

Universidad de Concepción
Campus Los Ángeles
Escuela de Ciencias y Tecnologías
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



Determinación de efecto antioxidante en la parte aérea de la especie vascular *Acaena pinnatifida* Ruiz et Pav.

Memoria de Título para
optar al Título de Ingeniero
en Biotecnología Vegetal.

Daniel Eduardo Troncoso Aceituno

Los Ángeles – Chile
2018

Determinación de efecto antioxidante en la parte aérea de la especie vascular *Acaena pinnatifida* Ruiz et Pav.

Alumno

Daniel Eduardo Troncoso Aceituno
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

Dr. Carlos Schneider Barrera
Profesor Asociado
Químico Farmacéutico

Jefe de carrera

Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero en Ejecución Forestal

Director Departamento

M. Sc. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero en Ejecución Forestal

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi madre Yanira Loreto Aceituno Larenas, por el apoyo incondicional que me brindo en estos años duros y largos de mucho esfuerzo y dedicación, ya que, a pesar de las circunstancias siempre tuvo fé en mí.

También quiero agradecer profundamente a mis abuelos, quienes en los malos momentos me hicieron recapacitar y no dejaron que me rindiera ante cualquier adversidad, solo decir que los quiero mucho a ellos y a mis amigos Scarlett Vera y Darwin Muñoz.



Resumen

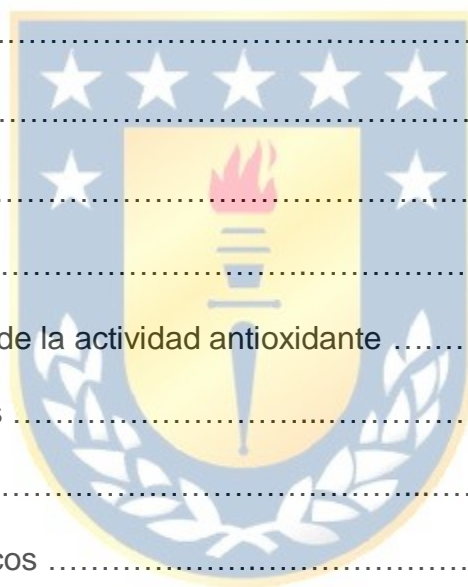
Los metabolitos secundarios están presentes en las plantas, las cuales por su diversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una rica fuente en antioxidantes, y para la búsqueda de nuevos compuestos con dicha actividad, este trabajo se enfocó en la especie perenne *Acaena pinnatifida*, comúnmente conocida como pimpinela, la cual se caracteriza por tolerar condiciones andinas, ambientes secos, grandes cambios de temperatura en verano e invierno, vientos fuertes, y una gran radiación solar. El hábitat de *A. pinnatifida* sugiere un desarrollo de un metabolismo químico como estrategia de adaptación a sus condiciones ambientales extremas. Mediante análisis espectrofotométrico del extracto metanólico se determinó la actividad antioxidante *in vitro*, la cual fue medida empleando técnicas de captura de los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y Ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS⁺). Los resultados del efecto antioxidante fueron expresados como equivalentes de Trolox para ABTS⁺ y Ácido gálico para DPPH. La presencia de metabolitos secundarios se determinó, mediante el uso de reactivos de coloración y de precipitación. Para los ensayos con DPPH y ABTS⁺, los valores de IC₅₀ medidos fueron de 0.49 mg/mL y 0.28 mg/mL respectivamente, siendo el IC₅₀ la concentración del extracto necesaria para inhibir en un 50% la absorbancia del radical. Los resultados en equivalentes, de la actividad inhibidora para ABTS⁺, fueron 66.12 ± 0.82 mg de trolox/gr de extracto y 23.42 ± 1.40 mg de Ácido gálico/gr de extracto, en el caso de DPPH. Los ensayos fitoquímicos observados sobre el efecto antioxidante revelan la presencia de Taninos, Cumarinas y derivados del núcleo esteroideo.

Summary

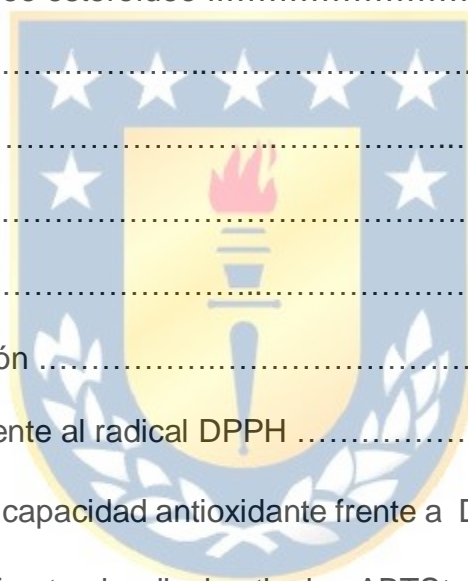
Secondary metabolites are present in plants, which due to their diversity and richness in secondary metabolites, provide a rich source of antioxidants, and for the search of new compounds with this activity, this work focused on the perennial species *Acaena pinnatifida*, commonly known as pimperl, which is characterized by tolerating Andean conditions, dry environments, large changes in temperature in summer and winter, strong winds, and solar radiation. The habitat of *A. pinnatifida* suggests the development of a chemical metabolism as a strategy of adaptation to its extreme environmental conditions. By spectrophotometric analysis of the methanolic extract, the antioxidant activity in vitro was determined, which was measured using techniques of capture of the radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS⁺). The results of the antioxidants effect were expressed as equivalents of Trolox for ABTS⁺ and gallic acid for DPPH. The presence of secondary metabolites was determined by the use of staining and precipitation reagents. For the DPPH and ABTS⁺ assays, the IC₅₀ values measured were 0.49 mg/mL and 0.28 mg/mL respectively, with the IC₅₀ being the concentration of the extract necessary to inhibit the absorbance of the radical by 50%. The results in equivalents, of the inhibitory activity for ABTS⁺, were 66.12 ± 0.82 mg of Trolox /gr of extract and 23.420 ± 1.400 mg of Gallic acid /gr of extract, in the case of DPPH. The phytochemical assays reveal the presence of tannins, coumarins and derivatives of the steroid nucleus.

Índice de contenidos

Resumen	4
Abstract	5
Nomenclatura y abreviaciones	8
1. Introducción	9
2. Hipótesis	10
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. Marco teórico	10
4.1 Actividad antioxidante	10
4.2 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	11
4.3 Metabolitos secundarios	13
4.3.1 Terpenos	13
4.3.2 Compuestos fenólicos	13
4.3.3 Glicosidos	15
4.3.4 Alcaloides	15
5. Metodología.....	16
5.1 Material vegetal.....	16
5.2 Determinación del efecto antioxidante utilizando el radical DPPH	16
5.2.1 Ensayo de cinética mediante el radical DPPH	17
5.3 Determinación del efecto antioxidante utilizando el radical catiónico ABTS.....	18
5.3.1 Ensayo de cinética mediante el radical catiónico ABTS.....	19
5.4 Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox y ácido gálico	19

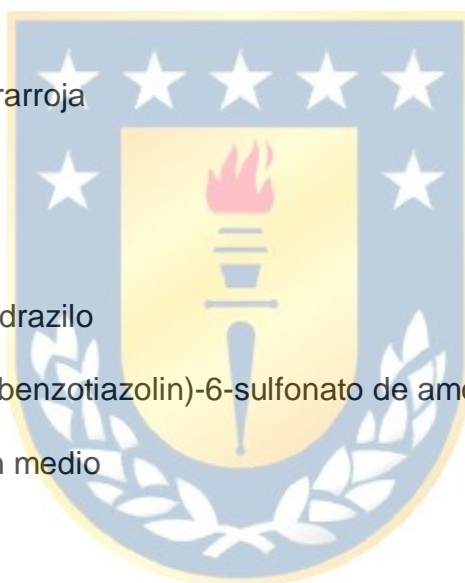


5.5	Determinación del contenido de fenoles totales en el extracto	20
5.6	Análisis fitoquímico	21
5.6.1	Flavonoides	21
5.6.2	Taninos	22
5.6.3	Cumarinas	22
5.6.4	Saponinas.....	22
5.6.5	Derivados del núcleo esteroideo	22
5.6.6	Alcaloides	23
5.6.7	Antocianinas	23
5.6.8	Heterosidos	23
6	Resultados	24
6.1	Rendimiento de extracción	24
6.2	Actividad antioxidante frente al radical DPPH	24
6.3	Efecto en el tiempo en la capacidad antioxidante frente a DPPH	27
6.4	Capacidad antioxidante frente al radical catiónico ABTS ⁺	27
6.5	Equivalentes de trólox según ensayos con ABTS ⁺	29
6.6	Metabolitos secundarios	30
7	Discusión	31
8	Conclusiones	32
9	Bibliografía	33
10	Anexos	38



NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

mL:	mililitro
g:	gramos
cm:	centímetros
nm:	nanómetros
μL:	microlitro
μg:	microgramo
FT-IR:	Espectrometría Infrarroja
BM:	Baño maría
FC:	Folin-Ciocalteu
DPPH:	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
ABTS:	2,2-azino-bis-3(etilbenzotiazolin)-6-sulfonato de amonio
IC ₅₀ :	Índice de inhibición medio
RL:	Radical libre
Trólox:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
MS:	Metabolitos secundarios
UV:	Ultravioleta
AOH:	Compuesto Antiradical



1. INTRODUCCIÓN

Según se ha reportado en diversos estudios, los fenoles, especialmente los flavonoides (Heim et al. 2002), y los antocianos (Espin et al. 2000; Heim et al. 2002; Moyer et al. 2002; Kuskoski et al. 2003), muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Lapidot et al. 1999; Ishige et al. 2001; Wang y Mazza 2002; Katsube et al. 2003).

Muchas plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos como métodos paliativos para las enfermedades humanas y ofrecen una nueva fuente de compuestos químicos biológicamente activos como agentes antimicrobianos (Das et al. 2010)

La actividad biológica de un extracto vegetal, como la actividad antioxidante y antimicrobiana, está dada por el efecto sinérgico o inhibitorio de los compuestos presentes (Kuskoski et al. 2003), y el efecto además depende del solvente utilizado en la obtención del extracto (Das et al. 2010). La actividad biológica se ha reportado en un gran número de taxas (Villaño 2005).

El estrés oxidativo inducido por radicales de oxígeno sería el principal factor en varias enfermedades degenerativas como el cáncer y úlceras gástricas (Eldeen et al. 2011). Los radicales de oxígeno como el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se producen naturalmente durante el metabolismo celular en procesos como la fotosíntesis, la fotorrespiración, etc. (Foyer y Noctor 2000).

La evidencia científica sugiere que los compuestos derivados de las plantas poseen actividades biológicas que pueden proteger los tejidos contra el estrés oxidativo (Aherne et al. 2007). Muchos de estos agentes han sido identificados como captadores de radicales libres o eliminadores de oxígeno activo (Kumaran y Karunakaran, 2007), lo que implica que las reacciones antioxidantes de los extractos de las plantas pueden ser procesos complejos y se necesitan múltiples ensayos para obtener una comprensión satisfactoria de estos procesos (Qiu et

al. 2010). Basado en el interés científico anteriormente mencionado en el presente estudio, fue evaluada la actividad antioxidante del extracto metanólico obtenido desde la parte aérea de *Acaena pinnatifida*.

2. HIPÓTESIS

La especie *Acaena pinnatifida* posee actividad antioxidante en sus hojas y tallos relacionada con su contenido de polifenoles.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante en extracto metanólico obtenido desde la parte aérea de la especie vegetal *Acaena pinnatifida*

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la actividad antioxidante en extracto metanólico de *Acaena pinnatifida* mediante los radicales DPPH y ABTS
2. Determinación cuantitativa en *Acaena pinnatifida* de poli fenoles expresados en ácido gálico.
3. Determinación cualitativa de diferentes grupos de metabolitos secundarios en la parte aérea de *Acaena pinnatifida*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Actividad Antioxidante

La especie *Acaena pinnatifida* o pimpinela como nombre común es una especie que, en Chile, crece en condiciones ambientales muy extremas para el desarrollo de otras especies vegetales, como son su elevación que está muy por encima de la línea del bosque y las condiciones de agua, ya que puede sobrevivir en lugares con 5 meses de sequía, y sus condiciones de luz, debido a que habita

en lugares sin ninguna protección ante la radiación solar. Debido a los aspectos anteriormente mencionados, esta especie posee una buena capacidad antioxidante. Esta especie crece principalmente en las zonas andinas de Chile y Argentina, y en Chile crece desde la región de Valparaíso hasta la región de Magallanes.

Como productos desde los procesos fisiológicos metabólicos normales de las plantas, se producen radicales libres (RL) como residuos, los que al reaccionar con otros átomos provocan daño celular, con efectos perjudiciales como la disminución a la resistencia al ambiente y aumento en la fragilidad celular (Hernández y Prieto 1999). Los RL son altamente inestables debido a que contienen uno o más electrones desapareados, lo que además los convierte en altamente reactivos (Zapata et al. 2014).

Un antioxidante, de acuerdo a Cano y Marino (2005), se define como “Toda aquella molécula capaz de evitar o prevenir el proceso oxidativo de otras moléculas, actuando como donador de electrones” (Cano y Marino 2005). De esta manera, es capaz de estabilizar una molécula con un electrón desapareado (RL) cediéndole un electrón, evitando con esta reacción de reducción una reacción del radical con otras moléculas, y previniendo de esta forma un posible estrés oxidativo (Causse 2010).

El estrés oxidativo se genera ya que al alcanzar la estabilidad electroquímica, los RL suelen captar el electrón faltante en moléculas estables, de forma muy rápida, descomponiendo ácidos nucleicos y otras moléculas de membrana (Kumar et al. 2006).

En consecuencia, el estrés oxidativo se neutraliza por medio del efecto de compuestos antioxidantes, que se encuentran en plantas en concentraciones bajas, y que son capaces de retardar o incluso prevenir la oxidación, interactuando con el radical libre (Valenzuela y Pérez 2013).

4.2 Métodos de Evaluación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante puede ser evaluada por distintos métodos, y entre los más utilizados está el uso de sustancias cromógenas que posean una naturaleza radical. De esta manera la absorbancia será reflejada en una pérdida de

coloración, que a su vez será proporcional a la concentración del compuesto antioxidante. Cuantificando dicha pérdida de coloración, se registrará la capacidad de una muestra de poder secuestrar radicales libres, representados en este caso por las sustancias cromógenas (Pérez et al. 2003).

Algunos ejemplos de compuestos cromógenos son ABTS, DPPH, DPD, DMPO y FRAP, aunque los más utilizados son ABTS y DPPH debido a su alta estabilidad (Anao 2000; Kuskowski et al. 2003).

El método con la utilización de DPPH (Brand-Williams et al. 1995) es el proceso más utilizado ya que se considera el más sencillo de realizar (Kedare y Sing 2011; Espinoza-Leal et al. 2015). La base de este método es la reducción de la absorbancia del radical DPPH, determinada en el espectrofotómetro UV-Visible a 517 nm.

Cuando disminuye la absorbancia del radical DPPH, producto de la reacción con el sustrato antioxidante, se disuelve la coloración violeta característica volviéndose transparente o amarillento (Tovar del Río 2013).

El DPPH puede ser disuelto en metanol o etanol, y al reaccionar con el antioxidante este último cede un hidrogeno (Figura 1), capturando el hidrogeno y estabilizando al DPPH.

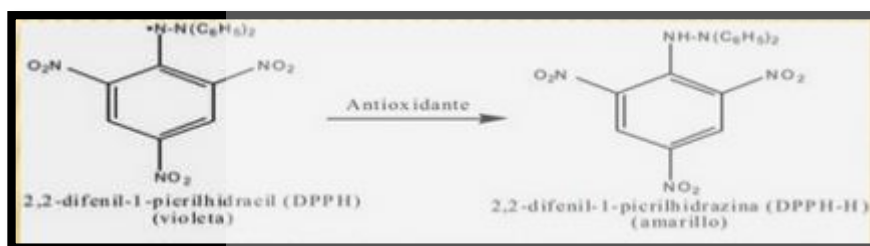


Figura 1: Reacción del radical DPPH con agente antioxidante

Por otro lado, el método basado en medidas con el radical ABTS (Re et al. 1999) debe prepararse en base de ABTS, que es radicalizado por medio de una reacción en la que se utiliza persulfato de potasio (Figura 2). Las medidas con ABTS se efectúan en espectrofotómetro UV-Visible, a 734 nm (Kuskoski et al.

2003) para evaluar la capacidad antioxidante conforme disminuya la absorbancia y la coloración del radical catiónico ABTS.

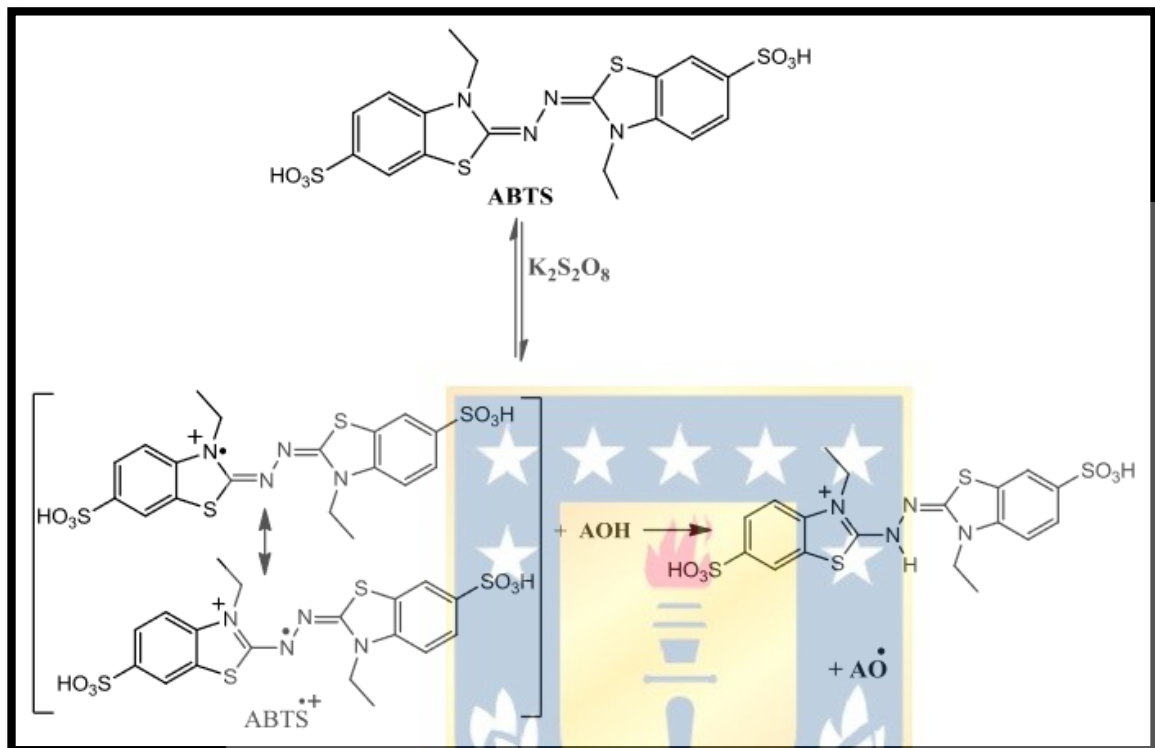


Figura 2: Oxidación de ABTS por parte de persulfato de potasio, produciendo el radical ABTS y su reacción con un compuesto antirradical (AOH).

4.3 Metabolitos Secundarios

4.3.1 Terpenos

En este grupo se pueden encontrar hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

Es el grupo más abundante entre los metabolitos secundarios, son insolubles en agua, y se caracterizan por su estructura compuesta de unidades de isopreno, compuesto por cinco carbonos

4.3.2 Compuestos fenólicos

Esta clasificación la integran Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos (Figura 3).

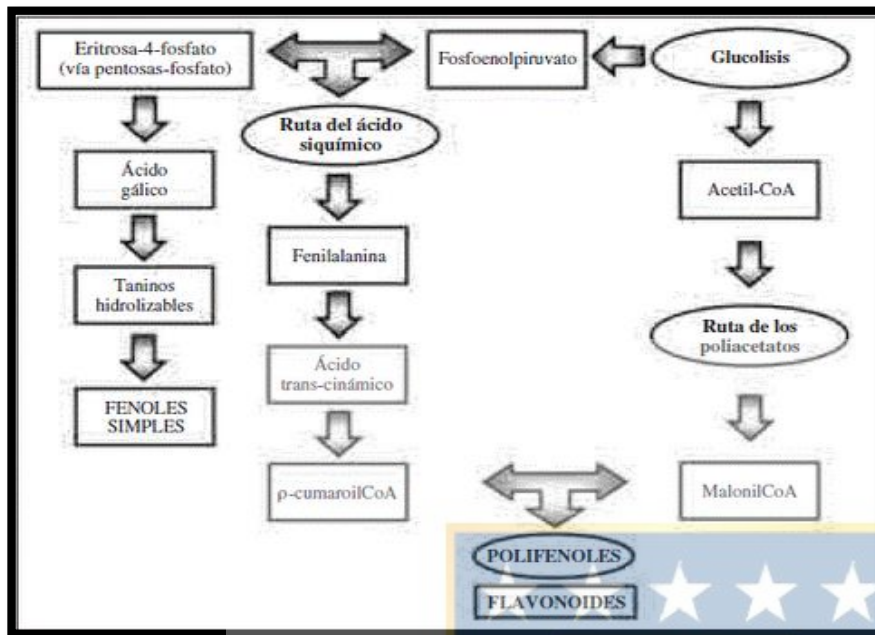


Figura 3: Ruta de síntesis de distintas familias de compuestos fenólicos

Entre algunas de sus funciones se encuentra la protección ante herbívoros y fitopatógenos (Alasalvar et al. 2001), y el color y/o el sabor de frutas y verduras (Ramírez et al. 2016)

Dependiendo de la cantidad de carbonos que constituyen su estructura base, se clasifican en grupos de fenoles simples o como polifenoles (Sgherri et al. 2003).

Según Ramírez et al. (2016) los polifenoles, son por definición “un conjunto de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas “.

Entre estas dos clasificaciones (fenoles y polifenoles), son los polifenoles provistos de la mejor estructura química antioxidante. Se destacan en su función antioxidante los ácidos fenólicos (Figura 4b) y los flavonoides (Figura 4a) (Sroka y Cisowski 2003).

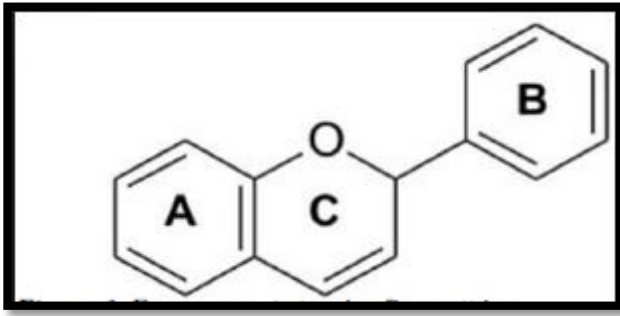


Figura 4a: Estructura química de los flavonoides.

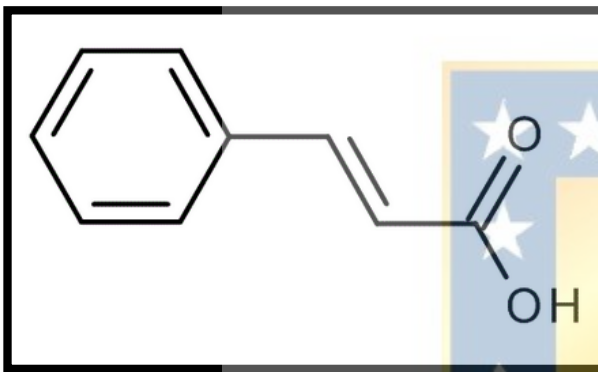


Figura 4b: Estructura química de los ácidos fenólicos.

4.3.3 Glicósidos

El grupo de glicósidos está formado por Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianógenicos y glucosinolatos.

Poseen en su estructura un enlace glicósidico. Este enlace se forma luego de que dos moléculas de azúcar (una de ellas con un grupo hidroxilo) se condensan.

4.3.4 Alcaloides

Es una gran familia de MS, cuyas características principales son ser solubles en agua, contener al menos un átomo de nitrógeno, y poseer una marcada actividad biológica.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal

Las muestras de *Acaena pinnatifida* fueron colectadas desde las Termas de Chillán, ubicadas en la región del Bío-bío, comuna de Chillán. Sus coordenadas son 36°54'33"S 71°25'08"O y se localiza a 2700 msnm.

El material fue trasladado hasta el laboratorio de extractos vegetales en bolsas cerradas, a temperatura ambiente. Al llegar las plantas fueron lavadas con abundante agua, separándolas cuidadosamente de otras especies vegetales. Posteriormente fueron secadas en una estufa a 30°C. Se molieron con una Minipimer 250W 2609 Stick Mixer, hasta obtener una muestra a la forma de polvo, desde la planta.

Para la preparación del extracto, se utilizó la parte aérea de la planta, *A. pinnatifida*, esta fue triturada y pesado en una balanza analítica (METTLER TOLEDO, Ab204-5) y posteriormente depositado en sachet de papel filtro, para llevar a cabo la extracción del extracto en un equipo Soxhlet (GLASSCO, 304918). La extracción se realizó a una temperatura de 65 ± 5 °C utilizando metanol grado técnico (CH₃OH) (Equilab) como solvente. El extracto obtenido se concentró en Rotavapor (Heidolph, Laborata 4001 efficiennt) a 65 ± 5 °C, para posteriormente ser almacenado en frascos de vidrio y secado en estufa (MEMMERT, UFB 500) a una temperatura de 35 °C, hasta obtener un peso constante.

5.2 Determinación del efecto antioxidante utilizando el radical DPPH

Para la medición de la actividad inhibidora del radical libre DPPH se empleó el método planteado por (Gavinia et al. 2009), con modificaciones. Se preparó una solución patrón de 36 µg/mL del radical libre DPPH, para lo cual se pesaron 1.8 mg de DPPH (Aldrich), se dispusieron en un matraz aforado de 50 mL, y se llevó a volumen con metanol grado técnico (Equilab), la solución fue almacenada a 4 °C y recubierta con papel aluminio para mayor protección contra la luz. Antes de las mediciones la solución de DPPH fue ajustada hasta obtener una absorbancia cercana a 0.9 ± 0.1 a una longitud de onda de 517 nm.

A un volumen de 2 ml del radical DPPH, fueron adicionados 175 μ L de extracto metanólico de *A. pinnatifida*, fue agitado suavemente durante 1 minuto a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectroquant, Pharo 300) a 517 nm. Las concentraciones de extracto evaluadas en este ensayo fueron 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8 mg/mL, y cada medición fue realizada en triplicado.

El blanco empleado para las mediciones fue metanol (Equilab, grado técnico) y una mezcla de 2 mL de DPPH y 175 μ L de metanol como control negativo.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad del radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \%I = \frac{A-A_1}{A} \times 100$$

Donde A es la absorbancia del control negativo, y A_1 es la absorbancia de la muestra.

Determinación de la concentración media inhibidora (IC_{50}) en relación al DPPH

Luego de haber calculado los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones, estas fueron ajustadas a una regresión y en base a la curva se determinó la concentración media inhibidora (IC_{50}), es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % de absorbancia del radical DPPH.

5.2.1 Ensayo de cinética mediante el radical DPPH

Con el dato de la concentración media inhibidora (IC_{50}), se evaluó el efecto antioxidante del extracto a través del tiempo, para lo cual se mezcló 2 mL de DPPH más 175 μ L de extracto, y tras un minuto de agitación suave a temperatura ambiente, se procedió a realizar las medidas de absorbancia a 517 nm cada 5 minutos, por un periodo de 180 minutos, y las mediciones fueron realizadas en triplicado.

5.3 Determinación del efecto antioxidante utilizando el radical catiónico ABTS

La metodología usada, fue desarrollada y descrita por Kuskoski et al (2003), sujeta a algunas modificaciones. La preparación del radical catiónico desde ABTS (Merck) se llevó a cabo mediante la reacción de persulfato de potasio (2,45 mM) con ABTS (ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) (7 mM). Para lograr estas concentraciones se mezclaron 33.111 mg de persulfato de potasio y 180.117 mg de reactivo ABTS en un matraz aforado de 50 mL aforado con metanol (Equilab, grado técnico). La mezcla se agito perfectamente y el frasco fue cubierto con papel aluminio dejándolo reposar 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez formado el radical catiónico, denotado por un color azul intenso, este se diluyó hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm (Spectroquant, Pharo 300).

Una vez ajustado el $ABTS^+$, se tomó una alícuota de 2 mL del radical, al cual se le adicionó 175 μ L del extracto metanólico de *A. pinnatifida*, se agitó suavemente para homogenizar la mezcla a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia luego de 1 minuto a 734 nm, las concentraciones evaluadas en este ensayo fueron 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 mg/mL, y cada medición fue realizada por triplicado.

El blanco empleado para estas mediciones fue Metanol (Equilab, grado técnico) y una mezcla de 2 mL de ABTS y 175 μ L de metanol como control negativo.

Posteriormente se calculó los porcentajes de inhibición para cada concentración evaluada haciendo uso de la misma expresión matemática empleada para el análisis de la capacidad de captura del radical ABTS, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \%I = \frac{A-A_1}{A} \times 100$$

Donde A es la absorbancia del blanco, y A_1 es la absorbancia de la muestra

Determinación de la concentración media inhibidora (IC_{50}) en relación al $ABTS^+$

Luego de haber calculado los porcentajes de inhibición con ABTS⁺, para cada una de las concentraciones del extracto, estas fueron ajustadas a una regresión y en base a la curva calculada, se determinó la concentración media inhibidora (IC₅₀), es decir, la concentración de extracto metanólico capaz de inhibir el 50 % de absorbancia del radical ABTS.

5.3.1 Ensayo de Cinética mediante el radical catiónico ABTS

Una vez calculada la concentración media inhibidora (IC₅₀), se evaluó el efecto antioxidante del extracto a través del tiempo, para lo cual se mezclaron 2 mL de ABTS⁺, mas 175 µL de extracto, y tras un minuto de agitación suave a temperatura ambiente, se procedió a realizar medidas de absorbancia a 734 nm cada 5 minutos, por un periodo de 180 minutos, y las mediciones fueron realizadas en triplicado.

5.4 Capacidad antioxidante en equivalentes de Trólox y Ácido gálico

Con el fin de comparar los resultados de capacidad antioxidante del extracto metanólico de *A. pinnatifida* que se obtuvieron mediante los diferentes métodos (DPPH y ABTS⁺), se determinó la equivalencia en, Ácido gálico y Trólox, tanto para la reducción del radical DPPH y del radical catiónico ABTS⁺, respectivamente (Bouaziz et al. 2008).

Para determinar la disminución de la absorbancia del radical DPPH, se mezcló 2 mL de radical con 175 µL del extracto en concentración 0.5 mg/mL, leída a 517 nm, luego de 1 minuto de agitación a temperatura ambiente, y esta lectura se realizó en triplicado. El resultado de la disminución del radical fue interpolado en una curva de calibración, confeccionada previamente con concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg/mL de ácido gálico (Merck), para la confección de la curva se mezcló 2 ml del radical con 175 µL

de ácido gálico, durante un minuto a temperatura ambiente y se procedió con su lectura a 517 nm., en duplicado. De la misma forma para determinar la disminución del radical catiónico ABTS⁺, se mezcló 2 mL del radical con 175 µL de extracto en concentración 0.125 mg/mL; se agitó suavemente por un minuto y se leyó su absorbancia a 734 nm. Las mediciones se realizaron en triplicado, y fueron comparadas con una curva de calibración confeccionada previamente con

concentraciones 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035, 0.040, 0.045, 0.050 y 0.055 mg/mL de Trólox (Merck), para la confección de la curva se mezcló 2 mL del radical con 175 μ L de Trólox, se agitó suavemente por 1 minuto y se leyó su absorbancia a 734 nm, cada determinación se realizó por duplicado.

Los resultados fueron expresados como X mg de Ácido gálico y Trólox equivalentes en 1000 mg (1gr) de extracto seco.

5.5 Determinación del contenido de fenoles totales en el extracto

Esta determinación de fenoles totales presentes en el extracto metanólico de *A. pinnatifida*, se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Follin-Ciocalteu (Merck) utilizando ácido gálico como referencia, basándose en el procedimiento descrito por Gulcin et al. (2007), con algunas modificaciones.

Se preparó una disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Merck) al 20 % pesando 20 gr de carbonato de sodio en un matraz aforado de 100 mL, inicialmente se disolvió en 80 mL de agua destilada y se llevó a ultrasonido hasta su completa disolución, finalmente se llevó a su volumen final correspondiente a 100 mL.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el reactivo Follin-Ciocalteu (Dewanto 2002), para lo cual fueron pesados 10 mg de extracto y llevados a un matraz aforado de 10 mL, se agregaron 10 mL de metanol grado técnico, para obtener una concentración final de 1 mg/mL, luego se midieron 180 μ L de la disolución, y fueron llevados a un matraz de 25 mL, para obtener una concentración final de 0.0072 mg/mL. A continuación de esto, fueron mezclados con 125.5 mL de agua destilada, 1.25 mL de reactivo Follin-Ciocalteu y 5 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20 %, se llevó a un volumen final de 25 mL con agua destilada, se agitó suavemente y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro UV-Visible (Spectroquant, Pharo 300). Este procedimiento se realizó por triplicado.

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 mg/mL, para lo cual se pesó 1 mg de ácido gálico, se dispuso en un matraz aforado de 10 mL y se llevó a volumen con metanol grado

técnico, a partir de la solución patrón de ácido gálico, se tomaron 250, 500, 750, 1000, 1250 y 1500 μL y se dispusieron en matraces aforados de 25 mL, para obtener como concentración final en cada matraz 1, 2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, luego se adiciono a cada matraz 12.5 mL de agua destilada, 1.25 mL de reactivo de Follin-Ciocalteu y 5 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20 %, luego se llevó a un volumen final de 25 mL con agua destilada, se agitó suavemente y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto el extracto de *A. pinnatifida*. Finalmente se leyó la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro de ultravioleta-visible (Spectroquant, Pharo 300).

El contenido de fenoles totales se terminó como los equivalentes de ácido gálico (GAE, mg de ácido gálico/g de extracto), y los valores se presentaron como la media de los datos del análisis \pm la desviación estándar.

5.6 Análisis Fitoquímico

Luego de obtener el extracto metanólico de *A. pinnatifida*, y determinar la capacidad antioxidante de esta, se procedió a determinar los metabolitos secundarios presentes, tales como Flavonoides, Taninos, Cumarinas, Saponinas, Derivados del Núcleo Esteroidal, Alcaloides, Antocianinas y Heterósidos (Antraquinónicos, Cianogénicos, Cardiotónicos), de acuerdo a la metodología descrita por García et al. (2009) con algunas modificaciones. Como criterio para valorar el resultado observado, se utilizó el sistema de cruces donde la presencia abundante se denotó con (+++), presencia relativamente abundante (++) , presencia escasa (+) y no detectado (-).

Los diferentes metabolitos se reconocieron mediante las metodologías descritas a continuación.

5.6.1 Flavonoides

Se mezcló una porción del extracto y material vegetal (Tallos y hojas) por separados con metanol absoluto, luego se filtró. Este filtrado, se dispuso en un tubo de ensayo con magnesio y otro con Zinc. Luego se adicionó HCL concentrado, gota a gota, hasta el desprendimiento de hidrogeno. Posteriormente, se observaron los cambios de color durante 10 minutos. La

aparición de una coloración rosada, roja, violeta o anaranjada indica la presencia de flavonoides (Alcaraz y Alcantara 2009; García et al. 2009)

5.6.2 Taninos

Para detectar la presencia de taninos el material vegetal (Tallos y hojas) y el extracto crudo fueron tratados por separado con agua en ebullición. El filtrado fue dispuesto en un tubo de ensayo, luego se adicionaron 3 gotas de FeCl_3 al 5%. La aparición de coloración o precipitado verde o azul se consideraba positivo para taninos pirocatéquicos no hidrolizables o de taninos pirogálicos hidrolizables (García et al. 2009; Sánchez et al. 2010).

5.6.3 Cumarinas

Para su detección se trató tanto el extracto como el material vegetal (Tallos y hojas) con H_2SO_4 al 10%, filtrado por algodón. Posteriormente el filtrado se trató con éter etílico y se decantó la fase orgánica en un tubo de ensayo, la fase orgánica se evaporó a sequedad, y se suspendió en agua estéril caliente. Luego se adicionaron 3 gotas de amoníaco concentrado. Finalmente se observó bajo la luz UV a 366 nm. Una fluorescencia color celeste revela la presencia de Cumarinas (García et al. 2009; Sánchez et al. 2010).

5.6.4 Saponinas

La presencia de saponinas se determinó mezclando vigorosamente una pequeña porción del material vegetal, con aproximadamente 5 mL de una solución acuosa (agua destilada), la formación de espuma persistente, durante al menos 15 minutos se consideró indicativo de un resultado positivo en la prueba. En el caso de las saponinas el criterio utilizado fue el índice de espuma: donde el contenido abundante (+++) corresponde a 14 mm o más de espuma formada; moderado (++) entre 10 y 14 mm y bajo (+) menor a 10 mm y en ausencia de espuma (-) (Galindo et al. 1989; García et al. 2009).

5.6.5 Derivados del Núcleo Esteroideo

El extracto y material vegetal (Tallos y hojas) fueron disueltos en cloroformo por separado, luego fue filtrado en algodón, el filtrado obtenido se secó con Na_2SO_4 anhidrido y mediante el calor a baño maría se evaporó el solvente restante. Al

residuo obtenido se le practicó la reacción de Liebermann: el residuo fue disuelto en 1 ml de anhídrido acético, bajo baño maría, posteriormente se enfrió, y se adicionó H_2SO_4 concentrado. La presencia de una coloración verde intenso indicó el resultado positivo de la prueba (Galindo et al. 1989; García et al. 2009)

5.6.6 Alcaloides

Para determinar la presencia de alcaloides se trató directamente el material vegetal (Tallos y Hojas), y el extracto con un solvente orgánico poco polar (Cloroformo) en un medio alcalino (NH_3), para filtrar a continuación. Posteriormente se decantó la fase orgánica en un vidrio reloj y mediante calor se evaporó el solvente. El residuo se trató con 3 gotas de HCl al 1 %, se distribuyó en vidrio reloj donde se practicó las reacciones de alcaloides adicionando reactivo de meyer o lugol. Se verifica un resultado positivo de la prueba, al obtener un precipitado (Galindo et al. 1989; García et al. 2009).

5.6.7 Antocianinas

Para esto se somete el material vegetal (Tallos y Hojas) y extracto a una solución acuosa, durante 5 minutos a punto de ebullición. Posteriormente se filtró, y el filtrado se dispuso en tubos de ensayo donde se adicionaron 1 mL de NaOH al 1 % y HCl al 1% respectivamente. Se asume como resultado positivo la formación de coloración diferente en pH básico (NaOH) y Ácido (HCl) (García et al, 2009).

5.6.8 Heterosidos

El extracto bruto y el material vegetal fueron colocados por separado en tubos de ensayo y se adicionó 1 mL de H_2SO_4 concentrado a cada tubo. La formación de color rojizo en la totalidad del material fue indicio de reacción positiva (Floriani 1938).

- a) Heterósidos Antraquinónicos: se trató el material vegetal con Ácido nítrico concentrado y KOH al 2 %. La formación de color rojo intenso en la totalidad del material fue indicio de reacción positiva (Floriani 1938).
- b) Heterósidos Cianogénicos: se inactivo el material vegetal por efecto del calor, posteriormente se sumergió en una solución de KOH al 2 % durante

media hora, se llevó luego a una solución ferroso-ferrica y se sometió a ebullición durante 3 minutos. Se adicionó luego una solución de HCl al 1 %. La formación de color azul de Prusia observada al microscopio en la totalidad del material se consideró indicio de reacción positiva (Floriani 1938).

- c) Heterósidos Cardiotónicos: Se adicionó al material vegetal una solución de sulfato férrico al 5 % y Ácido acético glacial, luego sulfato férrico en H₂SO₄ concentrado. La formación de color verde azulado en la totalidad del material fue indicio de reacción positiva (Floriani 1938).

6. RESULTADOS

6.1 Rendimiento de extracción

Fueron realizadas 4 extracciones metanólicas en equipo Soxhlet empleando un total de masa vegetal seca de 52.662 gr. El peso final del extracto seco total obtenido de las 6 extracciones fue de 4.059 gr. El extracto obtenido corresponde al 13.1 del peso seco de la parte área de la planta.

$$\frac{52,662}{4,059} \longrightarrow \frac{100}{X} \qquad X = \frac{4,059 \times 100}{52,662} \qquad X = 7,70$$

6.2 Actividad antioxidante frente al radical DPPH

A partir del ensayo realizado con el radical DPPH (Figura 6), en donde se evaluaron concentraciones entre el rango de 0.1 a 0.2 mg/ml se observó una alta actividad antioxidante; sin embargo, en las concentraciones más altas se pudo apreciar un aumento en la absorbancia (Anexo 1), por lo que se decidió realizar las mediciones posteriores en un rango menor (Gráfico 1). El segundo ensayo antioxidante con DPPH, contemplando concentraciones comprendidas entre 0.1 y 1.8 mg/ml (Anexo 1), permitió observar una actividad antioxidante positiva por parte del extracto acuoso de *A. pinnatifida* obteniéndose una disminución del 76.1% ± 3.3% con la mayor concentración estudiada (1.8 mg/ml), y una mínima actividad del 12.1 % ± 0.8%, con la concentración de 0.1 mg/ml.

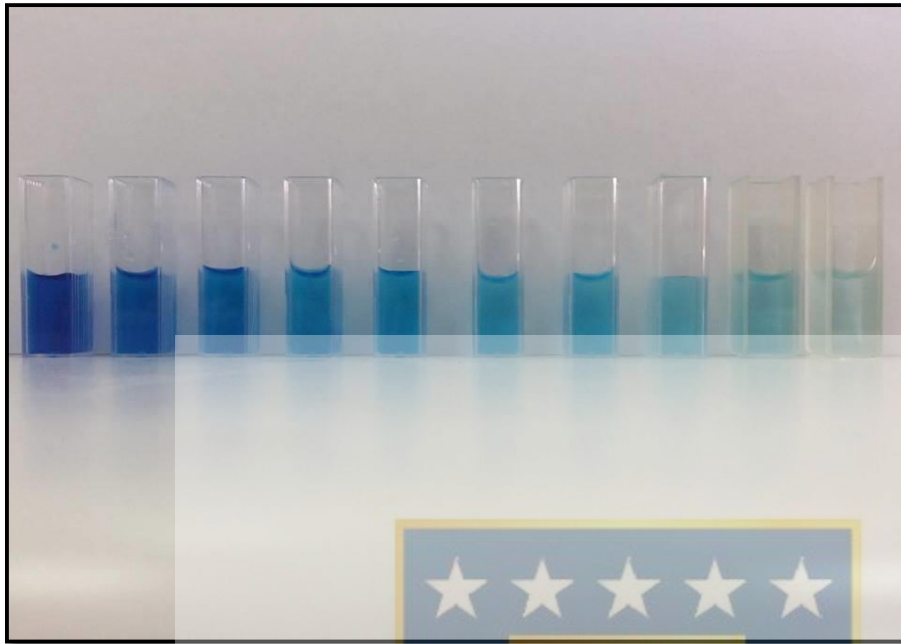


Figura 5: Reacción antioxidante con radical libre DPPH + extracto de *A. pinatifida* en concentraciones de 0 (efecto solvente), 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0,1 mg/ml (de izquierda a derecha).

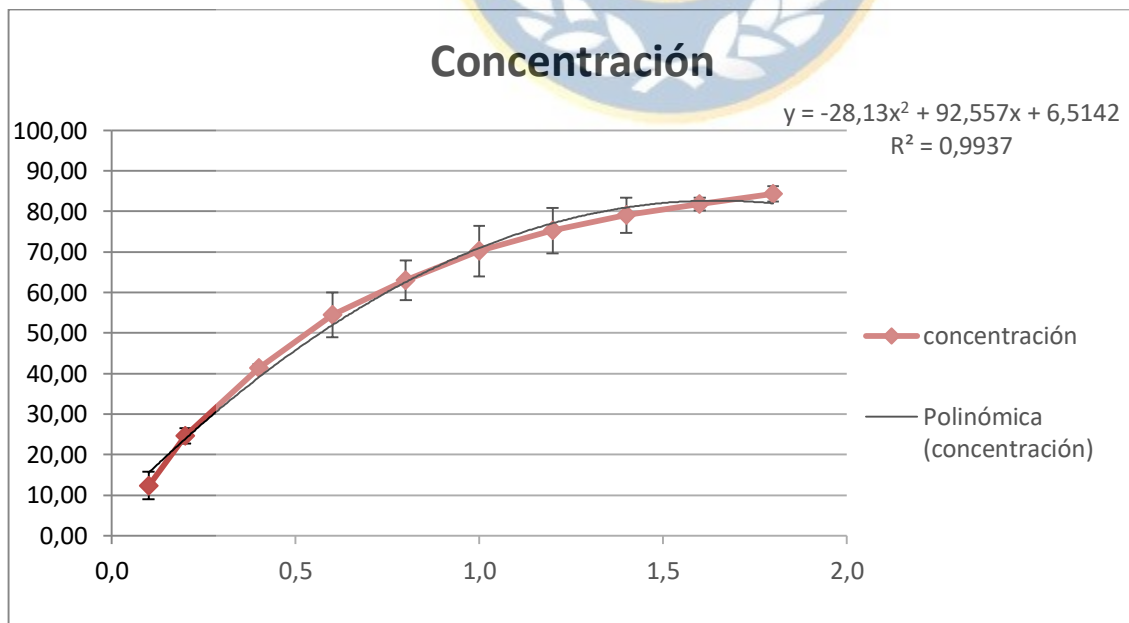


Gráfico 1: Porcentaje de disminución de absorbancia de DPPH con diferentes concentraciones de extracto metanólico (mg/mL) de *A. pinatifida*.

El cálculo del IC₅₀ se realizó a partir de la ecuación de la curva como la concentración requerida para obtener un 50% de disminución, siendo esta de 0.49 mg/ml.

$$Y = -28,13 x^2 + 92,557x + 6,5142$$
$$50 = -28,13 x^2 + 92,557x + 6,5142$$
$$X = 0,49$$

Según el análisis obtenido de los datos obtenidos del ensayo antioxidante con DPPH, con análisis de varianza y comprobación de los supuestos de la misma, las concentraciones evaluadas presentan diferencia significativa en comparación con el control (DPPH + metanol), observándose una creciente disminución de la absorbancia (Gráfico 1), con excepción de la concentración más baja analizada, que a pesar de presentar efecto antioxidante, este no es significativo respecto al resultado obtenido por el metanol como simple dilución.

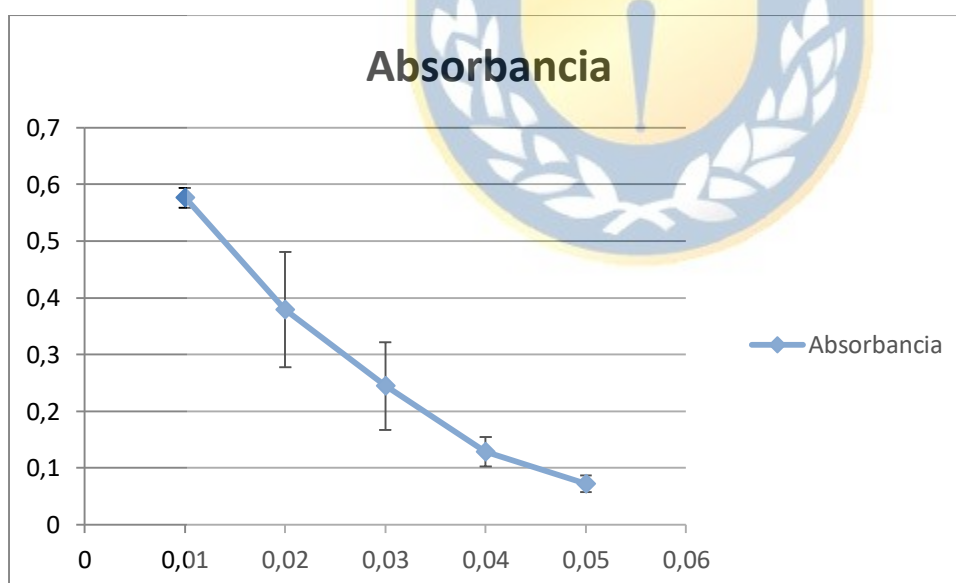


Gráfico 2: Curva estándar de Absorbancia en relación a ácido gálico (mg/mL) para el ensayo antioxidante con DPPH.

Los resultados obtenidos permiten establecer que 0.5 mg/mL o 500 µg/mL de extracto metanólico de la parte aérea de *A. pinnatifida* equivalen a 11.71 ± 0.7 µg/mL de ácido gálico, en promedio (Gráfico 2). Por lo tanto, 1000000 µg (1 gr.) de extracto acuoso de *A. pinnatifida*, equivalen a 23420 ± 1392 µg de ácido gálico.

- En el anexo 8 hay un ejemplo de como se realizo el calculo para el rendimiento de extracción.

6.3 Efecto en el tiempo en la capacidad antioxidante frente a DPPH

Al evaluar el efecto antioxidante del extracto metanólico en el tiempo (Gráfico 3), se puede observar una marcada disminución en la absorbancia a 517 nm del DPPH + extracto en concentración correspondiente al IC₅₀ (0,49 mg/mL), llegando a marcar una absorbancia de 0,426 a los 5 minutos de iniciada la reacción correspondiente a un 52,50 % de inhibición del radical (gráfico 3). Esta disminución se mantiene de forma progresiva hasta el minuto 150, en donde la cinética alcanza la mínima absorbancia inhibiendo un 78,1 del DPPH inicial considerando el efecto de dilución por solvente; posteriormente se produce una reacción de recuperación del radical libre manteniéndose estable (con mínimas variaciones en la absorbancia), cercano al 80% de disminución, a partir del minuto 160 (anexo 2).

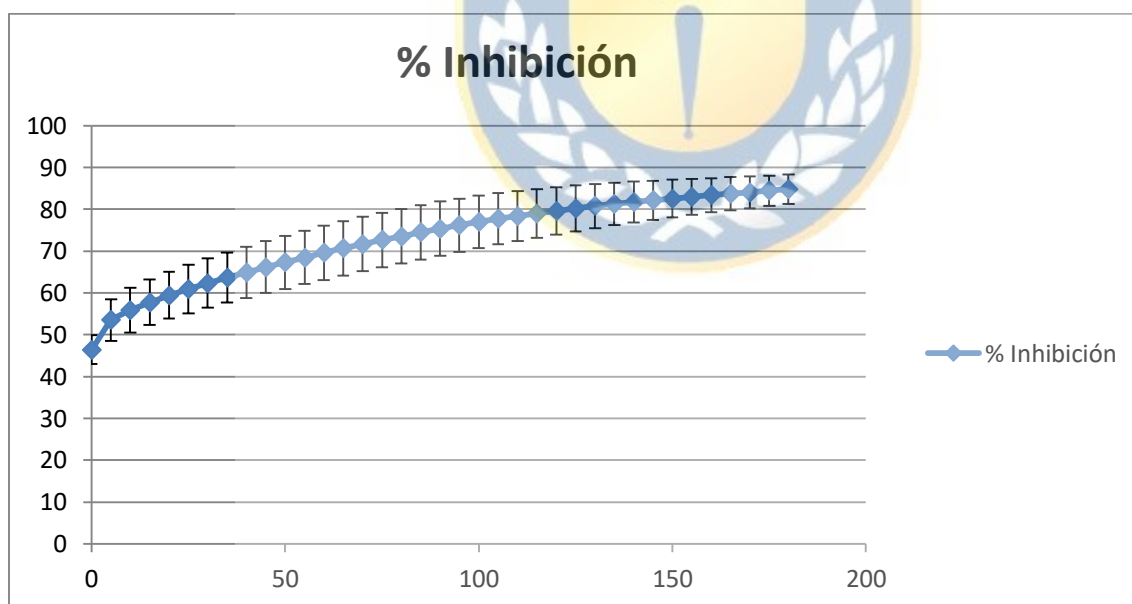


Gráfico 3: Efecto en el tiempo de extracto de *A. pinnatifida* frente al radical DPPH

6.4 Capacidad antioxidante frente al radical catiónico ABTS

La capacidad antioxidante presentada por el extracto metanólico de *A. pinnatifida* (Figura 6) a partir del ensayo con radical catiónico ABTS⁺ fue evaluada para concentraciones de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40,

0.45 y 0.50 mg/mL de extracto (Anexo 5); pudiéndose obtener una disminución del radical mayor que el observado en el ensayo de DPPH, alcanzando con la máxima concentración un efecto de disminución del 84,48% \pm 3.9%, mientras que con 0.05 mg/mL de extracto se logró observar una inhibición del radical del 4.3% \pm 3.2% (Gráfico 4)

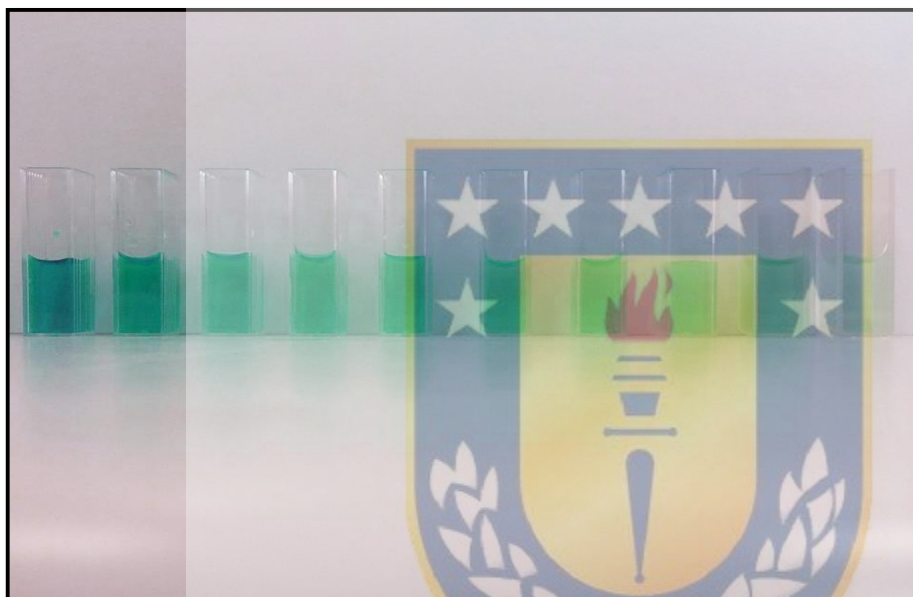


Figura 6: reacción antioxidante con radical libre ABTS⁺ + extracto de *A. pinatifida* en concentraciones de 0 (efecto solvente), 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, 0.05 mg/ml (de izquierda a derecha).

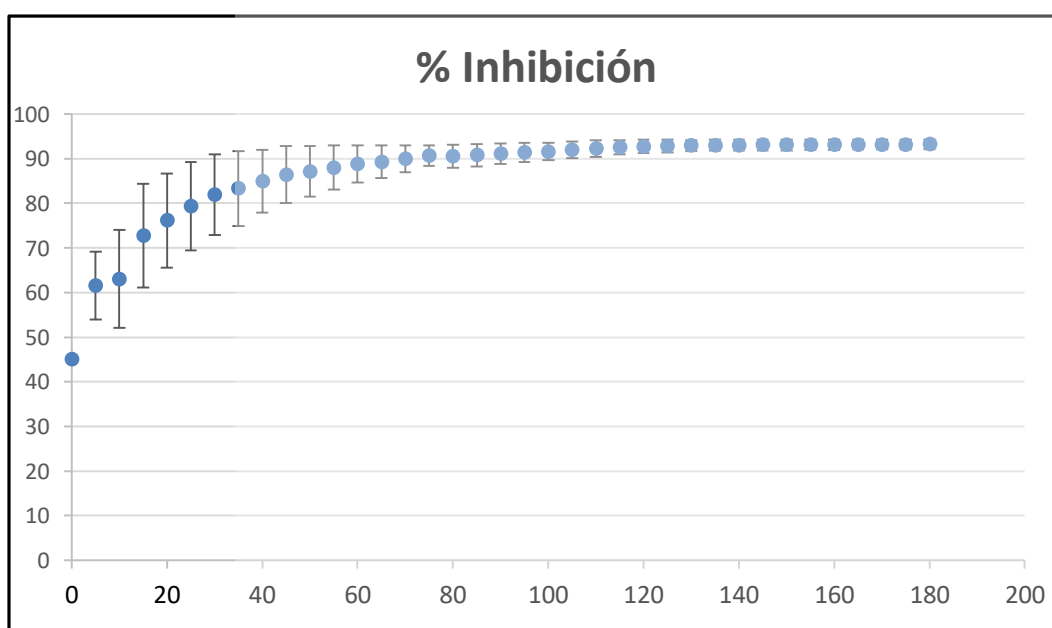


Gráfico 3: Efecto antioxidante del extracto Metanólico de *A. pinnatifida* en el tiempo, en concentración de IC₅₀. Valores expresados en porcentaje de disminución del radical. Periodo de la cinética 180 minutos.

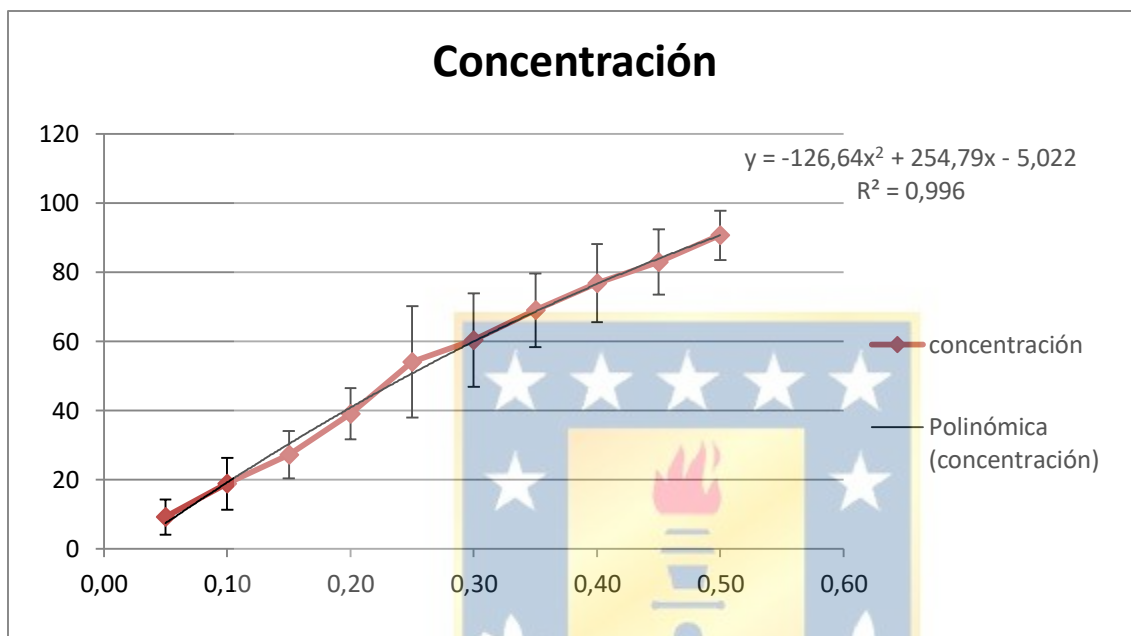


Gráfico 4: Porcentaje de disminución de ABTS con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *A. pinnatifida*.

$$Y = 126,64x^2 + 254,79x - 5,022$$

$$50 = 126,64x^2 + 254,79x - 5,022$$

$$X = 0,28$$

Todas las concentraciones estudiadas presentan diferencia significativa al comprarlas con la muestra control conformada por el radical catiónico ABTS metanol (Gráfico 6), control empleado con el fin de eliminar el error por efecto de dilución generado por la adición del solvente. Sólo las menores concentraciones de 0.05 y 0.10 mg/mL no presentaron diferencia significativa entre sí.

6.5 Equivalentes de Trolox según ensayos con ABTS

En la determinación de equivalentes de Trolox se desarrolló una curva de calibración del antioxidante (Gráfico 5) y se consideró la absorbancia de la reacción con el radical catiónico empleando una concentración de extracto de 0.28 mg/mL (Anexo 7). Los equivalentes se determinaron en base a la ecuación de la curva.

6.6 Metabolitos secundarios

A continuación se muestra un recuadro donde se detallan los análisis para identificar, cuantos y cuales fueron los metabolitos secundarios presentes en la planta *A. pinnatifida*.

Tabla 1: Tabla resumen de presencia. (+++) : Presencia abundante, (++): presencia, (+): presencia escasa y (-): sin presencia.

Metabolitos secundarios	Test químico	resultados
Flavonoides	HCl/ Mg o HCl/Zn	-
Taninos	FeCl ₃	+++
Cumarinas	H ₂ SO ₄ /UV 366 nm	++
Saponinas	Agitación	-
Alcaloides	NH ₃ /Reacción con lugol	-
Antraquinonas	Reacción de Borntraeger	-
Derivados del Núcleo esteroideo	Reacción de libermann	+++

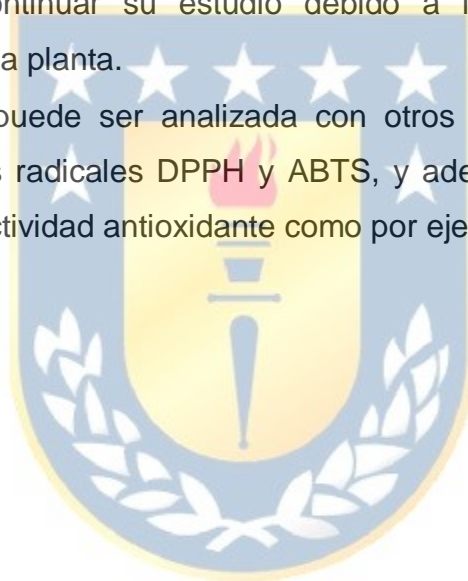
7. DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, es posible mencionar que el extracto metanólico obtenido de la especie *Acaena pinnatifida*, presenta una actividad antioxidante significativa, ya que se considera con una buena actividad antioxidante cuando su inhibición supera un 80% (Aubad et al. 2007), lo que permitiría emplearlo como una fuente natural y de fácil acceso para la obtención de sus compuestos. Además, en base a los resultados, se puede concluir que la extracción usando metanol como solvente es una metodología apropiada para la obtención de compuestos reductores (Cervantes et al. 2013). Esto es fundamentado en que se pudo obtener un porcentaje de disminución de 84.30% usando una concentración del extracto de 1.8 mg/ml, para la determinación de la actividad antioxidante utilizando ABTS⁺, se logró alcanzar un porcentaje de disminución del radical del 90.70% con una concentración de 0.50 mg/mL.

Cuando se evaluaron los resultados obtenidos desde los análisis antioxidantes, utilizando el radical libre DPPH y el radical catiónico ABTS se puede determinar que el método ABTS es más sensible en comparación al extracto metanólico de *A. pinnatifida*, ya que a bajas concentraciones de extracto (0.50 mg/mL) permite alcanzar un porcentaje de disminución del radical de 90.70%; mientras que en el caso para el método con DPPH⁺, bajo la misma concentración con el extracto, solo se logra alcanzar un porcentaje de disminución de 54.50%. Sin embargo, el método ABTS y el persulfato de potasio; por tanto, la reacción de reducción también puede ser revertida mientras se encuentren los sustratos de la reacción oxidante (Albornoz, 2016).

8. CONCLUSIONES

- La planta *A. pinnatifida* es una especie que presenta un amplio campo de investigación debido al desconocimiento existente sobre sus compuestos y respectiva actividad biológica.
- El método ABTS es más sensible que el DPPH por lo que permite calcular con menor cantidad de extracto su actividad antioxidante.
- *Acaena pinnatifida* es una especie la cual no posee estudios previos sobre la capacidad antioxidante en su parte aérea con metanol como solvente y es una buena alternativa para continuar su estudio debido a los compuestos antioxidantes presentes en la planta.
- La especie *A. pinnatifida* puede ser analizada con otros solventes, para estudiar la inhibición de los radicales DPPH y ABTS, y además es posible realizar otros ensayos de actividad antioxidante como por ejemplo ORAC.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Aherne J, Stuber J, Galea S, Stigma (2007) discrimination and the health of illicit drug users. *Drug Alcohol Depend.* 2:188-96
- Alasalvar C, Grigor J, Zhang D (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Plant Cell* 6:6-10
- Alcaraz J, Alcantara A (2009) Empleo de biocatalizadores para la obtención de sintones útiles en la preparación de fármacos. *Plant Cell* 5:16-18
- Anao H (2000) Runoff and peakflows after clearcutting and the establishment of a new plantation in an experimental catchment, southern Chile Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Geociencias, Valdivia, Chile. 11:41-48
- Aubad P, Lobo T (2007) Actividad Antioxidante en Musgos. 5:27-30
- Bisignano G, Germanó M, P Nostro A, Sanogo R (1996) Drugs used in Africa as dyes: antimicrobial activities. *Phyto her. Res.* 9:346-350
- Bouaziz J, Maha M, Feki A. (2008) Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L leaf extract growing in Algeria. *NCBI* 9:57-65
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Plant cell* 17:25-30
- Cano S, Marino M (2005) Ambientes y organismos marinos de la Reserva Biológica Isla del Caño, Área de Conservación Osa, Costa Rica. 143:16-27
- Causse M (2010) Biodiversidad de Anthocerotophyta y Marchantiophyta en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 31: 206-209
- Cervantes L, Gutierrez L (2013) Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. 56:122-125
- Das Sumana, Das Kuntal, Dubey Veenapani (2010) Inhibitory activity and phytochemical assessment of ethno-medicinal plants against some human pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(29):6536-6543
- Eldeen S, Shokr B, Shotoury E (2011) Effect of foliar spray with seaweeds extract and chitozan on earliness and productivity of globe artichoke. *Plant Production, Mansoura Univ* 5 (7) 33:1197-1207

- Espin J, C Soler-Rivas, Wichers H J, García-Viguera C (2000) Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff J Agric Food Chem. 48:1588-1592
- Espinoza M, Leal S, Heupel R, Collin A (2015) Movement patterns of silvertip sharks (*Carcharhinus albimarginatus*) on coral reefs. 223:807-821
- Foyer C, y Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling Tansley Review No 112. New Phytol 146:359-388
- Galindo P, Robles M, Guerrero P (1989) Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). 8:4-7
- Garcia L, Valiati H, Gottschalk M (2009) Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae) Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 15:2-8
- Gavinia C, Ochoa N, Sánchez C, Medina M, Lobo P, Galeano A, Mosquera A, Tamayo Y, Lopera B, Rojano (2009) Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). Boletín latinoamericano y del caribe de plantas Medicinales y Aromáticas. 8 (6): 519-528
- Gulcin I, Bursal E, Koksal E (2007). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. Plant cell 4:6-9
- Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J (2002) Flavonoid antioxidants: Chemistry metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 13:572-584
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y (2001) Flavonoids protect neuronal cell from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radic Biol Med 4:433-46
- Katsube N, Iwashita K, Yamaki K (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry and the anthocyanins. 51:68-75
- Kedare R, Sing F (2011) Variación nutricional y funcional de pulpa de Guayaba en respuesta a diferentes temperaturas de almacenamiento. Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha 2:9-19

- Kumar A, Dhankhar S, Ved P, Sanjay Y (2006) Antimicrobial activity of *Salvadora oleoides* Decne against some microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research* 14:2754-2760
- Kumaran A, Karunakaran R (2007) In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Science and Technology* 4:344-352
- Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini J (2003) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Scielo* 25(4):726-732
- Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J (1999) pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants *J Agric. Food Chem* 47:67-70
- Li Y, Ambrosone Ch, Mc Cullough M, Ahn J, Stevens V, Thun M, Hong Ch (2009) Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk *Carcinogenesis*. 30(5): 777-84
- Llancari A, Matos A (2011) Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria En: Universidad Peruana Unión I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima, 2-4
- Mazza C, Izaguirre M, Zavala J (2002) Insect perception of ambient ultraviolet-B radiation. *Ecology letters* 77-78
- Moyer R, Hummer K, Finn C, Frei B, Wrolstad R (2002) Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vacciniums*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:519-525
- Muñoz A, Ramos D, Alvarado C, Castañeda B (2007) Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú* 73 (3):142- 9.
- Noctor C. (2000) Advances in photosynthesis and respiration volumen 21 *Rev Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and Environment*. 12:242-244
- Núñez A (2011) Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública* 37: 644-60
- Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal P (2008) Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Composition Analysis* 21:241-8

- Pastene E (2009) Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas 8(6): 449- 555
- Pérez S, Quintana M (2003) Construcción científica e intervención práctica. Universidad de la Rioja. 6-7
- Qiu L, Pashkova N, Walker JR, Winistorfer S, Allali-Hassani A, Akutsu M, Piper R, Dhe-Paganon S. (2010) Structure and function of the PLAA/Ufd3-p97/Cdc48 complex. 16:365-72
- Quintanar M, Calderón J (2009) La capacidad antioxidante total Bases y Aplicaciones. Rev Educación Bioq 28 (3):89-101
- Ramirez M, Rajaram S, Roth M (2016) Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. Scielo 106:12-18
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Plant cell 57:123-136
- Reyes A, Galicia M, Carrillo M (2011) Antioxidantes: la magia de lo natural. Rev Tlatemoani (8):1-16
- Sanchez V, Charlie T (2010) Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. Plant cell 3:13-15
- Sgherri C, Branka M, a Navari-Izzo F (2003) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia plantarum* 122:478-485
- Sroka G, Cisowski V (2003) Antioxidative and Antiradical Properties of Plant Phenolics Department of Pharmacognosy, Wrocław University of Medicine, pl Nankiera. 1: 50-140
- Tovar del Rio, Espinoza H (2013) Características físico-químicas del vello externo del durazno (*Prunus pérsica* L.). Rev Mundo Agropecuario Pp. 15-17
- Valenzuela N, Perez G (2013) Merchandising at the point of sale: differential effect of end of aisle and islands. Scielo 22:66-79
- Vega S (2003) Innovaciones alimentarias al inicio del siglo XXI El caso de los llamados alimentos y sustancias funcionales En: Coronado, M., comp. Innovación tecnológica en el futuro de los profesionales en áreas biológicas Un texto para estudiantes universitarios. México, D.F: UAM-X p 223-59

- Villaño D (2005) Invitro Antioxidant Activities on Leaf Extracts of *Syzygium Malaccense* (L) Merr and Perry. 30(4): 110–113
- Wang J, Mazza G (2002) Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN Gamma-Activated RAW 264.7 Macrophages. *J Agric Food Chem* 50, 850-857
- Zamora J. (2007) Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr* 34 (1): 17-26
- Zapata J, Dephoure N, Macdonough T, Yu Y, Parnell EJ, Mooring M, Gygi, SP, Stillman, DJ, Kellogg, DR (2014) PP2ARts1 is a master regulator of pathways that control cell size. *Plant cell* 10:4-12



Anexos

Anexo 1: Detalle de las absorvancias y porcentajes de inhibición del triplicado en el ensayo antioxidante con radical DPPH.

Conce ntració n	Cantid ad (µlts)	Absorb ancia 1	Absorba ncia 2	Absorba ncia 3	%inhib ición 1	%inhibic ión 2	%inhibic ión 3	%inhib ición	Desv est	IC50
0,1	47	0,676	0,705	0,613	9,87	10,98	16,26	12,37	3,41	0,49
0,2	67	0,581	0,586	0,547	22,53	26,01	25,27	24,61	1,83	
0,4	133	0,432	0,465	0,437	42,40	41,29	40,30	41,33	1,05	
0,6	200	0,299	0,404	0,334	60,13	48,99	54,37	54,50	5,57	
0,8	333	0,247	0,336	0,261	67,07	57,58	64,34	63,00	4,89	
1,0	467	0,174	0,282	0,223	76,80	64,39	69,54	70,24	6,23	
1,2	533	0,145	0,242	0,178	80,67	69,44	75,68	75,26	5,62	
1,4	600	0,142	0,205	0,132	81,07	74,12	81,97	79,05	4,30	
1,6	667	0,131	0,159	0,125	82,53	79,92	82,92	81,79	1,63	
1,8	733	0,105	0,140	0,113	86,00	82,32	84,56	84,30	1,85	
CN	0,750	0,792	0,732							
DPPH	0,872	0,869	0,876							
STOC K	Volu men	Peso extract o								
1,5 mg/ml	10 ml	15 mg								

Anexo 2: Datos de las absorbancias de Cinética para DPPH en triplicado.

Concen	Min	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3	% Inhibición	Desvest
0,43	0	0,426	0,045	0,432	45,6633	44,0355	45,3856	45,0481	0,8366
	5	0,235	0,321	0,321	70,0255	55,2764	59,4185	61,5734	7,6070
	10	0,168	0,252	0,252	70,5714	50,4171	68,1416	68,3767	10,0792
	15	0,125	0,203	0,203	83,5459	60,4271	74,3363	72,7698	11,6387
	20	0,105	0,187	0,187	86,6071	65,4523	76,3590	76,1395	10,5791
	25	0,085	0,154	0,154	88,6480	68,9698	80,5310	79,3829	9,8892
	30	0,077	0,132	0,132	90,1786	72,2362	83,3123	81,9090	9,0531
	35	0,070	0,124	0,124	91,0714	74,4975	84,3236	83,2975	8,3345
	40	0,064	0,116	0,116	91,8367	77,7638	85,3350	84,9785	7,0432
	45	0,060	0,101	0,101	92,3469	79,6482	87,2314	86,4088	6,3892
	50	0,058	0,099	0,099	92,6020	81,2814	87,4842	87,1225	5,6690
	55	0,056	0,094	0,094	92,8571	83,0402	88,1163	88,0046	4,9094
	60	0,055	0,090	0,090	92,9847	84,6734	88,6220	88,7600	4,1574
	65	0,054	0,088	0,088	93,1122	85,9296	88,8748	89,3056	3,6106
	70	0,053	0,085	0,085	93,2398	87,3116	89,2541	89,9352	3,0222
	75	0,052	0,081	0,081	93,3673	88,9397	89,7598	90,3556	2,7624
	80	0,052	0,079	0,079	93,3673	88,3166	90,0126	90,5655	2,5704
	85	0,051	0,077	0,077	93,4949	88,5678	90,2655	90,7761	2,5029
	90	0,051	0,073	0,073	93,4949	88,9447	90,7712	91,0703	2,2898
	95	0,050	0,070	0,070	93,6224	89,3216	91,1504	91,3648	2,1584
	100	0,050	0,068	0,068	93,6224	89,6985	91,4033	91,5747	1,9676
	105	0,050	0,061	0,061	93,6224	89,9497	92,2882	91,9535	1,8591
	110	0,049	0,057	0,057	93,7500	90,2010	92,7333	92,2483	1,8363
	115	0,049	0,055	0,055	93,7500	90,7035	93,0468	92,5001	1,5951
	120	0,049	0,051	0,051	93,7500	90,9548	93,5525	92,7524	1,5599
	125	0,049	0,051	0,051	93,7500	91,2060	93,5525	92,8362	1,4152
	130	0,049	0,051	0,051	93,7500	91,4573	93,5525	92,9199	1,2705
	135	0,049	0,050	0,050	93,7500	91,5829	93,6788	93,0039	1,2312
	140	0,049	0,050	0,050	93,7500	91,5829	93,6788	93,0039	1,2312
	145	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,7085	93,6788	93,0883	1,1990
	150	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,7085	93,6788	93,0883	1,1990
	155	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,8342	93,6788	93,1302	1,1268
	160	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,8342	93,6788	93,1302	1,1268
	165	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,9598	93,6788	93,1721	1,0546
	170	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,9598	93,6788	93,1721	1,0546
	175	0,048	0,050	0,050	93,8776	91,9598	93,6788	93,1721	1,0546
	180	0,047	0,050	0,050	94,0051	91,9598	93,6788	93,2146	1,0989
DPPH		0,870	0,879	0,882					
CN		0,784	0,796	0,791					

Anexo 3: Datos de las absorbancias para el duplicado de Ácido gálico.

Concentración (µL)	Abs 1	Abs 2	Abs	Desvest	Concentración (µL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0,01	0,589	0,564	0,576	0,0177	0,49	0,442	0,451	0,465
0,02	0,307	0,451	0,379	0,1018				
0,03	0,190	0,299	0,244	0,0771				
0,04	0,110	0,147	0,128	0,0262				
0,05	0,062	0,083	0,072	0,0149		34,08	33,06	31,42
CN	0,759	0,763				32,85	Promedio	
DPPH	0,821	0,815				1,34	Desvest	

Anexo 4: Mediciones para el ensayo en triplicado de polifenoles.

Concent	Cant (µl)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Concent mg	Cant µl	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Desvest
0.10	100	0,341	0,337	0,343	0,001	250	0,103	0,135	0,119	0,0226
					0,002	500	0,295	0,287	0,291	0,0057
					0,003	750	0,336	0,359	0,347	0,0163
Stock	Volumen	Peso extracto	Abs		0,004	1000	0,479	0,468	0,473	0,0078
5 mg/ml	5 ml	25 mg	765 nm		0,005	1250	0,559	0,570	0,564	0,0078
					0,006	1500	0,627	0,632	0,629	0,0035
28,67	28,27	28,87	28,60	Prom		Stock	Vol.	Peso extracto		
			0,31	Desvest		0,1 mg/ml	50 ml	10 mg		

Anexo 5: Detalle de las absorbancias y porcentajes de inhibición del triplicado en el ensayo antioxidante con radical ABTS⁺.

Concen	Cant. μ lts	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% inhibic. 1	% inhibic. 2	% inhibic. 3	% inhibic.	Desvest	IC ₅₀
0,05	25	0,571	0,590	0,564	8,64	4,38	14,55	9,19	5,11	0,28
0,10	50	0,541	0,521	0,479	13,44	15,56	27,42	18,81	7,54	
0,15	75	0,482	0,470	0,428	22,88	23,82	35,15	27,29	6,83	
0,20	100	0,402	0,407	0,346	35,68	34,04	47,58	39,10	7,39	
0,25	125	0,360	0,324	0,181	42,40	47,49	72,58	54,15	16,15	
0,30	150	0,316	0,271	0,162	49,44	56,08	75,45	60,32	13,52	
0,35	175	0,241	0,219	0,124	61,44	64,51	81,21	69,05	10,64	
0,40	200	0,198	0,168	0,068	68,32	72,77	89,70	76,93	11,28	
0,45	225	0,154	0,122	0,043	75,36	80,23	93,48	83,02	9,38	
0,50	250	0,097	0,067	0,010	84,48	89,14	98,48	90,70	7,13	
CN		0,625	0,617	0,660	Prom 1	Prom 2	Prom 3	Total		
ABTS		0,685	0,699	0,716	46,208	48,801	63,561	52,856		

Anexo 6: Datos de las absorbancias de las cinéticas para ABTS⁺ en triplicado.

0,28	Tiempo (min)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% Inhibi 1	% inhibi 2	% inhibi 3	% inhibi	Desvest
	0	0,243	0,0362	0,311	62,267	44,479	50,713	52,488	9,026
	5	0,185	0,358	0,266	71,273	45,092	57,845	58,070	13,032
	10	0,126	0,351	0,242	80,435	46,166	61,648	62,750	17,161
	15	0,111	0,341	0,224	82,764	47,699	64,501	64,988	17,537
	20	0,100	0,334	0,215	84,472	48,773	65,927	66,391	17,854
	25	0,091	0,327	0,204	85,870	49,847	67,670	67,796	18,012
	30	0,084	0,318	0,197	86,957	51,227	68,780	68,988	17,866
	35	0,079	0,311	0,188	87,733	52,301	70,206	70,080	17,716
	40	0,073	0,303	0,180	88,665	53,528	71,474	71,222	17,570
	45	0,069	0,296	0,174	89,286	54,601	72,425	72,104	17,344
	50	0,066	0,283	0,167	89,752	55,675	73,534	72,987	17,045
	55	0,063	0,280	0,161	90,217	57,055	74,485	73,919	16,588
	60	0,060	0,264	0,155	90,683	59,509	75,436	75,203	15,588
	65	0,057	0,259	0,151	91,143	60,276	76,070	75,832	15,438
	70	0,055	0,251	0,147	91,460	61,503	76,704	76,555	14,979
	75	0,053	0,243	0,141	91,770	62,730	77,655	77,385	14,522
	80	0,051	0,231	0,136	92,081	64,571	78,447	78,366	13,755
	85	0,049	0,222	0,127	92,331	65,951	79,873	79,405	13,226
	90	0,048	0,214	0,124	92,547	67,178	80,343	80,024	12,687
	95	0,046	0,203	0,121	92,857	68,865	80,824	80,843	11,996
	100	0,045	0,193	0,115	93,012	70,399	81,775	81,729	11,307
	105	0,043	0,188	0,111	93,323	71,166	82,409	82,299	11,079
	110	0,042	0,181	0,109	93,478	72,239	82,726	82,814	10,620
	115	0,041	0,176	0,105	93,634	73,006	83,360	83,333	10,314
	120	0,040	0,171	0,100	93,789	73,773	84,152	83,905	10,010
	125	0,039	0,167	0,099	93,944	74,387	84,311	84,214	9,779
	130	0,038	0,159	0,097	94,099	75,613	84,628	84,780	9,244
	135	0,038	0,153	0,094	94,099	76,534	85,103	85,245	8,784
	140	0,037	0,145	0,091	94,255	77,761	85,578	85,865	8,251
	145	0,036	0,141	0,088	94,410	78,374	86,054	86,279	8,020
	150	0,035	0,139	0,086	94,565	78,681	86,371	86,539	7,943
	155	0,034	0,137	0,083	94,720	78,988	86,846	86,852	7,866
	160	0,034	0,137	0,079	94,720	78,988	87,480	87,063	7,875
	165	0,033	0,137	0,076	94,876	78,988	87,956	87,273	7,966
	170	0,033	0,137	0,074	94,876	78,988	88,273	87,379	7,982
	175	0,033	0,136	0,072	94,876	79,141	88,590	87,535	7,920
	180	0,033	0,134	0,072	94,876	79,448	88,590	87,638	7,758
	ABTS	0,712	0,714	0,704					
	CN	0,644	0,652	0,631					

Anexo 7: Mediciones en triplicado para la curva de Trolox en el ensayo de ABTS

Concent (µL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Desvest	Concent (µL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0,005	0,637	0,605	0,621	0,01600	0,28	0,356	0,364	0,360
0,010	0,610	0,578	0,594	0,01600				
0,015	0,534	0,538	0,536	0,00200				
0,020	0,521	0,471	0,496	0,02500				
0,025	0,451	0,407	0,429	0,02200	66,94	65,30	66,12	
0,030	0,395	0,376	0,385	0,00950				
0,035	0,364	0,328	0,346	0,01800		0,82	Desvest	
0,040	0,327	0,300	0,313	0,01350		66,12	Promed	
0,045	0,206	0,252	0,229	0,02300				
0,050	0,152	0,155	0,153	0,00153				
0,055	0,142	0,123	0,132	0,00950				
CN	0,691	0,675						
ABTS	0,722	0,715						

Anexo 8: Ejemplo de cálculo para los equivalentes en ácido gálico

$$Y = 12.58x + 0.657$$

$$0.470 = -12.58x + 0.657$$

$$x = \frac{0.47 - 0.657}{-12.58}$$

$$X = 0.015$$

Entonces para:

0.015 mg de ácido gálico -----→ 0.34 mg de extracto

X mg de ácido gálico -----→ 1000 mg de extracto

X = 44.117 mg de ácido gálico