



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA BLANQUEAMIENTO DEL
BETACAROTENO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS LIPOFÍLICOS: PLANTAS MEDICINALES, FRUTOS Y MICROALGAS”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

CLAUDIA DANIELA LEÓN GARCÍA

CI: 0107162067

PETER XAVIER REYES ZAQUINAULA

CI: 0105435325

DIRECTORA:

DRA. NANCY MIRIAM CUZCO QUIZHPI MGST

CI: 0301624854

ASESOR:

DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PHD

CI: 0102311610

CUENCA - ECUADOR

2017



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

El presente estudio pretendió estandarizar la técnica de blanqueamiento de betacaroteno, la cual se utilizó para evaluar la actividad antioxidante de compuestos lipofílicos, la variable introducida fue la utilización de dos tensioactivos diferentes (Tween 20 y Tween 80), dando como resultado de la estandarización que el tensioactivo fue el Tween 20 por las diferencias estadísticamente significativas en la actividad antioxidante con respecto al Tween 80, además de que indicó reproducibilidad y repetitividad de los resultados debido a su menor variabilidad entre una absorbancia y otra en un mismo extracto; la técnica se aplicó a un antioxidante puro (BHT) utilizado como patrón o estándar conocido y tres extractos de vegetales almacenados en el laboratorio de Fitoquímica del Proyecto de Plantas Medicinales VLIR-IUC, la cual tuvo como finalidad aportar una herramienta útil para su aplicación en el campo investigativo. En este estudio se incluyó la determinación de la actividad antioxidante y del IC50 de extractos frescos y almacenados de los siguientes vegetales: pimiento rojo (*Capsicum annum*), zanahoria (*Daucus carota*), hierba del infante (*Desmodium molliculum*), carne humana (*Jungia rugosa*) y microalgas como: microalga verde (*Scenedesmus sp*), microalga naranja (sin identificar género y especie). Se incluyó también la cuantificación de carotenoides totales de estas muestras y la relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de carotenoides, que dio como resultado que tanto la actividad antioxidante expresada como IC50(mg / mL) y contenido de carotenoides totales en este estudio mostraron el siguiente orden pimiento rojo > zanahoria > hierba del infante > carne humana, microalga naranja > microalga verde; se comprobó además que el contenido de carotenoides presentó una relación positiva con respecto a la actividad antioxidante de cada extracto lipofílico.

PALABRAS CLAVES: actividad antioxidante, blanqueamiento, betacaroteno, carotenoides.

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula

Página II



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABSTRACT

The present study aimed to standardize the beta carotene bleaching assay, which to be used to evaluate the antioxidant activity of lipophilic compounds, the variable to was analyzed was the use of two different surfactants (Tween 20 and Tween 80). The standardization shown that the ideal surfactant is Tween 20. The technique was applied to an antioxidant (BHT), used as a standard and three vegetable extracts stored in the laboratory of Phytochemistry of the VLIR-IUC Medicinal Plants Project. This research aimed to provide a useful tool on the standardization of carotene blanching technique for its application in the field of research. This study included the determination of the antioxidant activity and the IC50 of fresh and stored extracts of the following vegetables: red pepper (*Capsicum annum*), carrot (*Daucus carota*), infant grass (*Desmodium molliculum*), human flesh (*Jungia rugosa*) and microalgae such as green microalgae (*Scenedesmus sp*), orange algae (without identifying genus and species). We also included quantification of total carotenoids of these samples and analyzed the relationship between antioxidant activity and total carotenoid content, resulting that red pepper has the highest carotenoid content followed by carrot, infant herb, Human flesh, orange microalgae and green microalgae.

KEYWORDS: antioxidant activity, bleaching, beta carotene, carotenoids.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
PALABRAS CLAVES.....	II
ABSTRACT	III
KEYWORDS	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
AGRADECIMIENTO	XIV
DEDICATORIA	XV
DEDICATORIA	XVI
INTRODUCCIÓN.....	XVII
Objetivo General:.....	XIX
Objetivos específicos:.....	XIX
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 ANTIOXIDANTES	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.2 ESTRÉS OXIDATIVO	3
1.2.1 RADICALES LIBRES.....	4
1.2.2 ESPECIES REACTIVAS.....	5
1.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	9
1.3.1 BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO	11
1.4 CAROTENOIDES.....	14
1.4.1 PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CAROTENOIDES.....	14
1.4.2 ESTRUCTURA DE LOS CAROTENOIDES.....	15
1.4.3 PROPIEDADES DE LOS CAROTENOIDES.....	16
1.4.4 FUNCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	18
1.4.5 CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES	19
1.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VEGETALES, PLANTAS Y MICROALGAS ANALIZADAS.....	20
1.5.1 PIMIENTO ROJO (<i>Capsicum annum</i>)	20
1.5.2 ZANAHORIA (<i>Daucus carota</i>).....	21



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.3 HIERBA DEL INFANTE (Desmodium molliculum)	22
1.5.4 CARNE HUMANA (Jungia rugosa)	22
1.5.5 MICROALGAS	23
CAPÍTULO II	25
2. METODOLOGÍA	25
2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	25
2.2 LOCALIZACIÓN.....	25
2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS	25
2.3.1 MATERIA PRIMA	25
2.3.2 MATERIALES Y REACTIVOS	26
2.3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	26
2.3.3.1 Recolección.....	26
2.3.3.2 Lavado	27
2.3.3.3 Desección	28
2.3.3.4 Extracción.....	28
2.3.3.5 Concentración de los Extractos.	29
2.3.3.8 Extracción de Microalgas.....	29
2.3.3.7 Determinación de la Actividad Antioxidante.	30
2.3.3.8 Cuantificación de Carotenoides Totales.....	34
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
2.4.1 Análisis de varianza (ANOVA)	36
2.4.2 Prueba t de Student	37
CAPITULO III	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA BLANQUEAMIENTO DE β -CAROTENO.	38
3.1.1 Resultados de Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y Estándar BHT para la Estandarización de la Técnica.	38
3.1.2 Prueba T de Student de la Actividad Antioxidante mediante la Técnica de BBC con Tween 20 y Tween 80.	41
3.1.3 Análisis de Varianza ANOVA de dos vías para la Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y BHT usando Tween 20 o Tween 80.	43
3.1.4 Comparación de las Varianzas Agrupadas Considerando la Medidas Espectrofotométricas de cada Extracto con el uso de Tween 20 o Tween 80.....	44
3.1.5 Comparación de la Actividad Antioxidante del Estándar BHT con respecto a la Actividad Antioxidante determinada por un estudio de referencia.	45



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA BLANQUEAMIENTO DE B - CAROTENO ESTANDARIZADA EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS DE DIFERENTE FUENTE.....	49
3.2.1 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Almacenados y Frescos.....	49
3.3 CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS.....	52
3.3.1 Carotenoides Totales Presentes en los Extractos Almacenados y Frescos.	52
3.3.2 Análisis de Varianza ANOVA de dos Vías para el Contenido de Carotenoides Totales con Clorofila B y sin Clorofila B.....	54
3.3.3 Relación entre el Contenido de Carotenoides y la Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos.....	57
CAPITULO IV.....	60
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	60
4.1 CONCLUSIONES.....	60
4.2 RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	67
Anexo A: Preparación de las Soluciones Estándar de BHT.....	67
Anexo B: Diluciones de las Fases Etéreas en la Cuantificación de Carotenoides. ...	68
Anexo C: Datos y Cálculo de la Actividad Antioxidante del Estándar BHT y Extractos Lipofílicos en la Estandarización de la Técnica de Blanqueamiento del Betacaroteno con el Uso de Tween 20 o Tween 80.....	69
Anexo D Gráficas para el Cálculo del IC50 de BHT y Extractos Lipofílicos Almacenados y Frescos.....	79



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mecanismo de reacción de enzimas antioxidantes.....	8
Figura 1.2 Mecanismos de Actividad Antioxidante de los ensayos HAT y ET.....	11
Figura 1.3 Estructura química de carotenoides encontrados comúnmente en alimentos.....	16
Figura 1.4 Espectro de absorción ultravioleta/visible general para los carotenoides.....	17
Figura 2.1 Recolección en “El Cajas”.....	27
Figura 2.2 Recolección en Jadán.....	27
Figura 2.3 Emulsión de β - caroteno, Ácido Linoleico.....	31
Figura 2.4 A) Fase etérea 1 y 2; B) Fase metanólica; C) Diluciones de la Fase etérea.....	36
Figura 3.1 Curvas absorbancias vs concentración BHT (Tween 20 – Tween 80).....	41
Figura 3.2 Curvas absorbancias vs concentración VG 1 (Tween 20 – Tween 80).....	41
Figura 3.3 Curvas absorbancias vs concentración VG 3 (Tween 20 – Tween 80).....	42
Figura 3.4 Curvas absorbancias vs concentración Wilches 100 (Tween 20 – Tween 80).....	42
Figura 3.5 Relación %AA BHT Tween 20 Experimental vs %AA Referencia.....	48
Figura 3.6 Gráfica %AA Tween 80 vs Concentración BHT.....	49
Figura 3.7 Gráfica %AA Tween 80 vs LN Concentración de BHT.....	49
Figura 3.8 Interacción entre el Contenido de Carotenoides de Extractos lipofílicos según los Proceso de Cuantificación.....	57
Figura 3.9 Contenido de Carotenoides de Extractos lipofílicos en el Proceso 1 vs Proceso 2.....	58
Figura 3.10 Curva %AA vs Carotenoides Totales Extractos Almacenados.....	59
Figura 3.11 Curva %AA vs Carotenoides Totales Extractos Frescos.....	59



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de los antioxidantes.....	2
Tabla 1.2 Sitios y mecanismos de acción de algunos antioxidantes de origen natural..	2
Tabla 1.3 Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.....	7
Tabla 1.4. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT.....	9
Tabla 1.5 Carotenos y xantofilas comunes en frutas y verduras.....	14
Tabla 1.6 Propiedades benéficas de los carotenoides.....	19
Tabla 2.1. Extractos almacenados en el Laboratorio de Fitoquímica, Proyecto VLIR.	25
Tabla 2.2. Extractos frescos obtenidos mediante solvente lipofílico (DCM).....	25
Tabla 2.3. Concentración de las disoluciones de los extractos y BHT.....	32
Tabla 2.4. Distribución de la emulsión de B- Caroteno, Extractos y Controles.....	32
Tabla 2.5. Concentración de las disoluciones de los extractos lipofílicos y BHT.....	34
Tabla 3.1 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y BHT en la Estandarización de la Técnica.....	40
Tabla 3.2 Prueba t de student entre el %AA con Tween 20 o Tween 80.....	43
Tabla 3.3 Análisis de Varianza ANOVA para los %AA de extractos lipofílicos.....	44
Tabla 3.4 Cálculo de Varianza Agrupada para BHT y extractos lipofílicos.....	46
Tabla 3.5 Comparación %AA de BHT con un estudio de referencia.....	47
Tabla 3.6 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Almacenados.....	51
Tabla 3.7 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Frescos.....	52
Tabla 3.8 Carotenoides Totales en extractos lipofílicos almacenados.....	54
Tabla 3.9 Carotenoides Totales en extractos lipofílicos frescos.....	54
Tabla 3.10 ANOVA de Carotenoides Totales.....	56
Tabla 3.11 Regresión %AA vs Contenido de Carotenoides de extractos lipofílicos....	60



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABREVIATURAS

%AA	Porcentaje de Actividad Antioxidante
BBC	Blanqueamiento de β -caroteno
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
DCM	Diclorometano
rpm	Revoluciones por minuto
mL	Mililitros
mg	Miligramos
μ L	Microlitros
g	Gramos
ug / mL	Microgramos por mililitro
mg / mL	Miligramos por mililitro
Abs	Absorbancia
nm	Nanómetros
UV	Ultravioleta
h	Hora
Min	Minutos



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Claudia Daniela León García, autora del Trabajo de Titulación "Estandarización de la Técnica Blanqueamiento del Betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de mayo de 2017

Claudia Daniela León García

C.I: 0107162067



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Peter Xavier Reyes Zaquinaula, autor del Trabajo de Titulación “Estandarización de la Técnica Blanqueamiento del Betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas.”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 24 de mayo de 2017

Peter Xavier Reyes Zaquinaula

C.I: 010543532-5



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Claudia Daniela León García, autora del Trabajo de Titulación "Estandarización de la Técnica Blanqueamiento del Betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas.", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 24 de mayo de 2017

Claudia Daniela León García

C.I: 0107162067



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Peter Xavier Reyes Zaquinaula, autor del Trabajo de Titulación “Estandarización de la Técnica Blanqueamiento del Betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas.”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 24 de mayo de 2017

Peter Xavier Reyes Zaquinaula

C.I: 010543532-5



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTO

Una de las etapas más importantes de nuestra vida está por culminar, y como futuros profesionales es importante reconocer y dar las gracias a aquellas personas que fueron soporte en nuestra formación académica.

A nuestras familias, por su comprensión, y apoyo durante toda nuestra formación universitaria, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

De manera especial queremos agradecer a nuestra tutora de tesis, Dra. Nancy Cuzco y asesor Dr. Fabián León, quienes con su esfuerzo y dedicación supieron guiarnos durante la realización de este proyecto; les agradecemos por compartir sus conocimientos y estar pendiente del avance de este proyecto hasta culminar con éxito este trabajo de investigación.

A la Dra. Isabel Wilches por permitirnos hacer uso de los laboratorios del proyecto VLIR, importantes para llevar a cabo el presente trabajo. A Bqf. Diana Morales por su voluntad y confianza en nosotros depositada para que este trabajo llegue a buen término.

Queremos extender nuestro agradecimiento al Ing. Vladimiro Tobar, quien amablemente nos colaboró con el análisis estadístico de nuestra tesis.

También agradecemos a todos los que ayudaron de alguna manera para que pueda cumplir esta meta.

Daniela y Peter.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

A:

Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por todo lo vivido y por haber puesto en mi camino a las personas correctas que han sido mi soporte y compañía durante esta etapa de mi vida.

Mis padres: Jorge y Mercedes, por su amor y sus consejos, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y sobre todo por su apoyo incondicional mostrado para salir adelante.

Mi hermana Alba, por su cariño y atención en todos estos años principalmente al ser como una segunda madre para mí.

Mi mejor amiga Lorena, por ser mi confidente y compañía en todas las aventuras vividas, y por qué no por estos grandiosos 19 años de amistad.

Mis compañeros y amigos al mismo tiempo por las experiencias vividas ya que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional.

Todos aquellos familiares, amigos y profesores que de alguna manera con su apoyo y palabras de aliento contribuyeron a la realización y cumplimiento de esta meta tan importante en mi vida.

Daniela León García.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

Esta meta cumplida la dedico a mi familia ya que gracias a su apoyo incondicional pude concluir mi carrera.

A mi Padre por su comprensión y tolerancia, ya que, sin su sacrificio, esfuerzo y ayuda no lo habría logrado.

A mi Madre por ser la mejor, que gracias a su gran corazón que me ha acompañado durante toda mi vida dándome aliento y fuerza para culminar todas las metas que me proponga y hace de mí una mejor persona todos los días.

A mis hermanas por brindarme su tiempo, cariño y soportarme con todos mis defectos todo este tiempo.

A toda mi familia por mantenerse expectantes, orgullosos y positivos junto a mí.

A mis amigos por todas y cada una de las experiencias que hemos vivido que nos hacen crecer día tras día.

Peter X. Reyes Z



UNIVERSIDAD DE CUENCA

INTRODUCCIÓN

Actualmente es bien conocido el efecto negativo que ejercen los radicales libres como generadores de estrés oxidativo asociado a la patogénesis de varias enfermedades degenerativas y envejecimiento en el ser humano; de ahí la importancia de la investigación de las propiedades antioxidantes de diversas moléculas, las cuales mitigan la oxidación provocada por especies reactivas además de contribuir a la prevención de desórdenes asociados al daño oxidativo (**Magalhaes, Segundo, Reis, & Lima, 2008**).

Es de gran interés el conocimiento de la capacidad antioxidante de los constituyentes de las plantas y alimentos que consumimos, entre ellos compuestos polifenólicos, vitaminas E y C, y carotenoides; por ello existen diferentes métodos in vitro para la cuantificación de la efectividad antioxidante ante el efecto oxidativo de los radicales libres (**Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010**).

La técnica del “Blanqueamiento del β -caroteno” está descrita en la literatura, como una de las opciones al momento de evaluar el poder antioxidante presente en extractos de naturaleza lipofílica. Dicha acción, se fundamenta principalmente a la presencia de moléculas de tipo terpenoide como son los carotenoides y sustancias relacionadas, estas moléculas de naturaleza lipofílica se caracterizan por tener un sistema extenso de dobles enlaces conjugados en su estructura, los cuales son responsables de las propiedades antioxidantes. Los carotenoides al actuar como agentes antioxidantes protegen los sistemas biológicos del daño oxidativo mediado por el oxígeno singlete y radicales peroxilo por su capacidad de barrido e inhibición de formación de radicales libres (**Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010**). Luego de una revisión extensa de la literatura existente, se observó que las técnicas descritas varían en algunos parámetros físico-químicos o variables tales como: uso de reactivos, tiempos de incubación, temperatura, pH, solventes para redissolver extractos y concentración de reactivos a utilizar. Por lo cual en el presente estudio se dispone a unificar dichos criterios y realizar la estandarización de la técnica para así convertirse en una herramienta útil para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes de naturaleza lipofílica.

La aplicación de la técnica se basa en la formación de una emulsión aceite en agua O/A de betacaroteno y ácido linoleico. Las emulsiones están formadas por dos fases no miscibles entre sí, de las que una presenta carácter hidrófilo y la otra lipófilo. En el



UNIVERSIDAD DE CUENCA

caso de la emulsión a preparar el ácido linoleico y el betacaroteno forman la fase lipófila mientras que el agua saturada con oxígeno la fase hidrófila, además que para conseguir la estabilidad de la emulsión se utiliza un tensioactivo en este caso Tween 20 o Tween 80. Los tensioactivos se caracterizan por ser moléculas anfifílicas (poseen una parte hidrófila o polar y otra lipófila o no polar) que los hace afines por ambas fases de la emulsión, cuando se adiciona el tensioactivo a la emulsión sus moléculas se ordenan de tal forma que la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa y la parte lipófila hacia el aire o la fase oleosa de la emulsión, ejerciendo su acción emulgente, resultando así la disminución de la tensión superficial e interfacial existentes entre las fases de la emulsión. De esta forma se mitiga el antagonismo entre el agua y el aceite facilitando la estabilidad de la emulsión (**Faulli Trillo, 1993**).

Para el desarrollo de la técnica uno de los principales inconvenientes es lograr la estabilidad de la emulsión O/A de betacaroteno y ácido linoleico que depende de factores internos como el uso del tensioactivo: Tween 20 o Tween 80, a más de ello la estabilidad puede estar afectada por agentes externos como: la luz, tiempo de preparación de la emulsión, temperatura ambiente, los cuales afectan al betacaroteno presente en la emulsión decolorándolo por fotooxidación, influyendo de manera directa en las lecturas espectrofotométricas útiles para la evaluación de la actividad antioxidante. De ahí la importancia de mantener el control de los agentes que afectan la estabilidad de la emulsión para una aplicación correcta de la técnica en diferentes extractos lipofílicos y por lo mismo la obtención de resultados confiables y reproducibles.

Una vez estandarizada la técnica, con este estudio se pretende aplicarla en extractos lipofílicos de distinta fuente: plantas, frutos y microalgas; lo cual proveerá información de las propiedades antioxidantes de las moléculas presentes en los extractos de las muestras; plantas medicinales (compuestos fenólicos, alcaloides, derivados de la clorofila, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides), frutos (carotenoides: capsantina, capsorubina, criptoxantina, betacaroteno, violaxantina y licopeno) y microalgas (betacaroteno, astaxantina, zeaxantina, Vitamina E, polifenoles). Además, se propone la valoración de la concentración de carotenoides totales presentes en los extractos vegetales, lo cual permitirá comprobar si las muestras analizadas son una fuente significativa de antioxidantes naturales, de gran importancia en la actualidad debido a que ejercen su acción biológica mediante la prevención del estrés oxidativo asociado a diferentes patologías de alta incidencia en el hombre (**Prakash, Rigelhof & Miller, 2000**).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las hipótesis planteadas para este estudio fueron:

- Existe diferencia significativa en los resultados de actividad antioxidante provenientes de la técnica de blanqueamiento de betacaroteno usando el tensioactivo Tween 20 en comparación con el tensioactivo Tween 80.
- Hay una relación entre el contenido de carotenoides y el efecto antioxidante evaluado.

Se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Estandarizar la técnica de Blanqueamiento del Betacaroteno para evaluar la actividad antioxidante de extractos lipofílicos (plantas medicinales, frutos y microalgas).

Objetivos específicos:

- Evaluar la actividad antioxidante del patrón BHT con la técnica a estandarizar mediante la comparación de los resultados utilizando diferentes tensioactivos (Tween 20 o Tween 80).
- Aplicar la técnica estandarizada para la determinación de la actividad antioxidante en plantas medicinales: Hierba del infante (*Desmodium molliculum*), Carne humana (*Jungia rugosa*). Vegetales: Pimiento Rojo (*Capsicum annuum*), Zanahoria (*Daucus carota*). Microalgas: *Scenedesmus sp*, Microalga naranja (por identificar género y especie).
- Cuantificar los carotenoides presentes en las muestras por analizar y establecer una relación con la actividad antioxidante de las mismas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTIOXIDANTES

1.1.1 Generalidades

Las diferentes especies del reino vegetal poseen distintos compuestos bioactivos, entre los que destacan los antioxidantes, compuestos de distinta naturaleza química, que incluyen a las vitaminas C y E, polifenoles, carotenoides y terpenoides, entre otros. Estos compuestos se han relacionado con la prevención de distintos procesos crónicos, como la enfermedad cardiovascular, algunos desórdenes neurológicos y ciertos procesos inflamatorios (**Benabdallah, Aissi & Messaoud, 2016**).

Los antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de impedir o retardar la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la iniciación y propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se clasifican por su naturaleza en sintéticos y naturales. Los sintéticos son compuestos que tienen estructuras fenólicas con varios grupos de sustitución alquílica, los naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides como el betacaroteno. (**Muñoz & Gutiérrez, 2008**).

Un antioxidante se puede definir como una sustancia natural o artificial con la capacidad de neutralizar y proteger a un sistema biológico frente a radicales libres como: radicales de oxígeno, de nitrógeno y lipídicos (**Calín & Carbonell, 2003**).

Los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción: 1) impiden la formación de radicales libres y/o especies reactivas (sistemas de prevención), 2) inhiben la acción de los radicales libres (sistema barredor) y 3) favorecen a la reparación y reconstrucción de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación). Cada antioxidante posee una afinidad a un determinado o varios radicales libres, pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia de la oxidación y tener más de un mecanismo de acción, es necesario también la adición al organismo de ciertos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

oligoelementos como el cobre, hierro, zinc, selenio y manganeso, ya que forman parte vital del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (**Criado & Moya, 2009**).

Los antioxidantes también se pueden clasificar en Endógenos: sintetizados por la propia célula y Exógenos: ingresan al organismo por medio de la dieta o de suplementos con formulaciones que incluyen antioxidantes. En la **tabla 1.1** se observan la clasificación de los antioxidantes.

Tabla 1.1. Clasificación de los antioxidantes (Criado & Moya, 2009).

EXÓGENOS	ENDÓGENOS	COFACTORES
Vitamina C	Glutación	Cobre
Vitamina E	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido Tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas: Superóxidodismutasa (SOD), Catalasa, Glutación peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

Los compuestos conocidos como antioxidantes que se encuentran en frutas y vegetales, como la vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos, son químicamente diversos y se encuentran en diferentes partes de las plantas y células; pueden diferir en tamaño, solubilidad y susceptibilidad a la oxidación. También, poseen un mecanismo de acción diferente para lograr su efecto antioxidante en el organismo como se muestra en la **tabla 1.2**.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 1.2 Sitios y mecanismos de acción de algunos antioxidantes de origen natural. (Prakash, Rigelhof & Miller, 2000).

Grupo Antioxidante	Mecanismo Antioxidante	Sitios de Acción
Vitamina C	Donación directa de electrones. Reducción enzimática. Neutraliza especies reactivas de oxígeno.	Grupos OH vecinales
Carotenoides	Donación de electrones. Neutralización de especies reactivas de oxígeno.	Dobles enlaces conjugados
Polifenoles	Donación de electrones. Quelación de iones metálicos. Ahorro de Ácido ascórbico. Neutralización de especies reactivas de oxígeno.	Grupos OH vecinales Dobles enlaces conjugados

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno se encuentra de manera normal en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace (p) antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se puede producir una serie de especies químicas o sustancias pro-oxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) capaces de desencadenar múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo que llegan a producir daño celular; se comprende que, si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, se deben tener presentes los efectos tóxicos que posee (Venereo, 2002).

El estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura de la homeostasis que debe existir entre factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación, estructura y función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular; asociado a la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de síndromes de interés médico social (Venereo, 2002).



1.2.1 RADICALES LIBRES

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todos aquellos compuestos químicos, cargados o no, que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial que genera gran inestabilidad; por tanto, si hay electrones no apareados en un orbital, se generan especies moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (*Magalhaes, Segundo, Reis, & Lima, 2008*).

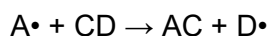
Poseen una estructura bi-radicalica, son altamente reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio en que se formaron y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular oxidativo al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (*Venereo, 2002*).

Las reacciones bioquímicas para la producción de radicales libres se clasifican en tres grupos:

1. Reacciones de iniciación: formación de un radical libre a partir de moléculas no radicales.



2. Reacciones de propagación: consisten en la formación de un radical libre a partir de la reacción entre una molécula estable y un radical libre.



3. Reacciones de terminación: reacción química entre dos radicales libres, en la cual sus electrones desapareados son cancelados y se genera una molécula estable. (*Corrales & Muñoz, 2012*)





UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.2.2 ESPECIES REACTIVAS

Las especies reactivas son moléculas radicales y otras no radicales libres, las cuales poseen capacidad oxidante y fácilmente pueden convertirse en radicales libres siendo compuestos que provocan daño celular. Entre las especies reactivas tenemos las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de hierro (RIS), las especies reactivas de cobre (RCS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS).

1.2.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los radicales libres del oxígeno tienen las funciones fisiológicas en el organismo de participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno, y la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis (**Venereo, 2002**).

Entre las principales ROS destacan:

Radicales: ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), alcoxilo (RO), peroxilo ($ROO\bullet$) y óxido de nitrógeno ($NO\bullet$)

No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($\bullet O_2$) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (**Martínez, 2007**)

Las ROS tienen un origen tanto endógeno, como exógeno. Entre las fuentes endógenas destacan:

1. La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las ROS.
2. Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente al ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).
3. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa y ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de esta producción.

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

Ambientales. Radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Farmacológicas. Xenobióticos, drogas, etc. (*Guzmán, Velásquez & Sierra, 2006*).

1.2.2.1 Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

Entre las principales RNS destacan:

Radicales: óxido de nitrógeno ($\text{NO}\bullet$)

No radicales: peroxinitrito (ONOO^-).

El óxido nitroso es un radical libre formado de manera enzimática a partir de un aminoácido (L-arginina). El óxido nitroso produce efectos fisiológicos y patológicos, los efectos fisiológicos se producen cuando se produce el óxido nitroso en bajas concentraciones por las óxido nítrico sintasas, los efectos patológicos se generan cuando el óxido nitroso se produce en elevadas concentraciones por la óxido nítrico sintasa inducible, esta producción elevada induce a la formación de varias especies reactivas de nitrógeno (ERON) y la disfunción mitocondrial, lo que se asocia a varias patologías como la diabetes mellitus, isquemia-reperfusión y múltiples procesos inflamatorios (*Guzmán, Velásquez & Sierra, 2006*).

1.2.3 EFECTO NOCIVO DE LOS RADICALES LIBRES

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

1. Lípidos. Es aquí donde se producen el daño mayor por medio de la peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular, se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo; los mismos que sustraen un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular.
2. Proteínas. Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos; lo cual produce inactivación y desnaturalización.

3. Acido desoxirribonucleico (ADN). Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, reordenamiento cromosómico y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes.

El daño se produce por inactivación o pérdida de algunos genes supresores de tumores (modificados por un cambio en una base crítica de la secuencia del ADN), lo que puede conducir a la iniciación o progresión de la carcinogénesis.

1.2.4 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Un sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este, como se muestra en la **Tabla 1.3**. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular).

Tabla 1.3 Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción (Martínez, 2007).

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
GHS	Ubiquinol – 10	Lactoferrinas
Proteínas que ligan metales		Haptoglobinas
Sistemas proteolíticos		Vitamina C
Vitamina C		Vitamina E



UNIVERSIDAD DE CUENCA

De entre ellos, los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingesta de alimentos que los contengan (*Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010*).

1.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante no se mide directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado; por tal motivo para la medición de la actividad antioxidante se puede valorar mediante la formación de productos intermedios o finales por la reacción entre el oxidante (radicales libres) y el antioxidante.

Es así que varios ensayos químicos in vitro se han desarrollado para medir la capacidad antioxidante de diversos componentes de productos vegetales que, basándose en el mecanismo de reacción, los ensayos que miden la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías; los ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y los Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (*Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010*). La clasificación se muestra en la **tabla 1.4**

Tabla 1.4. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT (*Huang, Ou, & Prior, 2005*).

CATEGORIA	ENSAYO
Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)
	Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)
	Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)
	Blanqueamiento del β -caroteno.
	Inhibición de la oxidación de ácido linoleico.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)	Capacidad antioxidante de equivalentes Trolox (TEAC, ABTS)
	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)
	Poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)
	Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)
	Compuestos fenólicos totales por el Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos.

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran generalmente una reacción redox que involucra dos componentes el oxidante y el antioxidante; en la cual el oxidante resulta como un indicador del punto final de reacción. Generalmente el cambio de color en el oxidante ocurre cuando este remueve un electrón del antioxidante; indicando que el grado de cambio de color es proporcional a la concentración de antioxidantes en la reacción. **(Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010)**.

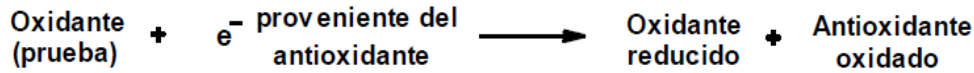
La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos por un generador de radical libre, una molécula oxidable y un antioxidante. Dado que la transferencia de átomos de hidrógeno es un paso clave en la cadena radical, los métodos basados en HAT son más relevantes para medir la capacidad de antioxidante para romper la cadena de formación de radicales. **(Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010)**.

Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra **(Huang, Ou & Prior, 2005)**. En la **figura 1.2** se muestran las reacciones específicas para los ensayos basados en la transferencia de electrones y en la transferencia de átomos de hidrógeno **(Magalhaes, Segundo, Reis, & Lima, 2008)**.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ensayos ET



Ensayos HAT

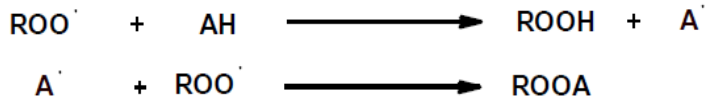


Figura 1.2 Mecanismos de Actividad Antioxidante de los ensayos HAT y ET (Huang, Ou, & Prior, 2005).

1.3.1 BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO

El ensayo de blanqueamiento del β -caroteno es uno de los métodos más antiguo y continuamente aplicado para estimar la actividad antioxidante de los compuestos lipófilos (Dawidowicz, & Olszowy, 2010). El ensayo de blanqueamiento del β -caroteno fue descrito por primera vez por Marco (1968) y modificado por otros investigadores incluyendo Miller y Amarowicz et al. (Ndhala, Moyo, & Van Staden, 2010); mide la habilidad de un antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica (Lai, & Lim, 2011).

1.3.1.1 Fundamento

En el sistema (emulsión) agua, β -caroteno y ácido linoleico se promueve la formación de radicales libres peroxilos, debido a la oxidación del ácido linoleico inducida por el calor que blanquea el β -caroteno en la emulsión (Ndhala, Moyo, & Van Staden, 2010).

El mecanismo de reacción implica que los radicales libres del ácido graso formados por la sustracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metílenos atacan las moléculas de β -caroteno las cuales pierden sus dobles enlaces que les da la característica de su color anaranjado en estado reducido (Lai, & Lim, 2011); por tanto el blanqueo de carotenoides vía oxidación inducida por calor y la decoloración resultante puede ser inhibida o disminuida por los antioxidantes que donan átomos de hidrógeno para neutralizar radicales (Dawidowicz, & Olszowy, 2010).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La autooxidación del β -caroteno se logra mediante incubación en un baño de agua a 50°C , haciendo del control de la temperatura un factor crítico. La absorbancia de β -caroteno se mide a 470 nm. Los extractos de muestra se disuelven hasta una concentración conocida (**Ramazan, Pinar, & Havser, 2011**). Se prepara β -caroteno (2,0 mg / ml) en cloroformo en una botella de color marrón para evitar la fotooxidación. El exceso de cloroformo se evapora bajo vacío o con nitrógeno gaseoso dejando una capa delgada de β -caroteno a la que se añaden ácido linoleico y un tensioactivo (Tween 20, Tween 40 o Tween 80). A continuación se añade agua destilada saturada de oxígeno a la mezcla para dar una concentración final de β -caroteno de $40\ \mu\text{g} / \text{ml}$. La emulsión se transfiere a tubos de ensayo que contienen una concentración conocida de la muestra y antioxidante estándar (control positivo). Se usa una solución del tensioactivo, ácido linoleico como blanco. Como control negativo la emulsión formada con el solvente de redisolución del extracto.

El uso del tensioactivo en el ensayo difiere entre autores por ejemplo Marco (1968) utilizó Tween 20, Miller (1971) utilizó Tween 40 y Tae-Hun (2003) utilizó Tween 80. Los tensioactivos se utilizan en la técnica para obtener la estabilidad de la emulsión de β -caroteno; se caracterizan por ser moléculas anfifílicas que los hace afines por ambas fases de la emulsión, cuando se adiciona el tensioactivo a la emulsión sus moléculas se ordenan de tal forma que la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa y la parte lipófila hacia el aire o la fase oleosa de la emulsión, ejerciendo su acción emulgente, resultando así la disminución de la tensión superficial e interfacial existentes entre las fases de la emulsión.

El grado de estabilidad que proporciona un tensioactivo depende de la relación entre la porción lipófila e hidrófila del mismo, lo cual es expresado como por su índice HLB (Hydrophile-Lipophile-Balance). Mientras mayor es el índice HLB mayor es su hidrofilia y por lo tanto es más estable en la fase acuosa de la emulsión. Los tensioactivos utilizados para realizar la técnica son:

- Tween 20 (Polioxietilen-20-sorbitan-monolaurato) HLB = 16,7
- Tween 40 (Polioxietilen-20-sorbitan-monopalmitato) HLB = 15,6
- Tween 80 (Polioxietilen-20-sorbitan-monooleato) HLB = 15,0

Se pueden calcular varios parámetros como indicadores de la cinética de inhibición. La velocidad de degradación de β -caroteno se calcula utilizando la siguiente fórmula:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

$$DR \text{ (Degradation Rate)} = \ln (A_t = 0 / A_t = t) \times 1 / t$$

Donde $A_t = 0$ es la absorbancia de la emulsión a 0 min; Y $A_t = t$ es la absorbancia en el instante t.

Para determinar la actividad antioxidante (AA) de los extractos de muestra y expresada como porcentaje de inhibición de la tasa de blanqueo de β -caroteno utilizando la fórmula:

$$\% AA = (DR_{\text{control}} - DR_{\text{sample}}) / CR_{\text{control}} \times 100 \text{ (Veliglou, Mazza, Gao, Oomah, 1998).}$$

Una ventaja importante del método de blanqueo de carotenoides es su aplicabilidad en ambos lipófilos e hidrófilos. Otra ventaja es que el ensayo de blanqueo con carotenoides puede detectar la acción antioxidante o pro-oxidante de un compuesto bajo investigación.

1.4.1.2 Factores que afectan al desarrollo de la técnica

El ensayo del blanqueamiento del β -caroteno, un método común para evaluar la actividad antioxidante, ha sido extensamente criticado debido a su baja reproducibilidad y la complejidad e inestabilidad de sus reactivos. Además de la interferencia de diferentes factores como el pH, temperatura y solventes de redisolución del extracto (*Prieto, Rodríguez, Vásquez, & Murado, 2012*).

En la técnica del blanqueamiento del β -caroteno como ya se explicó anteriormente, la temperatura de incubación es un factor crítico, por lo cual se debe tener en cuenta las condiciones ambientales con las que se trabaja en el laboratorio, ya que aumentos de la temperatura ambiente podrían provocar una autooxidación prematura de la emulsión, así como, también se la debe proteger de la luz, ya que el β -caroteno es fotosensible, lo cual provocaría la decoloración de la emulsión dándonos lecturas de la absorbancia incorrectas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.4 CAROTENOIDES

Son pigmentos orgánicos (rojo, amarillo y naranja) mayormente distribuidos en la naturaleza, estos pigmentos son sintetizados por algas en los océanos, algunas clases de hongos (*Phycomyces*) y bacterias (*Flavobacterium miltivorum* y *Brevibacterium linens*). En las plantas superiores los carotenoides de los cloroplastos están enmascarados por los pigmentos de la clorofila dominante (**Burgos & Calderón, 2009**). Se estima que la producción anual en la Naturaleza es de 10^8 toneladas, y en la actualidad se conocen cerca de 700 carotenoides.

1.4.1 PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CAROTENOIDES.

Están muy difundidos en la naturaleza, se los encuentra en todo el reino vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (proporcionan color amarillo, naranja y rojo a la mayoría de frutos), en bacterias, algas y hongos. Los animales no son capaces de sintetizarlos por lo que los incorporan a través de la dieta.

Los carotenoides se localizan en las células vegetales en el interior de orgánulos especializados como son cloroplastos y cromoplastos; en los primeros acompañan a las clorofilas. En el caso de los frutos maduros, los carotenoides se acumulan en los plastoglobulos de los cromoplastos de forma masiva y es donde la diversidad estructural alcanza un mayor grado (**Minguez, Perez & Hornero, 2010**). Los principales ejemplos se presentan en la **tabla 1.5**

Hay varios factores que pueden afectar el contenido total de carotenoides en las plantas como: factores genéticos, estadíos de madurez del vegetal, la exposición a la luz, condiciones del cultivo, enfermedades del vegetal, el procesamiento y almacenamiento (**Burgos & Calderón, 2009**).

Tabla 1.5 Carotenos y xantofilas comunes en frutas y verduras (**Burgos & Calderón, 2009**).

Carotenoide	Presencia natural
Carotenos	
α - caroteno, β - caroteno, δ - caroteno, γ - caroteno, ϵ - caroteno, ζ - caroteno	Frutas y verduras, especialmente en zanahorias, papa dulce y frutos secos
Licopeno, neurosporeno	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>), sandía
Fitoflueno, fitoeno	Frutas ricas en carotenoides, flores y raíces (zanahorias)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Trans β -caroteno, trans luteína, 9-cis luteína, 90-cis luteína, 13-cis luteína, trans and cis luteína epóxido, neoluteína	Brócoli, espinaca
Todos los β -carotenos trans, lactucaxantina, trans luteína	Lechuga
Xantofilas	
Anteraxantina	Anteras y pétalos de flores amarillas; además frutas y verduras
Luteína más zeaxantina	Espinaca, brócoli, lechuga, maíz, coles de Bruselas
Bixina, norbixina	Semillas de <i>Bixa Orellana</i> (Achiote)
Capsantina, capsantina 5,6-epóxido, capsorubina	<i>Capsicum annuum</i> maduro (Chile pimiento)
Luteína, violaxantina, neoxantina, mutatoxantina (en menor cantidad)	Frutas verdes, verduras y flores
Zeaxantina, β -criptoxantina, α -criptoxantina, criptoxantina 5,6-epóxido	Semillas (maíz), flores y frutas: mango, papaya, maracuyá

1.4.2 ESTRUCTURA DE LOS CAROTENOIDES.

Estructuralmente hablando los carotenoides son los únicos tetraterpenos naturales, derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono, con dobles enlaces conjugados formados por hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, oxidación o alguna combinación de estos procesos (**Burgos & Calderón, 2009**).

Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica como licopeno, o poseer distintas estructuras cíclicas de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos, como β -caroteno. Dado el gran número de dobles enlaces de la cadena polienoica central, los carotenoides pueden existir en diversas conformaciones cis / trans, aunque la más estable y por tanto presente en la naturaleza es la conformación trans (**Minguez, Perez & Hornero, 2010**).

Los carotenoides se clasifican en:

- a) Carotenos: son estrictamente hidrocarburos, pueden ser ácidos o poseer un anillo de 5 a 6 carbonos unido a uno o ambos extremos de la molecular.
- b) Xantofilas: son oxigenados, forman un grupo de derivados que contienen grupos hidroxilo, epóxido, aldehído o cetona (**Figura 1.3**).

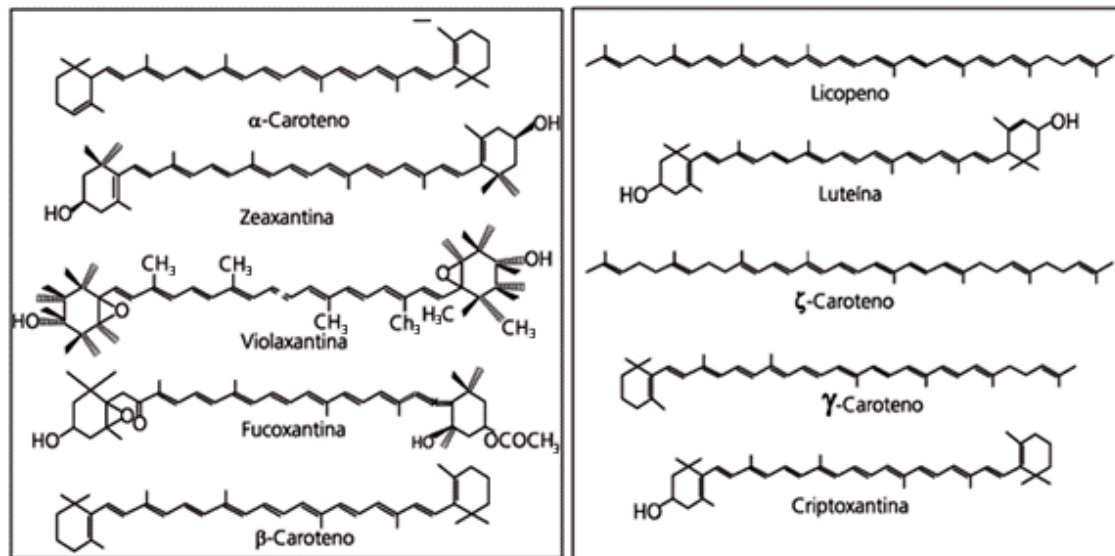


Figura 1.3 Estructura química de carotenoides encontrados comúnmente en alimentos (Minguez, Perez & Hornero, 2010)

1.4.3 PROPIEDADES DE LOS CAROTENOIDES.

1.4.3.1 Propiedades Físico-Químicas

Son solubles en solventes apolares y su grado de solubilidad dependerá de los sustituyentes de la molecular del carotenoide, los carotenos son más solubles en éter de petróleo y hexano, mientras que las xantofilas se solubilizan en etanol o metanol. La mayoría de los carotenoides son sensibles a la luz, oxígeno, calor, ácidos y peróxidos (Burgos & Calderón, 2009).

Estos pigmentos se oxidan fácilmente debido a sus numerosos dobles enlaces conjugados; en presencia de oxígeno, se produce una degradación oxidativa. Estas reacciones hacen que los alimentos pierdan el color de los carotenoides. La tasa de oxidación depende de la presión parcial de oxígeno, actividad del agua y temperatura. La lesión física de los tejidos o la extracción de los carotenoides aumenta la susceptibilidad a su oxidación, y mantenerlos en solventes orgánicos suele acelerar su descomposición.

Los enlaces dobles conjugados de los carotenoides existen en configuración *cis* – *trans*. Las reacciones de isomerización se inducen con facilidad por tratamientos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

térmicos, exposición a disolventes orgánicos, contacto con algunas superficies activas por un tiempo prolongado, tratamientos con ácidos, someter a iluminación sus disoluciones (**Burgos & Calderón, 2009**).

1.4.3.2 Propiedades Espectroscópicas.

La presencia del extenso sistema de dobles enlaces conjugados de la cadena polienoica de los carotenoides conforma un cromóforo (parte de la molécula responsable de la absorción de luz visible y por tanto del color del compuesto) cuya capacidad de absorción de luz da lugar a los llamativos y característicos colores de estos pigmentos (**Minguez, Perez & Hornero, 2010**).

El número de dobles enlaces conjugados y la presencia de diferentes grupos funcionales determinarán las características espectroscópicas propias de cada pigmento. Así los de menor cantidad de dobles enlaces son de tono amarillo y los de mayor son de tono rojo. El color del alimento dependerá del tipo de carotenoide que predomine en concentración y estado físico.

El espectro visible de los carotenoides va desde los 400nm hasta los 500nm, se observa en mayor cantidad alrededor de los 450nm y generalmente se aprecian dos máximos de absorción a cada lado (**Figura 1.4**) (**Burgos & Calderón, 2009**).

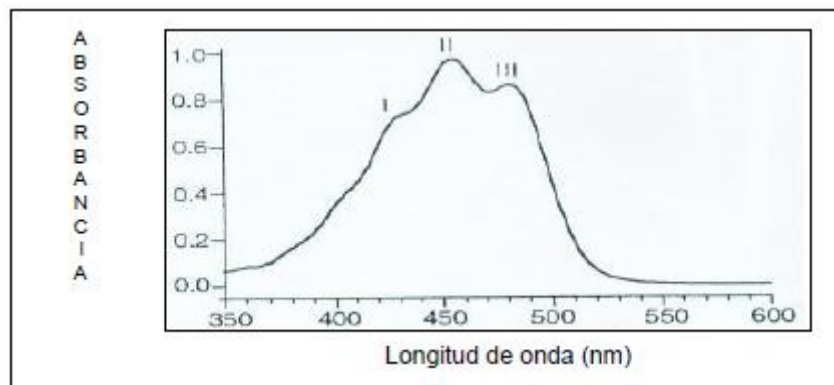


Figura 1.4 Espectro de absorción ultravioleta/visible general para los carotenoides (**Burgos & Calderón, 2009**).

La imagen del espectro de absorción de los carotenoides, su posición de máxima absorción, puede variar dependiendo de la interacción de estas moléculas con el solvente o el medio lipídico en el cual ha sido disuelto. En general, los solventes de baja polaridad poseen poco efecto sobre la posición de máxima absorción, por ello



UNIVERSIDAD DE CUENCA

para un determinado carotenoide, los valores de longitud máxima son casi idénticos en el hexano, petrolato líquido, dietil éter, metanol y etanol.

1.4.4 FUNCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

La principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos accesorios en la recolección de la luz durante el proceso fotosintético, y como sustancias fotoprotectoras, inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, por tanto, impidiendo la acción nociva de éstos a nivel celular.

En los animales presentan varias actividades biológicas muy importantes desde el punto de vista nutricional y fisiológico; debido a que no pueden sintetizar carotenoides de novo, aunque sí metabolizarlos a vitamina A (retinol), siempre y cuando reúnan los requisitos estructurales necesarios para ello, esto es, un anillo tipo β no sustituido. Aproximadamente un 10 % de los carotenoides cumplen esta configuración, siendo β -caroteno y β -criptoxanteno, los más representativos. La única fuente de estos precursores de retinol es la dieta, y en la mayoría de los casos son las frutas y vegetales los alimentos que principalmente aportan carotenoides con actividad de provitamínica a nuestra ingesta (*Minguez, Perez & Hornero, 2010*).

Además, nuestro organismo utiliza otra actividad de estos componentes, común a todos ellos: la capacidad antioxidante frente a radicales libres de muy diversa naturaleza y origen, integrando a los carotenoides en el complejo sistema de antioxidantes primarios junto a los tocoferoles y la vitamina C, entre los que existe un ciclo regenerativo que aumenta sinérgicamente la capacidad antioxidante. La actividad antioxidante de los carotenoides se debe a la gran afinidad para interactuar con el oxígeno molecular, estos fijan al oxígeno singlete y así protegen a las células de lesiones oxidativas.

Los carotenoides proveen además una serie de propiedades benéficas al ser humano, gracias a las funciones biológicas que cumplen como provitamina A y antioxidantes (**Tabla 1.6**)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 1.6 Propiedades benéficas de los carotenoides (Minguez, Perez & Hornero, 2010).

Carotenoides	Propiedades	Actividad Biológica
β -criptoxantina, licopeno y luteína/zeaxantina	Inhibición del cáncer	Regulan la proliferación anómala y el restablecimiento o la estimulación de la comunicación, ya que estimulan la expresión de un gen, conexin 43, que permite la comunicación intercelular.
β -caroteno, licopeno	Aumento de la inmunidad	Estimulan la comunicación intercelular del sistema inmunitario.
α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina	Prevención de enfermedades cardiovasculares	Evitar que las lipoproteínas LDL sufran un proceso de oxidación, previniendo así la formación de placas ateroscleróticas dentro de los vasos sanguíneos.
β -caroteno y β -criptoxantina	Disminución del riesgo de formación de cataratas	Actúan como provitamina A genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina.
Luteína y zeaxantina	Prevención de la degeneración macular	Reposición de los pigmentos luteína y zeaxantina naturales propios de la mácula de la retina.

1.4.5 CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

Los métodos clásicos para cuantificación de carotenoides son espectrofotométricos; por lo que en un extracto vegetal generalmente los carotenoides serán determinados en conjunto con clorofilas debido a que absorben la luz UV en similares longitudes de onda; de ahí la importancia de escoger un sistema de análisis adecuado para su determinación que a su vez dicho sistema dependerá de la muestra, la polaridad del solvente y el espectrómetro usado. Entonces la máxima absorción de la luz en el espectro de los pigmentos dependerá del sistema escogido; por ejemplo, los carotenoides amarillos aislados en dietil éter presentan su máxima absorción a tres longitudes de onda que comprenden en el rango espectral azul entre 400 y 500 nm. Por tanto, para el cálculo y cuantificación de carotenoides debe considerarse los coeficientes de absorción del solvente que producen cambios en los máximos de absorción de pigmentos en el espectro UV-visible y por tanto afectando las lecturas de absorbancia de la muestra (Biehler, Mayer, Hoffman, Krause, & Bohn, 2010).

En la técnica de determinación de carotenoides totales, se debe obtener extractos de las muestras a analizar utilizando como solvente la acetona previamente refrigerada, El extracto en acetona fría se coloca en un embudo de separación y se le añade éter



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de petróleo, se deja reposar para que el éter de petróleo remueva la acetona y solo arrastre los carotenoides. Se le coloca agua destilada y la mezcla se separa en dos fases, se deshecha la fase acuosa y la fase de éter de petróleo se lava cuatro veces con agua destilada para eliminar la acetona residual. Se recoge la fase etérea haciéndola pasar por un embudo pequeño que contiene sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual. El embudo de separación se lava con éter de petróleo. El contenido total de carotenoides se determina leyendo la absorbancia a 450 nm para β -caroteno y a 472 nm para licopeno (**Sahabi, Shehu, Saidu & Abdullahi, 2012**).

1.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VEGETALES, PLANTAS Y MICROALGAS ANALIZADAS.

1.5.1 PIMIENTO ROJO (*Capsicum annum*)

Fruto de la planta que pertenece a la familia de las Solanáceas que alcanza hasta 60cm de altura, su fruto es de color rojo, verde o amarillo. Contiene un porcentaje escaso de proteínas (0.89 %), hidratos de carbono (4.43 %) y grasa (0,19 %), por esta razón aportan tan solo con 27 kcal / 100 g. Contienen pequeñas cantidades de vitamina B, vitamina E y de todos los minerales, en su composición destacan lo siguiente:

- Provitamina A (β -caroteno): tiene aproximadamente 570 ug / 100 g, lo que significa que contiene más la mitad de la necesidad diaria de esta vitamina en un hombre adulto. Además, contiene licopeno, potente antioxidante que protege a las células de la degeneración cancerosa.
- Vitamina C y flavonoides que son potentes antioxidantes que actúan como antiinflamatorios y protectores del sistema circulatorio (**Pamplona, 2006**).

Estos frutos son usados en forma de concentrados, paprika, oleorresinas y como especias de colorantes alimenticios. Presentan una gran cantidad de carotenoides como: ceto-carotenoides, capsantina, capsorubina que son sintetizados durante la etapa de maduración del fruto, dándole así al mismo su coloración roja. El β -caroteno, zeaxantina, luteína y betacriptoxantina son pigmentos que proporcionan la coloración



UNIVERSIDAD DE CUENCA

amarillo-naranja. El estado de madurez y las condiciones de crecimiento son factores que afectan el contenido total de carotenoides. La temperatura, la iluminación y tiempo de secado son factores que pueden generar aumento o disminución de la concentración total de carotenoides. Al poseer una gran cantidad de carotenoides es de gran importancia su consumo debido al efecto antitumoral de los mismos, contribuyen de manera positiva con el sistema defensivo antioxidativo del organismo, también se ha encontrado actividad anticarcinogénica en los carotenoides y se los relaciona con el incremento de la comunicación intercelular (**Méndez, Gonzales & Gutiérrez, 2005**).

1.5.2 ZANAHORIA (*Daucus carota*)

Raíz de la planta perteneciente a la familia de las Umbelíferas que alcanza hasta 1 metro de altura, suelen ser de color anaranjado, aunque hay variedades de color amarillo.

La zanahoria es el alimento con mayor cantidad de provitamina A, contiene una pequeña porción de proteínas (1,03 %), grasas casi ausentes (0,19 %) y los hidratos de carbono son el 7,14 % de su peso, además de un alto contenido en fibra 2,9 %. Es una buena fuente de vitamina del grupo B, vitamina C, vitamina E, minerales y oligoelementos incluyendo al hierro, yodo y potasio.

Dentro de los carotenoides destaca el betacaroteno (6.628 μg / 100 g de porción comestible), el cual se convierte en vitamina A en nuestro organismo, este es imprescindible para el buen funcionamiento de la retina en especial en la visión nocturna o con poca luz, además favorecen al buen estado de la piel y las mucosas (**Pamplona, 2006**). Así también algunos estudios han atribuido al β -caroteno un papel preventivo frente a enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular senil, dada su capacidad antioxidante y moduladora de la respuesta inmunitaria.

En su composición le continúa el α -caroteno, cuyos niveles séricos se han relacionado inversamente con la presencia de enfermedad coronaria y formación de placa arterial; y cantidades traza de criptoxantina. En la zanahoria existen, además, otros carotenoides sin esta actividad, como la luteína (288 μg / 100 g de porción comestible). Ésta se localiza en retina y cristalino de ojo, pudiendo prevenir el daño oxidativo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

inducido por la luz y protegiendo, por tanto, frente al deterioro asociado a la edad (cataratas y degeneración macular senil) (*Moreiras & Col, 2013*).

1.5.3 HIERBA DEL INFANTE (*Desmodium molliculum*)

Planta que pertenece a la familia de las Fabaceae-papiloneaceae; planta oriunda del Perú y de crecimiento en la región andina, es conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antisépticas, diurética, y depuración sanguínea. (*Acero, Millones, Ticona & Torres, 2012*).

Esta planta presenta los siguientes principios activos: saponinas, flavonoides como astragalín, betafeniletildiamina, cosmosín, cyanidino-3-orthosphorósido, hordenina, pelargonidina-3-orto-ramnósido, tectorigenin, tetrahidroquinolinas y tiramina (*Oscanoa, 2005*).

De entre sus componentes químicos las saponinas han demostrado tener propiedades inmunomoduladoras a nivel de las células T cooperadoras y la supresión de las reacciones inmunes mediadas por IgE; además sus flavonoides le proveen propiedades antiinflamatorias mediante la reducción de la secreción de histamina e inhibición de la síntesis de leucotrienos (*Acero, Millones, Ticona & Torres, 2012*).

Posee un alto contenido en proteína y minerales como: azufre, calcio, cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, silicio, sodio, zinc. La fracción grasa está compuesta por: ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, gamamalinolénico, araquidónico (*Oscanoa, 2005*).

Esta planta tiene un gran contenido de taninos que tienen la habilidad para formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácido nucleicos, esteroides, alcaloides y saponina (*Oscanoa, 2005*).

1.5.4 CARNE HUMANA (*Jungia rugosa*)

Planta que pertenece a la familia de las Asteráceas conocidas por su actividad benéfica para la salud. Sus hojas están alternadas y cubiertas de vellosidades, con lóbulos muy marcados. El haz tiene una coloración verde intensa y de aspecto rugoso, el envés presenta en color verde pálido.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ha sido utilizada ancestralmente para curar lesiones en la piel gracias a su efecto antiinflamatorio y cicatrizante en la piel, también se usa para problemas gástricos y trastornos renales (**Campoverde & Verdugo, 2008**).

Los metabolitos primarios que contiene son: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, clorofila y ácidos nucleicos.

Los metabolitos secundarios que contiene son: compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles), cumarinas, terpenoides (o isoprenoides).

1.5.5 MICROALGAS

Son organismos microscópicos unicelulares o pluricelulares (2-200 μm), que pueden crecer de modo autótrofo o heterótrofo, contienen clorofila y otros pigmentos por lo que son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Forman parte de los microorganismos más antiguos del planeta, su clasificación se realiza en base a su estructura y en los diferentes pigmentos q poseen, las cuales son: cianofíceas, clorofíceas, criptofíceas, crisofíceas, diatomeas, dinofíceas, euglenofíceas y xantofíceas (**Pozo, 2010**).

Son altamente eficientes en la fijación del dióxido de carbono (CO_2) y en la utilización de energía solar para producir biomasa, con una eficacia hasta cuatro veces superior a la de las plantas. Su gran número de especies y su versatilidad ha permitido utilizarlas en la industria alimentaria, acuícola, farmacológica, cosmética y energética (**Cajamar, 2015**).

La composición de las microalgas es muy variable según la especie, sistema y condiciones de cultivo. En general, las cianobacterias tienen un contenido en lípidos de hasta un 20 %, mientras que las algas proclorofitas entre un 20-50 % en peso seco (**Andrade, Vera, Cárdenas & Morales, 2009**).

La biomasa de las microalgas está constituida generalmente por: proteínas carbohidratos (20-30 %), lípidos (10-30 %) y cenizas (5-10 %), porcentajes varían en función de las especies y las condiciones de cultivo (**Gómez, García, Garbalo & Vílchez, 2011**).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las microalgas tienen una composición bioquímica compleja debida a su capacidad fotosintética, que le da una gran riqueza en pigmentos y componentes como citocromos y ácidos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs). Esto resulta en un elevado contenido en productos de alto valor, como los carotenoides luteína y astaxantina o los PUFAs DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico). Como captadoras de CO₂ y asimiladoras del nitrógeno, son además una fuente sostenible de biocombustibles y biofertilizantes.

Las microalgas, debido a su vida fototrófica, están expuestas a estrés por oxígeno y radicales. Como resultado, las microalgas han desarrollado numerosos sistemas antioxidantes frente a radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Entre las moléculas con capacidad antioxidante más significativa cabe citar el β -caroteno, la astaxantina y la zeaxantina, vitamina E y otros antioxidantes polares que son compuestos como los flavonoides y ácidos fenólicos y cinámicos (**Gómez, García, Garbalo & Vílchez, 2011**).

1.5.5.1 Microalga *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus es uno de los géneros más comunes de microalgas de agua dulce, que comprende cientos de especies, y pertenece a la familia Scenedesmaceae; agrupa pequeñas algas verdes coloniales inmóviles, constituidas de células aisladas o en pareja en forma de placa aplanada. Posee una actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hace sobrevivir y ser un género común de aguas residuales (**Andrade, Vera, Cárdenas & Morales, 2009**).

Scenedesmus sp es una de entre muchas especies de microalgas que tienen alta capacidad de producir lípidos; según estudios y bajo condiciones de laboratorio esta microalga produce una gran cantidad de ácidos grasos con un valor de 22.29 mg / g peso seco, un contenido lipídico de 27,4 mg / g de peso seco y un 11.77 mg / g de ácido oleico en peso seco; razón por la cual se evidencia su potencialidad para la producción de biodiesel (**Prabakaran & Ravindran, 2012**).



CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio experimental de tipo correlacional.

2.2 LOCALIZACIÓN

Las actividades prácticas del presente estudio se realizaron en los laboratorios del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

2.3.1 MATERIA PRIMA

Para llevar a cabo este estudio se trabajó con extractos lipofílicos en diclorometano (DCM) de diferentes especies del reino vegetal (Plantas Medicinales, Vegetales, Microalgas); entre ellos 4 fueron extraídos y almacenados en meses y años anteriores a este estudio los cuales comprenden las siguientes especies:

Tabla 2.1. Extractos almacenados en el Laboratorio de Fitoquímica, Proyecto VLIR.

Código del Extracto	Nombre Científico	Nombre Común	Fecha de Extracción
PM 1	<i>Jungia rugosa</i>	Carne Humana	10/07/2014
PM 2	<i>Desmodium molliculum</i>	Hierba del Infante	22/01/2016
VG 1	<i>Capsicum annum</i>	Pimiento Rojo	20/10/2016
VG 3	<i>Capsicum annum</i>	Pimiento Verde	20/10/2016
MA 1	<i>Scenedesmus sp</i>	Microalga	27/11/2015

Además, se obtuvieron 6 extractos lipofílicos frescos de las siguientes especies:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 2.2. Extractos frescos obtenidos mediante solvente lipofílico (DCM).

Código del Extracto	Nombre Científico	Nombre Común	Fecha de Extracción
PM 1	<i>Jungia rugosa</i>	Carne Humana	19/12/2016
PM 2	<i>Desmodium molliculum</i>	Hierba del Infante	27/12/2016
VG 1	<i>Capsicum annum</i>	Pimiento Rojo	19/12/2016
VG 2	<i>Daucus carota</i>	Zanahoria	19/12/2016
MA 1	<i>Scenedesmus sp</i>	Microalga	20/12/2016
MA 2	Especie sin identificación	Microalga Naranja	20/12/2016

2.3.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Patrón Butil-hiroxi-tolueno, ácido linoleico, β -caroteno, Tween 20, Tween 80 marca Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Metanol grado análisis ACS,ISO,Reag. Ph Eur, Cloroformo grado análisis CAS 67-66-3, Diclorometano grado análisis CAS 75-09-2, Éter de Petróleo, Acetona grado análisis ACS,ISO,Reag. Ph Eur de marca Merck (Damstadt, Alemania).

El agua destilada se obtuvo en el destilador marca Fanem.

2.3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.3.1 Recolección

Una vez identificada la especie botánica de cada una de las muestras a analizar en la bibliografía correspondiente se procedió a la recolección manual procurando obtener una muestra representativa de cada una; cada especie se transportó en el menor tiempo posible en bolsas de papel rotuladas con: Nombre común y científico, fecha, hora y lugar de recolección.

Las plantas medicinales fueron recolectadas en el mismo lugar del cual se obtuvieron las anteriores muestras para los extractos almacenados en el laboratorio de Fitoquímica, según las coordenadas proporcionadas por el Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Para ello, se llevó a cabo la recolección de *Jungia rugosa* "Carne



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Humana” en las cercanías del Parque Nacional “El Cajas” en el camino hacia la Reserva Natural de Llaviucu (**figura 2.1**), cuyas coordenadas expresadas en UTM son: (17 706540; 9685407)

Desmodium molliculum “Hierba del Infante” fue recolectada al borde de la vía a Jadán, sector Vegaspamba (**figura 2.2**), con coordenadas UTM (17 737691; 9678215)



Figura 2.1 Recolección en “El Cajas”



Figura 2.2 Recolección en Jadán

Los vegetales Pimiento Rojo, *Capsicum annuum*, y Zanahoria, *Daucus carota*, fueron adquiridos y comprados en Supermaxi El Vergel de la ciudad de Cuenca y llevados al laboratorio para su posterior procesamiento.

La biomasa de las microalgas *Scenedesmus sp* y “Microalga naranja”, fue proporcionada por el Laboratorio de Microalgas del Proyecto VLIR.

2.3.3.2 Lavado

Una vez recolectada la droga vegetal se realizó primero en el caso de las plantas la selección de las hojas en buen estado, se procedió a su limpieza utilizando agua potable hasta eliminar los residuos de tierra o polvo que se encontraron en la superficie de la planta. Posterior a ellos se sumergió la droga vegetal en agua destilada por aproximadamente 10 minutos y se debió escurrir el exceso de agua colocando las hojas y vegetales sobre papel periódico etiquetado con el nombre y fecha de lavado respectivamente. El papel periódico debió colocarse sobre bandejas provistas de una malla de acero inoxidable montadas sobre un marco de madera, lo cual permitió una correcta aeración y escurrido de la droga vegetal.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.3.3 Deseccación

Previo a la desecación por liofilización la droga vegetal debió ser troceada o cortada en pequeñas porciones de entre 3 a 5 mm con la finalidad de distribuirla en los tubos de liofilización; se pesó y se colocó las muestras en proporciones iguales en cada tubo de 80 ml previamente pesados y rotulados, procurando que no sobrepase la marca de los 40ml señalados en el tubo.

Cada tubo se llevó a congelación a -80°C girando los tubos cada 5 minutos hasta obtener una capa uniforme alrededor de las paredes del tubo. Luego de 20 minutos se retiró el tapón del tubo y se cubrió con papel aluminio para dejarlo reposar en el congelador por aproximadamente 2 horas.

Finalmente se cargaron los tubos congelados en el liofilizador Labconco Free zone 2.5 (USA) previamente encendido y preparado a una temperatura de -52°C y presión de 0,090 mBar

Pasado el tiempo necesario entre 20 y 24 horas para la liofilización se retiraron las muestras y se almacenaron en fundas de papel especificando el código fecha de almacenamiento y peso final de la droga seca.

2.3.3.4 Extracción.

Se pesó una determinada cantidad de droga seca, se trituró y se colocó en un frasco de vidrio con tapa hermética previamente rotulado con el código peso y parte usada de la droga vegetal. Se humectó con el solvente de extracción en este caso se utilizó un solvente lipofílico como DCM y se dejó en humectación por un periodo de tiempo aproximado de 12 a 15 horas.

Posterior a ello se colocó en cada frasco una cantidad suficiente de solvente generalmente en una proporción 3:1 P/V con respecto a la cantidad de droga vegetal y se dejó en maceración y agitación continua por 3 días. Pasado este tiempo se filtró y se recogió el extracto en un balón fondo redondo y se almacenó para su posterior concentración. Nuevamente se adicionó a la droga solvente hasta haber cumplido al final con 3 ciclos de maceración y filtrado del extracto por 9 días en total.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.3.5 Concentración de los Extractos.

El extracto de cada muestra recolectado después del proceso de maceración se adaptó al rotavapor Heidolph, Heizbed HB digit (Alemania) para su eliminación y concentración del solvente por medio de la aplicación de presión de vacío, temperatura menor a 30 °C y una rotación de 90 rpm.

Una vez eliminado el solvente por completo, se redisolvió el extracto con la menor cantidad posible de DCM y se transfirió a un tubo tapa rosca de 15 mL correctamente etiquetado. El solvente agregado para la redisolución se eliminó en un baño ultrasónico, a no más de 30 °C, bajo una corriente continua de N₂, hasta obtener una cantidad entre 2 - 4 mL del extracto aproximadamente.

El extracto fue distribuido uniformemente mediante pipetas Pasteur en tubos tapa rosca de 7 mL, se redisolvió el extracto con una pequeña cantidad de DCM si es necesario para la distribución total del extracto.

Los tubos con extracto fueron colocados en el concentrador al vacío Labconco CentriVap Vacuum (USA) a una presión de 400 mBar, temperatura 35 °C y velocidad de 12 rpm por aproximadamente 2 horas o hasta obtener un extracto seco, luego se dio inicio a ciclos de concentración de 15 min aumentando la velocidad a 92 rpm y pesando cada vez los tubos con el extracto hasta obtener un peso constante con una variación entre peso y peso de 0,1mg.

2.3.3.8 Extracción de Microalgas.

Una vez obtenida la biomasa liofilizada de las microalgas, se procedió a pesar en un frasco de tapa hermética. El solvente de extracción DCM fue añadido en relación con el peso de la microalga; así por cada gramo de biomasa se debió agregar 30 mL de solvente de extracción. Se dejó macerar por aproximadamente 24 horas bajo una campana de extracción.

Se aplicó ultrasonido directo a las muestras maceradas a >20 KHz a una temperatura de 10 °C por 3 ciclos de 5 minutos cada uno con el objetivo de realizar la rotura celular de las microalgas y lograr la extracción completa de sus metabolitos. Este proceso fue realizado usando el equipo de ultrasonido Cole-Parmer Ultrasonic Processor (USA) del



UNIVERSIDAD DE CUENCA

laboratorio PROMAS en el Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Cuenca.

Posterior a ello las microalgas fueron transferidas a un balón 150 mL y se maceró nuevamente por un periodo de 5 horas en un baño con ultrasonido Cole-Parmer 8893-21 (USA) controlando que la temperatura se encuentre menor a 30 °C. Se filtró recogiendo el extracto en un balón; posteriormente la microalga se retornó al balón inicial y se añadió nuevamente la misma cantidad de solvente iniciando un nuevo proceso de maceración por 5 horas en las mismas condiciones. Al final se cumplió con 3 ciclos de maceración de 5 horas cada una y las fracciones del extracto filtradas de cada macerado se recolectaron y se concentraron en el rotavapor; para así continuar con el mismo proceso de concentración de extractos como indica el apartado 2.3.4.5.

2.3.3.7 Determinación de la Actividad Antioxidante.

2.3.3.7.1 Estandarización de la Técnica de Blanqueamiento de B- caroteno.

- **Preparación de la Emulsión de B- caroteno.**

En un vaso de precipitación se preparó una solución 0,2 mg / mL de β -caroteno en cloroformo, se añadió 1 mL de la solución 0,2 mg / mL de β -caroteno más 20 uL de ácido linoleico en un balón de 250 mL de capacidad, además se agregó 200 uL de Tween 20 o Tween 80 según sea el ensayo a realizar para evaluar la actividad antioxidante considerando como variable el uso de un tensioactivo u otro.

Se evaporó el cloroformo que se utilizó para la disolución del β -caroteno mediante una corriente continua de N_2 por un tiempo aproximado de 1 min (nótese la evaporación total del cloroformo debido a que puede proporcionar turbidez a la emulsión e interferir en las lecturas espectrofotométricas). Se esperó un tiempo aproximado entre 20 y 30 minutos que es el necesario para la preparación de las disoluciones del extracto y del estándar a diferentes concentraciones; posterior a ello se agregó por alícuotas 50 mL (5 alícuotas de 10 mL) de agua destilada previamente saturada de oxígeno por un tiempo de 2 minutos. Se mezcló todos los componentes de la emulsión en un baño con ultrasonido por aproximadamente 2 minutos hasta observar la formación de una emulsión amarilla translúcida como se observa en la **figura 2.3**.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

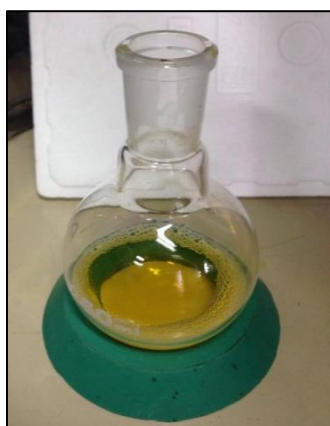


Figura 2.3 Emulsión de B- caroteno, Ácido Linoleico.

- **Preparación del Blanco de Reactivo.**

Al mismo tiempo que se preparó la emulsión, en un tubo de 20mL se agregó: 5 ul de ácido linoleico más 50 ul de Tween 20 o Tween 80, se añadió suavemente por las paredes del tubo 12,5 mL de agua destilada saturada de oxígeno, se agitó vigorosamente en un baño con ultrasonido durante 2 - 4 minutos hasta formar una emulsión transparente.

- **Preparación de los extractos y control positivo.**

Se preparó diferentes diluciones de los extractos lipofílicos y control positivo BHT (**Anexo A**) en una mezcla de solventes: Metanol 95 % - DCM 5 % a las concentraciones que indica la **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3. Concentración de las disoluciones de los extractos y BHT.

Código	Nombre	X1	X2	X3	X4
Extracto	Común				
PM 1	Carne	3 mg / ml	2 mg / ml	1 mg / ml	0,5 mg / ml
Hojas	Humana				
VG 1	Pimiento	1 mg / ml	0,75 mg / ml	0,5 mg / ml	0,25 mg / ml
	rojo				
Control		CP1	CP2	CP3	CP4
Positivo					
BHT		100 ug / ml	50 ug / ml	25 ug / ml	12.5 ug / ml



UNIVERSIDAD DE CUENCA

X = Diluciones a diferente concentración de cada extracto.

CP = Diluciones a diferente concentración del control positivo o estándar.

- **Ensayo de Actividad Antioxidante.**

En una gradilla se dispuso de una serie de tubos de ensayo de 7 mL etiquetados correctamente para cada concentración del extracto o control BHT, además para el control negativo, cada concentración se debió etiquetar por triplicado. Se encendió el espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Genesys 10-S (USA) 15 minutos antes de utilizarlo, se programó la longitud de onda a 470 nm y se encerró con el blanco de emulsión el cual generalmente indicó una absorbancia de 0,120 – 0,130 antes de encerrar el equipo.

Se distribuyó uniformemente la emulsión de β -caroteno controlando antes que su absorbancia sea de entre 0,200 a 0,210. Se adicionó los extractos y controles según como indica la **Tabla 2.4**.

Tabla 2.4. Distribución de la emulsión de β -Caroteno, Extractos y Controles.

Muestras	X1	X2	X3	Xn	CP1	CP2	CPn	Control negativo
Emulsión (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Extracto (ul)	100	100	100	100				
BHT (ul)					100	100	100	
Metanol-DCM 95%-5% (ul)								100

Xn = Número de diluciones a diferente concentración de cada extracto.

CPn = Número de diluciones a diferente concentración del control positivo o estándar.

Se agitaron los tubos en un Vortex Mixer VM-300 inmediatamente al agregar las muestras en la emulsión, se leyó la absorbancia a 470 nm a tiempo cero de cada muestra y controles dispuestos por triplicado. Se incubó las muestras en un Baño



UNIVERSIDAD DE CUENCA

María Memmert WNB 10(Alemania) de agua a 50 °C por 10 minutos aproximadamente y posterior a ello se retiró de la incubación y se esperó 5 minutos a temperatura ambiente cubriendo siempre las muestras de la luz. Se tomó lectura de la absorbancia cada 15 minutos observando que los valores sean estables, realizando 4 medidas en un lapso de 1 hora.

- **Expresión de los Resultados**

1. Actividad Antioxidante o porcentaje de inhibición en relación al control negativo.

$$\%AA = \frac{DR_{control} - DR_{muestra}}{DR_{control}} * 100$$

DR control= $\ln (A_{ci} / A_{ct}) / t$ Velocidad de degradación o tasa de blanqueamiento del control

Dónde:

A_{ci} = es la absorbancia de la emulsión con el control o estándar a 0 min.

A_{ct} = es la absorbancia del control en el instante t.

t= es el tiempo de incubación.

DR muestra= $\ln (A_{mi} / A_{mt}) / t$ Velocidad de degradación o tasa de blanqueamiento de la muestra.

Dónde:

A_{mi} = es la absorbancia de la emulsión con el extracto o muestra a 0 min.

A_{ct} = es la absorbancia de la muestra en el instante t.

t= es el tiempo de incubación.

2. IC50= Concentración del extracto o estándar a la cual se obtiene un 50 % de AA o Inhibición del blanqueo de β-caroteno, el cual es determinado y calculado a partir del gráfico de la curva % AA vs Ln de la Concentración del Extracto.

2.3.3.7.2 Actividad Antioxidante de Extractos lipofílicos por la Técnica de Blanqueamiento de β-caroteno.

Una vez estandarizada la técnica, para evaluar la actividad antioxidante de los diferentes extractos lipofílicos obtenidos mediante maceración con DCM se debió



UNIVERSIDAD DE CUENCA

proceder de la misma forma según el apartado 2.3.4.6.1, tomando en consideración lo siguiente:

- Para la formación de la emulsión se debe usar únicamente el Tween 20 el cual fue el Tensioactivo de elección y el que proveyó resultados reproducibles y estabilidad de la emulsión.
- La concentración de los extractos para la aplicación de la técnica dependerá del tipo de especie vegetal según la bibliografía consultada y se muestra en la

Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Concentración de las disoluciones de los extractos lipofílicos y BHT (2)

Código Extracto	Nombre Común	X1	X2	X3	X4
PM 1	Carne Humana	3 mg / ml	2 mg / ml	1 mg / ml	0,5 mg / ml
PM 2	H. de infante	2 mg / ml	1,5 mg / ml	1 mg / ml	0,5mg / ml
VG 1	Pimiento rojo	1 mg / ml	0,75 mg / ml	0,5 mg / ml	0,25 mg / ml
VG 2	Zanahoria	3 mg / ml	2 mg / ml	1 mg / ml	0,5 mg / ml
MA 1	MA. Scenedesmus	4 mg / ml	3 mg / ml	2 mg / ml	1 mg / ml
MA 2	MA. Naranja	4 mg / ml	3 mg / ml	2 mg / ml	1 mg / ml
Control Positivo		CP1	CP2	CP3	CP4
BHT		100 ug / ml	50 ug / ml	25 ug / ml	12.5 ug / ml

X = Diluciones a diferente concentración de cada extracto.

CP = Diluciones a diferente concentración del control positivo o estándar.

2.3.3.8 Cuantificación de Carotenoides Totales.

Se pesó 10 mg de extracto seco lipofílico, se añadió 2 mg de carbonato de magnesio y se disolvió en 2,5 ml de acetona fría (previamente refrigerada por 2 horas). Se mezcló en un baño de agua con ultrasonido por 2 minutos y se filtró usando papel filtro Whatman #4. En un embudo de separación se colocó 4 ml de éter de petróleo, se



UNIVERSIDAD DE CUENCA

añadió 2ml del extracto anterior resultante, se agitó y se dejó reposar por 15 minutos. Se agregó 15 ml de agua destilada de forma que fluya lentamente por las paredes del embudo. La mezcla se agitó, se dejó en reposo hasta observar la separación de fases y posteriormente se desechó la fase acuosa.

Se lavó cuatro veces más la fase etérea con 10 mL de agua destilada, desechando la fase acuosa con el objeto de eliminar la acetona residual. Se recogió la **fase etérea 1** en un tubo de ensayo. **Figura 2.4.A.**

2mL de fase etérea 1 fue colocada de nuevo al embudo de separación. Se adicionó 1,6mL de metanol acuoso 92%, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo por 15 minutos hasta la separación de fases. Se recogió en tubos diferentes la **fase etérea 2** y la **fase metanólica** respectivamente. **Figura 2.4.B**

Fase etérea 1: Contiene carotenoides totales y clorofilas a y b

Fase etérea 2: Contiene carotenoides y clorofila a

Fase metanólica: Contiene xantófilas y clorofila b

El contenido de carotenoides se determinó por la medida de las absorbancias a 450 nm tanto de la fase etérea 1 y 2 frente a un blanco de éter de petróleo. Para ello se realizaron las respectivas diluciones de las fases etéreas 1 y 2 de cada muestra hasta obtener una lectura de absorbancia dentro del rango espectrofotométrico, como se observa en el **Anexo B y Figura 2.4.C.**

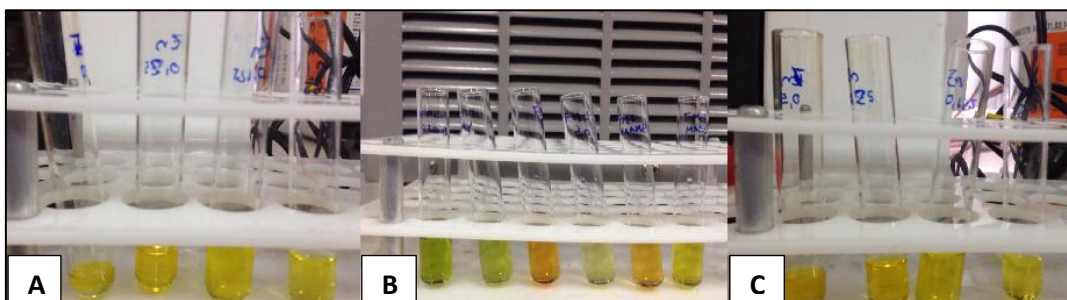


Figura 2.4 A) Fase etérea 1 y 2; B) Fase metanólica; C) Diluciones de la Fase etérea.

Para determinar la cantidad de carotenoides contenido en el extracto se aplica la siguiente fórmula.

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{E * V * 10^6}{E^{1\%} * 100 * p}$$



UNIVERSIDAD DE CUENCA

E= Absorbancia de la muestra a 450 nm

V= Volumen de extracto en la celda.

$E^{1\%}$ = 2500 Coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción de una solución de 1g de pigmento en 100 mL de solvente medido en una celda de 1 cm

P= peso de la muestra contenido en la dilución de lectura E.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.4.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza es una prueba estadística de significación capaz de comparar más de dos medias muestrales o variables en un diseño experimental. El problema ANOVA más simple se conoce indistintamente como unifactorial, de clasificación única o ANOVA unidireccional, e implica el análisis de datos muestreados de más de dos poblaciones (distribuciones) numéricas o de datos de experimentos en los cuales se utilizaron más de dos tratamientos.

Esta prueba se aplica para contrastar la hipótesis nula de que K medias con n réplicas son iguales, es decir:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots$$

Frente a: H_1 = Hipótesis alternativa: las medias son distintas.

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

1. Cada conjunto de datos debe ser independiente del resto.
2. Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
3. Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

El análisis de la varianza se basa en la comparación de la variabilidad que hay entre los grupos (intergrupo σ entre) debida al componente aleatorio, con la que hay dentro de los grupos (intragrupo σ dentro) variación causada por el error experimental intrínseco al proceso mismo, proporcionando el estadístico F para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias en los grupos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

$$F = \frac{\sigma^2 \text{ entre}}{\sigma^2 \text{ dentro}}$$

Cuanto mayor sea el valor del estadístico F , más diferenciados estarán los grupos. Si el p -valor asociado a F es igual o menor que α , se rechazará la hipótesis nula al nivel de significación α .

2.4.2 Prueba t de Student

La prueba t – student se deriva de las distribuciones t. Las distribuciones t son una familia de distribuciones simétricas con forma de campana (distribución normal). La forma de estas distribuciones cambia conforme cambia el diseño de la muestra.

Esta prueba se puede usar para comparar diferencias entre los promedios o medias de dos grupos u observaciones (independientes), o para comparar los promedios de dos observaciones (pareadas o apareadas) realizadas a un mismo sujeto.

Es una prueba de contraste de hipótesis sobre valores de diferentes medias:

H_0 = (Hipótesis nula o de igualdad): las medias de dos muestras son iguales.

H_1 = (Hipótesis alternativa o de diferencia): las medias de las muestras son significativamente distintas

Nivel alfa (α): es el porcentaje de error que estamos dispuestos a correr cuando se realice la prueba.

p - valor: es el nivel de significancia.

Prueba t de Student para dos muestras relacionadas

Esta prueba se efectúa para contrastar la hipótesis nula de no existencia de diferencias significativas entre las medias de dos variables, con distribución normal, medidas en los mismos sujetos, o bien la no existencia de diferencias significativas entre la media de una misma variable medida en los mismos sujetos en situaciones diferentes. La aplicación de la prueba de T student exige el mismo número de sujetos en ambas situaciones. Si el p – valor asociado al estadístico de contraste es mayor que α ($> 0,05$), se aceptará la hipótesis nula, por el contrario, si el p – valor es menor que α ($< 0,05$) se aceptará la hipótesis alternativa de diferencias significativas entre las medias de ambas variables, al nivel de significación α .



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA BLANQUEAMIENTO DE β -CAROTENO.

El ensayo del blanqueamiento del β -caroteno, un método común para la evaluación de actividad antioxidante, ha sido criticado por su baja reproducibilidad debido a factores como la preparación compleja de reactivos y sus cantidades, además de la interferencia de diferentes factores tales como la temperatura, pH y solventes; lo cual determina la importancia de la estandarización de criterios para valorar la efectividad real de un antioxidante (*Prieto, Rodríguez, Vásquez, & Murado, 2012*).

Para la estandarización de la técnica del blanqueamiento del β -caroteno como un método válido para la determinación de Actividad Antioxidante de extractos lipofílicos se consideró realizar pruebas preliminares con dos tensoactivos Tween 20 y Tween 80 como una variable influyente en la reproducibilidad de los resultados. Se procedió a determinar la actividad antioxidante por triplicado siguiendo el procedimiento del apartado 2.3.4.7.1; tanto de un antioxidante puro como estándar BHT (butilhidroxi tolueno), además de extractos lipofílicos de una planta medicinal Carne Humana (Código PM 1) y dos extractos vegetales de Pimiento rojo (Código VG 1) y Pimiento Verde (Código VG 3).

3.1.1 Resultados de Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y Estándar BHT para la Estandarización de la Técnica.

Una vez obtenidas las medidas espectrofotométricas (absorbancias) de cada réplica se procedió a calcular la actividad antioxidante de los extractos lipofílicos a 4 concentraciones diferentes según el apartado 2.3.4.7.1. Los datos y resultados obtenidos cada 15 minutos de incubación como indica la metodología se expresan en el **Anexo B**.

A continuación, en la **Tabla 3.1** se detallan las absorbancias y la actividad antioxidante del BHT y cada uno de los extractos, al cabo de los 60 minutos de incubación indicados en la técnica tanto con el tensoactivo Tween 20 y Tween 80.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 3.1 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y BHT en la Estandarización de la Técnica.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	Promedio Absorbancia (Tween 20)	Promedio % AA (Tween 20)	Promedio Absorbancia (Tween 80)	Promedio % AA (Tween 80)
BHT	100 ug / ml	0,131	91,322	0,111	70,925
	50 ug / ml	0,120	83,675	0,096	60,783
	25 ug / ml	0,098	67,376	0,090	54,495
	12,5 ug / ml	0,072	39,734	0,078	32,981
VG 1	1 mg / ml	0,757	87,698	0,872	94,725
	0,75 mg / ml	0,589	80,696	0,643	89,491
	0,5 mg / ml	0,399	70,067	0,410	79,383
	0,25 mg / ml	0,204	52,244	0,224	64,316
VG 3	3 mg / ml	0,520	78,719	0,443	73,924
	2 mg / ml	0,271	62,151	0,263	59,339
	1 mg / ml	0,175	58,007	0,156	44,080
	0,5 mg / ml	0,106	42,967	0,104	35,744
PM 1	3 mg / ml	0,485	67,961	0,408	61,755
	2,5 mg / ml	0,367	54,752	0,321	51,240
	2 mg / ml	0,287	35,650	0,244	33,899
	1 mg / ml	0,130	14,021	0,137	11,984

De acuerdo a la **Tabla 3.1** se evidenció diferencia en los valores de absorbancias y las actividades antioxidantes de los extractos y BHT realizando la técnica del blanqueo del betacaroteno con Tween 20 o con Tween 80. Es así el caso del BHT, VG 3 y PM 1 que las absorbancias y % AA fueron mayores con Tween 20 en comparación con las del Tween 80. Por lo tanto, según los resultados obtenidos nos dió una primera visión de una diferencia marcada entre ellos según el tipo de tensioactivo que se utilice para el desarrollo de la técnica.

Por otro lado, se realizó una estimación lineal de las curvas obtenidas a partir de los promedios de las medidas espectrofotométricas (absorbancias) vs la media de la concentración del estándar o de los diferentes extractos lipofílicos tanto para el ensayo con Tween 20 como con Tween 80; con el objeto de determinar la relación existente entre la disminución de la coloración de la emulsión del betacaroteno después de 1 hora de incubación con respecto a la concentración del extracto.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

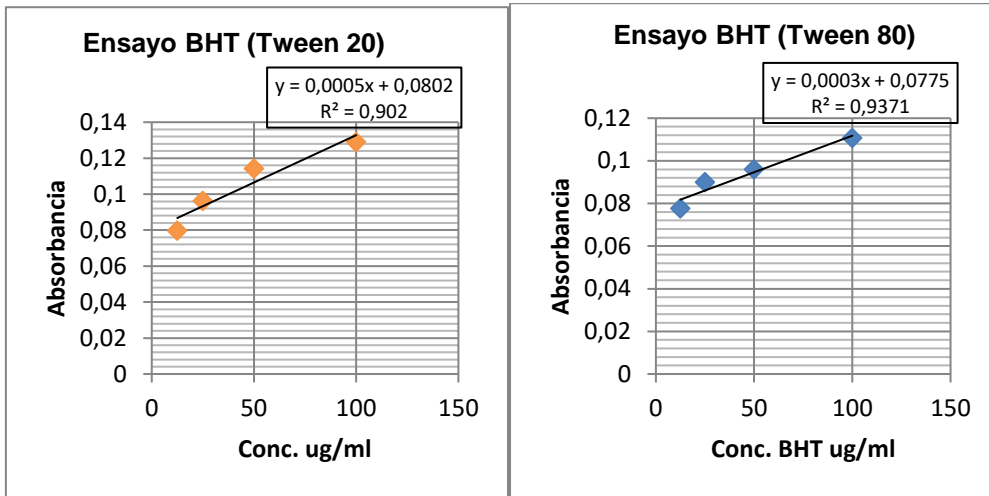


Figura 3.1 Curvas absorbancias vs concentración BHT (Tween 20 – Tween 80)

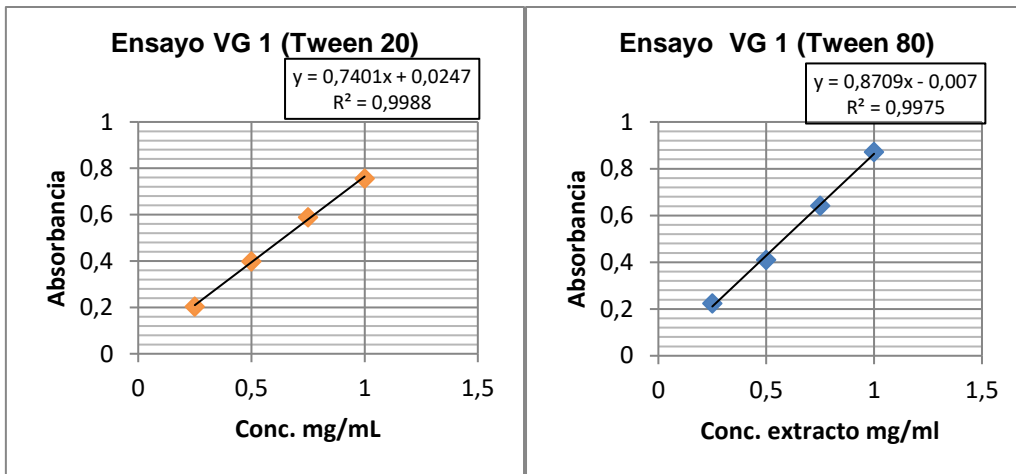
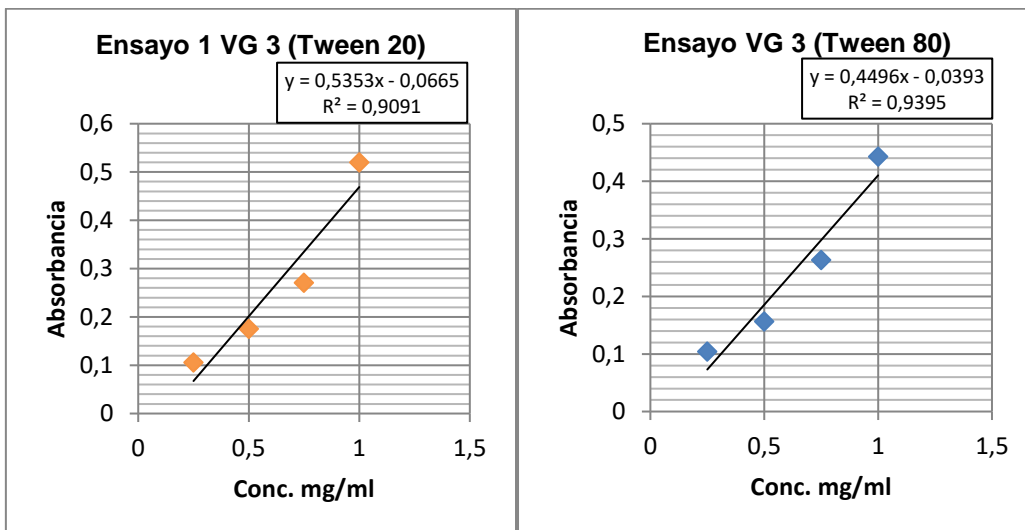


Figura 3.2 Curvas absorbancias vs concentración VG 1 (Tween 20 – Tween 80)





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.3 Curvas absorbancias vs concentración VG 3 (Tween 20 – Tween 80)

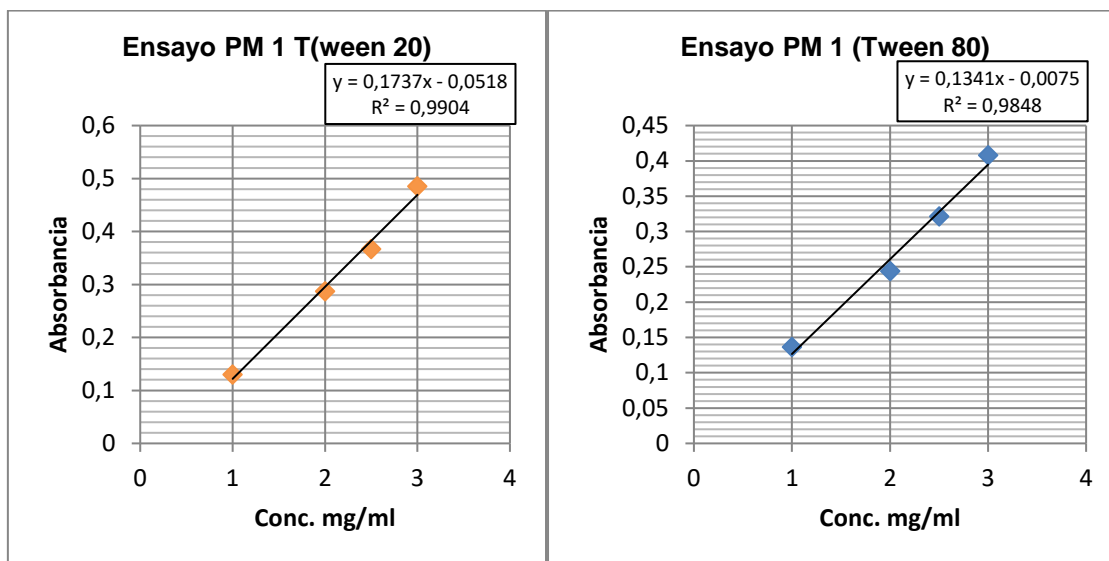


Figura 3.4 Curvas absorbancias vs concentración PM 1 (Tween 20 – Tween 80)

Tal como se muestran en las **figuras 3.1 – 3.4** existe una relación lineal entre la absorbancia (medida de la disminución del color de betacaroteno después de 1 hora de incubación a 50 °C) y la concentración del estándar BHT o extractos vegetales tanto con Tween 20 como con Tween 80, evidenciando en cada curva que el coeficiente de correlación lineal R^2 fue $> 0,9$; por lo tanto, las medidas espectrofotométricas después de un determinado tiempo de incubación fueron directamente proporcional a la concentración del antioxidante o extracto.

Así, Lai y Lim en su estudio titulado “Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia” indican que en el ensayo de BBC la absorbancia de la emulsión decrece rápidamente en muestras sin antioxidantes, mientras que, ante la presencia de antioxidantes, ellos retienen el color del β -caroteno ante la incubación; y que la absorbancia final es proporcional a la concentración del extracto usado (2011).

3.1.2 Prueba T de Student de la Actividad Antioxidante mediante la Técnica de BBC con Tween 20 y Tween 80.

Se realizó la prueba T de Student de dos Vías entre los porcentajes de actividad antioxidante determinados utilizando Tween 20 ó Tween 80; esto para cada una de las concentraciones del estándar y extractos. **Tabla 3.2.**



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Para el desarrollo de la prueba se planteó las siguientes hipótesis:

- **Hipótesis Nula H_0 :** no existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante usando el tensioactivo Tween 20 en comparación con Tween 80.
- **Hipótesis Alternativa H_1 :** existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante usando el tensioactivo Tween 20 en comparación con Tween 80.

Además, para la aplicación de la prueba t fue necesario determinar si las varianzas entre las actividades antioxidantes son estadísticamente iguales o diferentes mediante una prueba F.

Tabla 3.2 Prueba t de student entre el %AA con Tween 20 ó Tween 80.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	Promedio % AA (Tween 20)	Promedio % AA (Tween 80)	Prueba F	P dos colas	Valor crítico dos colas	T Estadístico
BHT	100 ug / ml	91,322	70,925	0,471	<0,001	2,776	30,476
	50 ug / ml	83,675	60,783	0,359	<0,001	2,776	16,447
	25 ug / ml	67,376	54,495	0,508	<0,001	2,776	10,723
	12,5 ug / ml	39,734	32,981	0,317	0,839	2,776	-0,217
VG 1	1 mg / ml	87,698	94,725	0,041	<0,001	2,776	-14,073
	0,75 mg / ml	80,696	89,491	0,196	<0,001	2,776	-11,165
	0,5 mg / ml	70,067	79,383	0,071	0,008	2,776	-4,921
	0,25 mg / ml	52,244	64,316	0,132	0,003	2,776	-6,456
VG 3	3 mg / ml	78,719	73,924	0,295	<0,001	2,776	14,730
	2 mg / ml	62,151	59,339	0,214	0,025	2,776	3,518
	1 mg / ml	58,007	44,080	0,214	0,001	2,776	9,880
	0,5 mg / ml	42,967	35,744	0,168	0,011	2,776	4,447
PM 1	3 mg / ml	67,961	61,755	0,382	<0,001	2,776	12,128
	2,5 mg / ml	54,752	51,240	0,144	0,012	2,776	4,421
	2 mg / ml	35,650	33,899	0,113	0,142	2,776	1,824
	1 mg / ml	14,021	11,984	0,552	0,018	2,776	3,843

Como se evidencia en la **Tabla 3.2** dado que el valor de p es menor que el nivel de significancia ($< 0,05$) en cada caso; o si se considera el valor t estadístico es mayor su valor crítico con $n = 2$ grados de libertad, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se



UNIVERSIDAD DE CUENCA

afirma que si existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante usando el tensioactivo Tween 20 en comparación con Tween 80.

3.1.3 Análisis de Varianza ANOVA de dos vías para la Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos y BHT usando Tween 20 o Tween 80.

Se realizó el análisis de varianza ANOVA de dos vías para cada una de las muestras y estándar, considerando dos factores que posiblemente generen diferencias significativas entre los resultados de actividad antioxidantes como son el uso de uno u otro tensioactivo (Tween 20 o Tween 80) y la concentración del extracto.

Para ellos mediante el análisis de varianza se comparó la media de % AA a distintas concentraciones de extracto usando en la técnica Tween 20 o Tween 80, considerando que los resultados pertenecen a los 60 minutos desde el inicio de la reacción antioxidante – radical libre en la emulsión de β -caroteno.

Tabla 3.3 Análisis de Varianza ANOVA para los % AA de extractos lipofílicos.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	Promedio % AA (Tween 20)	Promedio % AA (Tween 80)	Origen de las Variaciones	P	Valor crítico F	F
BHT	100 ug / ml	91,322	70,925	Concentración Extracto	0,011	9,277	27,869
	50 ug / ml	83,675	60,783				
	25 ug / ml	67,376	54,495	Tween	0,023	10,128	18,353
	12,5 ug / ml	39,734	32,981				
VG 1	1 mg / ml	87,698	94,725	Concentración Extracto	0,001	9,277	190,048
	0,75 mg / ml	80,696	89,491				
	0,5 mg / ml	70,067	79,383	Tween	0,003	10,128	79,234
	0,25 mg / ml	52,244	64,316				
VG 3	3 mg / ml	78,719	73,924	Concentración Extracto	0,006	9,277	41,781
	2 mg / ml	62,151	59,339				
	1 mg / ml	58,007	44,080	Tween	0,049	10,128	11,825
	0,5 mg / ml	42,967	35,744				
PM 1	3 mg / ml	67,961	61,755	Concentración Extracto	0,000	9,277	492,661
	2,5 mg / ml	54,752	51,240				
	2 mg / ml	35,650	33,899	Tween	0,045	10,128	10,979
	1 mg / ml	14,021	11,984				



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Según la **Tabla 3.3**, considerando como variable el tensioactivo usado en la técnica se obtuvo en el análisis de varianza un valor $p < 0,05$ en todos los casos, por tanto, se deduce que existe diferencias significativas en la actividad antioxidante debidas al uso de un Tween u otro. Sin embargo, también el p valor es menor al nivel de significancia considerando la concentración del extracto; es decir que la actividad antioxidante varía no solamente con respecto al tensioactivo usado, sino que además depende del tipo de muestra y de la concentración del extracto que se utilice en cada ensayo.

3.1.4 Comparación de las Varianzas Agrupadas Considerando la Medidas Espectrofotométricas de cada Extracto con el uso de Tween 20 o Tween 80.

Con la finalidad de establecer si existe diferencia en las lecturas espectrofotométricas de las muestras usando Tween 20 o Tween 80 en la técnica, en primer lugar, se calculó la Varianza para cada una de las concentraciones del estándar y extractos considerando las absorbancias obtenidas en las 3 réplicas de los ensayos. A continuación, a partir de las varianzas individuales se calculó la Varianza Agrupada para cada extracto tanto con Tween 20 como con Tween 80.

Finalmente, para establecer si las varianzas son estadísticamente diferentes se realizó una Prueba F considerando el conjunto de absorbancias de cada extracto con Tween 20 con respecto a las absorbancias con Tween 80.

Tabla 3.4 Cálculo de Varianza Agrupada para BHT y extractos lipofílicos.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	VARIANZA (Tween 20)	VAR*N grados libertad (8)	VARIANZA (Tween 80)	VAR*N grados libertad (8)	Prueba F
BHT	100 ug / ml	2,611E-06	2,089E-05	1,650E-05	1,320E-04	
	50 ug / ml	8,861E-06	7,089E-05	8,111E-06	6,489E-05	
	25 ug / ml	1,336E-05	1,069E-04	9,000E-06	7,200E-05	
	12,5 ug / ml	1,811E-05	1,449E-04	4,878E-05	3,902E-04	
Varianza Agrupada		Tween 20	1,074E-05	Tween 80	2,060E-05	0,00071
VG 1	1 mg / ml	3,032E-03	2,425E-02	2,640E-03	2,112E-02	
	0,75 mg / ml	1,587E-03	1,270E-02	1,044E-03	8,351E-03	
	0,5 mg / ml	8,836E-05	7,069E-04	3,027E-03	2,421E-02	
	0,25 mg / ml	1,423E-04	1,138E-03	1,264E-03	1,011E-02	
						0,044843



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Varianza Agrupada		Tween 20	1,212E-03	Tween 80	1,994E-03	
VG 3	3 mg / ml	2,845E-03	2,276E-02	7,673E-04	6,138E-03	
	2 mg / ml	1,744E-05	1,396E-04	1,880E-03	1,504E-02	
	1 mg / ml	8,528E-05	6,822E-04	2,022E-03	1,618E-02	
	0,5 mg / ml	8,000E-06	6,400E-05	2,645E-04	2,116E-03	
Varianza Agrupada		Tween 20	7,388E-04	Tween 80	1,233E-03	0,033134
PM 1	3 mg / ml	9,174E-04	7,339E-03	1,166E-03	9,332E-03	
	2,5 mg / ml	2,198E-04	1,758E-03	2,578E-04	2,062E-03	
	2 mg / ml	3,892E-04	3,114E-03	5,475E-04	4,380E-03	
	1 mg / ml	2,519E-05	2,016E-04	5,152E-04	4,122E-03	
Varianza Agrupada		Tween 20	3,879E-04	Tween 80	6,217E-04	0,02341

Como se puede observar en la **Tabla 3.4**, en el estándar BHT y en los extractos tanto las varianzas individuales como las varianzas agrupadas de las absorbancias obtenidas en el ensayo con Tween 20 fueron menores a las varianzas en el ensayo con Tween 80; es decir que la dispersión de los datos de absorbancia con Tween 20 fueron menores y homogéneos con respecto al Tween 80. Así también este análisis conlleva a deducir que en el ensayo con Tween 20 proveyó resultados más confiables en cuanto a la reproducibilidad y repetitividad de las absorbancias.

De acuerdo a la Prueba F de las Varianzas nos indica que ciertamente existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las varianzas o la medida de dispersión de los datos entre los ensayos con el uso de un tensioactivo u otro.

3.1.5 Comparación de la Actividad Antioxidante del Estándar BHT con respecto a la Actividad Antioxidante determinada por un estudio de referencia.

Se realizó una comparación de los resultados de actividad antioxidante obtenidos en nuestro estudio con los resultados obtenidos por estudios de referencia que hayan utilizado la técnica del blanqueo del β -caroteno tanto con Tween 20 y Tween 80. En los estudios de referencia consultados no se encontraron resultados de actividad antioxidante de los mismos extractos que fueron objeto de nuestro estudio, por lo que nuestro punto de comparación será la actividad antioxidante del BHT que generalmente se utiliza como estándar de referencia en esta técnica.



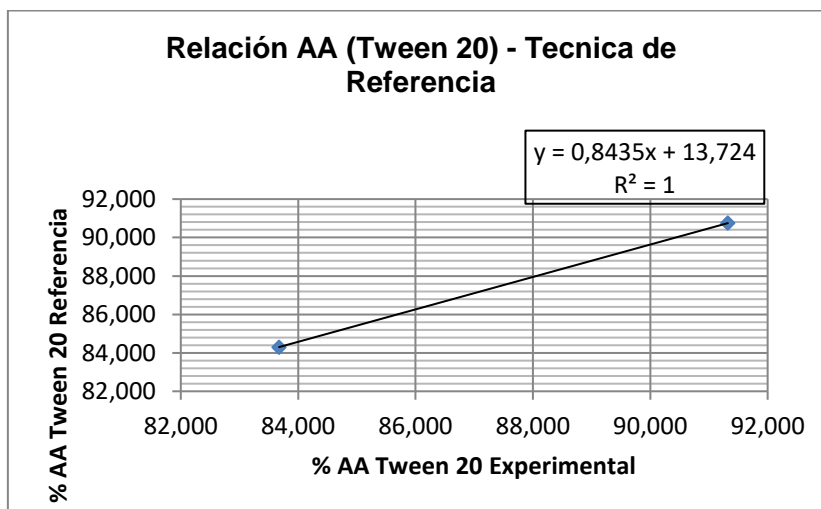
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Velioglu & Col, en su estudio “Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products” determinaron que la actividad antioxidante del BHT como control positivo por medio del ensayo de BBC con Tween 20 a las concentraciones de 50 y 100 ug / ml obteniendo porcentajes de AA de 84,3 % y 90,75 % respectivamente (1998). Para comparar dichos resultados con los de nuestro estudio se determinó la relación existente entre los % AA de nuestro estudio con los de la referencia a la misma concentración; demostrando que la actividad antioxidante del BHT en nuestro estudio son equivalentes en un 99 % a los resultados del estudio de referencia. (**Tabla 3.5**)

Tabla 3.5 Comparación % AA de BHT con un estudio de referencia.

Conc. Estándar BHT ug / ml	% AA (Tween 20)	Promedio % AA (Tween 20)	% AA Referencia (Tween 20)	Relación AA2 / AA1
100	91,148	91,322	90,750	0,994
	91,484			
	91,334			
50	83,376	83,675	84,300	0,993
	83,710			
	83,939			

Por otra parte, también se puede establecer la relación entre ambos resultados al realizar la gráfica de % AA experimental vs % AA de referencia (**Figura 3.5**) y estimar la pendiente m en la ecuación de la recta, la cual si es lo más próxima al valor 1 nos indica que los resultados son equivalentes entre sí con el uso del Tween 20 como tensioactivo en los ensayos de nuestro estudio como en los de referencia.





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.5 Relación %AA BHT Tween 20 Experimental vs %AA Referencia.

Para la comparación de nuestro estudio con el de referencia se consultó el Proyecto de Investigación realizado por Espinosa L. titulado “Bioactividad de extractos fenólicos de la testa de *J. curcas* no tóxica”; en el cual se determinó la actividad antioxidante de dichos extractos y estándar BHT utilizando la técnica del blanqueo de β -caroteno con Tween 80 obteniendo un IC50 para el BHT de 56 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Para el cálculo del IC50 de BHT en nuestro estudio primero se debió establecer la relación existente entre la actividad antioxidante vs la concentración del BHT (**Figura 3.6**), la cual indica que existe relación logarítmica entre las dos variables. Así se graficó el logaritmo natural (\ln) de la concentración de antioxidante frente al % AA y mediante la estimación lineal se interpola en la curva desde el 50 % de AA hacia el \ln de la concentración de BHT; por lo tanto, el valor del IC50 del BHT será el exponente de base (e) del valor interpolado (**Figura 3.7**).

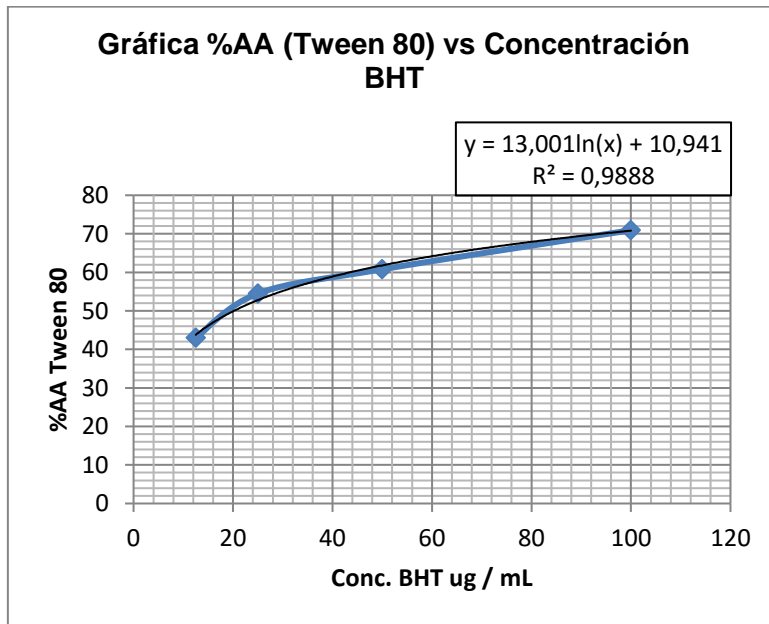


Figura 3.6 Gráfica %AA Tween 80 vs Concentración BHT



UNIVERSIDAD DE CUENCA

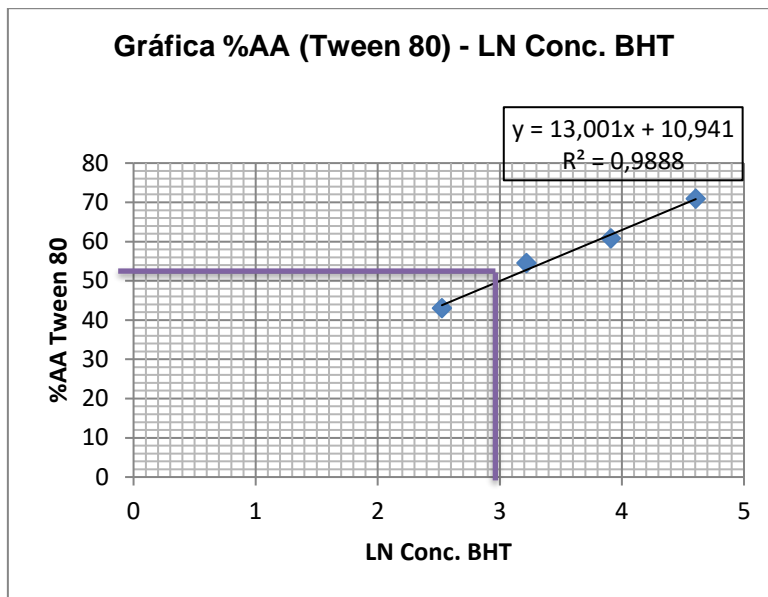


Figura 3.7 Gráfica %AA Tween 80 vs LN Concentración de BHT.

	IC 50 (Tween 80) ug / ml	Relación IC501 / IC502
Experimental	20,085	0,358
Referencia	56	

Una vez determinado el valor del IC50 del BHT (20,08 ug / ml) en nuestro estudio, se realizó la relación con el IC50 del BHT del estudio de referencia (56 ug / ml) indicando que solo existe una equivalencia alrededor del 35 % entre los dos resultados comparados.

Es así que mediante todo el estudio estadístico realizado se comprobó que se prefiere el uso del Tween 20 como emulgente o tensioactivo óptimo para conseguir la estabilidad de la emulsión de betacaroteno en la técnica estandarizada y por ende la obtención de resultados reproducibles. Aquello se puede explicar teóricamente debido a que la emulsión de betacaroteno formada para la aplicación de la técnica es del tipo aceite en agua O/A que para presentar estabilidad entre fases y un grado de dispersión óptimos necesita de un tensioactivo con un carácter hidrófilo y un índice HLB elevado. Así el Tween 20 (Polioxietilen -20- sorbitan- monooleato) posee un índice HLB de 16,7 y una proporción hidrófila del 84 % con respecto a la molécula total mientras el Tween 80 (Polioxietilen -20- sorbitan – monooleato) tiene un índice HLB de 15,0 y un 78 % de hidrofilia (**Faulli Trillo, 1993**); por lo tanto, el Tween 20 posee las



UNIVERSIDAD DE CUENCA

propiedades emulgentes idóneas para conseguir mejor estabilidad y dispersión de este tipo de emulsiones.

3.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA BLANQUEAMINETO DE B - CAROTENO ESTANDARIZADA EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS DE DIFERENTE FUENTE.

3.2.1 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Almacenados y Frescos.

Una vez estandarizada la técnica se procedió a la aplicación de la misma por triplicado en varios extractos lipofílicos de diversa fuente entre ellos vegetales, plantas medicinales y microalgas. 10 extractos en total fueron considerados para la aplicación de la técnica de entre ellos 4 ya se encontraban almacenados en el Laboratorio de Fitoquímica y los 6 restantes fueron extraídos en el periodo de octubre – diciembre de 2016. Posterior a ellos se determinó de cada réplica la actividad antioxidante de los extractos lipofílicos a 4 concentraciones diferentes según el apartado 2.3.4.7.1.

Para el cálculo del IC50 (Concentración del extracto o estándar a la cual se obtiene un 50 % de AA o Inhibición del blanqueo de β -caroteno) de los extractos frescos y almacenados en nuestro estudio se graficó el logaritmo natural (Ln) de la concentración del extracto frente al % AA (**Anexo C**) y mediante la estimación lineal se interpola en la curva desde el 50 % de AA hacia el Ln de la concentración; por lo tanto, el valor del IC50 del BHT será el exponente de base (e) del valor interpolado.

Los resultados de IC50 y actividad antioxidante de los extractos lipofílicos almacenados y frescos se muestran en la **Tabla 3.6** y **Tabla 3.7** respectivamente.

Tabla 3.6 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Almacenados.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	%AA 1	%AA 2	%AA 3	Promedio %AA	Desviación estándar σ	IC 50 mg/ml
BHT	100 ug / ml	91,148	91,484	91,334	91,322	0,168	0,016
	50 ug / ml	83,376	83,710	83,939	83,675	0,283	
	25 ug / ml	67,669	67,496	66,962	67,376	0,369	
	12,5 ug / ml	39,572	39,924	39,704	39,734	0,178	
VG 1	1 mg / ml	90,459	90,955	90,799	90,738	0,254	0,272
	0,75 mg / ml	81,173	82,529	81,884	81,862	0,678	
	0,5 mg / ml	71,608	72,102	72,184	71,965	0,312	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

	0,25 mg / ml	48,852	50,195	48,583	49,210	0,864	
PM 1	3 mg / ml	69,568	69,024	69,109	69,234	0,293	2,225
	2 mg / ml	42,612	42,178	42,006	42,265	0,313	
	1 mg / ml	20,290	20,051	20,545	20,295	0,247	
	0,5 mg / ml	11,692	11,683	11,817	11,730	0,075	
PM 2	2 mg / ml	84,893	84,579	84,298	84,590	0,298	0,818
	1,5 mg / ml	68,122	68,392	68,071	68,195	0,172	
	1 mg / ml	53,410	53,806	52,669	53,295	0,577	
	0,5 mg / ml	35,290	36,448	35,707	35,815	0,587	
MA 1	4 mg / ml	60,914	60,135	60,862	60,637	0,435	2,857
	3 mg / ml	53,544	53,137	53,515	53,399	0,227	
	2 mg / ml	32,004	31,774	32,611	32,130	0,432	
	1 mg / ml	11,713	11,163	11,454	11,443	0,275	

Tabla 3.7 Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos Frescos.

Código del Extracto	Concentración del Extracto	%AA 1	%AA 2	%AA 3	Promedio %AA	Desviación estándar σ	IC 50 mg/ml
VG 2	3 mg / ml	76,733	76,281	76,678	76,564	0,247	0,606
	2 mg / ml	69,507	69,175	69,788	69,490	0,307	
	1 mg / ml	60,753	60,186	60,620	60,520	0,296	
	0,5 mg / ml	47,613	47,315	47,710	47,546	0,206	
VG 1	1 mg / ml	90,575	91,615	91,192	91,127	0,523	0,223
	0,75 mg / ml	82,005	82,674	82,390	82,356	0,336	
	0,5 mg / ml	75,310	75,954	75,452	75,572	0,338	
	0,25 mg / ml	54,647	52,052	52,679	53,126	1,354	
PM 1	3 mg / ml	70,280	69,937	70,511	70,243	0,289	1,733
	2 mg / ml	56,475	56,046	56,805	56,442	0,381	
	1 mg / ml	22,330	21,772	21,473	21,858	0,435	
	0,5 mg / ml	12,281	12,854	12,521	12,552	0,288	
PM 2	2 mg / ml	85,259	84,950	85,103	85,104	0,154	0,67
	1,5 mg / ml	73,224	73,293	72,963	73,160	0,174	
	1 mg / ml	64,129	64,149	64,092	64,123	0,029	
	0,5 mg / ml	41,869	42,227	42,372	42,156	0,259	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

MA 1	4 mg / ml	62,552	62,616	62,451	62,540	0,083	2,71
	3 mg / ml	54,722	54,633	54,899	54,752	0,135	
	2 mg / ml	36,359	36,366	36,583	36,436	0,127	
	1 mg / ml	14,108	14,082	14,777	14,322	0,394	
MA 2	4 mg / ml	68,830	68,101	68,793	68,575	0,411	2,225
	3 mg / ml	58,814	58,920	58,935	58,890	0,066	
	2 mg / ml	45,567	45,784	45,848	45,733	0,147	
	1 mg / ml	28,612	28,688	28,622	28,640	0,041	

Como se muestra en las **Tablas 3.6 y 3.7** el promedio del porcentaje de actividad antioxidante fue proporcional a la concentración de los extractos, es decir mientras aumenta la concentración mayor será la AA de la muestra. Lo expuesto se confirma en el estudio “Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Gagea fibrosa* and *Romulea ramiflora*” de Mammadov, Illi & Erten, indica que el mecanismo de blanqueo del β -caroteno es un fenómeno mediado por radicales libres resultante de la formación de hidroperóxidos a partir de la oxidación del ácido linoleico. En ausencia de antioxidantes, el β -caroteno experimentará una rápida decoloración. La adición de los extractos que contienen antioxidantes puede proteger la extensión del color naranja de β -caroteno neutralizando los productos de hidroperóxido que se formaron a partir del ácido linoleico. Por lo tanto, los altos valores de concentración del extracto indicaron una actividad antioxidante más alta (2011).

Considerando el valor IC50 de cada extracto se evidencia que mientras menor es el IC50 del extracto mayor es su actividad antioxidante como se observa en las **Tablas 3.6 y 3.7**. Por lo que la capacidad antioxidante de los extractos almacenados expresada en IC50 (mg / ml) decrece en el orden siguiente: BHT (0,016) > VG 1 (0,27) > PM 2 (0,81) > PM 1 (2,22) > MA 1 (2,85); mientras que los extractos frescos siguen el siguiente orden > VG 1 (0,22) > VG 2 (0,60) > PM 2 (0,67) > PM 1 (1,73) > MA 2 (2,22) > MA 1 (2,71) respectivamente. Así se demuestra que el BHT posee la mayor actividad antioxidante para neutralizar radicales libres debido a que es un antioxidante puro; en caso de los extractos vegetales VG 1 (Pimiento rojo) y VG 2 (Zanahoria) muestran una gran capacidad antioxidante por sus bajos valores de IC50, seguidos de las plantas medicinales PM 2 y PM 1, para terminar con las microalgas MA 2 y MA 1 que poseen las menores actividades antioxidantes del grupo de estudio. Benabdalah et al en su estudio “Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species from northeast of Algeria” comprobaron que mediante el ensayo de BBC las



UNIVERSIDAD DE CUENCA

especies de menta revelan mejores propiedades antioxidantes mientras menor es el valor de su IC50 (2016).

Si se comparan los extractos almacenados disponibles con sus respectivos extractos frescos (VG 1, PM 2, PM 1, MA 1) se observa que la actividad antioxidante es mayor en los extractos frescos con respecto a los almacenados, lo cual puede explicarse por la sensibilidad que tienen los antioxidantes de un extracto a ser oxidados por diferentes factores tales como la luz UV, temperatura, etc. que pudieron intervenir en el periodo de almacenamiento (*Niki, 2010*). Sin embargo, no se pudo determinar si existe una diferencia significativa entre las actividades antioxidantes de un extracto almacenado y un fresco debido a que como se indica en el apartado 2.3.1 los tiempos de almacenamiento fueron diferentes en cada extracto por lo que no se demostrarían resultados estadísticamente significativos.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS.

3.3.1 Carotenoides Totales Presentes en los Extractos Almacenados y Frescos.

La cuantificación de carotenoides totales se realizó por triplicado según el proceso indicado en el apartado 2.3.4.8 tanto para los extractos en DCM almacenados y frescos; considerando que en el mismo proceso de cuantificación se realizó una modificación con la finalidad de separar del extracto la clorofila B y xantófilas solubles en solventes polares (Metanol) (*Abril, Bárcena, Galván & Fernández, 2011*). Los resultados de carotenoides totales expresados en ug / mg de extracto se demuestran en la **tabla 3.8 y 3.9** para extractos almacenados y frescos respectivamente.

Tabla 3.8 Carotenoides Totales en extractos lipofílicos almacenados.

Código Del Extracto	Carotenoides ug / mg	Promedio de CT ug / mg	Desviación estándar σ	C. Sin Clorofila B ug / mg	Promedio de CT Sin Clorofila ug / mg	Desviación estándar σ
VG 1	21,260	21,140	0,125	19,430	19,126	0,268
	21,148					
	21,011					



UNIVERSIDAD DE CUENCA

PM 2	4,284	4,270	0,016	2,983	2,960	0,025
	4,272			2,964		
	4,253			2,933		
PM 1	2,671	2,653	0,018	2,255	2,235	0,021
2,654	2,214					
2,635	2,236					
MA 1	2,239	2,232	0,008	1,351	1,358	0,020
2,233	1,380					
2,223	1,342					

Tabla 3.9 Carotenoides Totales en extractos lipofílicos frescos.

Código del Extracto	Carotenoides ug / mg	Promedio de CT ug / mg	Desviación estándar σ	C. Sin Clorofila B ug / mg	Promedio de CT Sin Clorofila ug / mg	Desviación estándar σ
VG 1	21,945	22,224	0,250	20,027	20,036	0,125
	22,431			20,164		
	22,294			19,915		
VG 2	7,056	7,247	0,215	7,043	7,226	0,222
7,479	7,473					
7,205	7,162					
PM 2	5,617	5,630	0,063	3,743	3,780	0,059
5,698	3,849					
5,574	3,749					
PM 1	3,086	3,006	0,084	2,722	2,731	0,008
2,918	2,738					
3,015	2,732					
MA 1	2,539	2,536	0,026	1,593	1,617	0,026
2,510	1,644					
2,561	1,615					
MA 2	3,153	3,179	0,029	2,918	2,923	0,026
3,211	2,950					
3,172	2,899					



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Como se muestra en la **tabla 3.8** la concentración de carotenoides que poseen los extractos almacenados en ug/mg fueron VG 1 (19,12) > PM 2 (2,96) > PM 1 (2,23) > MA 1 (1,35); en cuanto a los extractos frescos siguen el siguiente orden > VG 1 (20,03) > VG 2 (7,22) > PM 2 (3,78) > PM 1 (2,73) > MA 2 (2,92) > MA 1 (1,61) respectivamente. La secuencia de orden con respecto al contenido de carotenoides coincide con la secuencia de actividad antioxidante de cada extracto; es decir a mayor contenido de carotenoides de un extracto mayor será la actividad antioxidante del mismo, por lo que la relación que existe entre el contenido de carotenoides y la actividad antioxidante se muestra en el apartado 3.3.3.

3.3.2 Análisis de Varianza ANOVA de dos Vías para el Contenido de Carotenoides Totales con Clorofila B y sin Clorofila B.

Cada uno de los extractos fue sometido al proceso de cuantificación de carotenoides totales (Proceso 1) y al mismo tiempo a un posterior proceso de separación de clorofila B y xantófilas (Proceso 2) que elimina la interferencia que puede provocar la clorofila en las lecturas espectrofotométricas de los carotenoides; de tal manera se obtuvo aparentemente dos resultados diferentes en cuanto a su contenido de carotenoides en un proceso y otro (**Tabla 3.9**). La interferencia que produce la clorofila en las lecturas espectrofotométricas para la cuantificación de carotenoides se debe a que ésta presenta picos de absorción máximos a la misma longitud de onda (450 nm) a la que los carotenoides tienen su máximo de absorbancia en el espectro electromagnético (**Abril, Bárcena, Galván & Fernández, 2011**).

Para determinar si en realidad existe diferencias significativas entre el contenido de carotenoides por la aplicación del Proceso 1 y el Proceso 2 se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías considerando los resultados obtenidos en los 2 procesos para las diferentes muestras (**Tabla 3.10**)

Tabla 3.10 ANOVA de Carotenoides Totales.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	19712,4728	1,5707E-42	2,62065415
Carotenoides Proceso	476,255605	2,4512E-17	4,25967727
Interacción	77,8754392	4,8977E-14	2,62065415



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En el análisis de varianzas de dos vías se toma en consideración el origen de las variaciones de acuerdo a dos factores: por un lado, según el proceso de cuantificación existe diferencias significativas en el contenido de carotenoides en los extractos entre los dos procesos. Considerando la otra variable también el ANOVA nos indica que hay diferencia significativa en los carotenoides entre un tipo de muestra y otra; indicando que los resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Además, en el análisis se muestra que existe interacción entre los 2 factores ($p < 0,05$), esto es que tanto el proceso como el tipo de muestra influyen al mismo tiempo en la determinación de los carotenoides totales presentes en un extracto. Así por ejemplo en la **figura 3.8 y 3.9** se observa que en el caso de las plantas medicinales PM 1 y PM 2 y microalga MA 1 hay una disminución considerable en el contenido de carotenoides entre el proceso 1 y el proceso 2 ya que son organismos fotosintéticos y por ende la clorofila presente en el extracto fue separada en parte (Clorofila b) mediante el proceso 2. En el caso del extracto del pimiento rojo VG 1 también existe reducción en la concentración de carotenoides en el Proceso 2 debido a su contenido en carotenos y xantinas parte de estas últimas fueron solubles en metanol usado en el Proceso 2. Sin embargo, en cuanto al extracto de zanahoria VG 2 no se evidenció disminución en el contenido de carotenoides en el proceso en cuanto que esta es rica en β -caroteno un carotenoide apolar que es insoluble en metanol (**Burgos & Calderón, 2009**). Por lo tanto, la concentración de carotenoides en los 2 procesos depende del tipo de muestra analizado en cuanto a su contenido en clorofila y al tipo de carotenoides (carotenos y xantófilas).

Código Extracto	Proceso 1	Carotenoides ug / mg	Proceso 2	Carotenoides ug / mg
VG 1	1	22,224	1	20,036
PM 2	2	5,630	2	3,780
VG 2	3	7,247	3	7,226
MA 2	4	3,179	4	2,923
PM 1	5	3,006	5	2,731
MA 1	6	2,536	6	1,617



UNIVERSIDAD DE CUENCA

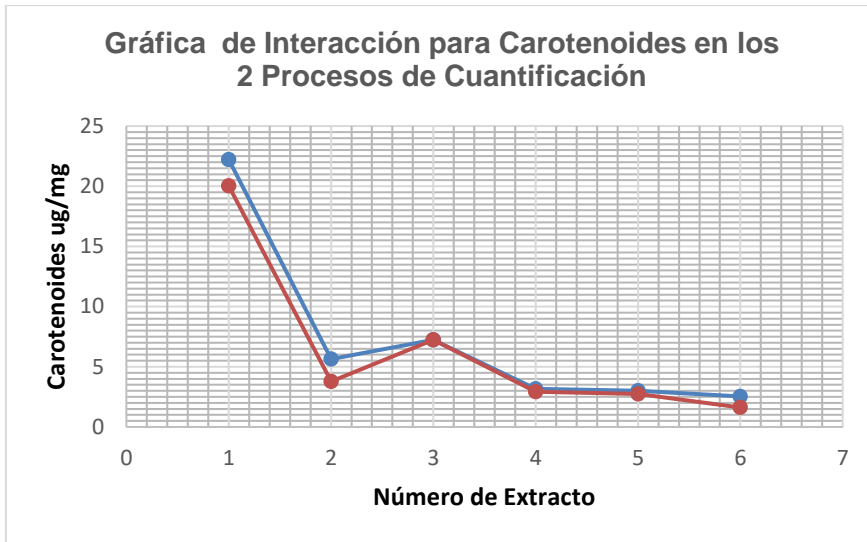
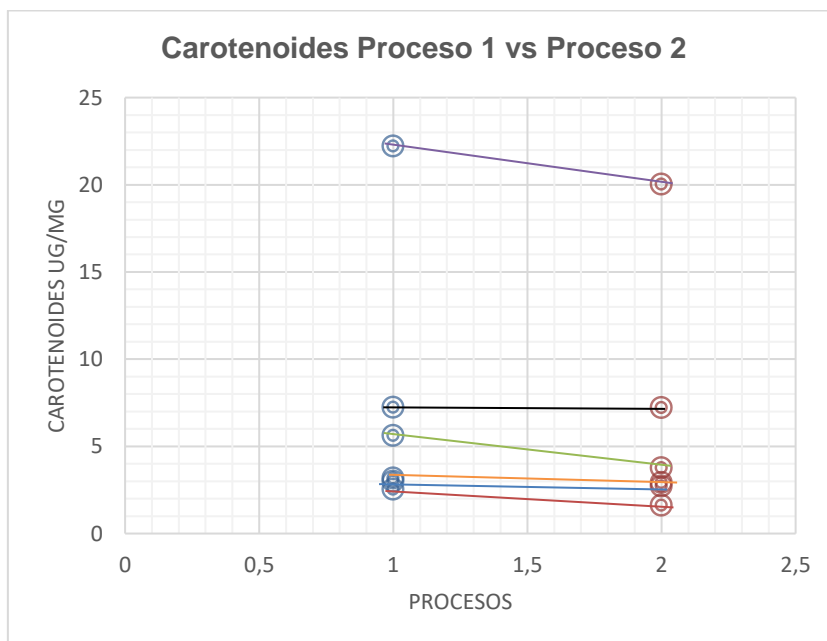


Figura 3.8 Interacción entre el Contenido de Carotenoides de Extractos lipofílicos según los Proceso de Cuantificación.

Código Extracto	Proceso 1	Carotenoides ug / mg	Proceso 2	Carotenoides ug / mg
VG 1	1	22,224	2	20,036
PM 2	1	5,630	2	3,780
VG 2	1	7,247	2	7,226
MA 2	1	3,179	2	2,923
PM 1	1	3,006	2	2,731
MA 1	1	2,536	2	1,617





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.9 Contenido de Carotenoides de Extractos lipofílicos en el Proceso 1 vs Proceso 2.

3.3.3 Relación entre el Contenido de Carotenoides y la Actividad Antioxidante de Extractos Lipofílicos.

Con el fin de determinar la relación que existe entre la actividad antioxidante de un extracto lipofílico y el contenido de carotenoides del mismo se graficaron curvas del % de AA a la concentración de 1mg / ml de extracto vs el contenido de carotenoides expresados en ug / mg **Figura 3.10 y 3.11** para extractos lipofílicos almacenados y frescos respectivamente.

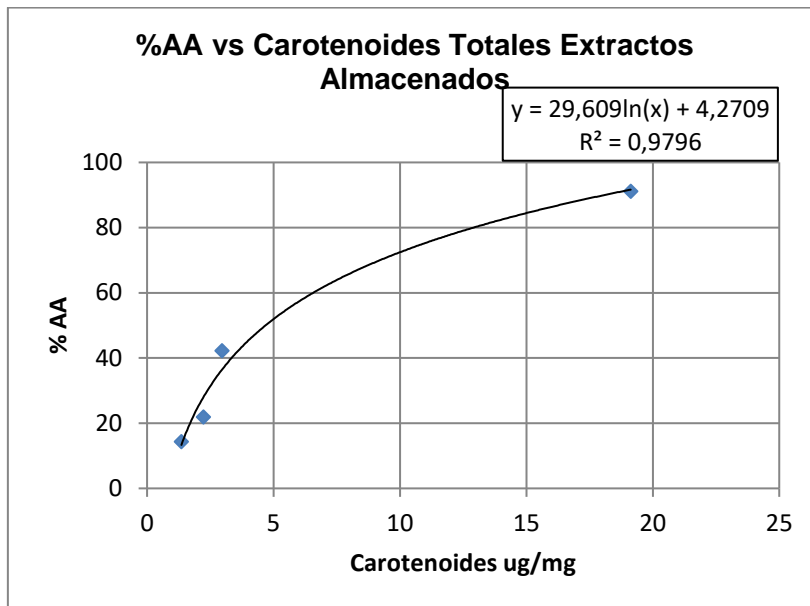
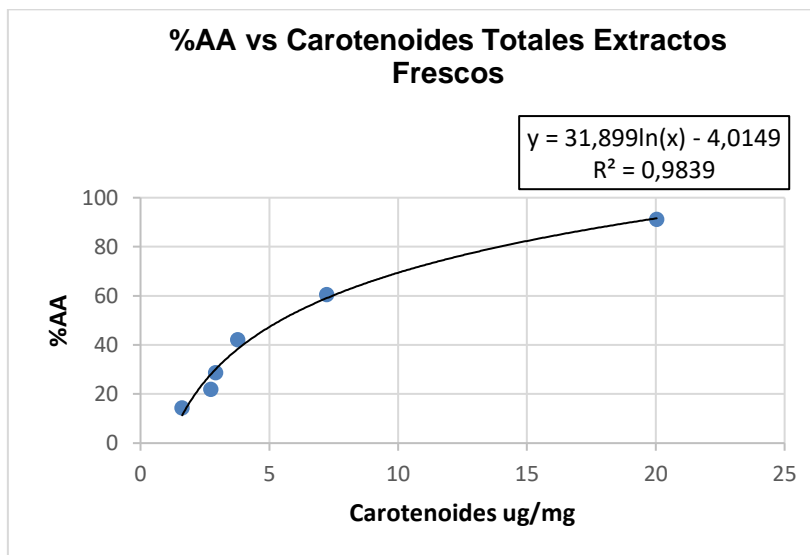


Figura 3.10 Curva %AA vs Carotenoides Totales Extractos Almacenados





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.11 Curva %AA vs Carotenoides Totales Extractos Frescos.

Tal como se muestran en las **Figuras 3.10 y 3.11** la actividad antioxidante vs la concentración de carotenoides en los extractos lipofílicos siguen una relación logarítmica $R^2 = 0,9839$ en los dos casos tanto para extractos almacenados como para extractos frescos; esto quiere decir que la actividad antioxidante será mayor mientras que el extracto en análisis tenga mayor contenido de carotenoides, hasta que el % AA llegue a su valor máximo (100 %) en la curva se forma una meseta y la AA no aumentará incluso si un extracto posee mayor cantidad de carotenoides.

Con el análisis de regresión realizado entre % AA vs Contenido de Carotenoides, se determinó mediante el coeficiente de correlación R, que la actividad antioxidante presentan una relación positiva en función de los carotenoides presentes en los extractos, es decir que, a medida que aumentan los carotenoides los valores de AA también aumentan y todos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Esto sugiere que el contenido de carotenoides puede jugar un importante rol en la actividad antioxidante de los extractos lipofílicos.

Tabla 3.11 Regresión % AA vs Contenido de Carotenoides de extractos lipofílicos.

Código Extracto	Carotenoides ug / mg	%AA 1mg / ml	Coeficiente de correlación múltiple R	P
VG 1	20,036	91,126	0,9667	0,0072
PM 2	3,780	42,156		
VG 2	7,226	60,520		
MA 2	2,923	28,640		
PM 1	2,731	21,858		
MA 1	1,617	14,322		

Lo expuesto en nuestro estudio se relaciona con otros estudios en los cuales sus autores relacionan el contenido de carotenoides en diferentes plantas, con la actividad antioxidante que éstas llevan a cabo, es así que podemos destacar hallazgos importantes en estos estudios entre los que se encuentran:

Burgos & Calderón, en su tesis titulada “Determinación del Contenido de Carotenoides Totales y Actividad Antioxidante en Ocho Especies De Frutas Y Verduras Comercializadas en la Zona Metropolitana de San Salvador” sostienen que los carotenoides presentes en los extractos de vegetales como pimiento y zanahoria pueden reducir el grado de destrucción de β -caroteno neutralizando los radicales libres



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de linoleato y otros radicales libres formados en el sistema en la técnica del blanqueo de β -caroteno (2009).

Barros et al en su estudio "Total phenols, ascorbic acid, betacarotene and lycopene in Portuguese mushrooms and their antioxidant activities" indican que los diferentes valores de AA obtenidos con cada extracto se pueden atribuir a su diferente composición química (2007). Por lo tanto, la actividad antioxidante de un extracto no puede predecirse sobre la base de su contenido total de fenoles y carotenoides. De lo contrario, la sinergia de compuestos carotenoides, entre sí y otros componentes presentes en un extracto, puede contribuir a la actividad antioxidante globalmente observada. Ordoñez et al mientras tanto recomienda que se debería tomar en consideración que la capacidad antioxidante puede ser atribuida a la estructura de cada compuesto antioxidante, así como al efecto de sinergia o antagonismo entre los metabolitos presentes el en extracto crudo (2006).



CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Se realizó la estandarización de la técnica de blanqueamiento de β -caroteno en la cual se introdujo como variable el uso de tensioactivos diferentes (Tween 20 y Tween 80); es así que usando un estándar BHT se comprobó que los resultados de actividad antioxidante son diferentes al utilizarse un tensioactivo u otro como indica el análisis estadístico t de student y ANOVA, en los cuales el valor de p es menor que el nivel de significancia (0,05) en todos los casos, por lo tanto, se pudo rechazar la hipótesis nula y decir que si existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante utilizando Tween 20 y Tween 80.
- Por otro lado después de realizar el análisis de las varianzas individuales y agrupadas de la absorbancia con Tween 20 y Tween 80, podemos decir que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas al utilizar los dos tensioactivos y que también existe menor variabilidad de resultados al utilizar Tween 20, por lo tanto, el ensayo realizado con este tensioactivo proveyó resultados con mejor reproducibilidad y repetitividad al tener un menor índice de dispersión entre absorbancias.

Además se realizó una comparación de los resultados obtenidos en nuestro estudio del estándar (BHT) utilizando la misma técnica , demostrándose que la actividad antioxidante al utilizar Tween 20 es semejante en un 99% al estudio de referencia, mientras que usando Tween 80 solo presentó una equivalencia de aproximadamente un 35 % con respecto al estudio consultado en la bibliografía. Al final de todo este análisis estadístico se concluyó que el tensioactivo ideal a utilizarse en la técnica de blanqueamiento de β -caroteno es



UNIVERSIDAD DE CUENCA

el Tween 20, que debido a sus propiedades emulgentes se consiguió mejor estabilidad y grado de dispersión de la emulsión formada en la técnica.

- Se aplicó la técnica estandarizada a diez extractos, cuatro extractos almacenados en el laboratorio de Fitoquímica del Proyecto de Plantas Medicinales VLIR-IUC (VG 1, PM 1, PM 2 Y MA 1) y a seis extractos frescos obtenidos en el mismo laboratorio (VG 1, VG 2, PM 1, PM 2, MA 1 y MA 2), así la actividad antioxidante de estos extractos y sus respectivos IC50 revelaron que en los extractos almacenados la actividad antioxidante es menor que los extractos frescos, lo que nos indica una disminución del poder antioxidante de los extractos almacenados con el paso del tiempo, además que se corroboró según los resultados que los vegetales presentaron un elevado contenido de carotenoides y alto poder antioxidante, teniendo como mayores exponentes al pimiento rojo y la zanahoria. De esta manera se comprobó que la técnica estandarizada es aplicable a varios extractos de diferente fuente vegetal extendiendo así el campo de estudio.
- Se realizó la cuantificación de carotenoides totales en los extractos analizados y los resultados demostraron una relación logarítmica con respecto a la actividad antioxidante $R^2 = 0,9839$, lo que significa que la actividad antioxidante será mayor mientras la muestra tenga un mayor contenido de carotenoides que se resume en que la actividad antioxidante tiene una relación positiva con el contenido total de carotenoides.

4.2 RECOMENDACIONES

Tomar este trabajo de investigación como punto de partida para futuros proyectos en los cuales se analice los resultados de actividad antioxidante con la técnica del blanqueamiento del β -caroteno considerando otras variables como la temperatura y pH que pueden causar inestabilidad de la emulsión al momento de la aplicación de la técnica.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abril, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez, F., & Túnez, I. (2008). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Febrero 17, 2017, de Universidad de Rabanales.
2. Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C., & Morales, E. (2009, agosto). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, v.32 n.2, pp.126-134.
3. Barros, L., Ferreira, M., Queirós, B., Ferreira, I., & Baptista, P. (2006, julio 17). *Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities*. *Food Chemistry*, vol. 103, 413–419. 2017, febrero 18, De Elsevier Base de datos.
4. Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (*Lamiaceae*) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*, vol. 6(9), pp.760-766.
5. Biehler, E., Mayer, F., Hoffman, L., Krause, E., & Bohn, T. (2010). Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*, Vol. 75, Nr. 1, p.55. Noviembre 18, 2016, De Institute of Food Technologists Base de datos.
6. Boonsong, S., Klaypradit, W., & Wilaipun, P. (2016, junio 9). *Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants*. *Agriculture and Natural Resources*, vol. 50, pp. 89-97.
7. Burgos, J., & Calderón, F. (2009). *Determinación del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de san salvador*. El Salvador: Universidad de El Salvador.
8. Cajamar. (2015). *¿Que son las microalgas?* Enero 28, 2017, de Grupo Cooperativo Cajamar Sitio web: <http://www.fundacioncajamar.es/pdf/bd/comun/transferecia/microalgas-1444391623.pdf>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

9. Calín, A., & Carbonell, A. (2003). *Punicalagina antioxidante del zumo y extracto de granada, en la alimentación funcional del futuro*. Universidad Miguel Hernández, España. Universitas Miguel Hernández. Pp.35-37.
10. Criado, C., & Moya, M. (2009). *Vitaminas y Antioxidantes*. Noviembre 17, 2016, de EL MEDICO Sitio web: http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf
11. Criollo Sumba, K. P., & Molina Fernández, N. J. (2016). *Tesis*. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25980>
12. Dawidowicz, A., & Olszowy, M. (2010, Abril 20). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by betacarotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *Eur Fodd res Technol*, 231:835-840, pp.835-839.
13. Dere, S., Güneş, T., & Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr. J. of Botany*, vol 22, pp.13-17.
14. Espinoza, L. (2014). *Bioactividad de extractos fenólicos de la testa de J. curcas no tóxica*. Febrero 17, 2017, de centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa.
15. Faulí & Trillo. (1993). *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid, España: LUZAN 5-S.A.DE EDITORES.
16. Gómez, J., García, T., Gómez, V., Garbayo, I., & Vílchez, C. (2008). Las microalgas, nuevos caminos hacia alimentos funcionales. Febrero 17, 2017, de Universidad de Huelva.
17. Guerrero, M., Rodríguez, H., Vargas, A., Gonzales, M., Campo, J., Moreno, J., & Ribas, J. (2002). *Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial*. Febrero 18, 2017, de Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC.
18. Guzmán, A., Velásquez, A., & Sierra, M. (2006, diciembre). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, Vol. 14, No. 4, pp.1-5.
19. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856, pp. 1841-1848. Noviembre 18, 2016, De American Chemical Society Base de datos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

20. Ismail, A., & Hong, T. (2002). Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds. *Mal J Nutr*, vol. 8(2), pp.167-177.
21. Jaeger, L., Barros, P., Oliveira, R., Pacheco, S., Fernández, P., Viana, J., Nutti, N., Lima, A., Rodríguez, A., & Rabelo, S. (2011, julio 28). *Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study*. *Food Research International*, vol. 47, 337–340. 2017, febrero 17, De ELSEVIER Base de datos.
22. Kulišić, T., Dragović, V., & Miloš, M. (2006). Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 44(4), pp.485-492.
23. Lai, H., & Lim, Y. (2011, diciembre). Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts os Selected Ferns in Malaysia. *Internacional Journal of Enviroment Science and Development*, Vol. 2. N° 6, pp.442-445. Noviembre 18, 2016, De Monash University Sunway Campus Base de datos.
24. Lichtenthaler, H., & Buschmann, C. (2001). *Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy*. Noviembre 18, 2016, de Wiley Online Library Sitio web: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.faf0403s01/abstract?useRlsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage>
25. Magalhaes, L., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, pp. 1-19.
26. Méndez, V., Gonzales, D., & Gutiérrez, A. (2005, julio-diciembre). *Contenido de carotenoides y color extractable de nuevos cultivares en chile pimienta*. *Revista Chapingo serie horticultura*, vol. 11, núm. 2, pp. 215-218.
27. Moraes de Souza, R., Oldoni, T., Reginato d'Arce, M., & Alencar, S. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cien. Technol. Aliment.*, vol 6(1), pp.41-467.
28. Muñoz, M., & Gutiérrez, D. (2008). *Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca**. Enero 28, 2017, de Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Sitio web: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/7VeranoUAQ/14MunozJuarez.pdf>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

29. Ndhkala, A., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Blomelocules. *Journal Molecules*, 15, 6905-6930, pp.6906-6922. Noviembre 18, 2016, De MDPI Base de datos.
30. Ordoñez, A. (2006). Determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, vol 97, pp.452-458.
31. Oscanoa, J. (2005). *Estudio Fármaco - Botánico de Desmodium molliculum*. Enero 28, 2017, de Botanical On-line Sitio web: <http://www.botanical-online.com/col/manapuya.htm>
32. Pamplona, J. (2006). *Salud por los alimentos*. Madrid, España: Editorial Safeliz. Pp. 188-189.
33. Pérez, M., Vargas, R., Martínez, F., García, E., & Hernández, B. (2003). *Actividad antioxidante de los alcaloides de Bocconia arborea. Estudio sobre seis métodos de análisis*. *Ars Pharmaceutica*, vol. 44:1, pp. 5-21.
34. Pozo, A. (2010). *Producción y valorización de biomasa de algas: un enfoque en refinería*. Salamanca, España: Ediciones Universidad de Salamanca. Pp. 247-249.
35. Prieto, M., Rodríguez, I., Vázquez, J., & Murado, M. (2012). B-carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8983-8993, pp.8983-8985. Noviembre 18, 2016, De American Chemical Society Publications Base de datos.
36. Ramazan, M., Pinar, I., & Havser, E. (2011). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Gagea fibrosa and Romulea ramiflora. *Iran Journal Chemistry*, Vol. 30, N° 3, pp.57-60. noviembre 18, 2016, De SID Base de datos.
37. Sahabi, D., Shehu, R., Saidu, Y., & Abdullahi, A. (2012, septiembre). Screening for Total Carotenoids and β -Carotene in Some Widely-Consumed Vegetables in Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 20(3): 225-227, pp.225-227.
38. Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., & Ercisli, S. (2009, enero). *Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.22, No.1, pp.102-106.
39. Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Los Ángeles, California: Universitat Jaume. Pp.529-531.
40. Veliglou, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Juornal*



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Agric. Food Chem.*, 46, pp.4413-4115. noviembre 18, 2016, De American Chemical Society Base de datos.
41. Venereo, J. (2002, junio). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Revista Cubana de Medicina Militar, v.31 n.2, pp.1-5.
 42. Wannes, W., & Marzouk, B. (2016, enero 8). *Characterization of myrtle seed (Myrtus communis var. baetica) as a source of lipids, phenolics, and antioxidant activities*. Journal of food and drug analysis, vol. 24, pp. 316-323.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXOS

Anexo A: Preparación de las Soluciones Estándar de BHT.

1. Pesar aproximadamente 1 mg de BHT en una Balanza Analítica con 0,1 mg de precisión.
2. Diluir el BHT pesado en 2 mL de una mezcla de solventes Metanol – DCM (95:5) para obtener una solución madre de 500 ug / mL
3. Realizar los cálculos y soluciones correspondientes a las concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5 ug / mL de BHT en Metanol – DCM (95:5), a partir de las siguientes fórmulas:

Factor de Dilución.

$$FD = \frac{Ci \text{ (Conc. inicial solución)}}{Cf \text{ (Conc. Final)}}$$

Volumen de Alícuota a tomar de la solución estándar.

$$VA = \frac{Vf \text{ (Vol. Final Solución)}}{FD \text{ (Factor de Dilución)}}$$

a) Solución estándar BHT 100 ug / mL

$$FD = \frac{500 \text{ ug/mL}}{100 \text{ ug/mL}} = 5$$

$$VA = \frac{3 \text{ mL}}{5} = 0,6 \text{ mL}$$

Se toma una alícuota de 0,6 mL de la solución 500 ug / mL y se agrega 2,4 mL de la mezcla Metanol – DCM (95:5) para obtener un volumen final de 3 mL de solución final 100 ug / mL.

b) Solución estándar BHT 50 ug / mL

$$FD = \frac{100 \text{ ug/mL}}{50 \text{ ug/mL}} = 2$$

$$VA = \frac{3 \text{ mL}}{2} = 1,5 \text{ mL}$$

Se toma una alícuota de 1,5 mL de la solución 100 ug / mL y se agrega 1,5 mL de la mezcla Metanol – DCM (95:5) para obtener un volumen final de 3 mL de solución final 50 ug / mL.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

c) Solución estándar BHT 25 ug / mL

$$FD = \frac{50 \text{ ug/mL}}{25 \text{ ug/mL}} = 2$$

$$VA = \frac{3 \text{ mL}}{2} = 1,5 \text{ mL}$$

Se toma una alícuota de 1,5 mL de la solución 50 ug / mL y se agrega 1,5 mL de la mezcla Metanol – DCM (95:5) para obtener un volumen final de 3 mL de solución final 25 ug / mL.

d) Solución estándar BHT 12,5 ug / mL

$$FD = \frac{25 \text{ ug / mL}}{12,5 \text{ ug/mL}} = 2$$

$$VA = \frac{3 \text{ mL}}{2} = 1,5 \text{ mL}$$

Se toma una alícuota de 1,5 mL de la solución 25 ug / mL y se agrega 1,5 mL de la mezcla Metanol – DCM (95:5) para obtener un volumen final de 3 mL de solución final 12,5 ug / mL.

Anexo B: Diluciones de las Fases Etéreas en la Cuantificación de Carotenoides.

Una vez obtenida la fase etérea se prosiguió de la siguiente manera las diluciones en éter de petróleo.

Código de Extracto	Diluciones de la Fase Etérea				
VG 1	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL	0,62 mg / mL	0,31 mg / mL
VG 2	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL	0,62 mg / mL	
PM 1	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL		
PM 2	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL	0,62 mg / mL	
MA 1	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL		
MA 2	5 mg / mL	2,5 mg / mL	1,25 mg / mL		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo C: Datos y Cálculo de la Actividad Antioxidante del Estándar BHT y Extractos Lipofílicos en la Estandarización de la Técnica de Blanqueamiento del Betacaroteno con el Uso de Tween 20 o Tween 80.

a) Estándar BHT.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BHT - TWEEN 20									
Estándar BHT ug / ml	Abs estándar BHT 0	Abs Estándar BHT 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio %AA	Desv. Estándar
100 1	0,145	0,131	0,148	0,047	0,0017	0,0191	91,1482	91,3221	0,1684
100 2	0,143	0,138	0,147	0,048	0,0016	0,0187	91,4843		
100 3	0,144	0,131	0,146	0,045	0,0016	0,0182	91,3338		
50 1	0,144	0,116	0,148	0,047	0,0032	0,0191	83,3758	83,6750	0,2832
50 2	0,144	0,12	0,147	0,048	0,0030	0,0187	83,7101		
50 3	0,143	0,12	0,146	0,045	0,0029	0,0182	83,9389		
25 1	0,142	0,094	0,148	0,047	0,0062	0,0191	67,6688	67,3756	0,3687
25 2	0,141	0,098	0,147	0,048	0,0061	0,0187	67,4962		
25 3	0,142	0,099	0,146	0,045	0,0060	0,0182	66,9617		
12,5 1	0,142	0,071	0,148	0,047	0,0116	0,0191	39,5721	39,7336	0,1780
12,5 2	0,143	0,073	0,147	0,048	0,0112	0,0187	39,9244		
12,5 3	0,141	0,073	0,146	0,045	0,0110	0,0182	39,7043		

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BHT - TWEEN 20				
Estándar BHT ug / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
100 1	93,306	91,550	90,721	90,462
100 2	93,030	91,359	90,570	90,358

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

100 3	93,664	91,680	90,873	90,636
50 1	82,849	80,731	80,605	82,470
50 2	82,137	80,285	81,582	82,265
50 3	83,540	80,756	80,646	81,630
25 1	64,559	65,168	62,384	65,365
25 2	63,609	64,877	62,312	63,336
25 3	62,155	64,934	62,141	65,177
12,5 1	44,580	41,044	40,759	39,944
12,5 2	43,525	41,032	41,156	39,363
12,5 3	43,443	41,547	41,321	39,249

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BHT - TWEEN 80									
Estándar BHT ug / ml	Abs estándar BHT 0	Abs Estándar BHT 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio % AA	Desviación estándar σ
100 1	0,156	0,108	0,154	0,048	0,0056	0,0194	70,8063	70,9246	0,5188
100 2	0,154	0,11	0,153	0,047	0,0056	0,0196	71,4924		
100 3	0,156	0,111	0,152	0,043	0,0056	0,0192	70,4752		
50 1	0,153	0,096	0,154	0,048	0,0077	0,0196	60,0180	60,7832	0,8064
50 2	0,151	0,092	0,153	0,047	0,0075	0,0196	61,6254		
50 3	0,151	0,096	0,152	0,043	0,0075	0,0192	60,7061		
25 1	0,153	0,086	0,154	0,048	0,0090	0,0194	53,5234	54,4949	0,9523
25 2	0,154	0,094	0,153	0,047	0,0087	0,0196	55,4268		
25 3	0,152	0,09	0,152	0,043	0,0087	0,0192	54,5345		
12,5 1	0,151	0,077	0,154	0,048	0,0112	0,0194	42,2283	42,9814	1,3994
12,5 2	0,15	0,072	0,153	0,047	0,0108	0,0196	44,5961		

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

12,5 3	0,152	0,078	0,152	0,043	0,0111	0,0192	42,1199		
--------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	---------	--	--

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BHT - TWEEN 80				
Estándar BHT ug / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
100 1	76,578	75,585	74,069	70,806
100 2	77,265	76,981	75,009	71,492
100 3	76,055	75,908	74,566	70,475
50 1	66,805	66,277	64,557	60,018
50 2	67,765	67,675	65,525	61,625
50 3	65,597	66,363	64,710	60,706
25 1	57,305	56,496	52,474	53,523
25 2	56,326	55,522	50,792	55,426
25 3	56,050	56,909	51,761	54,534
12,5 1	43,528	41,814	43,769	42,228
12,5 2	45,521	40,030	45,205	44,596
12,5 3	46,053	41,442	42,618	42,119

b) Extracto VG 1 PIMIENTO ROJO

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO ROJO											
Extr. P.Rojo mg / ml	Abs Rojo	P. 0min	Abs Rojo	P. 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio \bar{X}	Desviación estándar σ
1	0,834		0,723		0,157	0,049	0,0024	0,0194	87,7344	87,6984	0,1239
1	0,875		0,762		0,155	0,051	0,0023	0,0185	87,5605		

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1	0,912	0,786	0,159	0,047	0,0025	0,0203	87,8004		
0,75	0,687	0,551	0,157	0,049	0,0037	0,0194	81,0551		
0,75	0,755	0,606	0,155	0,051	0,0037	0,0185	80,2233		
0,75	0,772	0,611	0,159	0,047	0,0039	0,0203	80,8093	80,6959	0,4273
0,5	0,542	0,382	0,157	0,049	0,0058	0,0194	69,9555		
0,5	0,574	0,409	0,155	0,051	0,0056	0,0185	69,5111		
0,5	0,58	0,406	0,159	0,047	0,0059	0,0203	70,7345	70,0671	0,6193
0,25	0,353	0,203	0,157	0,049	0,0092	0,0194	52,4863		
0,25	0,351	0,208	0,155	0,051	0,0087	0,0185	52,9284		
0,25	0,362	0,2	0,159	0,047	0,0099	0,0203	51,3170	52,2439	0,8326

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO ROJO				
Extr. P.Rojo mg / ml	%AA 15'	%AA 30'	%AA 45'	%AA 60'
1	94,788	98,945	90,147	87,734
1	95,015	98,948	89,354	87,561
1	93,919	98,935	89,737	87,800
0,75	88,305	99,151	80,587	81,055
0,75	87,970	99,147	81,934	80,223
0,75	87,847	99,146	81,968	80,809
0,5	83,885	99,404	74,811	69,956
0,5	83,647	99,402	74,854	69,511
0,5	84,036	99,405	73,355	70,735
0,25	70,867	99,647	58,768	52,486
0,25	70,565	99,646	57,816	52,928



UNIVERSIDAD DE CUENCA

0,25	70,570	99,646	58,168	51,317
------	--------	--------	--------	--------

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO ROJO- TWEEN 80									
Extr. P.Rojo mg / ml	Abs Rojo 0min	Abs P. Rojo 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio X̄	Desviación estándar σ
1	0,939	0,88	0,174	0,04	0,0011	0,0245	95,5860	94,7252	0,8559
1	0,948	0,872	0,175	0,036	0,0014	0,0264	94,7153		
1	0,942	0,865	0,173	0,043	0,0014	0,0232	93,8743		
0,75	0,752	0,631	0,174	0,04	0,0029	0,0245	88,0674	89,4914	1,2958
0,75	0,759	0,646	0,175	0,036	0,0027	0,0264	89,8055		
0,75	0,742	0,651	0,173	0,043	0,0022	0,0232	90,6012		
0,5	0,552	0,423	0,174	0,04	0,0044	0,0245	81,8950	80,2502	1,7826
0,5	0,554	0,407	0,175	0,036	0,0051	0,0264	80,4997		
0,5	0,542	0,401	0,173	0,043	0,0050	0,0232	78,3560		
0,25	0,389	0,225	0,174	0,04	0,0091	0,0245	62,7610	64,3158	3,1297
0,25	0,377	0,227	0,175	0,036	0,0085	0,0264	67,9184		
0,25	0,372	0,22	0,173	0,043	0,0088	0,0232	62,2678		

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO ROJO TWEEN80				
Extr. P.Rojo mg / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
1	99,339	97,643	96,091	95,586
1	98,534	95,689	95,323	94,715
1	98,884	94,966	94,279	93,874
0,75	84,802	85,586	86,801	88,067

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

0,75	86,147	88,960	89,484	89,805
0,75	91,169	90,279	90,813	90,601
0,5	81,498	81,624	82,421	81,895
0,5	81,910	81,891	82,095	80,500
0,5	76,167	69,821	74,278	78,356
0,25	68,153	66,390	64,228	62,761
0,25	75,413	73,335	67,577	67,918
0,25	66,458	64,113	62,459	62,268

c) Extracto VG 3 PIMIENTO VERDE

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO VERDE-TWEEN 20									
Extr. P.Verde mg / ml	Abs P. Verde 0 min	Abs P. Verde 60 min	Abs Control 0	Abs Control 15 min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio \bar{X}	Desviación estándar σ
3	0,721	0,514	0,174	0,037	0,0056	0,0258	78,1404	78,7185	0,5205
3	0,72	0,522	0,173	0,037	0,0054	0,0257	79,1501		
3	0,725	0,525	0,175	0,038	0,0054	0,0255	78,8650		
2	0,483	0,271	0,174	0,037	0,0096	0,0258	62,6714	62,1512	0,4535
2	0,491	0,273	0,173	0,037	0,0098	0,0257	61,9436		
2	0,48	0,268	0,175	0,038	0,0097	0,0255	61,8387		
1	0,338	0,174	0,174	0,037	0,0111	0,0258	57,1104	58,0068	0,7983
1	0,335	0,176	0,173	0,037	0,0107	0,0257	58,2691		
1	0,331	0,176	0,175	0,038	0,0105	0,0255	58,6410		
0,5	0,255	0,107	0,174	0,037	0,0145	0,0258	43,9045	42,9666	0,8164
0,5	0,257	0,106	0,173	0,037	0,0148	0,0257	42,5796		
0,5	0,253	0,105	0,175	0,038	0,0147	0,0255	42,4156		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO VERDE-TWEEN 20				
Extr. P. Verde mg / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
3	90,231	85,438	81,102	78,140
3	91,670	85,527	80,470	79,150
3	90,597	84,848	80,966	78,865
2	86,926	79,158	70,433	62,671
2	87,244	80,100	70,393	61,944
2	87,366	79,827	70,088	61,839
1	75,978	70,788	62,907	57,110
1	75,289	70,728	62,375	58,269
1	75,458	70,708	61,205	58,641
0,5	68,343	63,876	58,435	43,905
0,5	68,848	63,566	58,217	42,580
0,5	68,140	62,599	58,409	42,416

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO VERDE-TWEEN 80											
Extr. P. Verde mg / ml	Abs Verde min	P. 0	Abs Verde min	P. 60	Abs Control 0	Abs Control 60 min	DR estandar	DR control	% AA	Promedio X	Desviación estándar σ
3	0,619		0,441		0,17	0,047	0,00557003	0,02142751	74,0052214		
3	0,614		0,447		0,167	0,05	0,00529061	0,02009951	73,6779421		
3	0,612		0,441		0,17	0,048	0,00546146	0,02107662	74,0876108	73,9236	0,2167
2	0,44		0,262		0,17	0,047	0,0086405	0,02142751	59,6756593	59,3386	1,3085

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2	0,437	0,263	0,167	0,05	0,00846299	0,02009951	57,8945726		
2	0,437	0,268	0,17	0,048	0,00833672	0,02107662	60,4456439		
1	0,313	0,150	0,17	0,047	0,01160579	0,02142751	45,8369906		
1	0,316	0,156	0,167	0,05	0,01176477	0,02009951	41,4673886		
1	0,315	0,159	0,17	0,048	0,01160545	0,02107662	44,9368772	44,0804	2,3073
0,5	0,234	0,109	0,17	0,047	0,01335601	0,02142751	37,6688644		
0,5	0,232	0,100	0,167	0,05	0,01353347	0,02009951	32,6676584		
0,5	0,231	0,106	0,17	0,048	0,01330045	0,02107662	36,894794	35,7438	2,6920

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRACTO DCM PIMIENTO VERDE-TWEEN 80					
Extr.	P.Verde	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
3		88,321	86,546	81,575	74,005
3		86,192	87,035	81,686	73,678
3		87,780	86,510	79,461	74,088
2		82,659	83,602	70,077	59,676
2		81,523	84,338	70,074	57,895
2		85,875	82,842	67,663	60,446
1		77,922	71,821	62,377	45,837
1		72,760	70,485	61,968	41,467
1		71,544	70,709	59,273	44,937
0,5		57,882	51,358	43,555	37,669
0,5		54,138	52,389	44,042	32,668
0,5		60,716	47,984	42,540	36,895



UNIVERSIDAD DE CUENCA

d) Extracto PM 1 CARNE HUMANA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PM 1 HOJAS - TWEEN 20									
PM 1 mg / ml	Abs PM 1 0min	Abs PM 1 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estandar	DR control	% AA	Promedio %AA	Desviación estándar σ
3	0,652	0,481	0,15	0,06	0,0050	0,0153	67,4820	66,8318	0,5706
3	0,654	0,485	0,151	0,062	0,0050	0,0148	66,4147		
3	0,655	0,487	0,153	0,063	0,0049	0,0148	66,5987		
2,5	0,542	0,364	0,15	0,06	0,0066	0,0153	56,5518	56,1278	0,3901
2,5	0,544	0,367	0,151	0,062	0,0066	0,0148	55,7839		
2,5	0,545	0,369	0,153	0,063	0,0065	0,0148	56,0478		
2	0,477	0,285	0,15	0,06	0,0086	0,0153	43,7922	44,0187	0,2229
2	0,474	0,288	0,151	0,062	0,0083	0,0148	44,0264		
2	0,474	0,289	0,153	0,063	0,0082	0,0148	44,2377		
1	0,264	0,122	0,15	0,06	0,0119	0,0153	21,8439	21,6643	0,5779
1	0,262	0,131	0,151	0,062	0,0116	0,0148	22,1310		
1	0,262	0,13	0,153	0,063	0,0117	0,0148	21,0180		

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PM 1 HOJAS - TWEEN 20				
PM 1 mg / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
3	76,638	74,222	71,467	67,482
3	76,383	74,719	70,474	66,415
3	77,615	73,030	70,527	66,599
2,5	72,492	62,090	58,674	56,552



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2,5	72,235	62,162	56,662	55,784
2,5	72,176	60,739	56,039	56,048
2	59,645	54,151	49,876	43,792
2	59,549	55,921	51,175	44,026
2	58,896	53,066	50,319	44,238
1	48,051	37,359	33,065	21,844
1	50,686	39,356	34,403	22,131
1	48,173	34,772	31,772	21,018

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PM 1 HOJAS - TWEEN 80 ENSAYO 1

PM 1 mg / ml	Abs PM 1 0min	Abs PM 1 60min	Abs Control 0	Abs Control 60min	DR estándar	DR control	% AA	Promedio %AA	Desviación estándar σ
3	0,643	0,431	0,198	0,068	0,0067	0,0178	62,5700	61,7545	0,7974
3	0,643	0,432	0,195	0,069	0,0066	0,0173	61,7170		
3	0,649	0,436	0,194	0,07	0,0066	0,0170	60,9766		
2,5	0,556	0,335	0,198	0,068	0,0084	0,0178	52,5957	51,2400	1,3255
2,5	0,553	0,333	0,195	0,069	0,0085	0,0173	51,1773		
2,5	0,553	0,332	0,194	0,07	0,0085	0,0170	49,9469		
2	0,455	0,229	0,198	0,068	0,0114	0,0178	35,7596	33,8988	1,6156
2	0,452	0,220	0,195	0,069	0,0116	0,0173	32,8534		
2	0,451	0,228	0,194	0,07	0,0114	0,0170	33,0835		
1	0,297	0,111	0,198	0,068	0,0158	0,0178	11,2242	11,9838	0,7813
1	0,292	0,118	0,195	0,069	0,0151	0,0173	12,7851		
1	0,292	0,119	0,194	0,07	0,0150	0,0170	11,9420		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PM 1 HOJAS - TWEEN 80				
PM 1 mg / ml	% AA 15'	% AA 30'	% AA 45'	% AA 60'
3	69,626	66,800	63,422	62,570
3	70,204	68,346	65,403	61,717
3	62,640	66,953	62,473	60,977
2,5	55,220	54,932	48,839	52,596
2,5	53,898	57,024	52,898	51,177
2,5	54,975	58,878	48,840	49,947
2	46,319	42,776	36,010	35,760
2	41,805	43,683	39,377	32,853
2	42,006	43,710	36,518	33,084
1	20,232	17,365	12,553	11,224
1	19,601	16,903	14,742	12,785
1	21,735	20,818	13,477	11,942

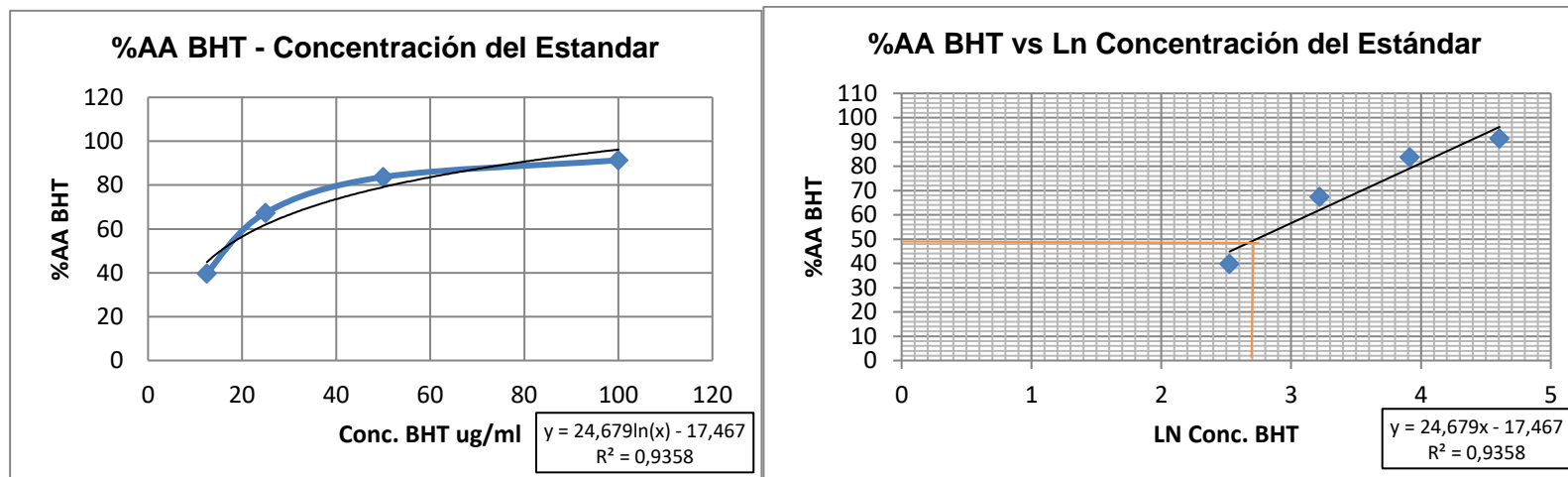
Anexo D Gráficas para el Cálculo del IC50 de BHT y Extractos Lipofílicos Almacenados y Frescos. EXTRACTOS ALMACENADOS

AUTORES: Claudia Daniela León García
Peter Xavier Reyes Zaquinaula



UNIVERSIDAD DE CUENCA

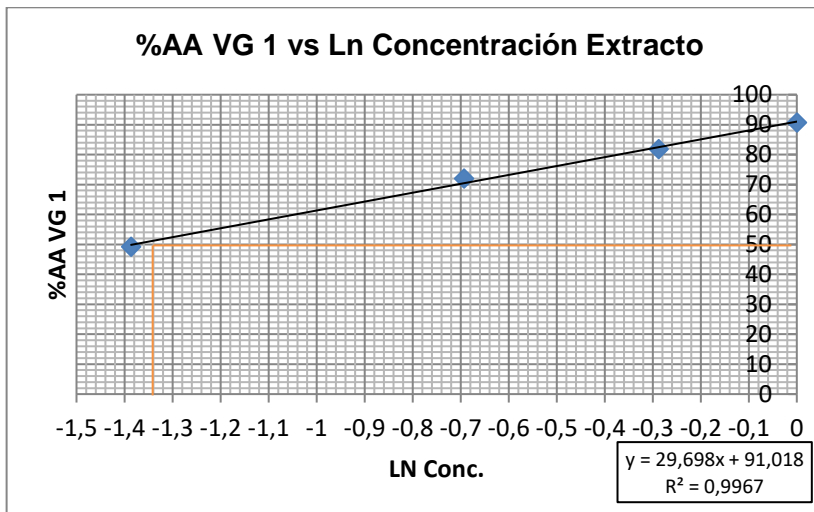
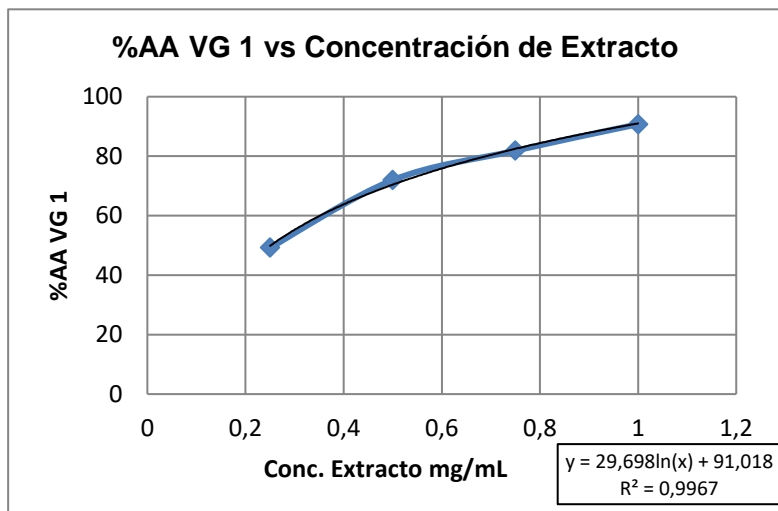
a) Estándar BHT



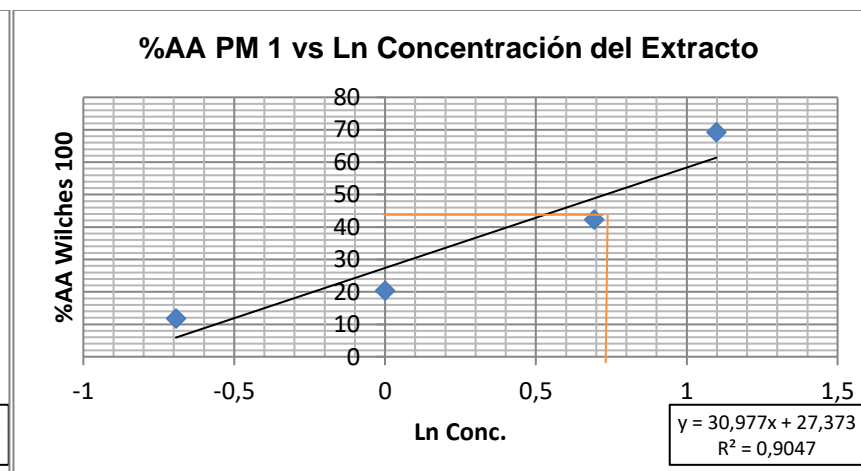
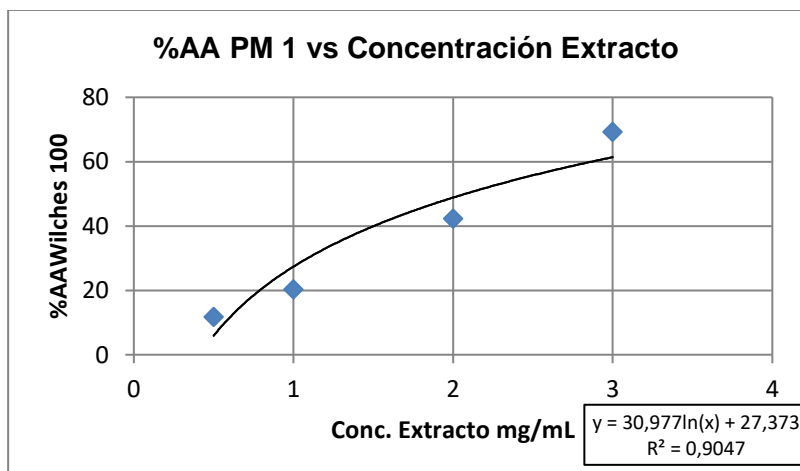
b) Extracto VG 1 PIMIENTO ROJO.



UNIVERSIDAD DE CUENCA



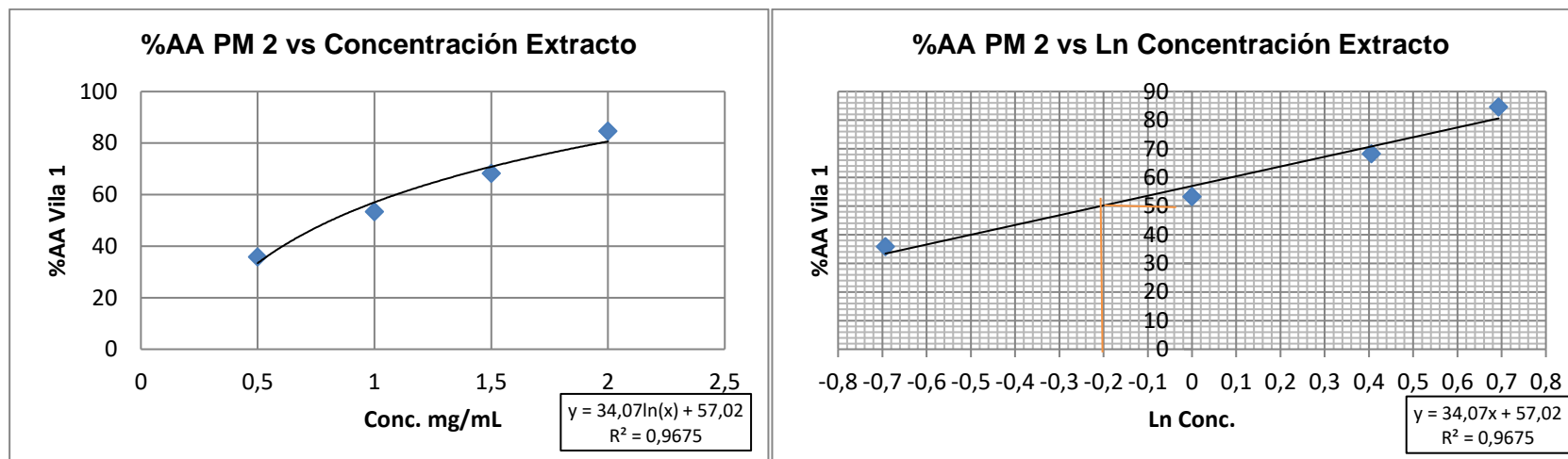
c) Extracto PM 1 CARNE HUMANA





UNIVERSIDAD DE CUENCA

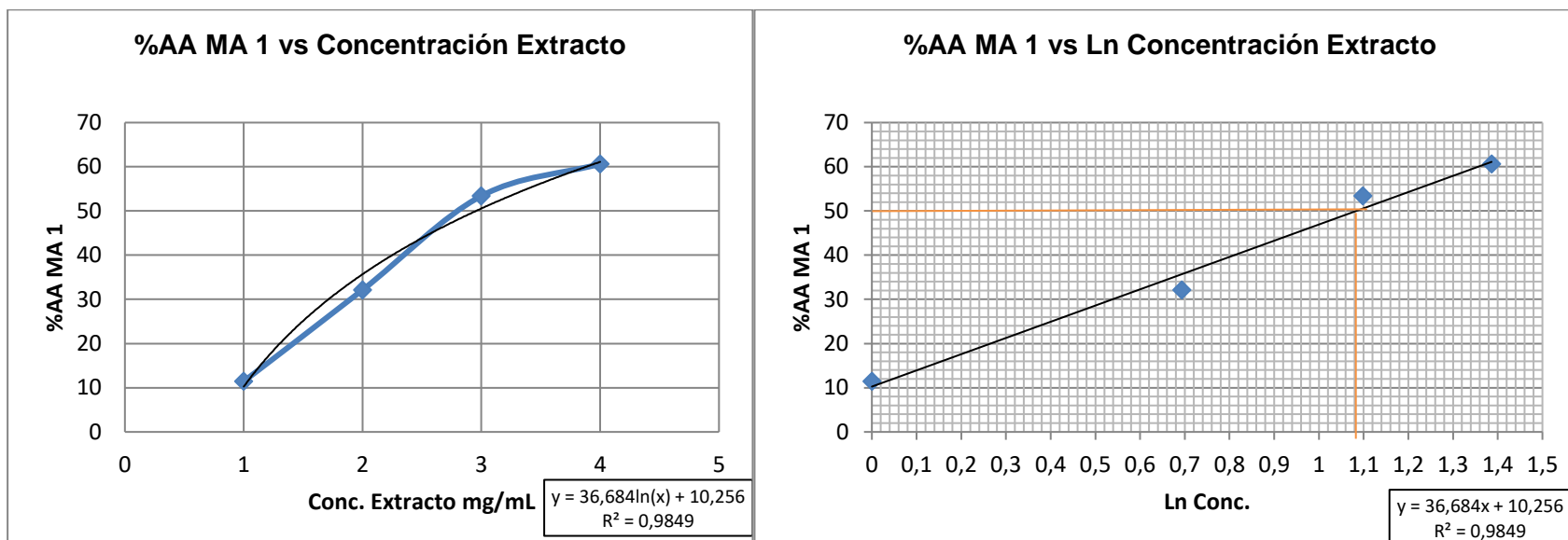
d) Extracto PM 2 HIERBA DEL INFANTE



e) Extracto MA 1 MICROALGA VERDE



UNIVERSIDAD DE CUENCA

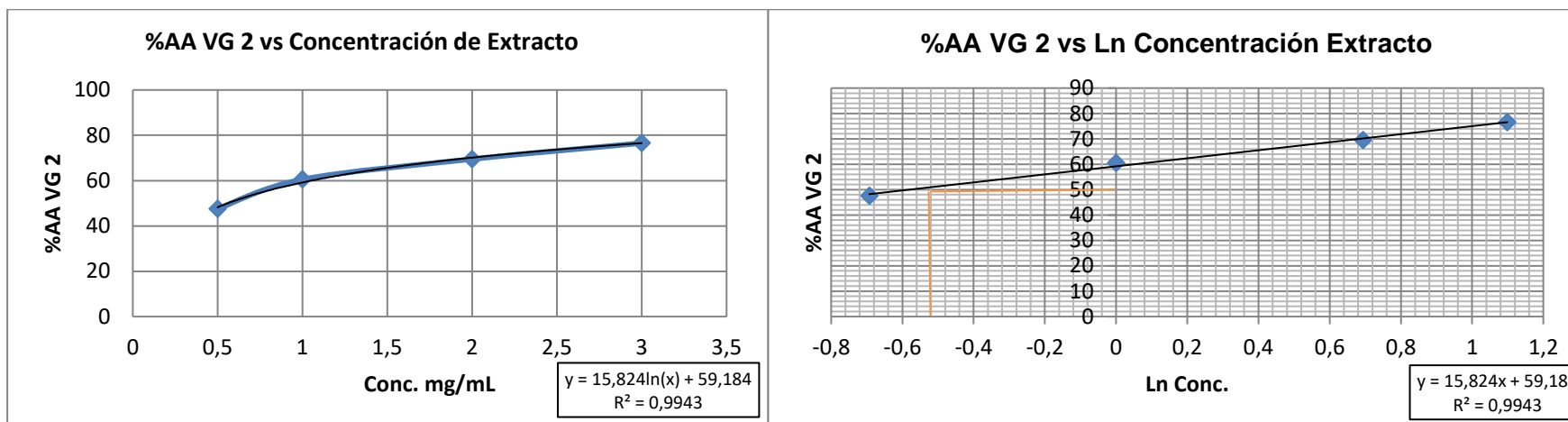


EXTRACTOS FRESCOS

a) Extracto VG 2 ZANAHORIA



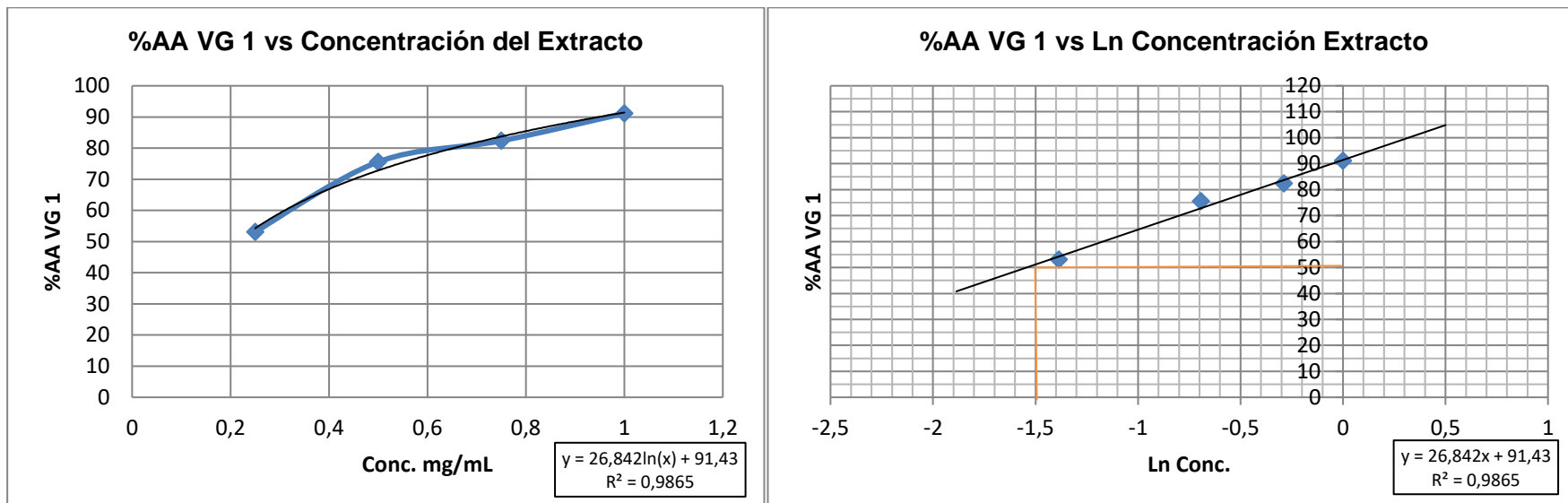
UNIVERSIDAD DE CUENCA



b) Extracto VG 1 PIMIENTO ROJO



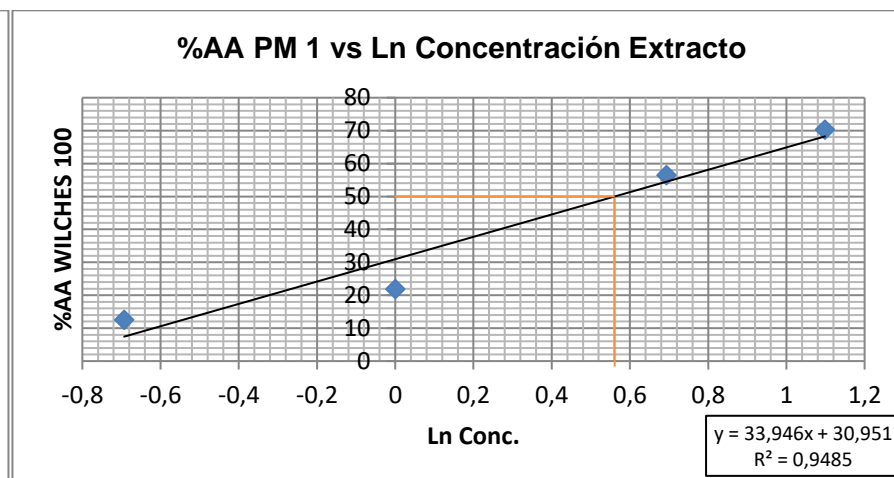
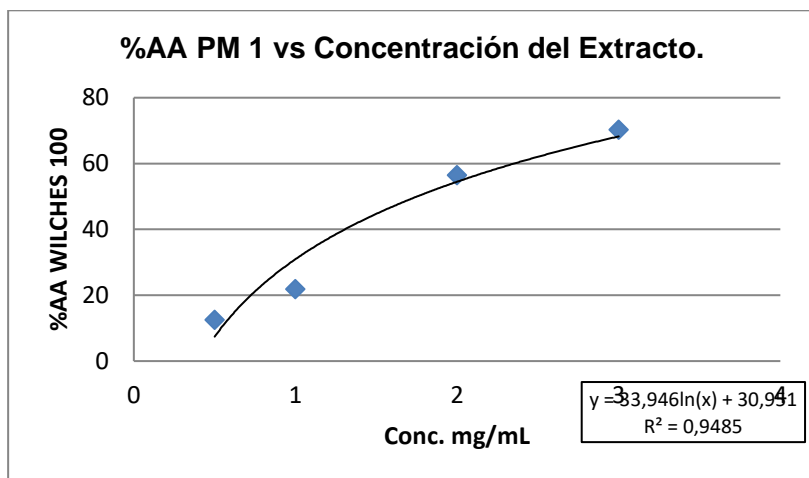
UNIVERSIDAD DE CUENCA



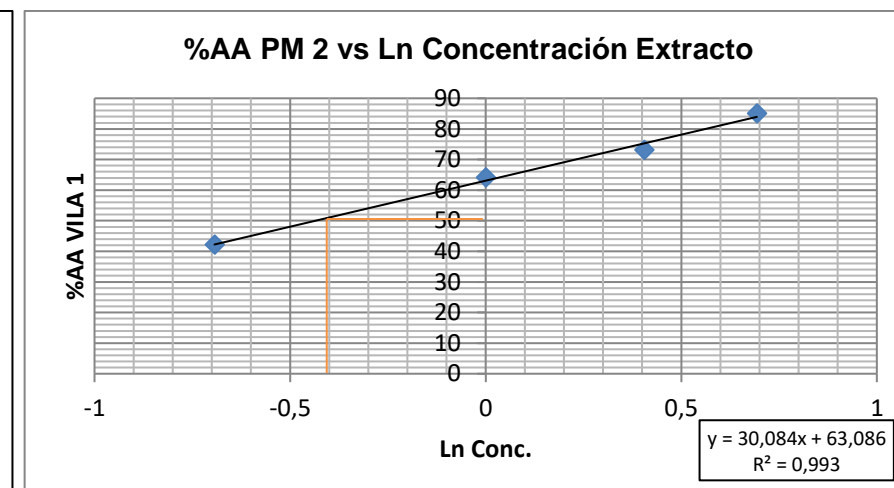
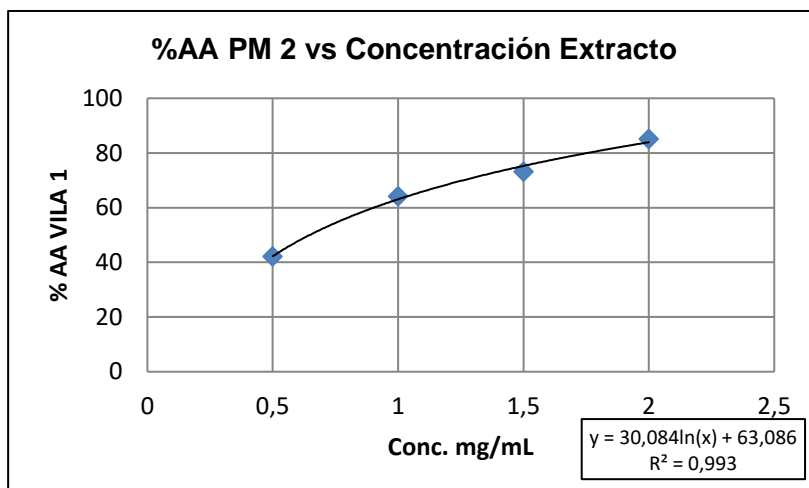
c) Extracto PM 1 CARNE HUMANA



UNIVERSIDAD DE CUENCA



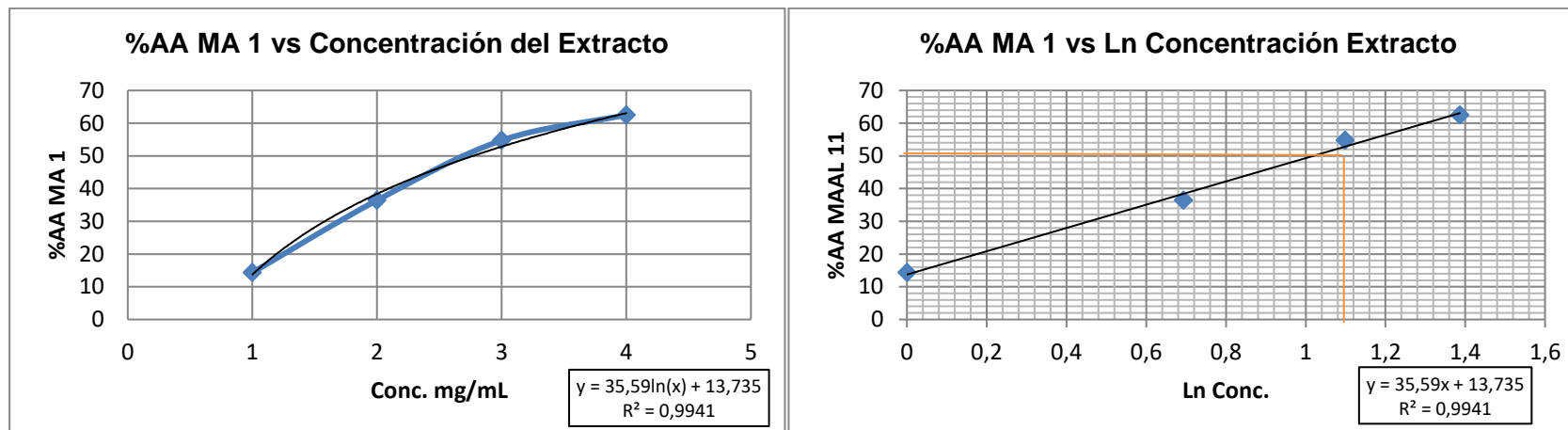
d) Extracto PM 2 HIERBA DEL INFANTE.





UNIVERSIDAD DE CUENCA

e) Extracto MA 1 MICROALGA SCENEDESMUS



f) Extracto MA 2 MICROALGA NARANJA



UNIVERSIDAD DE CUENCA

