



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE  
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE HOJAS DE  
*Vernonanthura patens* (KUNTH) H. ROB.”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de  
Magister en Biociencias Aplicadas con mención en BIODESCUBRIMIENTO**

Presentado por: Iván Andrés Chóez Guaranda

Guayaquil – Ecuador

2018

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo. A la Red Universitaria VLIR NETWORK ECUADOR por el apoyo económico brindado. A los docentes del Programa de Maestría en Biociencias Aplicadas quienes se esforzaron por darnos la mejor de las enseñanzas, en particular al Ph.D. Juan Manuel Cevallos por promover, apoyar y supervisar las actividades de postgrado. A la Ph.D. Daynet Sosa, Directora General del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador por confiar en mi trabajo. A la Ph.D. Patricia Manzano, directora de tesis por el respaldo constante e incondicional y a la Ph.D. Jenny Ruales por la colaboración interinstitucional brindada para culminar esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A todos los estudiantes de los programas de maestrías y doctorados de investigación del Ecuador que conocen y asumen la importancia de estudiar la biodiversidad de nuestro país

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

Ramón Espinel Martínez, Ph.D.  
DECANO

Patricia Manzano Santana, Ph.D.  
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN

Milton Barcos Arias, Ph.D.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

Christian Romero Bonifaz, Ph.D.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

Iván Andrés Chóez Guaranda

## RESUMEN

*Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., o laritaco es un arbusto silvestre que crece en varias provincias del Ecuador. Los conocimientos ancestrales indican que la cocción de las hojas ha sido empleada en la medicina tradicional para curar diferentes enfermedades. Varios estudios han reportado que los extractos acuosos y etanólicos obtenidos de las hojas de la especie exhiben una alta actividad antioxidante. Sin embargo, no se conocen las condiciones óptimas de extracción ni los compuestos responsables de esta actividad biológica. Por lo tanto, en el presente estudio se planteó como objetivo general determinar las condiciones óptimas de extracción de los compuestos antioxidantes de hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. La temperatura y el tiempo de extracción acuosa de las hojas obtenidas por decocción se optimizaron mediante análisis de superficie de respuesta para una máxima actividad captadora del radical DPPH, actividad captadora del radical catiónico ABTS, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales. Se aplicó un diseño central compuesto de 13 experimentos y se utilizaron modelos polinomiales de segundo orden para describir las respuestas en función de los parámetros de extracción evaluados. Las condiciones óptimas de extracción encontradas fueron 79.79 °C y 126.23 minutos, las cuales se obtuvieron empleando la función de deseabilidad compuesta para valores máximos de la actividad captadora del radical DPPH (87.34%) y la actividad captadora del radical catiónico ABTS (68.64%). Los modelos predictivos se comprobaron empleando tres tipos de deshidratación: estufa, liofilización y temperatura ambiente. La deshidratación a temperatura ambiente demostró ser el método más idóneo ya que genera valores de actividad antioxidante similares que la liofilización y mayores que la deshidratación por estufa. Finalmente, el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) sugiere que la actividad antioxidante de los extractos evaluados estaría dada por la presencia del ácido málico, ácido succínico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido cítrico, ácido *m*-hidroxibenzoico, ácido cafeíco, inositol y la  $\beta$ -amirina. Los resultados obtenidos confirman la importancia de la medicina tradicional y sirven como línea base para la preparación de futuros medicamentos naturales que contengan el principio activo de la especie.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
SIMBOLOGÍA.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4 MARCO TEÓRICO.....	3
1.4.1 <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob. ....	3
1.4.2 Avances en la extracción de compuestos antioxidantes en material vegetal	5
1.4.3 Avances en la determinación de actividad antioxidante en material vegetal	7
CAPÍTULO 2.....	9
METODOLOGÍA.....	9
2.1 Diseño de Experimentos.....	10
2.2 Recolección y preparación de la materia prima.....	10
2.3 Obtención de extractos acuosos.....	10
2.4 Ensayos de actividad antioxidante.....	11
2.4.1 Ensayo DPPH.....	11
2.4.2 Ensayo ABTS.....	11
2.5 Determinación de fenoles totales y flavonoides totales.....	12
2.5.1 Contenido de fenoles totales.....	12
2.5.2 Contenido flavonoides totales.....	12

2.6 Identificación de compuestos antioxidantes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) .....	12
2.7 Análisis estadísticos .....	13
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>14</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
3.1 Condiciones óptimas de extracción .....	14
3.1.1 Ajuste de los modelos matemáticos.....	14
3.1.2 Análisis de superficie de respuesta de la actividad captadora de radicales DPPH .....	16
3.1.3 Análisis de superficie de respuesta de la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS.....	17
3.1.4 Análisis de superficie de respuesta del contenido de fenoles totales.....	18
3.1.5 Análisis de superficie de respuesta del contenido de flavonoides totales...	19
3.1.6 Optimización de respuestas múltiples.....	21
3.2 Verificación del modelo predictivo .....	22
3.3 Composición química.....	28
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
ANOVA	Análisis de varianza
CE	Equivalentes de catequina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CV	Coefficiente de variación
DECAB	Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EPN	Escuela Politécnica Nacional
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
GAE	Equivalentes de ácido gálico
NIST	National Institute of Standards and Technology
PRESS	Predicted residual error sum of squares
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox

## SIMBOLOGÍA

°C	grado centígrado
cm	centímetro
min	minutos
mBar	milibar
mL	mililitro
mM	milimolar
M	molar
nm	nanómetro
µg	microgramo
µL	microlitro
µmol	micromol

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob. ....	5
Figura 2. Esquema de trabajo para la extracción de compuestos antioxidantes de hojas de <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob. ....	9
Figura 3. Mecanismo de reacción del A) radical DPPH y B) radical catiónico ABTS, frente a un compuesto antioxidante (AOH). ....	26
Figura 4. Perfiles cromatográficos de extractos acuosos de hojas de <i>V. patens</i> (Kunth) H. Rob., deshidratadas en: A) estufa, B) liofilizador y C) temperatura ambiente. ....	29

## INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad captadora de radicales DPPH. ....	16
Gráfico 2. Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS. ....	17
Gráfico 3. Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales. ....	18
Gráfico 4. Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de flavonoides totales. ....	19
Gráfico 5. Contorno de la función deseabilidad.....	21
Gráfico 6. Actividad antioxidante expresada como porcentajes de inhibición empleando diferentes tipos de secado. ....	23
Gráfico 7. Actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox empleando diferentes tipos de secado.....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental y valores de respuesta a las condiciones de extracción evaluadas .....	15
Tabla 2. Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de los polinomios de segundo orden predichos en respuesta de las variables independientes planteadas. ....	20
Tabla 3. Valores de actividad antioxidante empleando las condiciones óptimas de extracción y diferentes tipos de secado. ....	22
Tabla 4. Valores de actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox empleando las condiciones óptimas de extracción y diferentes tipos de secado .....	24
Tabla 5. Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de <i>V. patens</i> (Kunth) H. Rob., deshidratadas en estufa .....	30
Tabla 6. Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de <i>V. patens</i> (Kunth) H. Rob., deshidratadas mediante liofilización.....	31
Tabla 7. Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de <i>V. patens</i> (Kunth) H. Rob., deshidratadas a temperatura ambiente. ....	32

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Desde tiempos ancestrales, las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional por curanderos y chamanes para tratar enfermedades humanas (1). En el Ecuador, diferentes especies como el cedrón (Verbenaceae), ayahuasca (Malpighiaceae), palo santo (Burseraceae), guayusa (Aquifoliaceae), altamisa (Asteraceae), entre otras, han sido reportadas por comunidades indígenas para la preparación de remedios naturales con diversos fines terapéuticos (2).

En este contexto, la familia Asteraceae (Asterácea) es una de las más numerosas del reino vegetal con aproximadamente 23000 especies de árboles, arbustos y subarbustos distribuidos en el mundo. Diferentes géneros de esta familia son una fuente potencial de componentes antiinflamatorios y antioxidantes. Sin embargo, solo se han estudiado los principios activos de un porcentaje mínimo de estos (3).

*Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., es un arbusto silvestre perteneciente a la familia de las Asteráceas que crece en varias provincias del Ecuador: Esmeraldas, Guayas, El Oro y Loja (4); y, se ha reportado que la cocción de las hojas posee actividad anticefaleíca (5), antipirética (6), antimicótica (7), antiofídica (8) y antimalárica (9). Además, se conoce que los extractos acuosos poseen actividad antiinflamatoria, antileishmanial y antioxidante (10).

Estudios previos reportan que las hojas de ésta planta poseen mayor cantidad de terpenos a diferencia de las flores y las ramas, ya que han sido detectados 7 monoterpenos y 17 sesquiterpenos en hojas, 3 monoterpenos y 6 sesquiterpenos en ramas y 2 sesquiterpenos en flores (11). Estos compuestos volátiles como el beta-pineno y cariofileno han manifestado poseer efecto anticomulsivo y antinociceptivo en ratones (12, 13, 14). Asimismo, algunos triterpenoides como el lupeol, epilupeol y acetyl lupeol han sido aislados y han demostrado tener actividad antimicrobiana, esto explicaría por qué las hojas de esta especie han sido consumidas ancestralmente (15).

En este contexto, diferentes métodos de extracción como maceración alcohólica hasta agotamiento (16, 17), cocción por reflujo al 10% y extracción acuosa asistida por ultrasonido (10) han sido empleados en esta especie. Manzano y colaboradores (10) indican que la actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., disminuye al aumentar el tiempo de extracción, mientras que el contenido de fenoles totales incrementa (10). Esto

debido a que la actividad antioxidante de las matrices vegetales está explicada por el sinergismo de los compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios como los flavonoides (18, 19). Del mismo modo, la extracción Soxhlet ha sido utilizada para la obtención de extractos alcohólicos a partir de hojas de otra especie del género *Vernonia* reportando el contenido de fenoles y flavonoides totales de las muestras evaluadas (20).

Otros estudios llevados a cabo en hojas de *Stevia rebaudiana* (Asterácea) han demostrado que al colocar las hojas en baño María bajo agitación constante y con cambios de temperatura, se produce un incremento en la concentración de fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante (21). Igualmente, estudios sobre cinética de extracción acuosa en hojas de *Salvia fruticosa* indican que, incrementando la temperatura de extracción sobre los 70 °C por 80 minutos, se produce un aumento significativo de la constante de velocidad de extracción y la concentración de equilibrio de las variables evaluadas: sólidos solubles totales, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales (22).

Ahora bien, se conoce que los extractos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob poseen actividad antioxidante y un alto contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, no se conocen con exactitud los compuestos responsables que inducen esta actividad biológica, tampoco se entiende la estabilidad de los mismos bajo diferentes condiciones de extracción en laboratorio. Por lo antes expuesto, el objetivo de esta investigación se orientó en la determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes a partir de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob.

Las condiciones de extracción optimizadas fueron la temperatura y el tiempo de extracción, con la finalidad de efectuar los experimentos de la forma más similar posible al uso tradicional. Otros parámetros como el tamaño de partícula y la relación sólido-solvente se mantuvieron constantes ya que las farmacopeas brasileña, francesa y americana recomiendan utilizar material vegetal moderadamente grueso o semi-fino (180-710  $\mu\text{m}$ ) y la relación sólido-solvente (1:10) para la preparación de tinturas (23).

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., para conocer las condiciones idóneas de extracción de compuestos que estabilizan radicales libres.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones óptimas para la extracción acuosa de compuestos antioxidantes sintetizados por *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.
2. Evaluar las condiciones óptimas obtenidas para la extracción acuosa empleando tres tipos de secado (estufa, temperatura ambiente y liofilización).
3. Identificar la composición química de los extractos obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### 1.4.1 *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

El género *Vernonanthura* H. Rob., fue establecido para separar algunas especies anteriormente descritas del género *Vernonia* Schreb. sección *Lepidaploa* (Cass.) DC. subsección *Paniculatae* Benth. & Hook (24). Esta diferenciación fue necesaria ya que las características morfológicas de los granos de polen, la inflorescencia y el hábito leñoso del género *Vernonanthura* difieren del género *Vernonia* (25).

En América del Sur existen aproximadamente 80 especies del género *Vernonanthura* que se encuentran distribuidas desde el sur de México hasta el Río de la Plata en la frontera entre Uruguay y Argentina, incluyendo países como Panamá, Colombia, Ecuador y Bolivia. Sin embargo, su mayor diversificación se localiza en el sur de Brasil en donde se han reportado cerca de 40 variedades (25, 26, 27).

Estudios citotaxonómicos han demostrado que existen diferencias a nivel cromosómico entre el género *Vernonanthura* del género *Vernonia*. Siendo así, el caso de *Vernonanthura brasiliensis* (L.) H. Rob. y *V. tweediana* (Baker) H. Rob. de Paraguay; *V. amplexicaulis* H. Rob. y *V. brasiliensis* H. Rob. de Bolivia; *V. chamaedrys* (Less) H. Rob., *V. Chaquensis* (Less) H. Rob., *V. lorentensis* (Hieron.) H. Rob., *V. lucida* (Less.) H. Rob. y *V.*

*oligactoides* (Less.) H. Rob. de Argentina; y, *V. nudiflora* (Less.) H. Rob. y *V. pseudolinearifolia* (Hieron.) A. J. Vega & Dematt. de Uruguay (26). En el caso de la especie *V. patens* (Kunth) H. Rob. de Ecuador existen estudios que confirman que posee 100% de similitud genética con la especie de Costa Rica (28).

*Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., es originaria de México y de la parte norte de Sudamérica. Se encuentra distribuida en bosques secos o húmedos y pinares de 0-1865 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Está asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales y bosques mesófilos de montaña. Los especímenes de esta variedad se caracterizan principalmente por ser arbustos erectos poco ramificados de hasta 6 m de altura, tallos surcados con hojas lanceoladas de peciolo corto de 6–15 cm de largo y 1.5–3 cm de ancho e inflorescencias paniculadas con ampliación ramificada comúnmente de 20-30 cm de ancho (9, 27).

Esta especie es considerada una planta medicinal ya que el uso de las hojas y las flores reportan diferentes aplicaciones etnomédicas. En México la infusión de hojas ha sido empleada para tratar disentería y dolor de cabeza, mientras que las hojas molidas se han usado como emplastro sobre mordedura de serpientes. En Guatemala, la decocción de hojas se ha usado para calmar el dolor de estómago y regularizar las menstruaciones largas. En Costa Rica las hojas machacadas se insertan en las fosas nasales para detener el sangrado y en Panamá las infusiones de los botones florales y de las hojas se utilizan para reducir la fiebre (29).

En Ecuador, *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., es conocida como chilca en Esmeraldas, chilco blanco en Guayas y laritaco en El Oro y Loja. Crece de 0-2200 m.s.n.m. en la región costa (16, 2), incluyendo además las provincias de Manabí y Los Ríos (4). La medicina tradicional reporta el uso de la cocción de hojas de esta variedad para combatir el dolor de cabeza, lavar y cicatrizar heridas (5). Debido a los conocimientos ancestrales de la especie, en los últimos años se han llevado a cabo estudios científicos que demuestran las diferentes actividades biológicas que posee esta planta.

Los estudios más relevantes explican la actividad antiparasitaria, antioxidante y antimicrobiana de *V. patens* (Kunth) H. Rob. (7, 10, 17). En este contexto, se ha demostrado que el extracto etanólico de las hojas posee mayor selectividad contra el parásito causante de la Leishmania (*Leishmania amazonensis*) en comparación con el extracto etanólico del tallo que exhibe propiedades citotóxicas (17). Por otro lado, los extractos acuosos de hojas y flores obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido han mostrado tener alta capacidad antioxidante según el ensayo DPPH (10); y, dos triterpenos pentacíclicos: lupeol y epilupeol aislados

mediante cromatografía en columna con solventes de polaridad creciente han manifestado inhibir en un 80% el agente causante del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*) (15).



**Figura 1.** *Vernonia patens* (Kunth) H. Rob.

**Fuente:** Estación Biológica La Selva

#### **1.4.2 Avances en la extracción de compuestos antioxidantes en material vegetal**

Los compuestos bioactivos obtenidos a partir de material vegetal pueden extraerse mediante técnicas de extracción convencionales. La mayoría de estas técnicas como la extracción soxhlet, decocción, maceración e hidrodestilación se basan en la extractabilidad o poder de extracción del solvente empleado, la aplicación de calor y la mezcla. Sin embargo, estos métodos presentan desventajas al aplicar largos tiempos de extracción, empleo de solventes tóxicos, baja selectividad, descomposición térmica de los compuestos de interés, entre otras. Por consiguiente, técnicas de

extracción no convencionales han sido desarrolladas. Entre las más conocidas están la extracción asistida por ultrasonido, por enzimas, por microondas, la asistida por campo eléctrico pulsado, en fluido supercrítico y la extracción de líquido presurizado. No obstante, la extracción soxhlet es considerada como uno de los métodos de referencia para comparar el éxito de las metodologías nuevas (30).

A pesar de las limitaciones ligadas a las técnicas de extracción convencionales, algunos autores indican que la maceración, la decocción y la extracción soxhlet son las técnicas más empleadas para la extracción de compuestos fenólicos superando incluso a las técnicas no convencionales. Por ejemplo, para el periodo 2005-2015 un total de 889 trabajos científicos sobre compuestos fenólicos obtenidos por métodos convencionales pueden ser encontrados en el buscador Scopus en comparación con 521 publicaciones sobre compuestos fenólicos obtenidos por métodos no convencionales. En estos estudios, los solventes más utilizados son el metanol, el etanol y el agua (31).

Por otro lado, la eficiencia de extracción en cualquiera de los métodos convencionales antes mencionados depende principalmente de la elección del solvente ya que la polaridad del compuesto de interés es el factor más importante. No obstante, la transferencia de masa, el uso de co-solventes, la seguridad ambiental y la toxicidad humana deben también considerarse en la selección del solvente. En efecto, los compuestos bioactivos más relevantes obtenidos a partir de material vegetal empleando solventes polares y métodos convencionales son las antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, flavonoles, alcaloides y ácidos fenólicos (32).

En este contexto, es importante mencionar que los flavonoles (flavonoides) y los ácidos fenólicos constituyen en su mayoría los compuestos antioxidantes no enzimáticos denominados polifenoles. Los polifenoles están formados también por estilbenos, lignanos y alcoholes fenólicos que se sintetizan como producto del metabolismo secundario de las plantas frente a situaciones de estrés y estímulos diversos (33, 34).

Las propiedades antioxidantes de varios compuestos fenólicos juegan un rol crítico en el manejo del equilibrio oxidativo del cuerpo al proporcionar protección adicional contra agentes oxidantes, reacciones oxidativas y especies reactivas. De hecho, la participación de polifenoles es predominante en áreas pertenecientes a la investigación antibacteriana, anticancerígena y antiinflamatoria, particularmente en la búsqueda de candidatos a fármacos, utilizando extractos crudos de diferentes plantas medicinales (30).

### 1.4.3 Avances en la determinación de actividad antioxidante en material vegetal

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química en la que se transfieren electrones o átomos de hidrógeno de una sustancia a un agente oxidante. En este contexto, las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, en efecto, estos radicales pueden iniciar reacciones en cadena y cuando las reacciones en cadena ocurren en una célula, pueden causar daños o muerte celular. Los antioxidantes terminan estas reacciones en cadena eliminando los intermediarios de radicales libres e impidiendo otras reacciones oxidativas.

Existen varios métodos *in vitro* para determinar actividad antioxidante y se clasifican en función del tipo de oxidación. Los ensayos más empleados según la transferencia de átomos de hidrógeno son: capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), capacidad de inhibición de peroxidación de lípidos (LPIC), actividad inhibidora del radical Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), eliminación de radicales de peróxido de hidrógeno, entre otros. Mientras que los ensayos según la transferencia de electrones son: potencia antioxidante reductora férrica (FRAP), actividad captadora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), polifenoles totales por Folin-Ciocalteu, entre otros (34).

Los ensayos DPPH y FRAP han sido reportados para determinar la actividad antioxidante de varias especies de plantas pertenecientes a la familia de las Asteráceas: *Ambrosia cumanensis*, *Acmella brachyglossa* Cass, *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist., *Ageratum conyzoides* L., *Clibadium surinamense* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cirsium vulgare* (Savi) Ten., *Centaurea nigra* L., *Arctium minus* Schkuhr, *Sonchus asper* L. (Hill) y *Taraxacum officinale* F.H. (Webb) (35, 36). Asimismo, los ensayos ABTS y ORAC han sido descritos en estudios de plantas medicinales, alimentos provenientes de plantas, bebidas y aceites (19, 36).

Del mismo modo, los ensayos DPPH, LPIC y ABTS han sido referenciados para determinar la actividad antioxidante de algunas especies del género *Vernonia* y el género *Vernonanthura*. El ensayo DPPH ha sido empleado para evaluar extractos hidroalcohólicos de hojas de *Vernonia tweediana* Baker (37), extractos acuosos de hojas de *Vernonia amygdalina* (38), extractos alcohólicos de hojas de *Vernonia cinérea* (39) y extractos acuosos de hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (10). Asimismo, el ensayo LPIC ha sido reportado para evaluar extractos acuosos de hojas de *Vernonia amygdalina* (40) y extractos hidroalcohólicos de hojas de *Vernonia cinerea* (20); y, el ensayo ABTS ha sido referenciado para

evaluar extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas de *Vernonia cinérea* (20, 39).

Numerosos métodos han sido empleados para evaluar la actividad antioxidante de compuestos naturales en alimentos y diferentes sistemas biológicos incluyendo algunas especies del género *Vernonia* y del género *Vernonanthura* con resultados variables. Sin embargo, los dos ensayos más usados para medir la actividad antioxidante son el ABTS y DPPH. No obstante, algunos autores recomiendan evaluar esta actividad biológica con varios métodos con la finalidad de considerar los diferentes mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes (36).

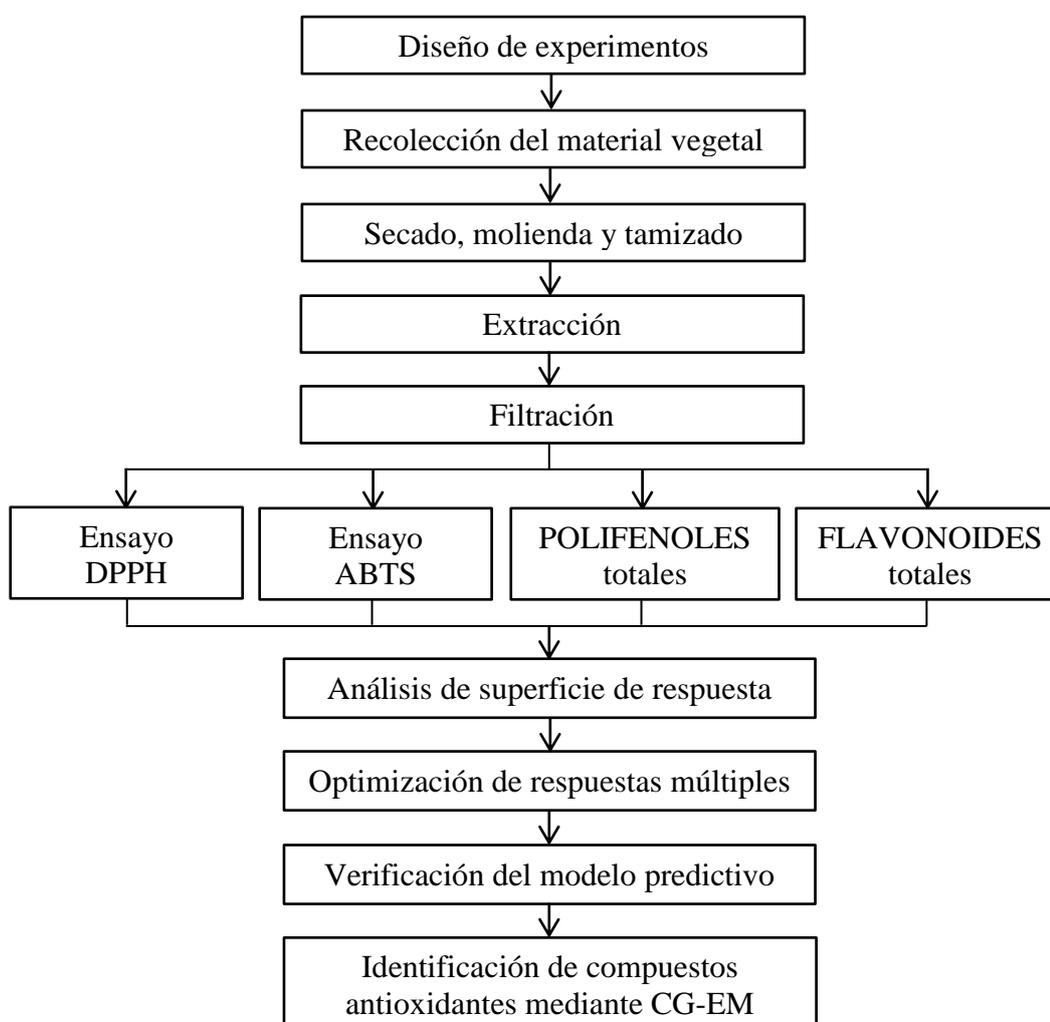
El ensayo ABTS mide la reducción del color azul-verdoso del radical catiónico ABTS después de la reacción con la sustancia antioxidante que actúa como donante de átomos de hidrógeno. El radical catiónico ABTS se genera haciendo reaccionar un agente oxidante como el persulfato de potasio con la sal de ABTS (41). Mientras que, el ensayo DPPH consiste en la medición colorimétrica de la capacidad que tiene la sustancia antioxidante para reducir el radical libre DPPH, la misma que se expresa como una pérdida de la coloración violeta que caracteriza el DPPH (33).

Los resultados de la actividad antioxidante obtenidos mediante los ensayos DPPH y ABTS (% de inhibición) pueden ser convertidos a capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC). Este procedimiento se emplea habitualmente debido a las dificultades para cuantificar la bioactividad de los componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja (42) y se utiliza a menudo para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, bebidas y suplementos nutricionales (43).

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA

Este trabajo formó parte del proyecto de investigación CIBE-20-2013 denominado “Estudio químico y biológico de compuestos polares de *V. patens*”. Los métodos descritos a continuación se efectuaron en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y en el Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional (EPN). La figura 2 muestra el esquema de trabajo empleado.



**Figura 2.** Esquema de trabajo para la extracción de compuestos antioxidantes de hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

## 2.1 Diseño de Experimentos

Los tratamientos empleados para el proceso de extracción fueron definidos mediante un diseño central compuesto conformado por un diseño factorial  $2^2$  con 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 5 puntos centrales. Los factores o variables independientes definidos fueron la temperatura ( $X_1$ ) y el tiempo de extracción ( $X_2$ ), mientras que las variables de respuesta fueron: actividad captadora de radicales DPPH ( $Y_1$ ), actividad inhibidora del radical catiónico ABTS ( $Y_2$ ), contenido de fenoles totales ( $Y_3$ ) y contenido de flavonoides totales ( $Y_4$ ). En total se efectuaron 13 tratamientos con 6 réplicas, considerando diferentes niveles para los factores propuestos. Los niveles experimentales fueron: (40°C, 47.5°C, 65°C, 82.5°C, 90°C) para la temperatura y (10 min, 28 min, 70 min, 112 min, 130 min) para el tiempo de extracción. Los niveles experimentales fueron planteados en función del análisis de resultados preliminares (10). Cada variable de respuesta ( $Y$ ) fue empleada para desarrollar un modelo matemático que permita explicar el efecto de las condiciones de extracción, utilizando la ecuación polinómica de segundo orden [1] que se muestra a continuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad [1]$$

donde,  $\beta_0$  es el coeficiente constante del modelo,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de interacción y  $\beta_{ii}$  es el coeficiente cuadrático.

## 2.2 Recolección y preparación de la materia prima

La recolección del material vegetal se realizó en el cantón Marcabelí (El Oro, Ecuador) durante el mes de octubre de 2016. Las coordenadas de recolección fueron 3°47'6.43" S, 79°54'26.14" O. Se emplearon hojas de plantas en estado vegetativo de floración, evitando la selección de hojas jóvenes, viejas y con pérdida foliar superior al 40% según la escala referenciada (44). Una muestra del material vegetal fue utilizada para la identificación botánica en el Herbario Nacional del Ecuador QCNE con voucher CIBE 037. Posteriormente, las hojas se lavaron con abundante agua, se seleccionaron y se deshidrataron a 45 °C en estufa con circulación de aire (VWR Scientific Products) (45), se trituraron en molino de bolas y se homogenizaron en tamiz de 500  $\mu$ m (Cole Palmer).

## 2.3 Obtención de extractos acuosos

El proceso de extracción acuoso se efectuó mediante decocción en baño de agua utilizando un plato calentador (Fisher Scientific), se colocó 10% de muestra seca en relación al solvente como indica la Farmacopea (23). Los extractos acuosos obtenidos fueron filtrados en papel Whatman No.1, deshidratados y conservados a -17 °C previo a los análisis espectrofotométricos.

## 2.4 Ensayos de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos acuosos se evaluó espectrofotométricamente con los ensayos DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico)

### 2.4.1 Ensayo DPPH

El ensayo DPPH se efectuó tomando como referencia la metodología descrita por Pérez-Jiménez y colaboradores (19). Se hizo reaccionar 0.2 mL de muestra (1250 µg/mL) con 3.2 mL de una solución metanólica de DPPH 0.1 mM Sigma-Aldrich y después de 30 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 517 nm usando un Lector multi-modal Synergy HTX con detector UV-VIS (Biotek). El porcentaje de actividad captadora de radicales DPPH fue calculado de acuerdo a la ecuación [2]:

$$\text{Actividad captadora de DPPH (\%)} = \left[ 1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] \times 100 \quad [2]$$

### 2.4.2 Ensayo ABTS

El ensayo ABTS se realizó según los procedimientos descritos por Vasco y colaboradores (46). Se preparó una solución stock del radical catiónico (ABTS<sup>+</sup>) mediante reacción de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) Sigma-Aldrich y persulfato de potasio (Sigma-Aldrich). La solución stock se refrigeró a 4 °C en oscuridad durante 18 horas. Finalmente, 10 µL de muestra (1250 µg/mL) se hicieron reaccionar con 1 mL de la solución stock e inmediatamente se efectuaron las mediciones a 734 nm en un espectrofotómetro UV-160A (Shimadzu). El porcentaje de actividad inhibidora del radical catiónico ABTS fue calculado de acuerdo a la ecuación [3]:

$$\text{Actividad inhibidora de ABTS}^+ \text{ (\%)} = \left[ 1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] \times 100 \quad [3]$$

Las mediciones de los extractos acuosos evaluados se compararon también con una curva de calibración preparada con soluciones del antioxidante Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) Sigma y los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados como µmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco. Se utilizaron concentraciones de Trolox entre (100 - 800 µmol/L) y (312 - 2500 µmol/L) para el ensayo DPPH y el ensayo ABTS respectivamente (Anexos 1-2).

## **2.5 Determinación de fenoles totales y flavonoides totales**

### **2.5.1 Contenido de fenoles totales**

Se empleó el método colorimétrico Folin-Ciocalteu considerando la separación previa de interferencias en cartuchos Oasis (Waters). Un volumen de 500 uL fueron mezclados con 2.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), se agitó en vortex (VWR Scientific Products) y se colocó en baño de agua (VWR Scientific Products) a 50 °C durante 15 minutos. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV-160A (Shimadzu). La medición se comparó con una curva de calibración preparada con soluciones de ácido gálico (Sigma) y el resultado se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco (47, 48).

### **2.5.2 Contenido flavonoides totales**

Un volumen de 250 uL de muestra fueron mezclados con 1,25 mL de agua destilada y 75 uL de nitrito de sodio (Merck) al 5%, después se agitó en vortex (VWR Scientific Products) y se dejó en reposo durante 6 minutos. Luego se agregaron 150 uL de cloruro de aluminio (Merck) al 10%, se agitó y se dejó en reposo por 5 minutos. Finalmente, previo al análisis colorimétrico se añadieron 0,5 mL de hidróxido de sodio (J.T. Baker) 1M y 275 uL de agua destilada. La absorbancia se midió a 510 nm usando un Lector multi-modal Synergy HTX con detector UV-VIS (Biotek). La medición se comparó con una curva de calibración preparada con soluciones de (+)-catequina (Sigma-Aldrich) y el resultado se expresó en mg equivalentes de catequina (CE) por gramo de extracto seco (22, 49).

## **2.6 Identificación de compuestos antioxidantes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Los extractos secos fueron silanizados durante 2 horas en baño de agua a 70 °C empleando 200 uL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Sigma - Aldrich) como agente derivatizante (50, 51). Posteriormente, la separación e identificación de compuestos se efectuó siguiendo la metodología descrita por Salem y colaboradores (52) empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en un equipo marca Agilent Technologies (sistema 7890A GC y 5975C inerte XL MSD con detector de triple eje). Se empleó una columna capilar DB-5MS (30 m × 0.25 mm) con fenil metilpolisiloxano (0.25 µm de espesor de película) como fase estacionaria y helio como gas de arrastre (1.2 mL/min). La inyección de 2 uL de las muestras previamente derivatizadas se efectuó a 250 °C, la temperatura del horno se mantuvo en 60 °C por 2 minutos, se incrementó hasta 200 °C a 15 °C/min con un tiempo de espera de 2 minutos, luego se incrementó hasta 300 °C a 5 °C/min y se

mantuvo a 300 °C por 5 minutos. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C y la temperatura del detector fue de 230 °C. Finalmente, los compuestos separados fueron identificados mediante comparación con los espectros de masas de la librería NIST 2011 y fueron confirmados por medio del cálculo de los índices de retención. El Anexo 3 y el Anexo 4 muestran el perfil cromatográfico del estándar de n-alcenos (C7-C40) empleado como sustancia de referencia y los n-alcenos identificados utilizando las condiciones antes descritas respectivamente.

## **2.7 Análisis estadísticos**

La metodología de superficie de respuesta fue utilizada para analizar el efecto de las variables independientes: temperatura y tiempo de extracción sobre las variables de respuesta definidas empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. El software también se usó para la construcción de los modelos matemáticos, el trazado de gráficas y la verificación de los valores óptimos predichos.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Objetivo específico 1

#### 3.1 Condiciones óptimas de extracción

##### 3.1.1 Ajuste de los modelos matemáticos

Los valores experimentales y los valores predichos de la actividad captadora de radicales DPPH ( $Y_1$ ), la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS ( $Y_2$ ), el contenido de fenoles totales ( $Y_3$ ) y el contenido de flavonoides totales ( $Y_4$ ) de los extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., se muestran en la tabla 1. Los valores experimentales de cada variable de respuesta fueron ajustados en una ecuación polinómica de segundo orden y los coeficientes de regresión fueron calculados individualmente. El signo positivo delante de los coeficientes indica un efecto sinérgico, mientras que el signo negativo indica el efecto opuesto. La significancia de los coeficientes de cada modelo matemático se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) como se resume en la tabla 2. Gráficos de probabilidad normal fueron previamente utilizados para determinar la normalidad de los datos obtenidos de cada una de las variables antes descritas (Anexos 5-8).

La calidad de los modelos matemáticos fue evaluada en función de los coeficientes de correlación  $R^2$ , cuando este valor se aproxima a 1, existe una buena correlación entre los datos observados y los datos predichos. El coeficiente de variación (CV) indica el grado de precisión entre los valores experimentales y los valores predichos, lo que significa que una mayor fiabilidad del experimento se indica regularmente por un valor CV bajo. El valor PRESS denota la suma de cuadrados de los residuos predichos y se eligieron los modelos con los valores PRESS más bajos (53, 54).

**Tabla 1.** Diseño experimental y valores de respuesta a las condiciones de extracción evaluadas

T <sup>**</sup>	Variables independientes		Variables de respuesta *											
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (min)	Y <sub>1</sub>			Y <sub>2</sub>			Y <sub>3</sub>			Y <sub>4</sub>		
			Exp. ***	Pred.	Exp. ***	Exp. ***	Pred.	Exp. ***	Pred.	Exp. ***	Pred.	Exp. ***	Pred.	
1	40	70	73.49 ± 7.44	74.35	45.94 ± 2.91	38.21	67.11 ± 4.43	55.33	19.42 ± 3.69	31.97				
2	47.5	28	84.30 ± 1.56	81.28	33.40 ± 3.30	42.38	92.11 ± 3.60	65.98	28.61 ± 6.51	37.65				
3	47.5	70	72.83 ± 3.27	78.04	47.54 ± 3.18	43.47	35.27 ± 2.31	78.39	55.62 ± 4.37	28.11				
4	47.5	112	84.42 ± 0.98	81.09	29.37 ± 0.41	37.05	69.62 ± 4.11	66.46	21.14 ± 2.69	26.32				
5	65	10	89.44 ± 2.11	90.60	50.96 ± 2.83	43.63	64.08 ± 2.99	82.75	42.82 ± 3.15	31.31				
6	65	28	87.64 ± 1.34	87.16	46.10 ± 2.48	48.24	105.23 ± 3.34	100.44	28.57 ± 3.78	28.32				
7	65	70	85.74 ± 1.71	83.65	49.02 ± 3.49	53.63	79.85 ± 4.37	124.32	21.12 ± 3.38	26.89				
8	65	112	86.99 ± 1.46	86.44	53.87 ± 3.58	51.49	227.89 ± 5.71	123.85	44.88 ± 3.02	33.20				
9	65	130	87.95 ± 0.56	89.57	50.61 ± 2.09	48.27	60.23 ± 3.21	116.20	36.37 ± 3.94	38.27				
10	82.5	28	87.86 ± 2.30	88.84	48.81 ± 4.47	51.11	142.43 ± 2.64	123.85	19.26 ± 1.28	29.86				
11	82.5	70	84.96 ± 0.70	85.06	66.29 ± 3.35	60.78	178.95 ± 3.32	159.19	9.64 ± 2.27	36.53				
12	82.5	112	86.90 ± 1.70	87.59	61.92 ± 6.53	62.92	165.79 ± 10.51	170.19	44.21 ± 8.79	50.94				
13	90	70	85.55 ± 1.50	84.38	60.28 ± 3.50	62.92	149.10 ± 9.20	170.75	71.68 ± 4.42	43.98				

\* Y<sub>1</sub> = actividad captadora de radicales DPPH (%), Y<sub>2</sub> = actividad inhibidora del radical catiónico ABTS (%),

Y<sub>3</sub> = contenido de fenoles totales (mg GAE/g), Y<sub>4</sub> = contenido de flavonoides totales (mg CE/g)

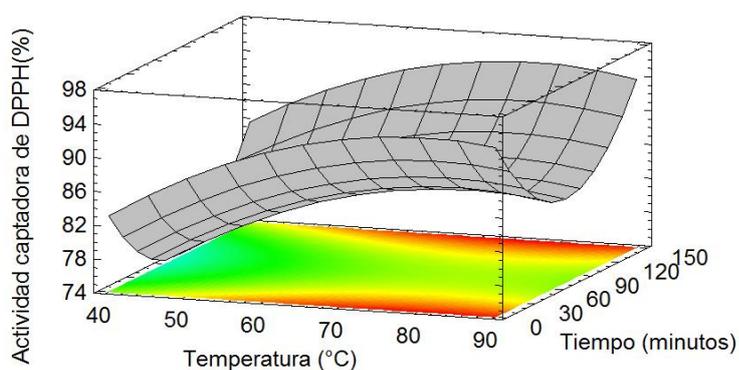
\*\* T = Tratamiento, \*\*\* Valores promedios (n=6) ± desviación estándar

### 3.1.2 Análisis de superficie de respuesta de la actividad captadora de radicales DPPH

El análisis de superficie de respuesta obtenido de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 1, indica que la temperatura y el tiempo de extracción tuvieron un efecto cuadrático sobre la actividad captadora de radicales DPPH con un coeficiente de correlación ( $R^2 = 0.6645$ ). La influencia de los parámetros de extracción evaluados sobre la actividad captadora de radicales DPPH se muestra en la ecuación [4] a continuación:

$$Y_1 = 49.3286 + 1.1179X_1 - 0.2351X_2 - 0.0069X_1^2 + 0.0018X_2^2 - 0.0004X_1X_2 \quad [4]$$

La temperatura de extracción tuvo un efecto lineal significativo ( $p < 0.01$ ), el tiempo de extracción y la temperatura tuvieron un efecto cuadrático significativo ( $p < 0.01$ ) con una influencia negativa de la temperatura; mientras que una interacción no significativa se observó entre el tiempo de extracción y la temperatura (Tabla 2). El gráfico 1 muestra el gráfico de superficie de respuesta y el gráfico de contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad captadora de radicales DPPH.



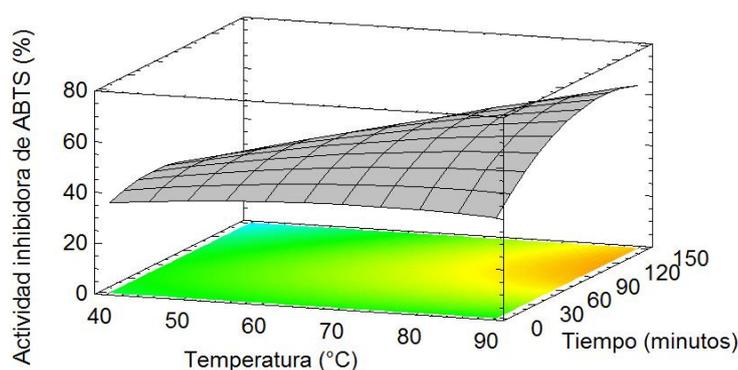
**Gráfico 1.** Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad captadora de radicales DPPH.

### 3.1.3 Análisis de superficie de respuesta de la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS

El análisis de superficie de respuesta obtenido de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 1, demostró que los parámetros de extracción ejercieron un efecto cuadrático sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS con un coeficiente de correlación ( $R^2 = 0,6553$ ). El efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS se muestra en la ecuación [5] a continuación:

$$Y_2 = 14.2054 + 0.7223X_1 - 0.0420X_2 - 0.0049X_1^2 - 0.0021X_2^2 + 0.0058X_1X_2 \quad [5]$$

La temperatura de extracción demostró una influencia lineal significativa ( $p < 0.01$ ) pero se halló un impacto cuadrático no significativo, mientras que el tiempo de extracción solo mostró un efecto cuadrático negativo ( $p < 0.01$ ) y se observaron efectos de interacción significativos entre la temperatura y el tiempo de extracción (Tabla 2). El gráfico 2 muestra el gráfico de superficie de respuesta y el gráfico de contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS.



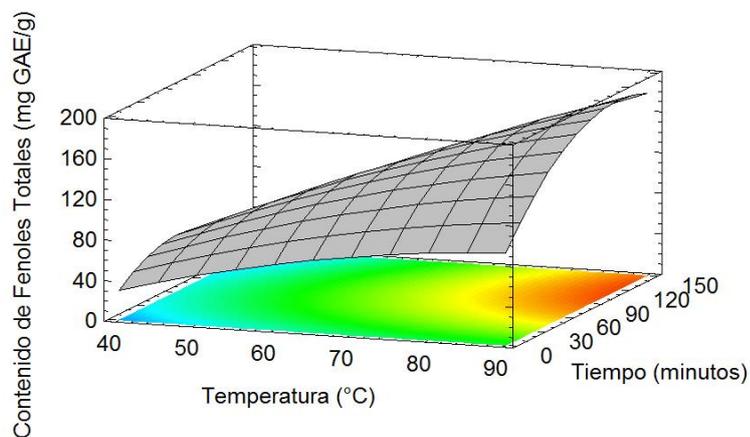
**Gráfico 2.** Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS.

### 3.1.4 Análisis de superficie de respuesta del contenido de fenoles totales

El análisis de superficie de respuesta de los datos que se muestran en la Tabla 1 indican que la temperatura y el tiempo de extracción tuvieron un efecto cuadrático sobre el contenido de fenoles totales con un coeficiente de correlación ( $R^2 = 0,4810$ ). La influencia de los parámetros de extracción sobre el contenido de fenoles totales se muestra en la ecuación [6] a continuación:

$$Y_3 = -84.3414 + 3.5628X_1 + 0.2310X_2 - 0.0180X_1^2 - 0.0069X_2^2 + 0.0155X_1X_2 \quad [6]$$

La temperatura de extracción tuvo un efecto lineal significativo ( $p < 0.01$ ) y el tiempo de extracción mostró un efecto lineal ( $p < 0.05$ ) sobre el contenido de fenoles totales. No se encontraron efectos cuadráticos ni de interacción significativos (Tabla 2). El gráfico 3 muestra el gráfico de superficie de respuesta y el gráfico de contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales.



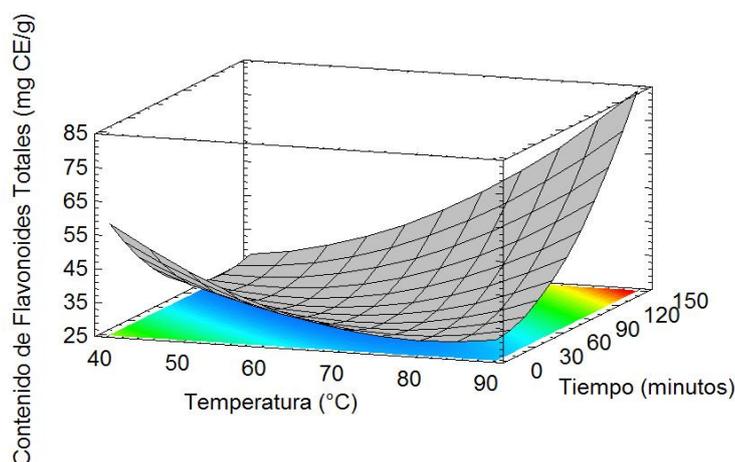
**Gráfico 3.** Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales.

### 3.1.5 Análisis de superficie de respuesta del contenido de flavonoides totales

El análisis de superficie de respuesta de los datos que se muestran en la Tabla 1 indican que la temperatura y el tiempo de extracción tuvieron un efecto cuadrático sobre el contenido de flavonoides totales con un coeficiente de correlación ( $R^2 = 0,1653$ ). El efecto de los parámetros de extracción sobre el contenido de flavonoides totales se muestra en la ecuación [7] a continuación:

$$Y_4 = 143.0840 - 2.8379X_1 - 0.9659X_2 + 0.0177X_1^2 + 0.0022X_2^2 + 0.0110X_1X_2 \quad [7]$$

La temperatura de extracción mostró un efecto lineal negativo ( $p < 0.05$ ). Se observó un efecto de interacción significativo entre la temperatura y el tiempo de extracción ( $p < 0.05$ ). No se encontraron efectos cuadráticos significativos sobre el contenido de fenoles totales (Tabla 2). El gráfico 4 muestra el gráfico de superficie de respuesta y el gráfico de contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de flavonoides totales.



**Gráfico 4.** Superficie de respuesta y contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de flavonoides totales.

**Tabla 2.** Coeficientes de regresión y análisis de varianza (ANOVA) de los polinomios de segundo orden predichos en respuesta de las variables independientes planteadas.

	Coeficientes de regresión <sup>a</sup>			
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
Constantes	49.3268	14.2054	-84.3414	143.0840
Lineales				
X <sub>1</sub> : Temperatura (°C)	1.1179**	0.7223**	3.5628**	-2.8379*
X <sub>2</sub> : Tiempo de extracción (min)	-0.2351	-0.0420	0.2310*	-0.9659
Cuadráticos				
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.0069**	-0.0049	-0.0180	0.0177
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.0018**	-0.0021**	-0.0069	0.0022
Interacción				
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.0004	0.0058**	0.0155	0.0110*
R <sup>2</sup>	0.6645	0.6553	0.4810	0.1653
R <sup>2</sup> ajustado	0.6412	0.6314	0.4449	0.1074
PRESS	961.50	3445.22	140024	21967
Análisis de varianza				
Media	84.4668	49.5469	110.5909	34.1024
Error estándar	3.3709	6.3429	41.3464	16.2825
Coefficiente de variación (%)	3.9908	12.8019	37.3868	47.7459
Cuadrado medio	324.04**	1101.50**	22813.1**	756.13*
Valor-F (modelo)	28.52**	27.38**	13.34**	2.85*

<sup>a</sup> Y<sub>1</sub> = actividad captadora de radicales DPPH (%), Y<sub>2</sub> = actividad inhibidora del radical catiónico ABTS (%), Y<sub>3</sub> = contenido de fenoles totales (mg GAE/g), Y<sub>4</sub> = contenido de flavonoides totales (mg CE/g).

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

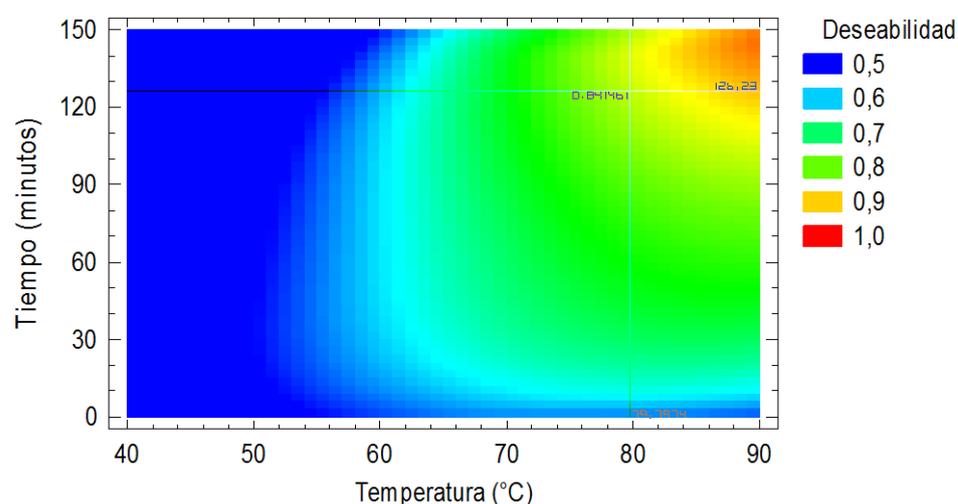
En el presente estudio, los valores estadísticos como el R<sup>2</sup>, R<sup>2</sup> ajustado, CV, error estándar y los valores PRESS para la actividad captadora de radicales DPPH y la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS indicaron que las ecuaciones polinomiales de segundo orden estaban mejor representados por los datos experimentales que el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales. Por lo tanto, se puede deducir que los modelos predichos para las variables Y<sub>1</sub> y Y<sub>2</sub> estaban moderadamente representados por los datos experimentales y fueron seleccionados para el proceso de optimización.

Como se observó en la tabla 2, la actividad captadora de radicales DPPH y la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS estuvieron explicadas en un 66.45% y 65.53% respectivamente por las variables independientes

temperatura y tiempo de extracción. Este resultado denota que posiblemente otros parámetros podrían estar afectando el proceso de extracción ya que la eficiencia de los procesos de extracción está influenciada por varios factores como concentración y tipo del solvente, temperatura, pH, tiempo de extracción, relación solido-solvente y el tamaño de partícula (55). Sin embargo, esta investigación fue realizada con valores de tamaño de partícula y relación solido-solvente dentro de los rangos mencionados en la farmacopea (23).

### 3.1.6 Optimización de respuestas múltiples

Para optimizar el proceso de extracción se utilizó la función de deseabilidad. Se determinó un valor de deseabilidad compuesto de 0.84 para un valor máximo de la actividad captadora de radicales DPPH (87.34%) y un valor máximo de la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS (68.64%) con la finalidad de encontrar los mejores ajustes para la extracción acuosa de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob. Las condiciones de extracción óptimas determinadas fueron 79.79 °C y 126.23 minutos para las variables  $Y_1$  y  $Y_2$ . La representación del gráfico 5 ilustra las mejores condiciones de extracción para obtener los valores óptimos de actividad antioxidante antes descritos.



**Gráfico 5.** Contorno de la función deseabilidad

## Objetivo específico 2

### 3.2 Verificación del modelo predictivo

La verificación fue realizada con la finalidad de confirmar las condiciones de extracción predichas por los modelos matemáticos ajustados. Tres tipos de secado (estufa, temperatura ambiente y liofilización) fueron utilizados previamente al proceso de extracción acuosa para la validación individual de la actividad captadora de radicales DPPH y la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS. Las condiciones de secado empleadas fueron: 45 °C en estufa con circulación de aire (VWR Scientific Products) durante 24 horas, temperatura ambiente de 25 °C durante 48 horas y 133 mBar - 46 °C durante 48 horas en equipo de liofilización (Labconco). La tabla 3 y el gráfico 6 presentan los valores de la actividad antioxidante obtenidos en cada uno de los ensayos antes descritos empleando las condiciones óptimas de extracción y diferentes tipos de secado.

**Tabla 3.** Valores de actividad antioxidante empleando las condiciones óptimas de extracción y diferentes tipos de secado.

	Y <sub>1</sub> * (%)	Y <sub>2</sub> (%)
Valores predichos	89,57	60,30
Estufa **	87,14 ± 1,13 A	50,68 ± 5,43 A
Temperatura ambiente **	89,33 ± 3,55 A	36,60 ± 2,50 B
Liofilización **	89,14 ± 0,71 A	33,53 ± 2,39 B

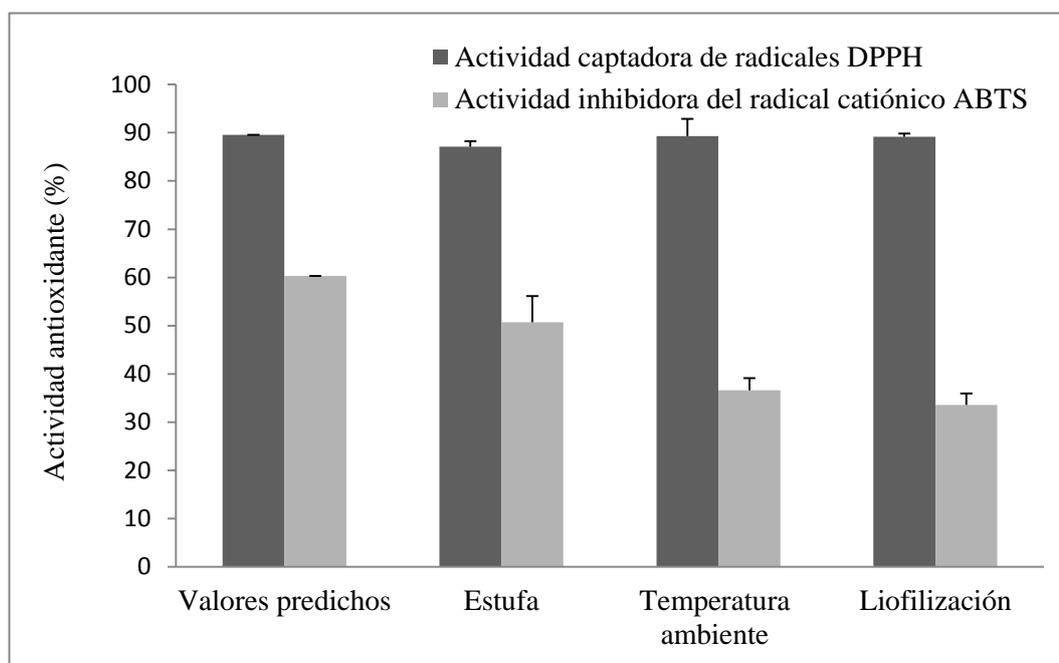
\* Y<sub>1</sub> = actividad captadora de radicales DPPH, Y<sub>2</sub> = actividad inhibidora del radical catiónico ABTS, \*\* Valores promedios (n=6) ± desviación estándar, Valores promedios con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes según Test de Tukey (p>0,05)

La tabla 3 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de deshidratación empleados para la actividad captadora de radicales DPPH, puesto que el valor p=0,1918 de los valores promedios para esta variable es mayor o igual que 0,05 entre un método de secado y otro con un nivel de confianza del 95 % (Anexo 9). Además, la tabla 3 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de deshidratación empleados para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS, puesto que el valor p obtenido de los valores promedios para esta variable es menor que 0,05 entre un método de secado y otro con un nivel de confianza del 95 % (Anexo 10).

Esta diferencia de resultados entre métodos de secado para la variable Y<sub>2</sub> está explicada directamente por los factores de dilución empleados para determinar los porcentajes de inhibición expuestos ya que se empleó 625 µg/mL de concentración para las hojas deshidratadas a temperatura ambiente y liofilización. En general, estos resultados indican que el método de secado tuvo un efecto

significativo sobre la actividad inhibitora del radical catiónico ABTS pero no sobre la actividad captadora de radicales DPPH.

La actividad captadora de radicales DPPH obtenida para los tres tipos de secado probablemente podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos en la muestra. En este trabajo, el contenido de fenoles totales no fue optimizado debido a los resultados no significativos de los valores estadísticos. Sin embargo, el tratamiento 11 mostró el segundo valor de fenoles totales más alto. Es importante destacar que el tratamiento citado presentó las condiciones de extracción más cercanas a las condiciones óptimas encontradas (tabla 1). Este resultado confirma que el ensayo DPPH es ampliamente utilizado para medir la actividad antioxidante de compuestos fenólicos purificados, así como de extractos de plantas naturales y que el ensayo DPPH debe ser evaluado a través del tiempo (56) ya que la mayoría de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante reaccionan lentamente frente al reactivo DPPH (57).



**Gráfico 6.** Actividad antioxidante expresada como porcentajes de inhibición empleando diferentes tipos de secado.

Los porcentajes de inhibición obtenidos son más altos que los reportados por God'swill y colaboradores, quienes reportaron un porcentaje de inhibición del 22 % para extractos acuosos de hojas de *Vernonia amigdalina* con una concentración de 300 µg/mL obtenidos por maceración (58). También es más alto que los valores descritos por Manzano y colaboradores, quienes informan un porcentaje de inhibición del  $80.98 \pm 1.70$  % para extractos acuosos de hojas *V. patens*

(Kunth) H. Rob., obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido en baño de agua durante 15 minutos y decrece después de 60 minutos (10).

Estos resultados difieren con el porcentaje de inhibición del  $80 \pm 1.89$  % reportado por Re y colaboradores, quienes evaluaron extractos metanólicos de hojas de *Vernonia cinérea* con una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (59). Los resultados del presente estudio fueron por consiguiente inferiores que el porcentaje de inhibición citado debido a las concentraciones de los extractos evaluados. No obstante, es importante destacar que el experimento referido utilizó solvente orgánico en el proceso de extracción.

La actividad antioxidante de los extractos evaluados con las condiciones óptimas de extracción fue también expresada como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco. La tabla 4 y el gráfico 7 muestran los valores de actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox para la actividad captadora de radicales DPPH y la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS.

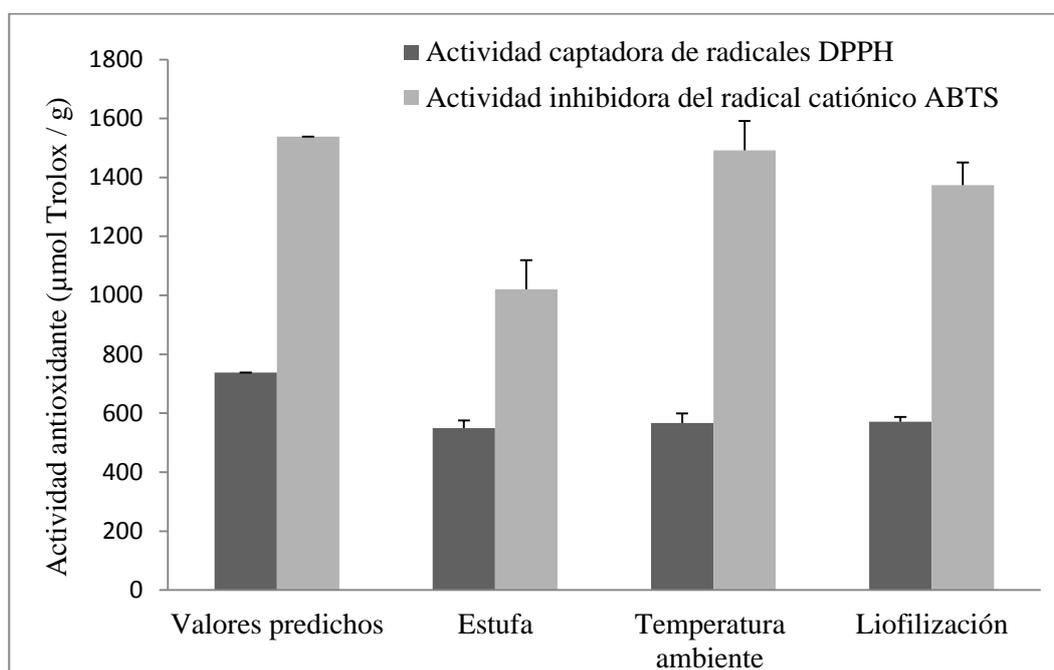
**Tabla 4.** Valores de actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox empleando las condiciones óptimas de extracción y diferentes tipos de secado

	$Y_1$ * ( $\mu\text{mol}$ Trolox / g)	$Y_2$ ( $\mu\text{mol}$ Trolox / g)
Valores predichos	738,13	1538,39
Estufa **	$549,80 \pm 25,95$ A	$1020,68 \pm 99,07$ B
Temperatura ambiente **	$566,62 \pm 32,88$ A	$1491,75 \pm 99,53$ A
Liofilización **	$570,67 \pm 16,20$ A	$1373,63 \pm 77,35$ A

\*  $Y_1$  = actividad captadora de radicales DPPH,  $Y_2$  = actividad inhibidora del radical catiónico ABTS, \*\* Valores promedios ( $n=6$ )  $\pm$  desviación estándar, Valores promedios con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes según Test de Tukey ( $p>0,05$ )

La tabla 4 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de secado empleados para la actividad captadora de radicales DPPH, puesto que el valor  $p=0,3605$  de los valores promedio para esta variable es mayor o igual que 0,05 entre un método de secado y otro con un nivel de confianza del 95,0% (Anexo 11). Asimismo, indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de deshidratación empleados para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS, puesto que el valor  $p$  obtenido de los valores promedio para esta variable es menor que 0,05 entre un método de secado y otro con un nivel de confianza del 95,0% (Anexo 12).

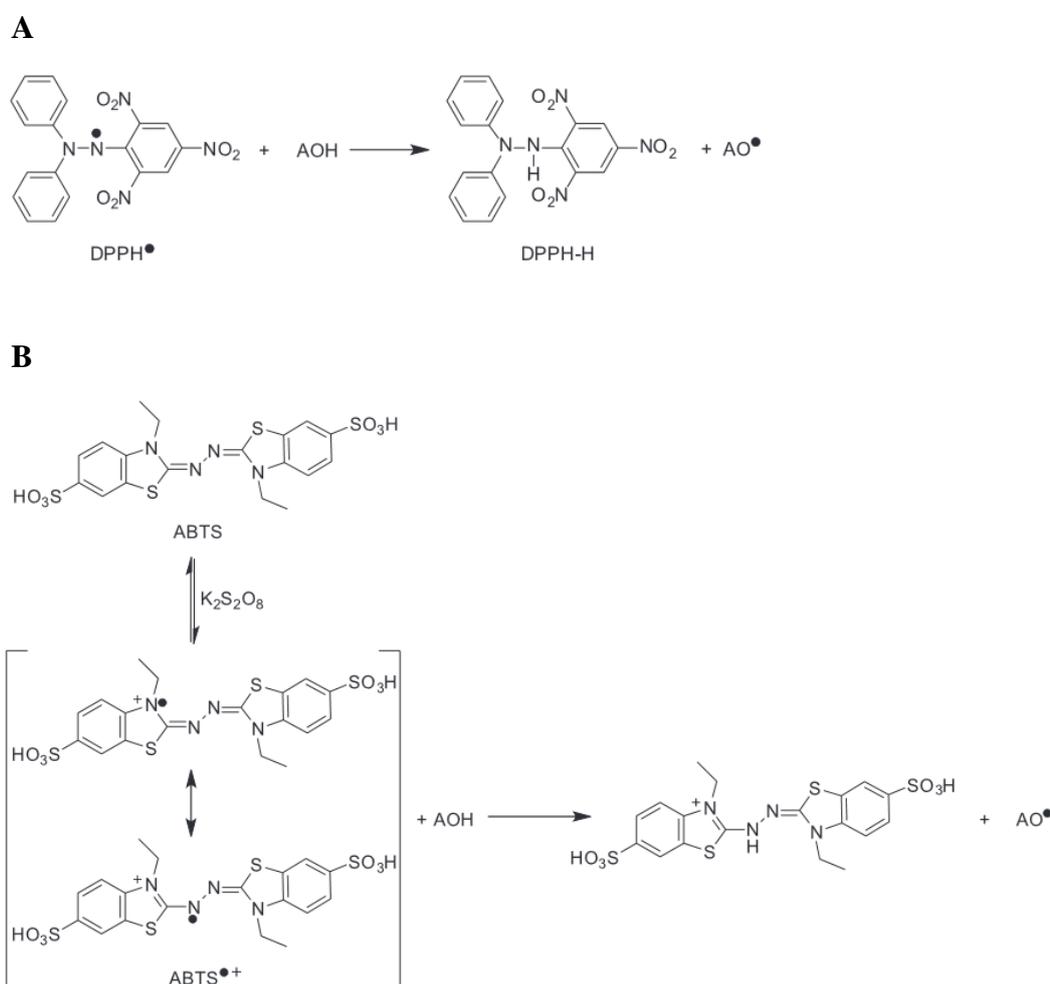
Como se puede observar en la tabla 4, los valores de actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox del ensayo ABTS son mayores que el ensayo DPPH. Esta diferencia de resultados entre ensayos está explicada



**Gráfico 7.** Actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox empleando diferentes tipos de secado.

directamente por la reactividad de los radicales empleados. El radical catiónico ABTS es una sustancia más reactiva que el radical DPPH ya que puede interactuar con antioxidantes donantes de hidrógeno o de electrones, mientras que el radical DPPH solo puede ser estabilizado por especies donantes de hidrógeno. Es importante destacar que ambas metodologías poseen la capacidad de atrapar radicales libres, sin embargo, el ensayo DPPH es más selectivo que el ensayo ABTS (60, 61). Algunos autores indican que el mecanismo de reacción del ensayo ABTS considera compuestos hidrofílicos y lipofílicos a diferencia del ensayo DPPH que solo considera compuestos hidrofílicos (62). La Figura 3 muestra los mecanismos de reacción del radical DPPH y el radical catiónico ABTS<sup>+</sup> frente a un compuesto antiradicalario (63).

Por otro lado, la diferencia de resultados entre tipos de secado para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS probablemente se debe a los métodos de deshidratación y las temperaturas relacionadas a cada proceso utilizado. Tomaino y colaboradores indican que el proceso de secado generalmente provoca un agotamiento de antioxidantes naturales provenientes de materia prima de las plantas (64). Asimismo, otros autores mencionan que los tratamientos térmicos intensos y prolongados ocasionan pérdidas significativas de antioxidantes naturales ya que la mayoría de estos compuestos son relativamente inestables (65).



**Figura 3.** Mecanismo de reacción del A) radical DPPH y B) radical catiónico ABTS, frente a un compuesto antioxidante (AOH).

**Fuente:** Oliveira y colaboradores, 2014 (63).

En este contexto, se puede inferir que el proceso de deshidratación por estufa influyó en los resultados de este estudio ya que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de hojas deshidratadas mediante esta metodología fue menor que los valores de actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de hojas deshidratadas mediante liofilización y temperatura ambiente.

Este fenómeno podría ser explicado posiblemente por el estrés provocado sobre la estructura celular debido al cambio de temperaturas. En el caso del secado en estufa, el incremento de la temperatura ejerce presión sobre la pared de las células vegetales favoreciendo la eliminación de agua, compuestos intracelulares como

los polifenoles y enzimas oxidativas como las polifenoloxidasas. Mientras que, durante la liofilización la formación de cristales de hielo induce la degradación de la pared celular, provocando el mismo fenómeno de expulsión antes mencionado. Sin embargo, las enzimas serían inactivadas durante la liofilización por las bajas temperaturas y probablemente recuperarían su capacidad oxidativa durante el proceso de extracción (66). Por el contrario, durante la deshidratación a temperatura ambiente no existen cambios de temperatura que provoquen estrés en las células vegetales.

Los valores de actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox de este trabajo fueron bajos en comparación con los valores reportados por Adesanoye y colaboradores, quienes demostraron que la actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox de extractos metanólicos de *Vernonia amygdalina* frente al radical catiónico ABTS incrementan a medida que aumenta la concentración del extracto. En otras palabras, al aumentar los extractos entre 50-600  $\mu\text{g}$  la actividad antioxidante aumenta entre  $339.4 \pm 155.3$  a  $4320.0 \pm 33.6$   $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox. Asimismo, estos extractos demostraron una actividad inhibitoria similar que la catequina a 50  $\mu\text{g}$  (61). Este fenómeno podría explicarse probablemente por la polaridad del solvente orgánico empleado en el trabajo citado ya que el metanol posee la capacidad de extraer compuestos activos polares moderados o bajos como los flavonoides, saponinas, entre otros (67).

### Objetivo específico 3

#### 3.3 Composición química

La identificación de compuestos químicos fue realizada con el propósito de determinar los metabolitos responsables de la actividad antioxidante encontrada en los extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob. La figura 4 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos mediante CG-EM de los extractos acuosos preparados a partir de hojas deshidratadas en estufa, liofilizadas y secadas a temperatura ambiente.

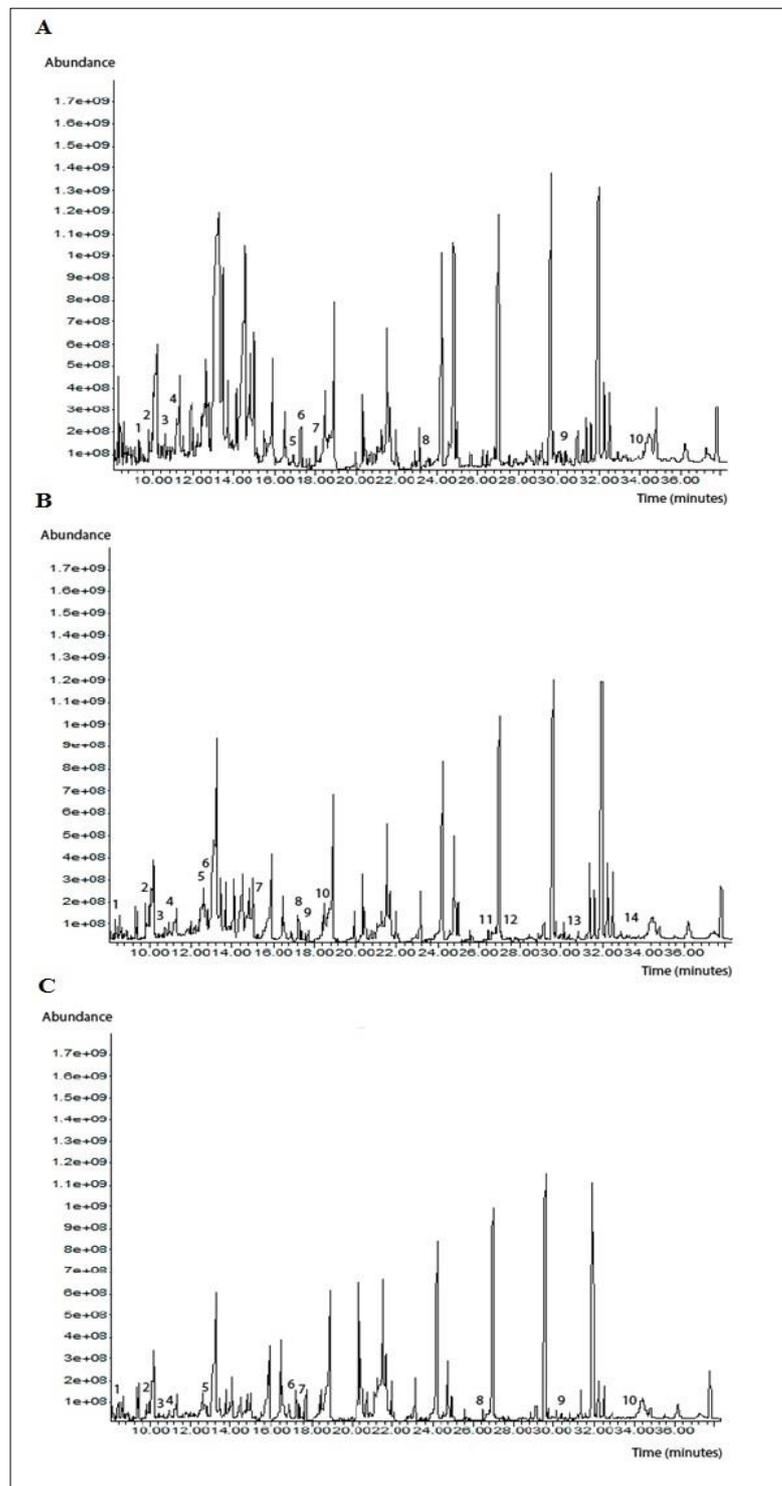
Los compuestos identificados en el extracto acuoso de hojas deshidratadas en estufa se muestran en la tabla 5 según el orden de elución en la columna cromatográfica. En total 10 compuestos fueron identificados y confirmados mediante la estimación del índice retención de n-alcános: 4 ácidos grasos, 2 aminoácidos, 1 ácido dicarboxílico, 1 ácido fenólico, 1 disacárido y 1 terpeno.

Por otro lado, en la tabla 6 se muestran los compuestos identificados en el extracto acuoso de hojas deshidratadas mediante liofilización. En total 14 compuestos fueron identificados y confirmados mediante la estimación del índice de retención de n-alcános: 4 ácidos grasos, 3 ácidos dicarboxílicos, 2 ácidos fenólicos, 1 monosacárido, 1 ácido tricarboxílico, 1 polialcohol o alcohol derivado de azúcar, 1 hidrocarburo y 1 terpeno.

Asimismo, los compuestos identificados en el extracto acuoso de hojas deshidratadas a temperatura ambiente se muestran en la tabla 7. En total 10 compuestos fueron identificados y confirmados mediante la estimación del índice de retención de n-alcános: 3 ácidos grasos, 3 ácidos dicarboxílicos, 2 ácidos fenólicos, 1 ácido tricarboxílico y 1 terpeno.

Como se puede observar, la mayor cantidad de compuestos fueron identificados en el extracto acuoso obtenido a partir de hojas deshidratadas mediante liofilización, confirmando así que este método conserva mejor los compuestos de la muestra vegetal (68). Sin embargo, no todos los compuestos identificados en este extracto son antioxidantes. Lo que explicaría la similar actividad antioxidante obtenida por este método y la deshidratación a temperatura ambiente (tabla 4).

En general, la actividad antioxidante de los extractos evaluados podría estar explicada por la presencia de los ácidos carboxílicos: ácido málico, ácido succínico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y ácido cítrico; los ácidos fenólicos: ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido cafeico; el polialcohol: inositol; y, el triterpeno pentacíclico  $\beta$ -amirina. De hecho, la ausencia de algunos de los compuestos antes mencionados posiblemente explicaría la baja actividad antioxidante obtenida por los extractos acuosos de hojas deshidratadas en estufa.



**Figura 4.** Perfiles cromatográficos de extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., deshidratadas en: A) estufa, B) liofilizador y C) temperatura ambiente.

**Tabla 5.** Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., deshidratadas en estufa

Pico	Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Porcentaje de área (%) <sup>*</sup>	Índice de retención (calculado) <sup>**</sup>	Índice de retención (referencia) <sup>***</sup>
1	9,08	L-treonina	0,11 ± 0,02	1354,42	1357,00
2	9,82	Ácido málico	0,70 ± 0,22	1435,81	1390,00
3	10,42	Ácido L-treónico	0,69 ± 0,27	1504,89	1518,00
4	11,47	L-asparagina	0,79 ± 0,39	1632,82	1538,00
5	16,92	Ácido cafeíco	0,41 ± 0,12	2140,45	2144,00
6	17,40	Ácido heptadecanoico	0,61 ± 0,26	2107,31	2087,00
7	18,00	Ácido 11-cis-octadecenoico	1,03 ± 0,60	2145,90	2194,00
8	23,58	2 $\alpha$ -manobiosa	0,29 ± 0,17	2504,01	2598,00
9	30,40	Ácido hexacosanoico	0,15 ± 0,03	2991,56	2981,00
10	34,17	$\beta$ -amirina	0,14 ± 0,05	3299,42	3320,40

\* Valores promedios (n=6)  $\pm$  desviación estándar, \*\* Índice de retención calculado en columna capilar DB-5MS, \*\*\* Índice de retención de referencia estimado en columna capilar no polar (Librería NIST 2011)

La actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas deshidratadas en estufa probablemente estaría explicada por la presencia del ácido málico (0,70  $\pm$  0,22 %), ácido cafeíco (0,41  $\pm$  0,12 %) y la  $\beta$ -amirina (0,14  $\pm$  0,05 %). El ácido cafeíco es un compuesto fenólico que posee la capacidad de donar protones debido a su estructura química y ha sido reportado como agente antioxidante (69, 70), antiinflamatorio (71, 72) y anticancerígeno (73). El triterpeno pentacíclico  $\beta$ -amirina ha sido extraído de diferentes matrices vegetales demostrando poseer actividad antiinflamatoria (74, 75), anti-fibrótica (75) y anticancerígena (76). Por otro lado, el ácido málico ha manifestado poseer una moderada correlación positiva con la actividad captadora de radicales DPPH, demostrando ser uno de los ácidos orgánicos que poseen la capacidad de eliminar este radical libre (77).

Del mismo modo, la actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas deshidratadas mediante liofilización estaría explicada por la presencia del ácido succínico (0,21  $\pm$  0,07 %), ácido málico (0,56  $\pm$  0,09 %), ácido *m*-hidroxibenzoico (0,17  $\pm$  0,07 %), ácido  $\alpha$ -cetoglutárico (0,43  $\pm$  0,10 %), ácido cítrico (0,65  $\pm$  0,27 %), inositol (1,34  $\pm$  0,24 %), ácido cafeíco (0,23  $\pm$  0,05%) y la  $\beta$ -amirina (0,12  $\pm$  0,02 %).

**Tabla 6.** Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., deshidratadas mediante liofilización

Pico	Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Porcentaje de área (%) <sup>*</sup>	Índice de retención (calculado) <sup>**</sup>	Índice de retención (referencia) <sup>***</sup>
1	8,37	Ácido succínico	0,21 ± 0,07	1392,00	1314,00
2	9,79	Ácido málico	0,56 ± 0,09	1432,38	1390,00
3	10,69	Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico	0,17 ± 0,07	1537,65	1559,00
4	10,97	Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,43 ± 0,10	1572,13	1538,00
5	12,63	Fructosa	1,19 ± 0,27	1756,47	1805,10
6	12,81	Ácido cítrico	0,65 ± 0,27	1774,42	1839,00
7	15,01	Inositol	1,34 ± 0,24	1946,03	1848,00
8	17,25	Ácido cafeico	0,23 ± 0,05	2097,22	2144,00
9	17,39	Ácido heptadecanoico	0,24 ± 0,01	2106,86	2136,40
10	10,69	Ácido 11-cis-octadecenoico	1,08 ± 0,14	2178,27	2194,00
11	26,48	2-Monostearin	0,20 ± 0,01	2700,64	2772,00
12	27,39	Esqualeno	0,14 ± 0,06	2765,65	2797,00
13	30,39	Ácido hexacosanoico	0,14 ± 0,03	2991,01	2981,00
14	34,16	$\beta$ -amirina	0,12 ± 0,02	3298,77	3320,40

\* Valores promedios (n=6)  $\pm$  desviación estándar, \*\* Índice de retención calculado en columna capilar DB-5MS, \*\*\* Índice de retención de referencia estimado en columna capilar no polar (Librería NIST 2011)

Diferentes autores han investigado las propiedades bioactivas de los compuestos antes mencionados. De la misma forma que el ácido málico, el ácido succínico ha manifestado poseer una moderada correlación positiva con la actividad captadora de radicales DPPH, mientras que el ácido cítrico ha demostrado poseer una fuerte correlación positiva con este radical libre. De hecho, se encuentra también correlacionado con la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP) y el contenido de fenoles totales (77).

El ácido *m*-hidroxibenzoico es otro compuesto fenólico que ha reportado tener propiedades antioxidantes (78, 79) y antimicrobianas (80). Este derivado del ácido benzoico ha demostrado poseer porcentajes de inhibición similares al ácido gálico y al ácido cafeico frente al radical superóxido después de 15 minutos de reacción (78). Sin embargo, ha manifestado ser un compuesto antioxidante débil frente al radical DPPH y el peróxido de hidrógeno (79).

**Tabla 7.** Compuestos identificados en extractos acuosos de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., deshidratadas a temperatura ambiente.

Pico	Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Porcentaje de área (%) <sup>*</sup>	Índice de retención (estimado) <sup>**</sup>	Índice de retención (referencia) <sup>***</sup>
1	8,34	Ácido succínico	0,27 ± 0,07	1390,72	1314,00
2	9,98	Ácido málico	0,48 ± 0,11	1454,46	1390,00
3	10,68	Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico	0,13 ± 0,03	1536,80	1559,00
4	10,96	Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	0,35 ± 0,13	1571,27	1538,00
5	12,80	Ácido cítrico	0,45 ± 0,19	1773,65	1839,00
6	17,25	Ácido cafeico	0,52 ± 0,10	2097,22	2144,00
7	17,39	Ácido heptadecanoico	0,31 ± 0,04	2106,41	2087,00
8	26,47	2-Monostearin	0,21 ± 0,04	2700,14	2772,00
9	30,38	Ácido hexacosanoico	0,17 ± 0,02	2989,85	2981,00
10	34,14	$\beta$ -amirina	0,24 ± 0,09	3296,95	3320,40

\* Valores promedios (n=6)  $\pm$  desviación estándar, \*\* Índice de retención calculado en columna capilar DB-5MS, \*\*\* Índice de retención de referencia estimado en columna capilar no polar (Librería NIST 2011)

Por otra parte, el ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ha manifestado poseer actividad antiradicalaria frente al peróxido de hidrógeno (81), mientras que el ácido cítrico ha demostrado incrementar la actividad antioxidante frente al radical DPPH en combinación con otros compuestos fenólicos (82) y el inositol ha mostrado aumentar la capacidad antioxidante de células epiteliales, contribuyendo así la proliferación de células nuevas y disminuyendo el daño celular (83).

Finalmente, la actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas deshidratadas a temperatura ambiente posiblemente estaría explicada por la presencia del ácido succínico (0,27  $\pm$  0,07 %), ácido málico (0,48  $\pm$  0,11%), ácido *m*-hidroxibenzoico (0,13  $\pm$  0,03 %), ácido  $\alpha$ -cetoglutárico (0,35  $\pm$  0,13%), ácido cítrico (0,45  $\pm$  0,19 %), ácido cafeico (0,52  $\pm$  0,10 %) y la  $\beta$ -amirina (0,24  $\pm$  0,09 %).

Es importante destacar que a pesar de la ausencia de inositol, como ocurre en los extractos de hojas deshidratadas mediante liofilización, los extractos acuosos de hojas deshidratadas a temperatura ambiente muestran mayor abundancia del ácido succínico, ácido cafeico y  $\beta$ -amirina. Lo que probablemente también explicaría la actividad antioxidante similar a la obtenida entre la deshidratación mediante liofilización y temperatura ambiente.

Es probable que exista mayor cantidad de compuestos fenólicos, como lo indican el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales (tabla 1). Sin embargo, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) no es el método ideal debido a la naturaleza de las muestras.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las condiciones óptimas para la extracción acuosa de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., fueron 79.79 °C y 126.23 minutos para la actividad captadora de radicales DPPH y la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS. Es importante destacar que los valores óptimos encontrados aplican a extractos acuosos obtenidos a partir de hojas deshidratadas en estufa bajo las condiciones evaluadas.

La deshidratación a temperatura ambiente resultó ser el método de secado más idóneo previo a la extracción acuosa de hojas de *V. patens* (Kunth) H. Rob., ya que genera resultados similares que la liofilización para la actividad antioxidante según el ensayo DPPH y el ensayo ABTS. Además, es un procedimiento económico ya que no genera costos de operación y mantenimiento de equipos durante el proceso de secado.

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) sugiere que la actividad antioxidante de los extractos se debe probablemente a la presencia de los ácidos carboxílicos: ácido málico, ácido succínico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y ácido cítrico; los ácidos fenólicos: ácido *m*-hidroxibenzoico y ácido cafeíco; el polialcohol: inositol; y, el triterpeno pentacíclico  $\beta$ -amirina. Sin embargo, estudios complementarios deberían realizarse para identificar todos los compuestos polares responsables de la actividad antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ríos, M., De la Cruz, R., & Mora, A. (2008). Conocimiento Tradicional Y Plantas Útiles Del Ecuador: Saberes Y Prácticas. Editorial Abya Yala.
2. Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63-81.
3. Kenny, O., Smyth, T.J., Walsh, D., Kelleher, C.T., Hewage, C.M., Brunton, N.P. (2014) Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79-86.
4. Aguirre, Z., Kvist, L. P., & Sánchez, O. (2006). Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 2, 162–187.
5. Kvist, L. P., Aguirre, Z., & Sánchez, O. (2006). Bosques montanos bajos occidentales en Ecuador y sus plantas útiles. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 205–23.
6. Toyang, N. J., & Verpoorte, R. (2013). A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 681-723.
7. Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán-Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F. A., ... Bourdy, G. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 413-422.
8. Vásquez, J., Alarcón, J. C., Jiménez, S. L., Jaramillo, G. I., Gómez-Betancur, I. C., Rey-Suárez, J. P., ... Romero, J. O. (2015). Main plants used in traditional medicine for the treatment of snake bites in the regions of the department of Antioquia, Colombia. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 158-166.
9. Blair, S., & Madrigal, B. (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana. Universidad de Antioquia.
10. Manzano, P. I., Miranda, M., Quijano, M. F., & Monzote, L. (2015). Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. En A. V. Rao & L. G. Rao (Eds.), *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech.
11. Manzano, P., Miranda, M., Orellana, T., & Quijano, M. (2014). Studies of the Volatile Compounds Present in Leaves, Stems and Flowers of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. *International Journal of Organic Chemistry*, 4(5), 314-318.
12. Al Mansouri, S., Ojha, S., Al Maamari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S. M., & Bahi, A. (2014). The cannabinoid receptor 2 agonist,  $\beta$ -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 124, 260-268.

13. Bahi, A., Al Mansouri, S., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S. M., & Ojha, S. (2014).  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior*, 135, 119-124.
14. Katsuyama, S., Mizoguchi, H., Kuwahata, H., Komatsu, T., Nagaoka, K., Nakamura, H., ... Sakurada, S. (2013). Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in  $\beta$ -caryophyllene-induced antinociception. *European Journal of Pain (London, England)*, 17(5), 664-675.
15. Manzano, P. I., Miranda, M., Payrol, J. A., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. L. (2013). Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(7).
16. Manzano Santana, P. I., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. L. (2012). Phytochemical Studies of Fractions and Compounds Present in *Vernonanthura Patens* with Antifungal Bioactivity and Potential as Antineoplastic. En V. Rao (Ed.), *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech.
17. Manzano Santana, P. I., García, M., Mendiola, J., Fernández-Calientes, A., Orellana, T., Miranda, M., ... Monzote, L. (2014). *In vitro* anti-protozoal assessment of *Vernonanthura patens* extracts. *Pharmacology Online*, 1, 1-6.
18. Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.
19. Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
20. Rajamurugan, R., Selvaganabathy, N., Kumaravel, S., Ramamurthy, C. H., Sujatha, V., Suresh Kumar, M., & Thirunavukkarasu, C. (2011). Identification, quantification of bioactive constituents, evaluation of antioxidant and *in vivo* acute toxicity property from the methanol extract of *Vernonia cinerea* leaf extract. *Pharmaceutical Biology*, 49(12), 1311-1320.
21. Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A., & Escriche, I. (2015). Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 119-127.
22. Torun, M., Dincer, C., Topuz, A., Sahin-Nadeem, H., & Ozdemir, F. (2015). Aqueous extraction kinetics of soluble solids, phenolics and flavonoids from sage (*Salvia fruticosa* Miller) leaves. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2797-2805.
23. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (No. 78). Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.
24. Robinson, H. (1992) A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). *Phytologia* 73(2): 65-76

25. Vega, Á. J., & Dematteis, M. (2011). Nuevas combinaciones y tipificaciones en el género *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 46(3-4), 369-374.
26. Vega, A. J., & Dematteis, M. (2016). Cytotaxonomy of some species of *Vernonanthura* and *Vernonia* (Asteraceae, Vernonieae) from South America. *Caryologia*, 69(1), 29-37.
27. Robinson H. (1992) *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. *Phytologia* 73(2): 72.
28. Manzano, P. I., Miranda, M., Gutiérrez, Y., Santos, E., & Scull, R. (2014). Estudio morfo-anatómico e identificación genética de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(5), 119-128.
29. Gupta, M. P. (1995). 270 plantas medicinales iberoamericanas (pp. 1-576). P. I. D. C. y Tecnología, & C. A. Bello (Eds.). Bogotá: CYTED-SECAB.
30. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
31. Kala, H. K., Mehta, R., Tandey, R., Sen, K. K., & Mandal, V. (2016). Ten years of research on phenolics (2005–2015): a status report. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(1), 1-4.
32. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
33. Moharram, A. H., & Youssef, M. M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
34. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
35. Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79-86.
36. Jiménez, N., Carrillo-Hormaza, L., Pujol, A., Álzate, F., Osorio, E., & Lara-Guzman, O. (2015). Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. *Industrial Crops and Products*, 70, 272-279.
37. Zanon, R. B. (2006). Metabólitos secundários em *Vernonia tweediana* Baker. Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil.
38. Adesanoye, O. A., & Farombi, E. O. (2014). In Vitro Antioxidant Properties of Methanolic Leaf Extract of *Vernonia Amygdalina* Del. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 29(2), 93-101.

39. Leelaprakash, G., Mohan Dass, S., & Sivajothi, V. (2011). Antioxidant and hepatoprotective activities of *Vernonia cinerea* extract against CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in albino rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 10, 30-34.
40. God'swill Nduka Anyasor, K. O., Ogunwenmo, A. A. O., & Olabisi, A. S. (2010). Comparative antioxidant, phytochemical and proximate analysis of aqueous and methanolic extracts of *Vernonia amygdalina* and *Talinum triangulare*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(3), 259-264.
41. Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*.
42. Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
43. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
44. Anapo (2011). Cartilla de difusión técnica: Plagas en el cultivo de soya. Proyecto: Producción de soya responsable en Bolivia. Asociación de productores de oleaginosas y trigo. Santa Cruz, Bolivia.
45. Manzano Santana, P., Orellana León, T., Miranda Martínez, M., Abreu Payrol, J., Ruíz, O., García, P., & L, E. (2013). Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 131-139.
46. Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical Composition and Phenolic Compound Profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274-8281.
47. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
48. Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.
49. Al-Saeedi, A. H., & Hossain, M. A. (2015). Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 316-321.
50. Saitta, M., Lo Curto, S., Salvo, F., Di Bella, G., Dugo, G., 2002. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta*. 466, 335-344.
51. Zuo, Y., Wang, C., Zhan, J., 2002. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3789-3794.

52. Salem, M. M., Hussein, S. R., El-Sharawy, R., El-Khateeb, A., Ragab, E. A., Dawood, K. M., & El Negoumy, S. I. (2016). Antioxidant and antiviral activities of the aqueous alcoholic leaf extract of *Boscia angustifolia* A. Rich.(Capparaceae) and its major component'ombuin'. Egyptian Pharmaceutical Journal, 15(1), 1.
53. Yim, H. S., Chye, F. Y., Koo, S. M., Matanjun, P., How, S. E., & Ho, C. W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. Food and Bioproducts Processing, 90(2), 235-242.
54. Nazir, S., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2017). Extraction optimization of mucilage from Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds using response surface methodology. Journal of Advanced Research, 8(3), 235-244.
55. Yim, H. S., Chye, F. Y., Koo, S. M., Matanjun, P., How, S. E., & Ho, C. W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. Food and Bioproducts Processing, 90(2), 235-242.
56. Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 42(5), 556-564.
57. Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. LWT-Food Science and Technology, 30(6), 609-615.
58. God'swill Nduka Anyasor, K. O., Ogunwenmo, A. A. O., & Olabisi, A. S. (2010). Comparative antioxidant, phytochemical and proximate analysis of aqueous and methanolic extracts of *Vernonia amygdalina* and *Talinum triangulare*. Pakistan Journal of Nutrition, 9(3), 259-264.
59. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.
60. Rojano, B. A., Gaviria, C. A., Gil, M. A., Saez, J. A., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Antioxidant activity of the isoespintanol in different media. Vitae, 15(1), 173-181.
61. Adesanoye, O. A., & Farombi, E. O. (2014). *In Vitro* antioxidant properties of methanolic leaf extract of *Vernonia amygdalina* Del. Nigerian Journal of Physiological Sciences, 29(2), 93-101.
62. Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Analytical Methods, 2(1), 41-60.
63. Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., Pena, M. J., Romoff, P., & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. Química Nova, 37(3), 497-503.
64. Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the

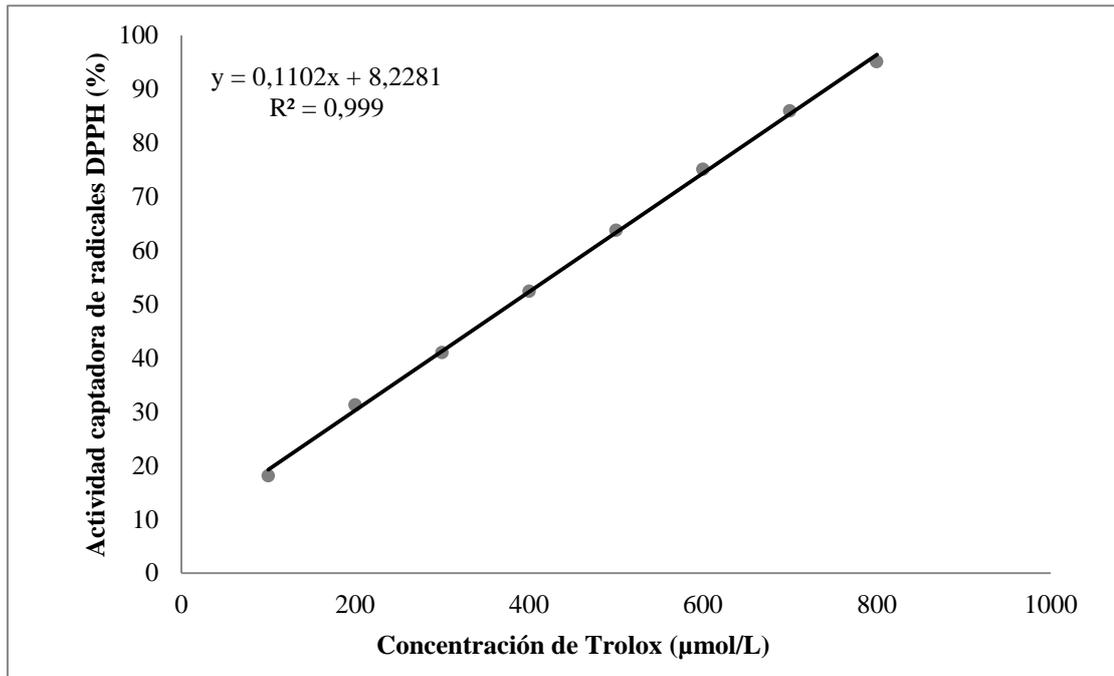
- chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549-554.
65. Lim, Y. Y., & Murtijaya, J. (2007). Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1664-1669.
  66. Ahmad Qasem Mateo, B.H. (2014). Influencia del secado y almacenamiento en el potencial antioxidante de extractos de hoja de olivo (var. serrana). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
  67. Zhao, J., Deng, J. W., Chen, Y. W., & Li, S. P. (2013). Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. *Journal of Chromatography A*, 1313, 2-23.
  68. Osorio, E. (2009). Aspectos básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Colombia.
  69. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., ... & Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1), 136-138.
  70. Son, S., & Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure–activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 468-472.
  71. Norata, G. D., Marchesi, P., Passamonti, S., Pirillo, A., Violi, F., & Catapano, A. L. (2007). Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*, 191(2), 265-271.
  72. Chao, P. C., Hsu, C. C., & Yin, M. C. (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & Metabolism*, 6(1), 33.
  73. Prasad, N. R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B. V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349(1-2), 11-19.
  74. Krishnan, K., Mathew, L. E., Vijayalakshmi, N. R., & Helen, A. (2014). Anti-inflammatory potential of  $\beta$ -amyryn, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology*, 22(6), 373-385.
  75. Thirupathi, A., Silveira, P. C., Nesi, R. T., & Pinho, R. A. (2017).  $\beta$ -Amyryn, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine–induced hepatic fibrosis in male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 36(2), 113-122.
  76. Maiyo, F., Moodley, R., & Singh, M. (2016). Phytochemistry, cytotoxicity and apoptosis studies of  $\beta$ -sitosterol-3-O-Glucoside and  $\beta$ -amyryn from *Prunus africana*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 13(4), 105-112.
  77. Mingye, P., Jingyi, L., ZhiJie, L., Bin, F., Yong, H., Mengzhou, Z., Caixia, F., Bing, G., Chao, W., Dongsheng, L., Ning, X. (2018), Effect of citrus peel on

- phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of soy sauce. *LWT-Food Science and Technology*. (In press, accepted manuscript)
78. Velika, B., & Kron, I. (2012). Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 62-67.
  79. Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(11-12), 833-843.
  80. Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., ... & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372-382.
  81. Long, L. H., & Halliwell, B. (2011). Artefacts in cell culture:  $\alpha$ -Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(1), 20-24.
  82. Kranz, S., & Bolling, B. (2015). Sugars and Citric Acid Differently Modulate DPPH Antioxidant Activity in Polyphenol-rich Fruit Juices. *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement), 922-14.
  83. Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Li, S. H., ... & Zhou, X. Q. (2013). Effects of myo-inositol on proliferation, differentiation, oxidative status and antioxidant capacity of carp enterocytes in primary culture. *Aquaculture Nutrition*, 19(1), 45-53.

# **ANEXOS**

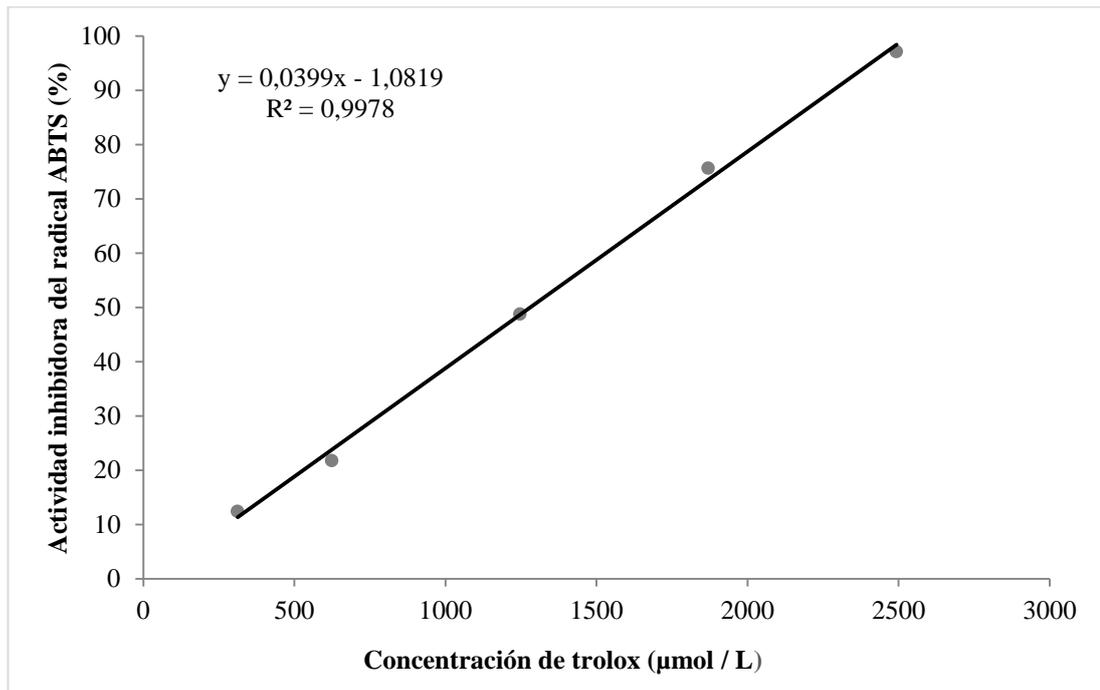
## ANEXO 1

### Curva de calibración de Trolox para la actividad captadora de radicales DPPH



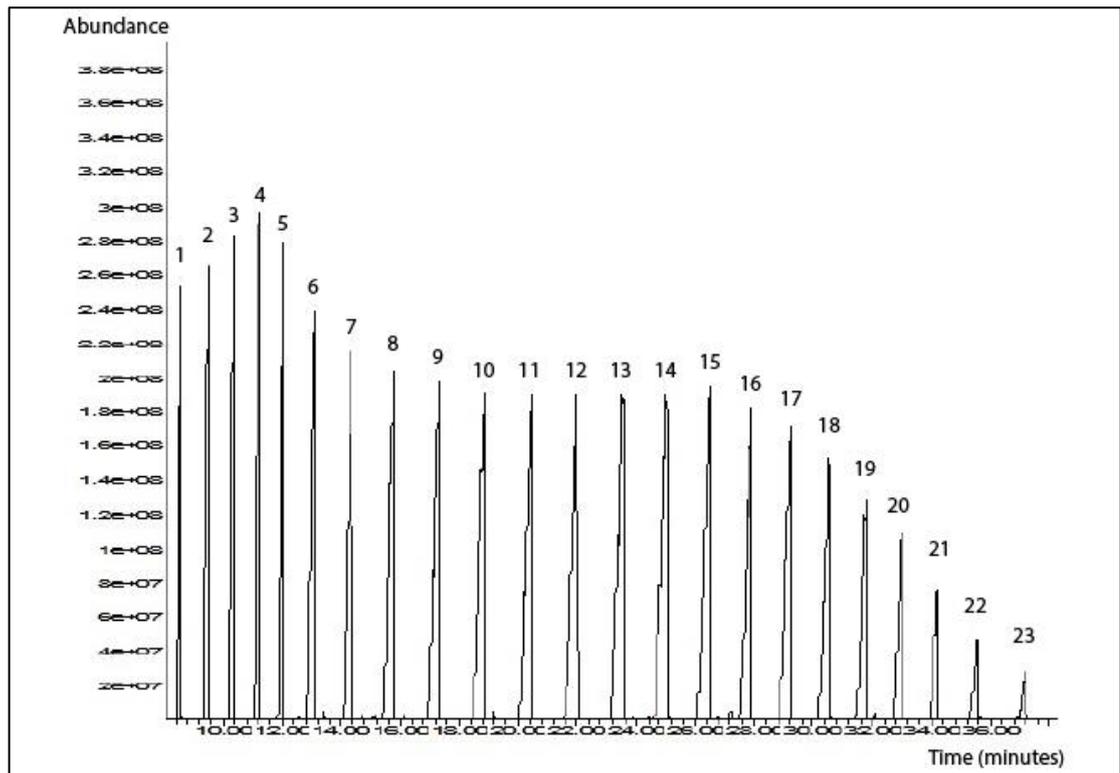
## ANEXO 2

### Curva de calibración de Trolox para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS



### ANEXO 3

#### Separación de n-alcenos (C7-C40) obtenido mediante CG-EM en columna capilar DB-5MS



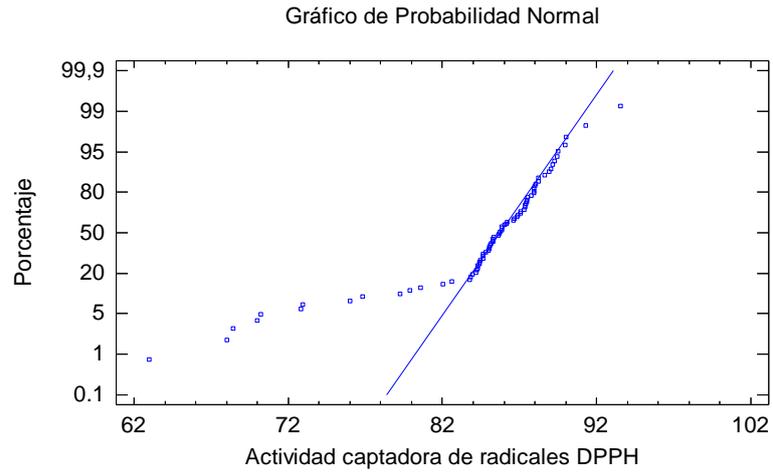
## ANEXO 4

### n-alcanos identificados mediante CG-EM en columna capilar DB-5MS

Pico	Tiempo de retención (minutos)	Alcano	Fórmula molecular	Índice de retención
1	8,577	n-Tridecane	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	1300
2	9,505	n-Tetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	1400
3	10,379	n-Pentadecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	1500
4	11,197	n-Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	1600
5	12,041	n-Heptadecane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	1700
6	13,077	n-Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	1800
7	14,355	n-Nonadecane	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	1900
8	15,778	n-Eicosane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	2000
9	17,288	n-Heneicosane	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	2100
10	18,848	n-Docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	2200
11	20,424	n-Tricosane	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	2300
12	21,988	n-Tetracosane	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	2400
13	23,523	n-Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	2500
14	25,021	n-Hexacosane	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	2600
15	26,471	n-Heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	2700
16	27,877	n-Octacosane	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	2800
17	29,220	n-Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	2900
18	30,511	n-Triacontane	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	3000
19	31,752	n-Hentriacontane	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	3100
20	32,961	n-Dotriacontane	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	3200
21	34,176	n-Tritriacontane	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>	3300
22	35,559	n-Tetratriacontane	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>	3400
23	37,180	n-Pentatriacontane	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>	3500

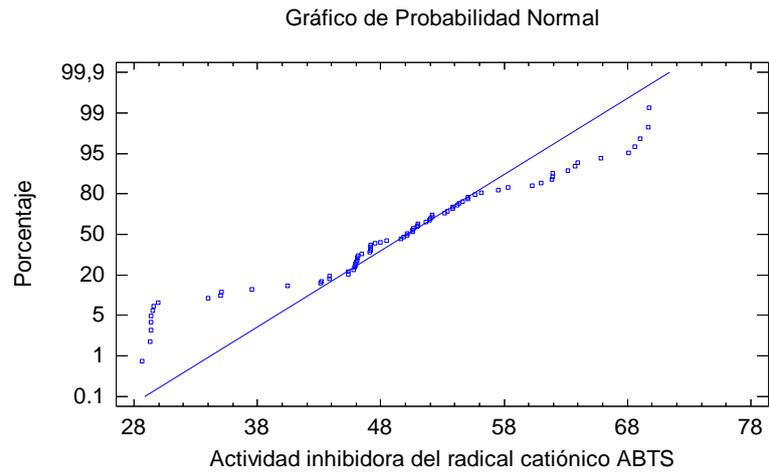
## ANEXO 5

### Gráfico de normalidad para la actividad captadora de radicales DPPH



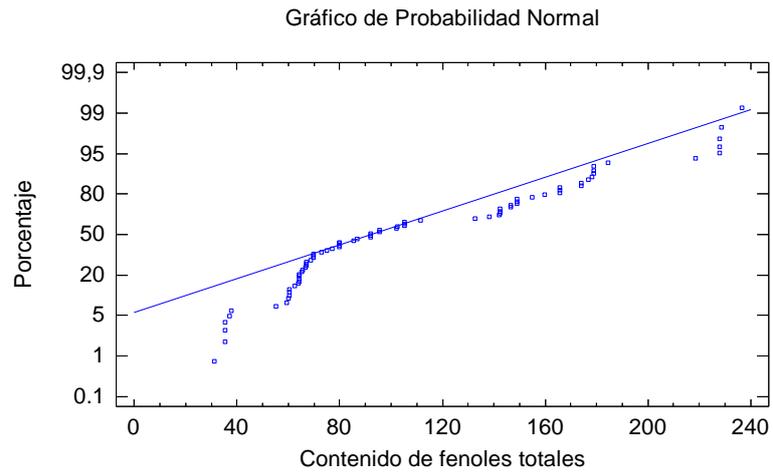
## ANEXO 6

### Gráfico de normalidad para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS



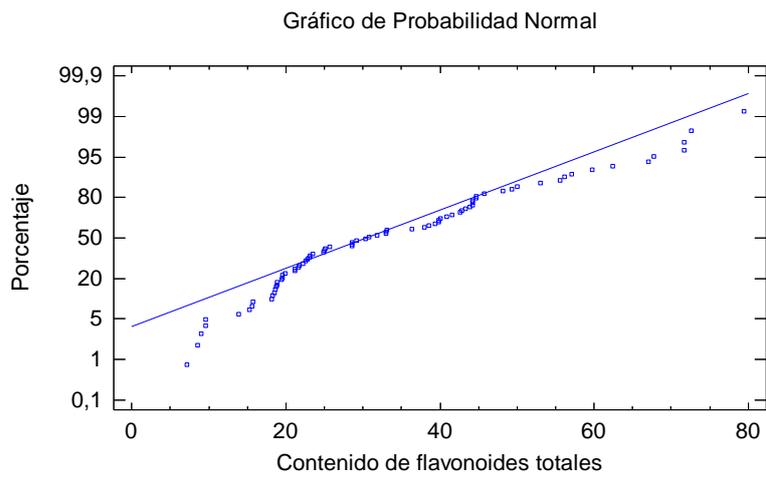
## ANEXO 7

### Gráfico de normalidad para el contenido de fenoles totales



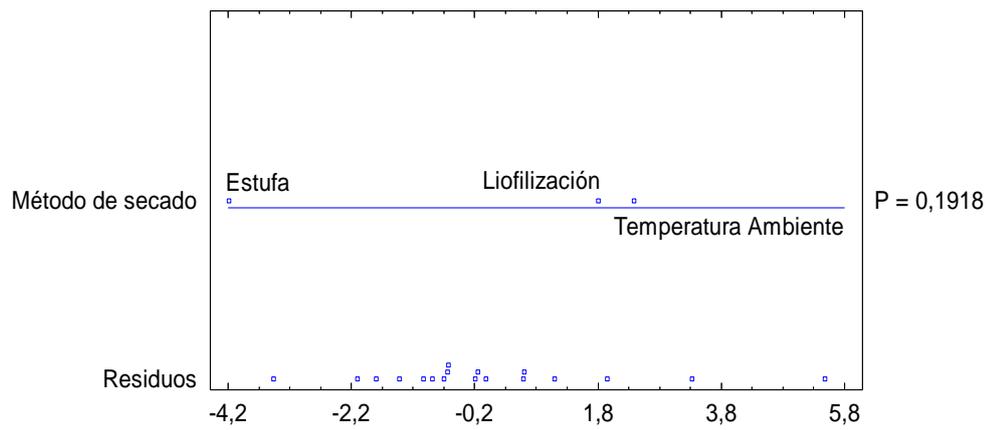
## ANEXO 8

### Gráfico de normalidad para el contenido de flavonoides totales



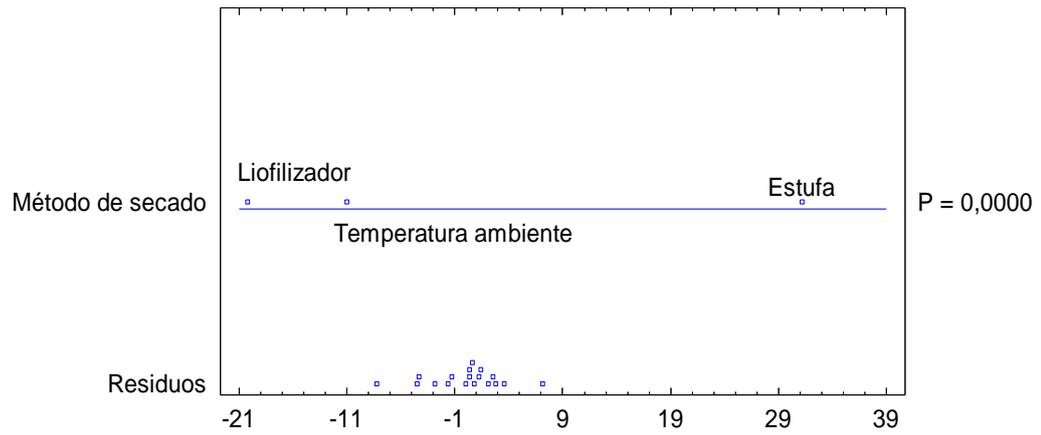
## ANEXO 9

**Gráfico ANOVA para la actividad captadora de radicales DPPH**



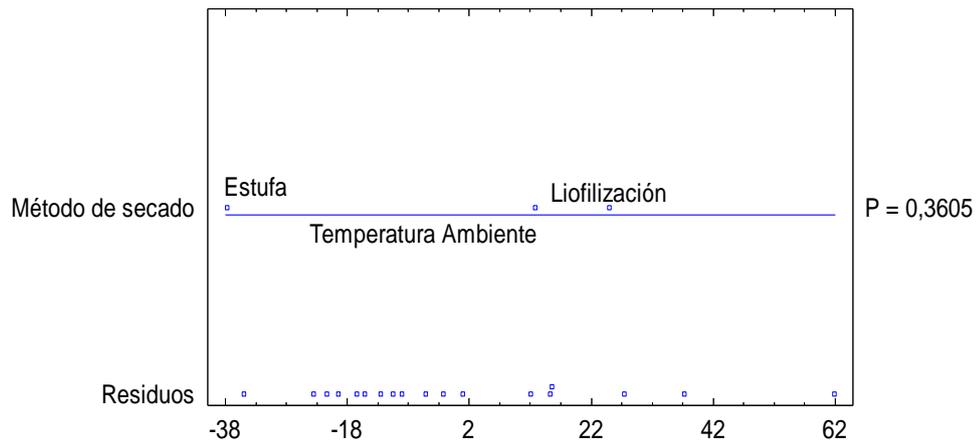
## ANEXO 10

**Gráfico ANOVA para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS**



## ANEXO 11

**Gráfico ANOVA para la actividad captadora de radicales DPPH expresada como equivalentes de Trolox**



## ANEXO 12

**Gráfico ANOVA para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS expresada como equivalentes de Trolox**

