrofenilhidrazina. Un mL de las diluciones se mezcló con 2 mL 2,4-Dinitrofenilhidrazina al 1% y 2 mL de metanol. La mezcla se incubó a 50°C por 50 min y se enfría a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó 1mL de la muestra se le adiciona 5mL de hidróxido de potasio al 1% en metanol al 70% durante 2 minutos, y finalmente a 1 mL de la mezcla se le adiciona 5 mL de metanol, la mezcla se centrifugó a 1000 RPM por 10 min a 4°C para remover el precipitado. El sobrenadante recuperado se afora a 25 mL. La absorbencia se midió a 495 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000. Los fueron expresados en mg equivalentes de naringenina por gramo de hoja seca de chincuya (mg EN/g de extracto) empleando una curva estándar de naringenina de 0.0 a 1000 µg·mL⁻¹ (ANEXO VI).

5.4 Actividad antirradical de extractos de *A. purpurea* mediante el radical DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo)

La actividad antirradical de los extractos se determinó en términos de la habilidad de donar hidrógeno o de atrapar radicales utilizando el radical estable DPPH(2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de acuerdo a la metodología empleada por Castañeda *et al.* (2008) y consideraciones de Sharma and Bhat (2009).

A 0.3 mL de muestra se adicionó 2.7mL de una solución metanólica de DPPH (60.4 µM) y luego de 30 minutos de reacción se leyó su absorbencia a 517 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000 que se calibró con metanol. El blanco de muestra se preparó con 0.3 mL del extracto y 2.7 mL del solvente correspondiente. El experimento se llevó a cabo en una habitación con iluminación tenue y temperatura ambiente (~25 °C). El porcentaje de inhibición del radical DPPH se determinó con la fórmula de Castañeda *et al.* (2008):

Porcentaje de inhibición del radical DPPH se determinó con la formula.

$$AAr (\%) = [(Abm - Am) / Abm] \times 100$$

En Donde AAr-actividad antirradical. Abm- absorbencia de la muestra en blanco,

Am- absorbencia de la muestra.

5.5 Diseño experimental y análisis estadísticos.

El diseño experimental fue un diseño multifactorial completamente al azar con tres repeticiones. Se determinó el efecto de los factores mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% y la comparación de medias fue realizada mediante la prueba de Diferencia Media Significativa.

6. Resultados y discusión

6.1 Análisis fitoquímico cuantitativo de extractos de *Annona purpurea*

6.1.1 Estimación del contenido de fenoles totales.

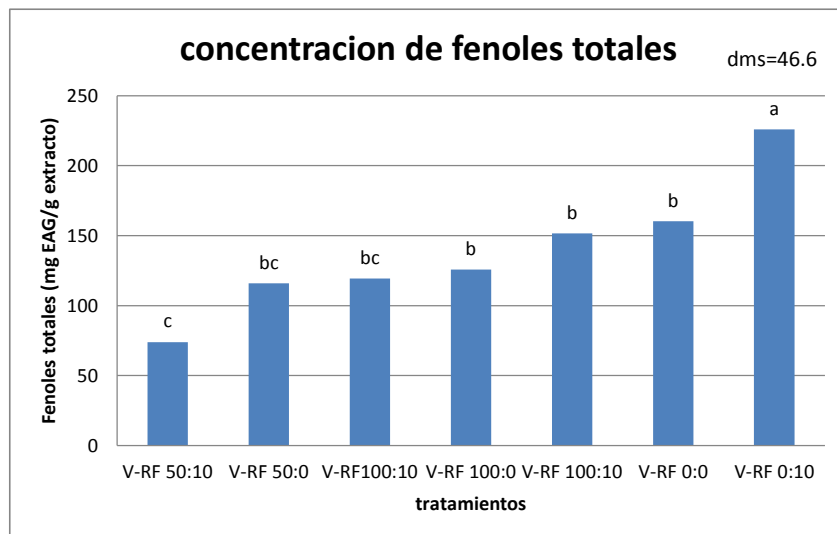


Figura 11. Grafica de análisis de varianza de comparación de medias de concentración de fenoles totales. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba LSD con 95% de confianza.

En la figura 11 se observa que con la interacción 0:10 vermicomposta, rocafosfórica respectivamente tuvo una diferencia mínima significativa 46.6 con respecto a los otros tratamientos, con una media de 225.88 ± 15 macg, y la menor con el tratamiento 50:10 vermicomposta roca fosfórica con una media de 73.9 ± 15 , Palencia (2005) describe la ventaja del uso de fertilización mineral roca fosfórica, la cual es la producción de metabolitos secundarios en la planta, los cuales, son compuestos colorante, aromático, regulador de crecimientos, protectores naturales frente a parásitos y otros tipos de microorganismos. El aumento de las actividades microbianas en el suelo pueden aumentar la biodisponibilidad de fósforo en el suelo (Zhao et al. 2012).

Se obtuvieron resultados similares con otras plantas en el cual se indujo un aumento de fenoles totales (Yu et al. 2012). Sin embargo, la aplicación a largo plazo de fosfato de roca afectada la comunidad microbiana, como el número de actinomicetos aumentó y el de los hongos disminuyó (Mechri et al. 2014).

La adición del tratamiento 0:10 se observa un aumento en la concentración contenido de fenoles totales sugiere que al tener una buena disponibilidad de P la planta tiende a producir más fenoles totales además de que se puede crear un estrés debido al alojamiento de diferentes microorganismos .

6.1.2 Estimación del contenido de flavonoides totales

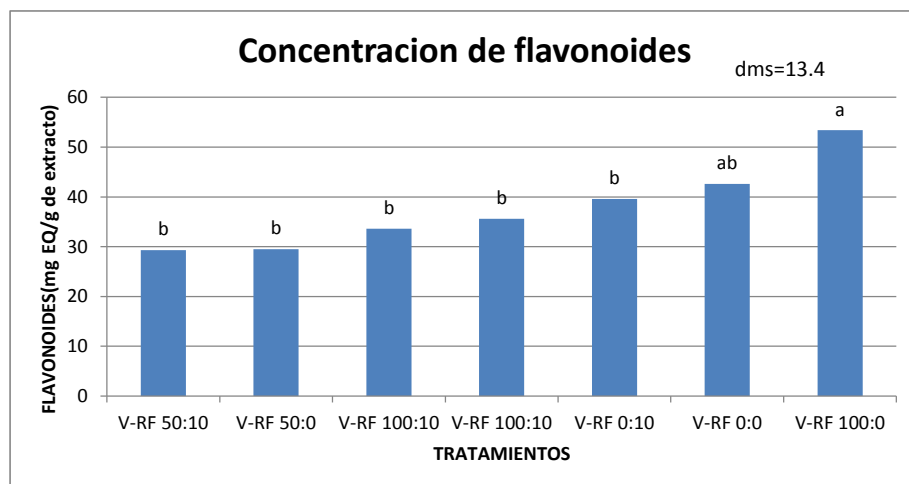


Figura 12. Grafica de análisis de varianza de comparación de medias de concentración de flavonoides totales. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba LSD con 95% de confianza.

En la figura 12 se observan los resultados obtenidos en las determinaciones de flavonoides totales. Se observa que la mayor concentración se obtuvo cuando se utilizó 100:0, vermicomposta: roca fosfórica respectivamente con una concentración promedio de 53.4 ± 3.8 mg/g EQ. Los estudios también han indicado que la deficiencia de P, B y Mn induce la acumulación de flavonoides, mientras que Co y Ni suplementados aumentan la producción de flavonoides (Lillo et al. 2007; Eman et al. 2007; Jayakumar et al. 2007).

Comentado [h1]: Que numero poner bien todas

Los estudios fisiológicos que implican la manipulación de N han demostrado que las condiciones limitantes N inducen un aumento en la biosíntesis de flavonoides (Dixon and Paiva, 1995).

Scheible et al. (2004) reportaron que la deficiencia de N conduce a una amplia reprogramación de metabolismo primario y secundario que resulta en una inducción coordinada de genes para el metabolismo secundario y la represión de la mayoría de genes asignados a la fotosíntesis y la síntesis de clorofila. En contraste, el aumento de flavonoides a niveles altos de vermicomposta es atribuido a una alta concentración de sales, pobre aireación, toxicidad inducida por metales pesados y/o presencia de sustancias fitotóxicas (Arancon et al.2004; Atiyeh et al.2002).

6.2 Actividad antirradical de extractos de *Annona purpurea* (método del DPPH)

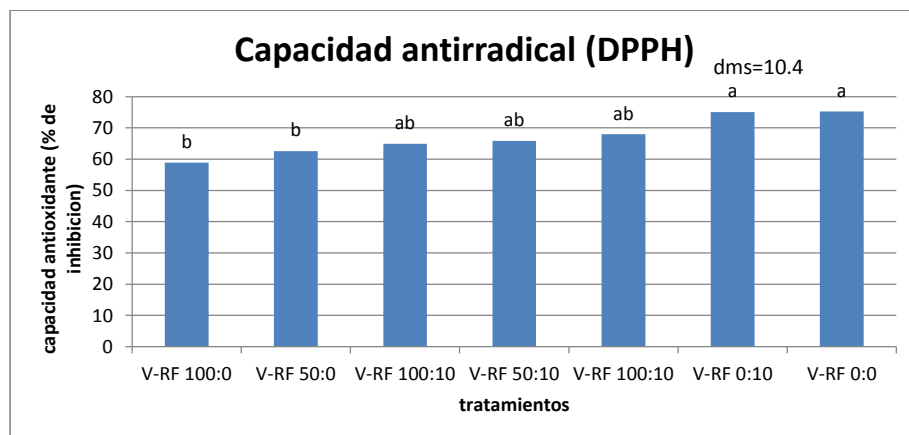


Figura 13.grafica Análisis de varianza de comparación de medias de porcentaje de inhibición antirradical por el método DPPH. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba LSD con 95% de confianza.

En la figura 13se observa que la actividad más alta se obtuvo en las plantas de control sin adiciones de roca fosfórica y humus de lombriz 75.26 ± 3.2 . Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los polifenoles del te son neutralizadores

efectivos de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno, incluyendo los radicales superóxido (Nakagawa, 2002)

Por su diversidad y la amplia distribución son el grupo más importante de metabolitos con actividad antioxidante natural.

Los flavonoides son compuestos con capacidad de atrapar los radicales libres, metales pesados quelato y modulan la actividad de ciertas enzimas, y se ha demostrado que los flavonoides tienen propiedades anticancerígenas, cardiotónico, antitrombótico, vascular, disminución del colesterol y contribuyen a la protección de hígado, y otros (Robards et al.1999). Los flavonoides son una gran familia de los polifenoles incluyendo las flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, sintetizados a partir de diversos puntos de ramificación en la ruta biosintética phenylpropanoid (Malesev y Kuntic, 2007). La acumulación de estos diversos metabolitos secundarios ha demostrado ser influenciado por las interacciones entre genotipo de la planta (especie y variedad dentro de las especies) y factores ambientales, como técnica de cultivo, temporada, abiótico y biótico estrés y estado de los nutrientes (Downey et al.2006; Ksouri et al. 2007). Yu-Hong et al (2011) demostraron que el manejo de diferentes tipos de fertilización puede modificar la estructura microbiana del suelo rizosférico en tabaco, en este caso los diferentes tipos de fertilización modifican la capacidad antioxidante.

Al comparar los tratamientos con el tratamiento control se observa que no existió una diferencia el cual sugiere que al comparar a los fenoles totales no influyen o no contienen la capacidad de la captura de radicales libres.

Comentado [h2]: checar si esta bien escrito

7. Conclusiones

En este estudio analizo cómo influyen los biofertilizantes en la producción de metabolitos secundarios y de este modo también evaluar la actividad antioxidante ya que depende directamente de los polifenoles.

La cantidad de fenoles totales y flavonoides tienen una relación directa con el poder reductor y actividad antirradical del extracto. Consecuentemente, se puede establecer que la actividad antioxidante del extractos orgánico de *Annona purpurea* L. se debe a los compuestos fenólicos. Ya que cuando el valor de concentración de fenoles totales disminuye el porcentaje de inhibición es menor.

La vermicomposta influyó negativamente en el crecimiento de las plantas, debido a que si se emplea una mayor concentración los valores decrecen sugiriendo que las plantas sufren un estrés nutrimental por alguno de los componentes que contiene la vermicomposta.

La roca fosfórica influyó en la concentración de los fenoles totales al igual que en el desarrollo de la planta, evaluado como altura, peso y número de hojas.

Los biofertilizantes influyeron sobre la concentración de metabolitos secundarios ya que cada tratamiento analizado tuvo un efecto sobre la concentración sugiere entonces que al utilizar diferentes dosis el metabolismo de la planta se adapta es decir al tener condiciones nutrimentales óptimas puede utilizarla para su producción de metabolitos primarios o secundarios sufre una reprogramación metabólica.

Comentado [h3]: checar ortografía en todo

8. Recomendaciones

La experiencia obtenida durante el desarrollo de este trabajo de investigación, aunada a la literatura revisada durante el mismo proceso, permite dar las siguientes recomendaciones:

Un punto de gran interés sería el conocer la composición polifenólica en extracción con solventes de diferente polaridad (no polar): acetato de etilo, éter de petróleo, acetona, entre otros. Esto permitiría una estimación con mayor precisión de la composición polifenólica de la planta.

Evaluar otras partes de la planta para determinar la influencia de los biofertilizantes de acuerdo si presenta mayor actividad antioxidante.

Emplear dosis más bajas de biofertilizantes ya que la vermicompostaha tenido una influencia negativa y así observar su comportamiento a bajas concentraciones

9. Bibliografía

- Andersen ØM and Markham KR. (Eds.), 2006. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. USA: Taylor & Francis Group.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Atiyeh, R. and Metzger, J.D., 2004. Effects of vermicompost produced from food waste on the growth and yield of greenhouse peppers. *Bioresource Technology*. 93:103-144.
- Atiyeh, R.M., Arancon, N., Edwards, C.A., and Metzger, J.D., 2002. The influence of earthworm-processed pig manure on the growth and productivity of marigolds. *Bioresource Technology*. 81:103-108
- Baziramakenga, R., 1998. Simard, R.R. Low molecular weight aliphatic acid content of composted manure. *Journal of Environmental Quality*. 27, 557-561.
- Benezzer-Benezzer M, Castro-Mercado E and García-Pineda E 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, 56-61.
- Black, C.A., 1968. *Soil-plant relationships*. New York, Estados Unidos de América, John Wiley y Sons.
- Breedlove, D.E., 1986. Listados florísticos de México. IV flora de Chiapas, instituto de biología. UNAM México. pág. 33
- Bridg H., 2001. Micropropagation and determination of the in vitro stability of *Annona cherimola* Mill. and *Annona muricata* L. Berlín, Humboldt Universität. 143 p.
- Burda S and Oleszek W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 2774-2779.
- Cabrera Silva M, Lissi Gervaso E & Honeyman Mauro J., 2006. *Radiación Ultravioleta y Salud*. Santiago de Chile: Universitaria.
- Castañeda C, Ramos. L. E and Ibáñez V., 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico* 8, 56-72.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM and Chern JC., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drugs Analysis*, 10 (3), 178-182.
- Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J and Schmeda-Hirschmann G., 2005. Free radical scavenger and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2511-2517.
- Chien, S.H., 1979. Dissolution of phosphate rock in acid soil as influenced by nitrogen and potassium fertilizers. *Soil Sci*. 127, 371-376.

Chien, S.H., 1979. Dissolution of phosphate rock in acid soil as influenced by nitrogen and potassium fertilizers. *Soil Sci.* 127, 371-376.

Christ, M.J., M.B. Davies., 1996. Temperature and moisture effects on the production of dissolved organic carbon in a spodosol. *Soil Biology and Biochemistry.* 28, 1191-1199.

Cruz, E., 2002. Cultivo de anona. El Salvador, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. 21 p.

Dawidowicz AL & Olszowy M., 2010. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -caroteno bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231, 835-840.

Devasagayam T, Tilak J, Bolor K, Sane KS, Ghaskadbi SS & Lele R., 2004. Free radicals and antioxidants on human health: current status and future prospects. *Journal of the association of physicians of India* 52, 794-804.9

Dewick PM., 2009. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach* (3rded.) UK:Wiley.

Dirzo R., 1985. Metabolitos secundarios en las plantas ¿Atributos panglossianos o de valor adaptativo? *Ciencia* (36), 137-145.

Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1055–1097.

Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Kristic, M.P., 2006. Cultural practice and environmental impacts on flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 257–268.

Duarte-Almeida JM, Dos santos RJ, Genovese MI, & Lajolo FM, 2006. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico E Método de seqüestro De Radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 446-452.

Durán RM & Borja Padilla R., 1993. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, España.

Eman, A.E., Gad, N., Badran, N.M., 2007. Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 1, 73–78.

Escribano, P., M.A. Viruel J.I. Hormaza. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Mol. Ecol. Notes* 4: 746-748.

Escribano, P., M.A. Viruel J.I. Hormaza. 2008. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and

selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Mol. Ecol. Resources* 8: 317-321.

Fang, Y., Yang S., G Wu 2002 Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879

FAO. 1984. Fertilizer and plant nutrition guide. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin N° 9. Rome. 1984.

Fennema, O., 2000. Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza.

Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M & Barros L., 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.

Figueirinha A, Paranhos A, Pérez-Alonso JJ, Santos-Buelga C & Batista MT., 2008. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry* (110), 718-28.

Flanzy C., 2003. Enología: fundamentos científicos y tecnológicos (2 ed.). (Gómez AL, Quevedo JM, Vicente AM y Cenzano AM, Trads) París: Mundi-Prensa.

Fox, T.R., 1990. Comerford N.B., McFee, W.W. Phosphorous and aluminium from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Science Society American Journal*. 54:1763-1767.

Gentry, A.H., 1993. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru), with supplementary notes on herbaceous taxa. The University of Chicago, Chicago, USA. 894 p.

Gerke, J., 2000. L. Beissner; W. Römer. The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. I. The basic concept and determination of soil parameters. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163:207-212.

Goenadi, D.H., Siswanto, Sugiarto, Y., 2000. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilising fungus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 927-932.

González Esquinca, AR.; Luna Cazáres L.; Álvarez Moctezuma, J.G.; y De Paz Velasco, Y., 1997. Estudio del letargo de *Annona diversifolia* Safford. Memoria del 1º congreso internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México. Pags. 169-186.

Halliwel, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*; 97, 1634-1658.

He, Z.L.; Baligar., 1979 ; V.C. Martens, D.C. Ritchey, K.D. Effect of phosphate rock, lime and cellulose on soil microbial biomass in acidic forest soil and its significance in carbon cycling. *Biology and Fertility of Soils*. 24, 329-334.

Jayakumar, K., Jaleel, C.A., Vijayarengan, P., 2007. Changes in growth, biochemical constituents, and antioxidant potentials in radish (*Raphanussativus* L.) under cobalt stress. *Turk. J. Biol.* 31, 127–136.

Jones, SB., 1987. *Sistemática vegetal*. Trad. por Maria de Lourdes Huesca. México, McGraw Hill.336 p.

Khalequzzaman, M. and Sultana, S. 2006.Insecticidal activity of *Annonasquamosa*L.seed extracts against the red flour beetle, *Triboliumcastaneum*(Herbst). *Journal of BioScience*, 14(1): 107-112.

Kotkar, H.M., Mendki, P.S., Sadan, S.V., Jha, S.R., Upasani,S.M. and Maheshwari, V.V. 2002.Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annonasquamosa*. *Pest Management Science*.58, 33-37.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 244–249.

Khasawneh, F.E, Doll, E.C. The use of phosphate rock for direct application to soils.*Advances in Agronomy*. 30,159-206,1979

Kulisic T, Rodonic A, Katalinic V & Milos M., 2004.Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil.*Food Chemistry* (85), 633-640.

Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J & Fett R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (4), 726-732.

Leboeuf, M.; Cave, A.; Bhaumik, P.K.; Mukherjee, B. & Mukherjee, R. 1982. - The phytochemistry of *Annonaceae*. *Phytochemistry*, 21 (12): 2783–2813.

Lillo, C., Lea, U.S., Ruoff, P., 2007.Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.* 31, 587–601.

Lobo, V., Patil A., Phatak A., N. Chandra 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *PharmacognosyReview*; 4: 118–126.

Malesev, D., Kuntic, V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. J. Serb.Chem. Soc. 72, 921-939.

Marschner.,1993 H. Mineral nutrition of higher plants. Londres, Academic Press Ltd., Harcourt Brace y Co. Publishers. 1993.

Martínez SA., 2010. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) En alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Memoria Doctoral, Universidad Complutense De Madrid; Facultad de Farmacia, Nutrición y Bromatología II, Madrid.

Martínez, F.S., G.J. González, J.M. Culebras, M.J. Tuñón 2002 Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Nutrición Hospitalaria, 17, 271-278.

Martínez, M., 1979 catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México. Págs. 997-1209

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM and Tuñón MJ., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria, 17 (6), 271-278.

Martínez-Valverde I, Jesús Periago M and Ros G., 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Lationamericanos de Nutrición, 50 (1).

Mechri, B., Attia F., Tekaya M., and Cheheb H. M., 2014. "Hammami agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional groups under long-term field conditions". Soil Biology and Biochemistry

Miller, J.K., E. B.Slebodzinska 1993. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, Journal of Dairy Science, 76, 2812-2823.

Molyneux P., 2004. The Use of the stable free radical diphenylpicryl-hidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal of Science and Technology, 26 (2), 211-219.

Morton, J., 1987. Cherimoya. (En línea) Miami, FL, Fruits of warm climates, p.65-69. *Oligonychus yothersi*.

Nakagawa, T. &. 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. Food and Chemical Toxicology, 1745-1750.

Narayama, K., R. Reddy, M. Sripal, M.R Chaluvadi, D.R. Krishna 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial, Indian Journal of Pharmacology, 33, 2-16

Ochse, JJ., 1986. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. México, Limusa. v. I, 828 p.

Orellana, A.D. and E. Martínez. 2002. Distribución geográfica de anonáceas en Guatemala. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (FAUSAC) & Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). ICTA, Villanueva, Guatemala. 23 p.

Palencia M. Y. 2005. Sustancias bioactivas en los alimentos. Universidad de Zaragoza. España

Peñarrieta JM, Alvarado JA, Akesson B & Bergenstahl B., 2007. Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Revista Boliviana de Química*, 24 (1).

Pereira RP, Fachineto R, Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM., 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, 56 *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemistry Research*, 34, 973-983.

Pérez-Trueba G., 2003. Los flavonoides: antioxidantes o pro-oxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22 (1), 48-57.

Pietta, P. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63, 1035-1042.

Pinto, AC de Q; Cordeiro, MCR; Andrade, SRM De; Ferreira, FR; Filgueiras, HA de C; Alves, RE; Kinpara, DI. 2005. *Annona* species. Southampton, UK, International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton. 263 p

Robards, K., Prenzler, D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66:401-436.

Sahn, S.N., Jana, B.B., 2000. Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecological Engineering* 15, 27-39.

Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schinelasch, D., Thimm, O., Udvaedi, M.K., Stitt, M. 2004. Genome wide programming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483-2499.

Sharma OP & Bhat KT., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* (113), 1202-1205.

Singleton V, Orthofer R. & Lamuela-Raventós R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.

Soog.kim, G.; Zeng, W.; AlaliF.;McLaughlin J.L. and Sastrodihardj S. 1998. Two New mono-tetrahydrofuran ring Acetogenins: Annomuricin E and Muricapentocin from the Leaves of *Annonamuricata*.En journal Natural Products. Vol 52 No 7. Pags 1175-1178.

Szöllösi R & Szöllösi Varga I., 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation fo FRAP method). 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46 (3-4), pp. 125-127. Hungary.

Tan, K., 1986. Degradation of soil minerals by organic acid. In: Interaction of soil minerals with natural organic and microbes SSSA Spec. Pub. N° 17:1-17.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L & Byrne DH., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 669-675.

Venero Gutiérrez JR., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana Médica Militar, 2 (31), 126-133.

Vidal Quintanar RL., 2008. Protección antioxidante en los alimentos. Revista Universidad De Sonora, 26-28.

Wang, D. H., Shi, Q. H., Wang, X. F., Wei, M., Hu, J. Y., Liu, J., & Yang, F. J.,(2010). Influence of cow manure vermicompost on the growth, metabolite contents, and antioxidant activities of Chinese cabbage (*Brassica campestris ssp chinensis*). *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 689-696.

Waterhouse, AL., 2002. Determination on total phenolics.Wiley.

Yu-Hong Y.,Dong-Mei C., Yan J., Hai-Bin W., Yu-Qi D., Xu-Kui G., Hai-Bin H.,Wen-Xion L., Effect of different fertilizers on Functional Diversity of Microbial Flora in Rhizospheric Soil Under Tobacco Monoculture. 2011 Yunnan provincial Institute of Tobacco Research. China

Yu, X., Liu X., Zhu T. H., Liu G., and Mao C., 2012. "Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrientuptake by walnut".European Journal of Soil Biology

Young, I., J. Woodside., 2001. Antioxidants in health and disease.Journal of ClinicalPathology; 54, 176–186

Zhao, X. L., Mu Z. J., Cao C: M., and Wang D: Y., 2012."Growth and heavy-metal uptake by lettuce grown insoils applied with sewage sludge compost".Communications in Soil Science and Plant Analysis

Anexos

Anexo I. Análisis de varianza para fenoles totales por tratamiento chincuya (*Annona purpurea*)

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ve-rf 5010	3	73.8933	Xc
ve-rf 500	3	115.893	XXbc
ve-rf 10010	2	119.295	XXbc
ve-rf 1000	3	125.813	Xb
ve-rf 10020	1	151.62	Xb
ve-rf 00	3	160.267	Xb
ve-rf 010	3	225.88	Xa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ve-rf 00 - ve-rf 010	*	-65.6133	46.642
ve-rf 00 - ve-rf 1000		34.4533	46.642
ve-rf 00 - ve-rf 10010		40.9717	52.1474
ve-rf 00 - ve-rf 10020		8.64667	65.9618
ve-rf 00 - ve-rf 500		44.3733	46.642
ve-rf 00 - ve-rf 5010	*	86.3733	46.642
ve-rf 010 - ve-rf 1000	*	100.067	46.642
ve-rf 010 - ve-rf 10010	*	106.585	52.1474
ve-rf 010 - ve-rf 10020	*	74.26	65.9618
ve-rf 010 - ve-rf 500	*	109.987	46.642
ve-rf 010 - ve-rf 5010	*	151.987	46.642
ve-rf 1000 - ve-rf 10010		6.51833	52.1474
ve-rf 1000 - ve-rf 10020		-25.8067	65.9618
ve-rf 1000 - ve-rf 500		9.92	46.642
ve-rf 1000 - ve-rf 5010	*	51.92	46.642
ve-rf 10010 - ve-rf 10020		-32.325	69.9631
ve-rf 10010 - ve-rf 500		3.40167	52.1474
ve-rf 10010 - ve-rf 5010		45.4017	52.1474
ve-rf 10020 - ve-rf 500		35.7267	65.9618
ve-rf 10020 - ve-rf 5010	*	77.7267	65.9618
ve-rf 500 - ve-rf 5010		42.0	46.642

* indica una diferencia significativa

Anexo II. Análisis de varianza para flavonoides totales por tratamiento chincuya (*Annona purpurea*)

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ve-rf 5010	3	29.3049	Xb
ve-rf 500	3	29.4928	Xb
ve-rf 10020	1	33.5875	Xb
ve-rf 10010	2	35.6149	Xb
ve-rf 010	3	39.6076	Xb
ve-rf 00	3	42.5756	XXab
ve-rf 1000	3	53.3911	Xa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ve-rf 00 - ve-rf 010		2.96804	13.3674
ve-rf 00 - ve-rf 1000		-10.8155	13.3674
ve-rf 00 - ve-rf 10010		6.96066	14.9452
ve-rf 00 - ve-rf 10020		8.98806	18.9044
ve-rf 00 - ve-rf 500		13.0828	13.3674
ve-rf 00 - ve-rf 5010		13.2707	13.3674
ve-rf 010 - ve-rf 1000	*	-13.7835	13.3674
ve-rf 010 - ve-rf 10010		3.99263	14.9452
ve-rf 010 - ve-rf 10020		6.02003	18.9044
ve-rf 010 - ve-rf 500		10.1148	13.3674
ve-rf 010 - ve-rf 5010		10.3026	13.3674
ve-rf 1000 - ve-rf 10010	*	17.7761	14.9452
ve-rf 1000 - ve-rf 10020	*	19.8035	18.9044
ve-rf 1000 - ve-rf 500	*	23.8983	13.3674
ve-rf 1000 - ve-rf 5010	*	24.0861	13.3674
ve-rf 10010 - ve-rf 10020		2.0274	20.0512
ve-rf 10010 - ve-rf 500		6.12216	14.9452
ve-rf 10010 - ve-rf 5010		6.31	14.9452
ve-rf 10020 - ve-rf 500		4.09476	18.9044
ve-rf 10020 - ve-rf 5010		4.28261	18.9044

ve-rf 500 - ve-rf 5010		0.187846	13.3674
------------------------	--	----------	---------

* indica una diferencia significativa.

Anexo III. Análisis de varianza para actividad antirradical por tratamiento chincuya (*Annona purpurea*)

Método: 95.0 porcentaje LSD

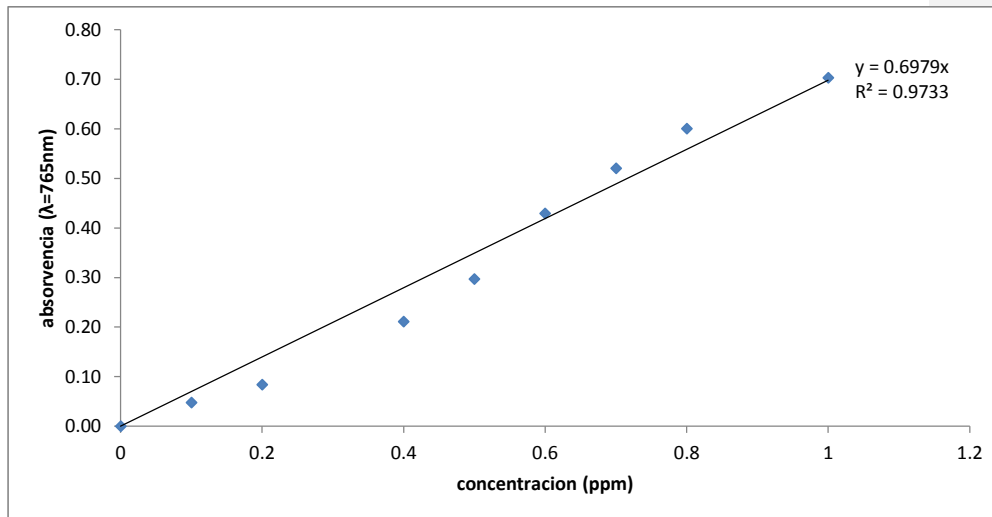
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ve-rf 1000	3	58.8698	Xb
ve-rf 500	3	62.5656	Xb
ve-rf 10020	1	64.9499	XXab
ve-rf 5010	3	65.8441	XXab
ve-rf 10010	2	67.99	XXab
ve-rf 010	3	75.0629	Xa
ve-rf 00	3	75.2688	Xa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ve-rf 00 - ve-rf 010		0.205875	10.3666
ve-rf 00 - ve-rf 1000	*	16.399	10.3666
ve-rf 00 - ve-rf 10010		7.27883	11.5902
ve-rf 00 - ve-rf 10020		10.3189	14.6606
ve-rf 00 - ve-rf 500	*	12.7032	10.3666
ve-rf 00 - ve-rf 5010		9.42475	10.3666
ve-rf 010 - ve-rf 1000	*	16.1931	10.3666
ve-rf 010 - ve-rf 10010		7.07296	11.5902
ve-rf 010 - ve-rf 10020		10.113	14.6606
ve-rf 010 - ve-rf 500	*	12.4974	10.3666
ve-rf 010 - ve-rf 5010		9.21888	10.3666
ve-rf 1000 - ve-rf 10010		-9.12017	11.5902
ve-rf 1000 - ve-rf 10020		-6.08011	14.6606
ve-rf 1000 - ve-rf 500		-3.69576	10.3666
ve-rf 1000 - ve-rf 5010		-6.97425	10.3666
ve-rf 10010 - ve-rf 10020		3.04006	15.5499

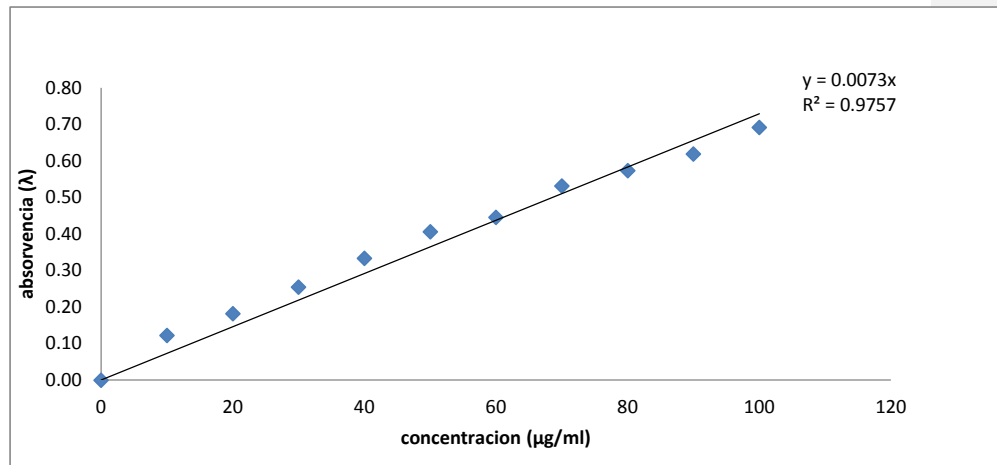
ve-rf 10010 - ve-rf 500		5.42442	11.5902
ve-rf 10010 - ve-rf 5010		2.14592	11.5902
ve-rf 10020 - ve-rf 500		2.38436	14.6606
ve-rf 10020 - ve-rf 5010		-0.894134	14.6606
ve-rf 500 - ve-rf 5010		-3.27849	10.3666

* indica una diferencia significativa.

ANEXO IV. Curva Estándar de Ácido Gálico (Método de FolinCiocalteu). Cuantificación de Fenoles Totales.



ANEXO V. Curva Estándar de Quercetina (Método de Tricloruro de Aluminio). Cuantificación de flavonoides



ANEXO VI. Curva Estándar de Naringenina(método colorimétrico de 2,4 Dinitrofenilhidrazina). Cuantificación de Flavanonas.

