

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA EN EL JUGO DE FIQUE
(Furcraea sp.)

YURI CÓRDOBA CAMPO
LISBETH ALEXANDRA BENAVIDES CASTILLO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)
POPAYÁN
2010

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA EN EL JUGO DE FIQUE
(*Furcraea sp.*)

YURI CÓRDOBA CAMPO
LISBETH BENAVIDES CASTILLO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director, Ph.D. Fabio Cabezas Fajardo
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Asesor, M.Sc. Fernando Hernández
PROFESOR ASISTENTE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)
POPAYÁN
2010

Nota de Aceptación.

Director

Fabio Antonio Cabezas Fajardo
Ph.D

Jurado

Jaime Martin
Ph. D.

Jurado

Hipólito Izasa
Ph.D

Dedicatoria:

*"Al ser más especial y amoroso,
que ha colmado mi vida de alegrías
y quien es mi mayor bendición, mi mami"*

LISBETH BERNANDES CASTALLO

*Dedico esta tesis de Grado a Dios quien me guio, dio la vida y el entendimiento necesario para mis estudios, mis padres Dámaso Córdoba, Noheми Campo quienes con su sabiduría paciencia y amor me apoyaron cuando más lo necesite, a mis hermanos Adriana y Juan Carlos quienes con sus ideas y anécdotas me ayudaron cuando sentí que el fracaso me agobiaba, a mi novio que con su ayuda incondicional siempre creyó y ha estado junto a mí.
Al Alma Mater que ha forjado durante muchos años personas con calidad profesional y humana, a mis profesores quienes inspiraron y forjaron paso a paso mi ser. Y a mis mascotas que siempre me alegraron en todo momento.*

MURI CORDOBA CAMPO

AGRADECIMIENTOS

De manera muy afectuosa y fraterna doy las gracias a:

Dios por permitirme terminar esta etapa tan importante en mi vida y por regalarme a la mejor mamá del mundo.

El Doctor Fabio Cabezas y al M.Sc. Fernando Hernández por la enriquecedora oportunidad de trabajar junto a ellos, por su entusiasmo y disposición para educar, por sus numerosas e inspiradoras enseñanzas.

A los Doctores Jaime Martin e Hipólito Izasa, por su tiempo y objetiva evaluación del trabajo.

A mi mami, ejemplo de vida, quien me ha brindado todo lo necesario para alcanzar las metas propuestas; a mi abuelita que con su infinito amor ayudó a mi formación y que hoy es un ángel más que me cuida, igualmente a mi familia; a mis hermanos Roberth Andrés, David y Juan Pablo, mis tías Marilú, Hegeli y Gloria, mis tíos Nelson y Arturo, mis primos Paola, Johana, Daniela, Aidaly, Darlin, Rubi, Deisy y Felipe. Y a quienes desde el cielo me acompañan, mi papá, mis abuelitos Hernando y Maurilio, y a Nelson.

A Edison, por su amor, dedicación, compañía y apoyo incondicional en una de las etapas más importantes de mi vida, a su familia por su aceptación y cariño.

A mis compañeros del grupo de investigación QCB, especialmente a Yuri por compartir conmigo toda la carrera, a mis buenos amigos Andrés Vivas, Yohanna Tobar y Lady Carvajal. Gracias por permitirme conocerlos y brindarme su amistad y colaboración en todo momento.

A quienes de una u otra manera colaboraron con la realización de este proyecto, El Doctor Juan Carlos Argoti, M.Sc. Luis Gonzalo Sequeda, M.Sc. Darwin Hoyos y el Lic. José Soto.

A los profesores del Departamento de Química por ayudarme en mi formación profesional y al Grupo de Investigación CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander por su Hospitalidad y aportes para el desarrollo experimental de esta investigación.

LISBETH BENAVIDES CASTILLO

Al terminar un trabajo tan arduo y lleno de obstáculos como el desarrollo de una tesis de grado es necesario mencionar los nombres de algunas personas que volvieron realidad este sueño, por tanto quisiera agradecer a:

Dios por haberme dado la vida y la fuerza necesaria para seguir adelante.

Al Doctor Fabio Antonio Cabezas, al M.Sc. Fernando Hernández excelentes mentores quienes con su paciencia, conocimientos e inigualable profesionalismo han infundido valiosas enseñanzas y al grupo de profesores del Departamento de Química y al grupo de investigación QCB.

A mi compañera y amiga de trabajo Lisbeth Benavides quien me ha acompañado en toda mi carrera.

A los evaluadores de nuestro proyecto Ph. D. Jaime Martin y al Ph.D Hipólito Izasa por su objetividad y disposición de tiempo. A la Doctora Beatriz Jaramillo y al Doctor Juan Carlos Argoti.

A mis padres que han sido un excelente ejemplo a seguir.

A Yohanna Tobar quien con su valiosa amistad y colaboración proporcionó información para el desarrollo de este estudio. Al grupo de investigación CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander. Y a José Andrés Soto Arboleda quien me insistió siempre a seguir a delante con mis estudios, sin importar obstáculo alguno.

YURI CÓRDOBA CAMPO

CONTENIDO

	pág.
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ESQUEMAS	
LISTA DE ECUACIONES	
LISTA DE GRAFICOS	
LISTA DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	22
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GENERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
3. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	26
3.1 EL FIQUE (<i>Furcraea sp.</i>) Y SU CULTIVO	26
3.2 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	31
3.3 ESTRÉS OXIDATIVO	49
3.4 LOS RADICALES LIBRES	51
3.5 ANTIOXIDANTES	54
3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL BIOENSAYO “IN VITRO” ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES	59
3.6.1 Método del DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidracil)	60
3.6.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ * (ácido 2,2´azino bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6))	63
3.6.3 Prueba de Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno (ORAC)	67
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
3.7.1 Diseño de experimentos	71

3.7.2	Diseño factorial	73
3.7.3	Modelos matemáticos	74
3.7.3.1	Diseño 2 ^k factorial	74
3.7.3.2	Diseño Factorial 2 ³	79
3.7.4	Robustez del método	76
3.8	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL	76
3.8.1	Extracción líquido-líquido	76
3.8.2	Extracción en Fase Sólida	77
3.8.3	Cromatografía de Gases (GC)	79
4.	METODOLOGÍA	82
4.1	REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS	82
4.2	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	83
4.3	RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA	83
4.4	EXTRACCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL JUGO DE FIQUE PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA	84
4.4.1	Extracción líquido-líquido	84
4.4.2	Extracción por SPE	87
4.4.3	Tamizaje fitoquímico	88
4.5	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL BIOENSAYO "IN VITRO": ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES	89
4.5.1	Ensayo de Decoloración del Radical DPPH*	89
4.5.2	Determinación del efecto antioxidante de las fracciones del Jugo de Fique usando el Ensayo de Decoloración del Cation-Radical ABTS ⁺ *	91
4.5.3	Ensayo de la Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno (ORAC)	93
4.6	IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES EN LAS FRACCIONES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA POR LA TÉCNICA ANALÍTICA CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR DE MASAS	94
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
5.1	DISEÑO DE EXPERIMENTOS 2 ³	96
5.2	TAMIZAJE FITOQUIMICO	103
5.3	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	104

5.4	MÉTODO DEL DPPH*	105
5.5	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DEL JUGO DE FIQUE USANDO EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS ⁺ *	112
5.6	PRUEBA DE CAPACIDAD DE ABSORBANCIA DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO (ORAC)	114
5.7	DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA EN LAS FRACCIONES DE n-BuOH POR CG-MS	124
	CONCLUSIONES	130
	BIBLIOGRAFIA	132
	ANEXOS	143

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición química cualitativa de la hoja de Fique (<i>Furcraea sp.</i>)	28
Tabla 2. Aplicaciones de algunos alcaloides	48
Tabla 3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) fisiológicas	52
Tabla 4. Clasificación de antioxidantes	56
Tabla 5. Matriz de experimentos de un diseño factorial completo 2 ³ , plan de experimentación y respuestas medidas	75
Tabla 6. Lista de reactivos, solventes y equipos	82
Tabla 7. Diseño de Experimentos 2 ³	84
Tabla 8. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en los extractos	89
Tabla 9. Condiciones del GC-MS (Hewlett-Packard 6890) de alta resolución	95
Tabla 10. ANOVA en las interacciones dobles en la fracción de AcOEt	96
Tabla 11. ANOVA de las interacciones dobles para la fracción de n-BuOH	99
Tabla 12. Condiciones óptimas en la extracción Líquido-Líquido	101
Tabla 13. Resultados de los tres tratamientos para evaluar la robustez de las condiciones del AcOEt	102
Tabla 14. Resultados de los tres tratamientos para evaluar la robustez de las condiciones del n-BuOH	102
Tabla 15. Resultados tamizaje fitoquímico para fracciones obtenidas del Jugo de Fique	103

Tabla 16.	Resultado de la Extracción en Fase Sólida	105
Tabla 17.	Recta de calibrado patrones de Trolox	115
Tabla 18.	Seguimiento de la reacción de los patrones de Trolox para determinar el valor ORAC	116
Tabla 19.	Seguimiento de la reacción de los patrones BHA y α -Tocoferol o Vitamina E y de las fracciones obtenidas para determinar el valor ORAC	119
Tabla 20.	Área bajo la curva AUC para patrones y extractos	121
Tabla 21.	Valor ORAC para muestras y patrones	122
Tabla 22.	Composición de la fracción de n-BuOH lograda por extracción líquido – líquido	125
Tabla 23.	Composición de la fracción de n-BuOH lograda por SPE	128

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura general de saponinas esteroides	30
Figura 2. Saponinas esteroides con usos farmacéuticos	30
Figura 3. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas	31
Figura 4. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios	33
Figura 5. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen	36
Figura 6. Estructura química de los monoterpenos (a) limoneno y (b) mentol	38
Figura 7. Estructura química de las saponinas	39
Figura 8. Estructura química de la amigdalina	39
Figura 9. Estructura química de la sinigrina presenta en semillas de mostaza negra	40
Figura 10. Estructura química del psolareno	42
Figura 11. Estructura química de la (a) vainillina y (b) del ácido salicílico	43
Figura 12. Estructura básica de los flavonoides	43
Figura 13. Estructura química de (a) antocianinas y (b) antocianidinas	44
Figura 14. Estructura química de la reticulina	46
Figura 15. Estructura química de la heroína	47
Figura 16. Mecanismo de reacción del radical superóxido	53
Figura 17. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes	55
Figura 18. Mecanismo de reacción de enzimas antioxidantes	57

Figura 19.	Estructura del DPPH*. Estructura original y Estructura reducida	62
Figura 20.	Estructuras químicas del ABTS ⁺ , vitamina E y Trolox	66
Figura 21.	AAPH (2,2'-azo bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro)	68
Figura 22.	Generación del radical peroxilo	69
Figura 23.	Reacciones que tiene lugar en el ensayo de ORAC	69
Figura 24.	Actividad antioxidante ORAC de una muestra medida como AUC	70
Figura 25.	Diseño 2 ^k factorial para k = 2 y k = 3	74
Figura 26.	Principales partes de un cromatógrafo de gases	80
Figura 27.	Principales partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas	81
Figura 28.	Diseño factorial 2 ³ y su representación geométrica	85
Figura 29.	Montaje de extracción Líquido-Líquido	86
Figura 30.	Eliminación del solvente por medio de rotaevaporación	86
Figura 31.	Extracción por SPE	88
Figura 32.	Lector placas Modulus™ II Microplate Multimode	92
Figura 33.	Efecto de interacción pH-Tiempo de extracción para a) 25mL y b) 50mL de AcOEt	97
Figura 34.	Efecto de interacción pH-Tiempo de extracción para 25mL y 50mL de n-BuOH, respectivamente	99
Figura 35.	Curva de Calibración del DPPH*	105
Figura 36.	Cinética de Reaccion del BHT	106
Figura 37.	Cinética de Reacción de la fracción AcOEt obtenida por extracción líquido-líquido	107
Figura 38.	Cinética de Reacción de la fracción n-BuOH obtenida extracción líquido-líquido	107
Figura 39.	Cinética de Reacción de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE	108

	Desaparición del DPPH* en función del número de miligramos de Antioxidante/miligramos de DPPH*. a) Patrón de BHT, b) Fracción de AcOEt obtenida por extracción L-L, c) fracción de n-BuOH obtenida por extracción L-L y d) Fracción de n-BuOH obtenida por SPE	110
Figura 40.		
Figura 41.	Comparación de las fracciones del jugo de Fique y la sustancia de referencia	111
Figura 42.	Absorbancia del catión radical ABTS*, en función de la concentración del Trolox	112
Figura 43.	Comparación de las Actividades Antioxidantes totales de las fracciones del Jugo de Fique y sustancias de referencia	113
Figura 44.	Recta de calibrado patrones de Trolox	115
Figura 45.	Reacción de los patrones de Trolox para determinar el valor ORAC	118
Figura 46.	Reacción de patrones y fracciones obtenidas para determinar el valor ORAC	120
Figura 47.	Valor ORAC de las sustancias utilizadas como referencia y de los extractos obtenidos del jugo de Fique	123
Figura 48.	Cromatograma de la fracción de n-BuOH obtenido por extracción líquido-líquido	124
Figura 49.	Espectro de masas del 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído	126
Figura 50.	Cromatograma de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE	127

LISTA DE ESQUEMAS

	pág.
Esquema 1. Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios	35
Esquema 2. Reacción entre el radical DPPH [*] y un Antioxidante	61
Esquema 3. Reacción entre el catión radical ABTS ⁺⁺ y un Antioxidante	65
Esquema 4. Diagrama de flujo de Extracción Líquido-Líquido	87
Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído	127

LISTADO DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Capacidad de decoloración del radical DPPH*	90
Ecuación 2. Cálculo de la Concentración Efectiva (EC)	91
Ecuación 3. Cálculo del área bajo la curva (AUC)	94
Ecuación 4. Cálculo de los equivalentes Trolox en la muestra	122

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Participación departamental en la producción nacional de Fique para el año 2002	27

LISTA DE ANEXOS

		pág.
ANEXO 1.	ANOVA PARA LA FRACCIÓN DE AcOEt	143
ANEXO 2.	ANOVA PARA LA FRACCIÓN DE n-BuOH	147
ANEXO 3.	ROBUSTEZ DEL MÉTODO	150
ANEXO 4.	DATOS ORAC	152

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH:	[2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro]
AcOEt:	Acetato de etilo
ANOVA:	Análisis de varianza
BuOH:	Butanol
B-PE:	B-ficoeritrina
BHT:	Hidroxitolueno butilado [2,6-di(<i>ter</i> -Butil)- <i>p</i> -cresol]
BHA:	Hidroxibutilanisol [2-(<i>ter</i> -Butil)-4-metoxifenol]
QBC:	Química de Compuestos Bioactivos
CoA:	Coenzima A
CIBIMOL:	Centro de Investigaciones en Biomoléculas
CAT:	Catalasa
CENIVAM:	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales
°C:	Grado(s) <i>Celsius</i> .
GC:	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GPx:	Glutación Peroxidasa
GSH:	Glutación Reducido
IPP:	Isopentil Difosfato
<i>i.e.:</i>	Por ejemplo (<i>In Exempti</i>)
MeOH:	Metanol
MEP:	Fosfato de Metileritrol
m.s.n.m:	Metros sobre el nivel del mar
µL:	Microlitro(s)
ORAC:	Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
ppm:	Partes por millón
RL:	Radicales Libres
RBrS:	Especies Reactivas de Bromo

RCIS:	Especies Reactivas de Cloro
RNS:	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS:	Especies Reactivas de Oxígeno
SOD:	Superóxido Dismutasa
SPE:	Extracción en Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
TEAC:	Factor Trolox (<i>Trolox equivalent Antioxidant Capacity</i>)
UV-Vis:	Ultravioleta-visible (<i>Ultraviolet-Visible</i>)

RESUMEN

Actualmente, se buscan fuentes de antioxidantes naturales que posean propiedades funcionales adecuadas para su incorporación a diversos productos comerciales, como consecuencia de alta demanda de este tipo de productos y la posible toxicidad presentada por algunos antioxidantes comúnmente utilizados (1,2). Por ello es importante realizar estudios que permitan identificar dichas fuentes naturales, tal como podría serlo el jugo de Fique. Este es un residuo agroindustrial, el cual actualmente es vertido sobre las aguas y suelos de la región causando un gran problema de contaminación ambiental (3).

En este trabajo se evaluó la Actividad Antioxidativa en el jugo de Fique, recolectado en el sector de Miraflores del municipio de Totoró (Cauca), al que previamente se realizó un tamizaje fitoquímico, con el fin identificar metabolitos a los que se le podría atribuir dicha actividad. Posteriormente se realizaron extracciones de los metabolitos secundarios presentes, mediante las técnicas de extracción Líquido-Líquido y en Fase Sólida (SPE), con el fin de identificar las fracciones que posean la máxima capacidad captadora de radicales libres utilizando los métodos del DPPH*, decoloración del catión-radical ABTS* y el ensayo de ORAC. Estos estudios se realizaron en el laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos (QCB) de la Universidad del Cauca, en convenio con en el grupo de investigación Química de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad del Valle y en el Grupo de Investigación CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander.

Finalmente, se realizó una identificación preliminar, utilizando CG/MS como técnica de separación y la biblioteca de espectros de Masas NIST del Centro de Investigación de Biomoléculas (CIBIMOL) de la Universidad Industrial de

Santander, en las fracciones que presentaron mayor actividad antioxidante, lo cual permitió distinguir los componentes de la mezcla.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Normalmente, los cultivadores de fique limitan su producción a la obtención de la fibra con fines artesanales, mientras que el jugo resultante de este proceso, se convierte en un problema ambiental muy serio (3); ya que genera contaminación en los suelos causando fuerte acidez, y a cuerpos de agua a los cuales pasa por infiltración produciendo serios problemas a aguas superficiales, debido a la solubilización de elementos como metales pesados (4).

En el presente trabajo de investigación se pretende estudiar dicho residuo agroindustrial, con el fin de encontrar una fuente de antioxidantes naturales, debido a la presencia de compuestos como saponinas, flavonoides y carotenoides; metabolitos que potencializan la actividad antioxidativa; y de dar una alternativa de disminución de contaminación ambiental y de mejoramiento de condiciones de vida desde el punto de vista socioeconómico.

Estos compuestos poseen una gran demanda industrial, puesto que son adicionados a productos alimenticios y cosméticos, entre otros, para mitigar la acción negativa de los llamados radicales libres, los cuales provocan reacciones en cadena que alteran y dañan moléculas como carbohidratos, vitaminas y todos aquellos compuestos cuya susceptibilidad a la oxidación es alta. Dado los efectos secundarios causados por algunos de los antioxidantes comúnmente utilizados, los cuales a altas concentraciones pueden actuar como prooxidantes, y además generar células carcinogénicas como se ha evidenciado en ensayos con ratones; se hace necesaria la búsqueda de estos compuestos en fuentes de origen natural como lo podría ser en este caso el jugo de fique.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la capacidad antioxidante general de los extractos polares obtenidos del jugo de Fique (*Furcraea sp.*) y su efectividad para evitar la oxidación vía radicales libres por la metodología de captación DPPH*, el método de decoloración del catión-radical ABTS*⁺ y el ensayo de ORAC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un diseño de experimentos para establecer las condiciones óptimas de la extracción líquido-líquido de los metabolitos secundarios con actividad antioxidante.
- Obtener los extractos del jugo de fique en acetato de etilo y n-butanol mediante extracción líquido-líquido y Extracción en fase sólida (SPE).
- Evaluar la capacidad antioxidativa en el jugo de fique utilizando los métodos de DPPH*, ABTS*⁺ y ORAC.
- Realizar el tamizaje fitoquímico a las fracciones que presenten la más alta capacidad antioxidativa.
- Identificar preliminarmente los componentes del extracto que presentó la mayor actividad captadora de radicales libres, utilizando la metodología de cromatografía de gases con detector de masas (GC-EM).

3. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 EL FIQUE (*Furcraea sp.*) Y SU CULTIVO

El fique es una planta originaria de la América Tropical, su cultivo se da de manera particular en las zonas andinas de Colombia, Venezuela y Ecuador. En nuestro país su siembra se realiza en la parte alta de la sierra templada y fría.

Su cultivo óptimo es en climas templados y secos, en temperaturas que oscilan entre los 19°C y 32°C con una humedad relativa entre el 70 y 90%, y una pluviosidad de 300 a 1.600 mm anuales, a una altitud entre 1.300 y 2.800 m.s.n.m. En el país se siembra con mayor énfasis en los departamentos de Cauca, Nariño, Santander, Antioquia y Boyacá, en donde el Cauca se constituye en el mayor productor con más de 7.000 toneladas al año con un 33% de la producción nacional (Gráfico 1), siendo la producción promedio anual para Colombia durante los últimos años, superior a las 20.000 toneladas, aun cuando ha descendido en los últimos años. De esta producción, la mayor parte se destina a actividades de tipo industrial y el resto a la manufactura artesanal, siendo un cultivo de economía campesina (5).

En varios municipios del país y del departamento del Cauca, existen familias dedicadas al cultivo, procesamiento y trabajo artesanal del fique, actividades que contribuyen en la economía familiar, pues con el hilado de este producto, sus pobladores aportan buena parte del dinero para el mercado semanal.

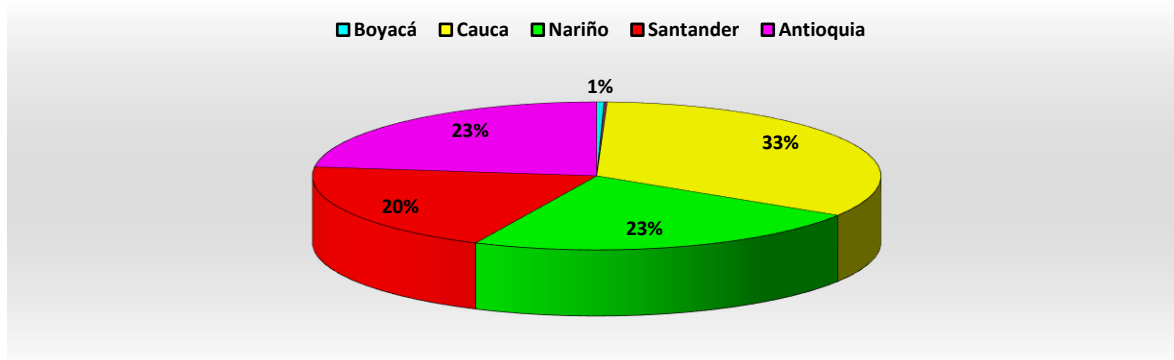


Gráfico 1. Participación departamental en la producción nacional de fique para el año 2002.

No obstante, en lo referente al medio ambiente, el cultivo presenta algunos inconvenientes relacionados con la contaminación de aguas y suelos, debido al lavado de la cabuya, dado que el bagazo y el jugo de fique contienen sustancias como las saponinas, que al parecer desplazan el oxígeno disuelto en el agua por el proceso de oxidación, afectando la ictiofauna en las quebradas, además de otras sustancias tóxicas que causan problemas a la salud, al ser consumidas por personas y animales (4).

Son plantas, de tallo erguido, su altura varía entre 2-7m, densamente poblado de hojas de color verde, en forma radial, largas, angostas, carnosas, puntiagudas, acanaladas, y dentado espinosas, en algunas variedades, presentando líneas o estrías tenues de unos 3mm de largo. Su flor es de color blanco verdoso, solo florece una vez en su ciclo de vida y luego le sobreviene la muerte. Las semillas germinan en la misma planta y sus bulbillos caen ya formados al suelo por lo que considera al fique una planta vivípara. Poseen una gran cantidad de raíces que se expanden y enraízan profundamente haciéndola una planta anti-erosiva. Su vida útil (producción de fibra, jugos, etc.) comienza entre los 3-6 años, dependiendo de las condiciones que enfrente. Su composición química (Tabla 1) varía según la planta y el cultivo (5).

Tabla 1. Composición química cualitativa de la hoja de Fique (*Furcraea sp.*)

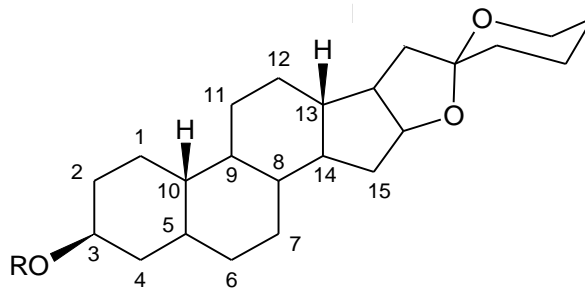
Fibra	Cenizas Celulosa Resinas Lignina Pentosanos Ceras y grasas
Jugo	Clorofila Carotenoides Saponinas Azúcares Resinas Flavonoides Ácidos orgánicos Alquitranes Lignina Calcio Lipoides
Bagazo	Fósforo Magnesio Elementos Nitrogenados Calcio Fósforo Sodio Cobre Hierro Manganeso Zinc

El jugo constituye el 70%, del cual hasta el 40% se puede extraer por prensado. Este es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad, la estación del año y la fertilidad del suelo. De color verde ocre, tiene un olor característico fuerte, y es muy corrosivo. Su densidad media a escala experimental es de 1.02 Kg/L y su pH varía entre 4-5. Sus constituyentes se conocen de forma cualitativa, siendo agua, celulosa, materia orgánica y minerales, con los siguientes valores porcentuales: 85% humedad, 6% celulosa (D-glucosa), 8% parte orgánica y amorfa (sacarosa, proteínas, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, saponinas y saponinas, entre otros) y 1% minerales (5).

Los diferentes estudios que involucran al Fique, en su mayoría son referentes a la fibra con fines artesanales, incluso algunos autores han intentado darle alguna aplicación como Muñoz, D. *et al.*, quienes proponen al fique como aislante térmico (6) obteniendo resultados novedosos que indican que la fibra es un material aislante térmico apto en la conservación de la temperatura de los productos perecederos agrícolas y pecuarios y que es una barrera térmica efectiva y una solución ecológica, económica y novedosa para el transporte y conservación de alimentos y compite con los aislantes tradicionales como el algodón mineral.

En cuanto al jugo, las publicaciones hacen referencia a su contaminación ambiental (3) y a la producción de saponinas esteroides (Figura 1) con fines farmacéuticos (Figura 2), como precursores únicos de muchos medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos (7), entre otros, a los cuales se les han atribuido diversos tipos de actividad biológica tal como antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, insecticida, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, anti-úlceras, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, hemolítica, antimicótica, entre otras (8), pero no se ha reportado estudios en los cuales se atribuya actividad antioxidante; sin embargo se ha reportado metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico como flavonoides, saponinas, taninos, esteroides, glicósidos

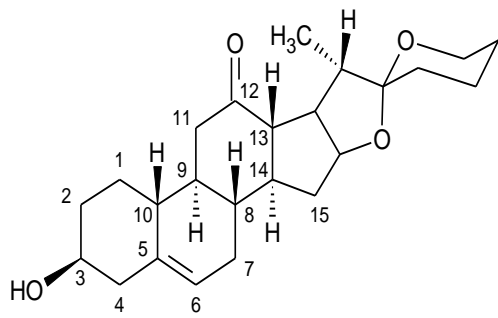
cardiotónicos y alcaloides (9), algunos de los cuales podrían contribuir dicha actividad biológica.



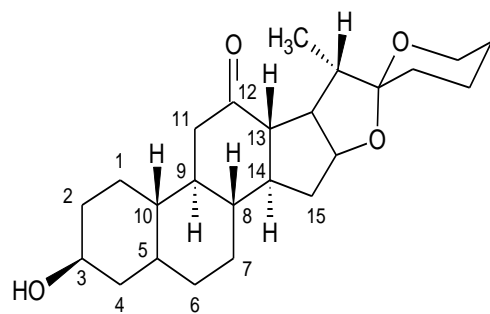
R=H, Sapogenina esteroide

R= Carbohidratos (Deoxi). Saponina esteroide

Figura 1. Estructura general de sapogeninas esteroides



Diosgenina



Hecogenina

Figura 2. Saponinas esteroides con usos farmacéuticos

3.2 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, nitrógeno y la energía, termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Figura 3).

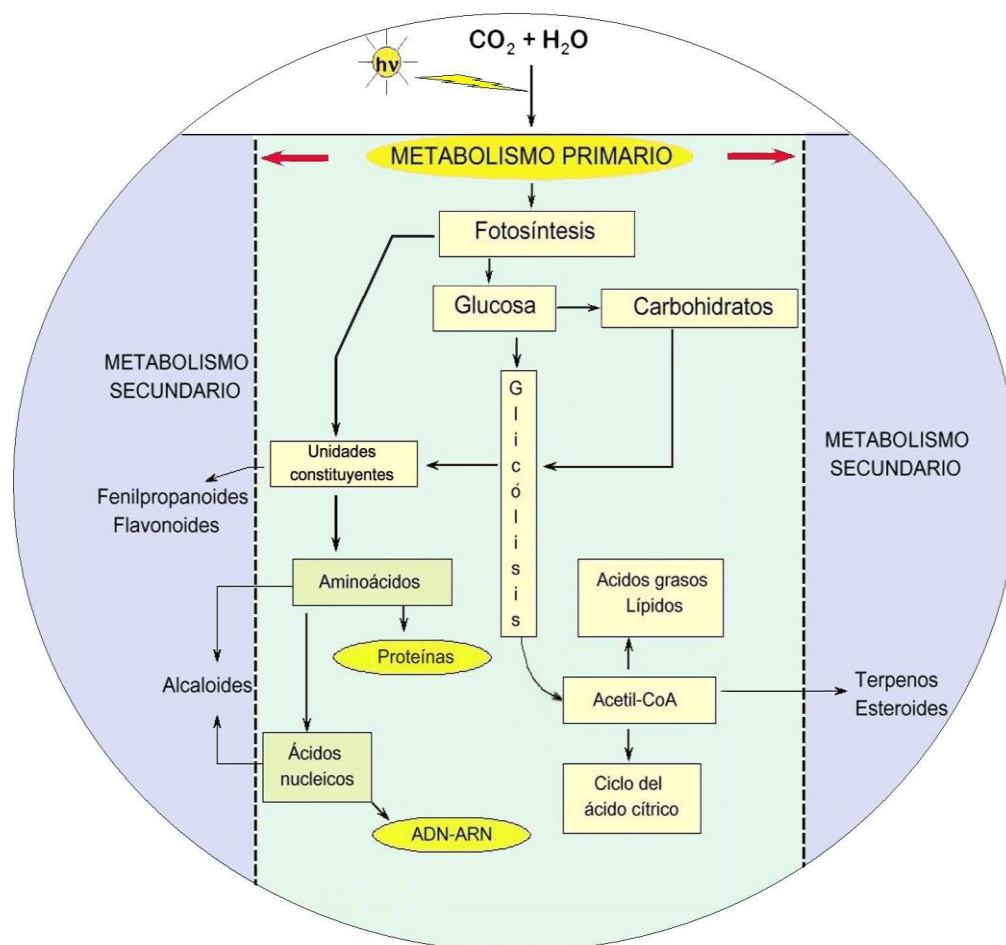


Figura 3. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (10).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (11).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Figura 4).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc (12).

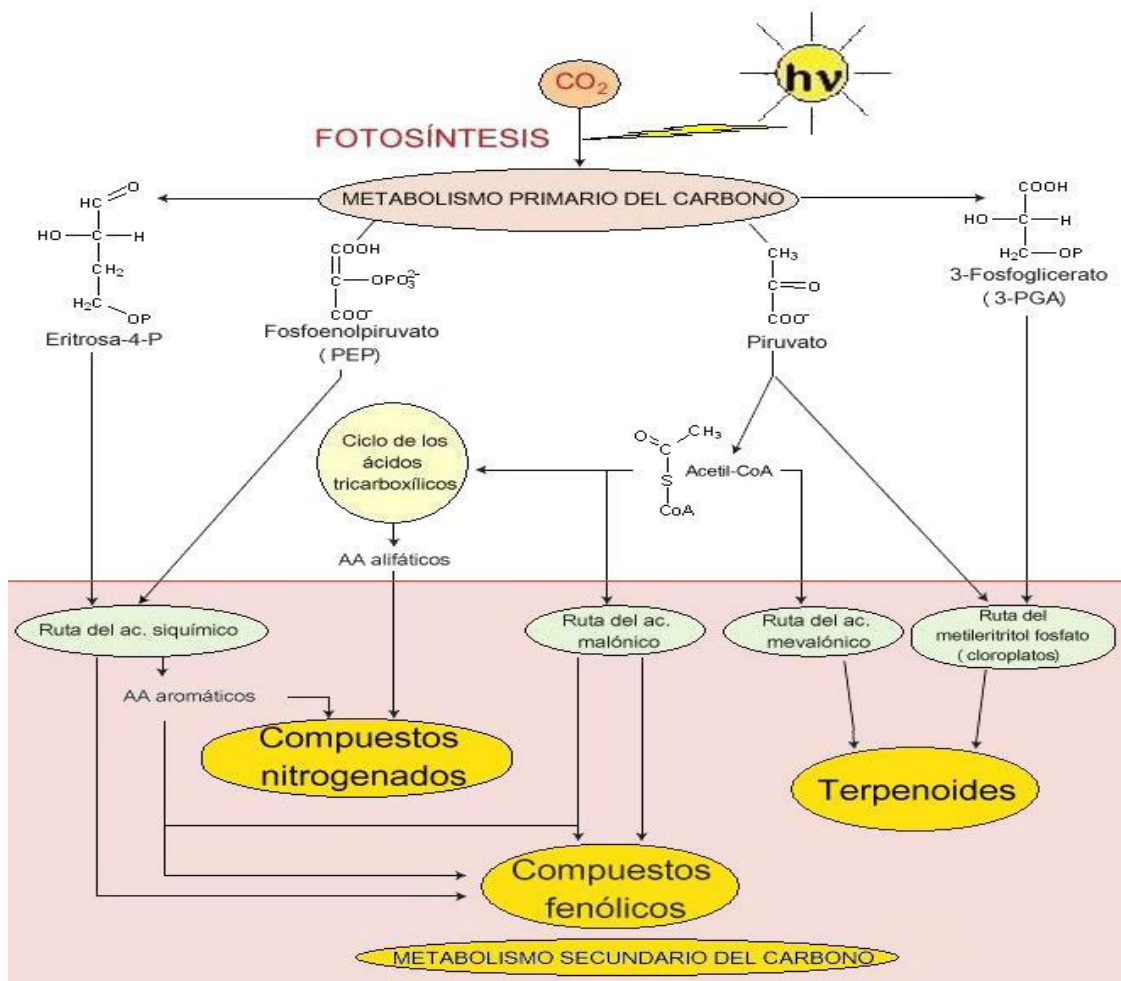


Figura 4. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios

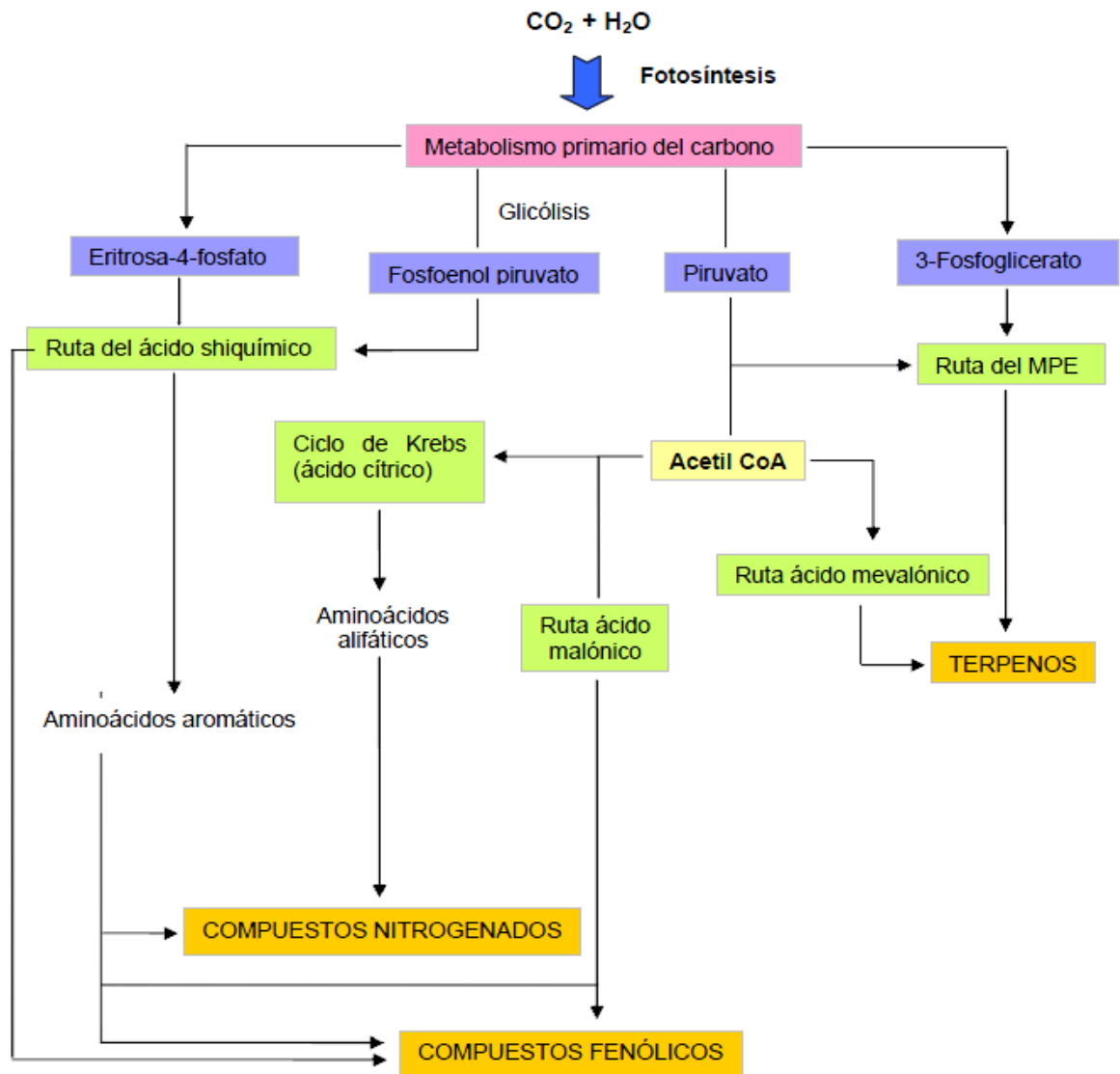
Los metabolitos secundarios se dividen principalmente en tres grupos según la ruta biosintética que les da su origen: (1) Terpenos, (2) Compuestos fenólicos y (3) Nitrogenados, que se obtienen a partir de las vías de síntesis relacionadas con rutas degradativas del metabolismo primario de las plantas. El esquema general de biosíntesis de estos compuestos se ilustra en el Esquema 1.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos, aceites esenciales, saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (11).

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (Figura 5). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (13).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Figura 5).



Esquema 1. Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Figura 5).

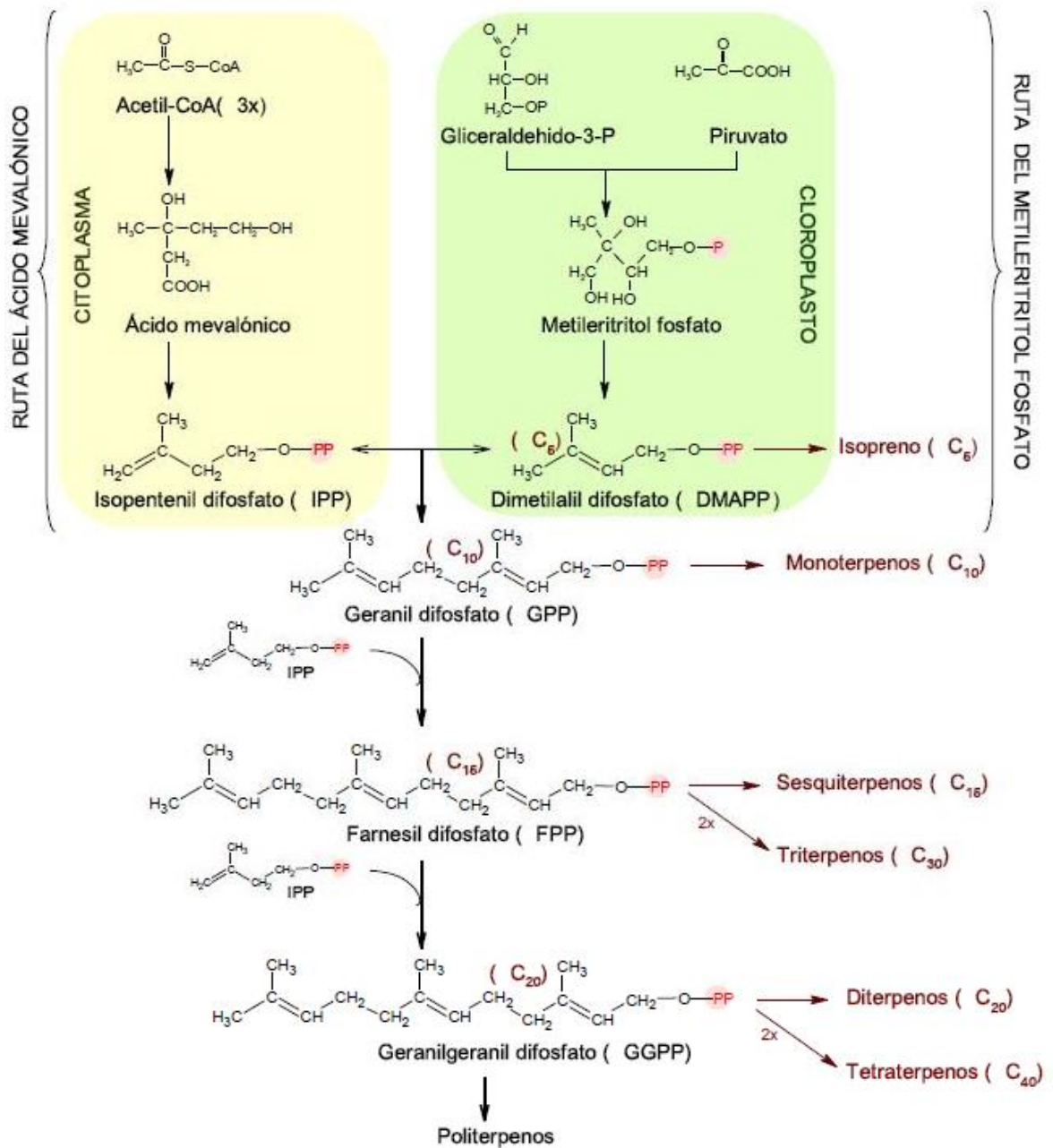


Figura 5. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardíacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc (14).

Muchas plantas (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas. Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, principales monoterpenos constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente (Figura 6) (12).

Entre los Diterpenoides se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas y entre los triterpenos se encuentran algunos esteroides en forma de glicósidos. Estos glicósidos esteroideos, tienen importantes funciones en medicina y en la industria (cardenólpidos y saponinas).

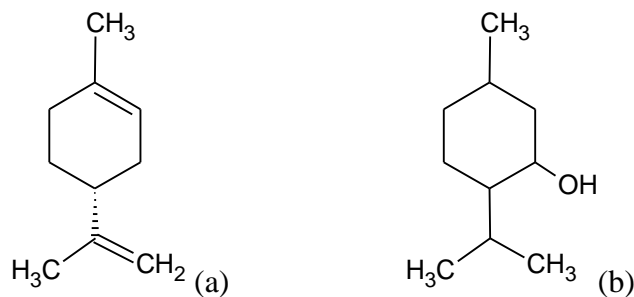


Figura 6. Estructura química de los monoterpenos (a) limoneno y (b) mentol

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (11).

Las saponinas (Figura 7) se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas.

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada

de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva.

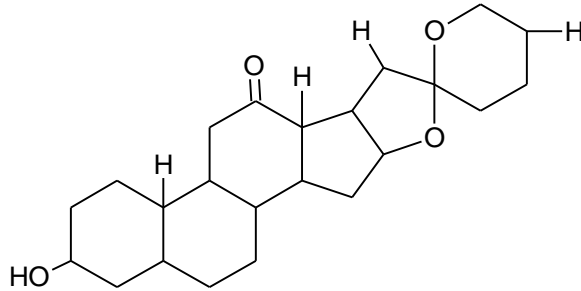


Figura 7. Estructura química de las saponinas

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina (Figura 8) que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón.

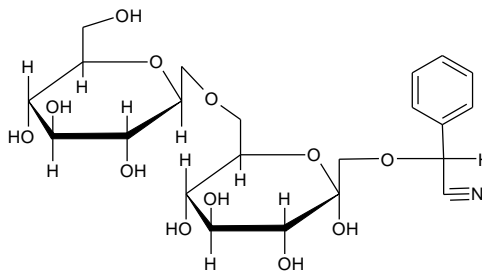


Figura 8. Estructura química de la amigdalina

Los glicósidos cianogénicos normalmente no se degradan cuando la planta está intacta. Tienen un papel protector en algunas especies frente a herbívoros. El

Los terpenos de mayor tamaño son los tetraterpenos y politerpenos, entre los que se encuentran los carotenoides (tetraterpenos) y los hidrocarburos de alto peso molecular caucho y gutapercha (politerpenos o poliisoprenoides).

- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos (12).

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo.

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (15).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico (Esquema 1).

La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. Este es reconocido como el punto de partida para un vasto número de compuestos naturales de diferentes clases. Aunque es un constituyente vegetal a nivel de trazas, no hay duda de que es un metabolito “universal” en todas las plantas superiores. El ácido shiquímico es el precursor de

los constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos diferentes a los formados por la ruta del la malonilcoenzima-A. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (11).

Entre los compuestos fenólicos tenemos las cumarinas, estas son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas muestran fitotoxicidad frente a insectos (es el caso del psoraleno) (Figura 10) tras activarse por luz UV, acción llevada a cabo por bloqueo de la transcripción y de la reparación de DNA, provocando la muerte celular.

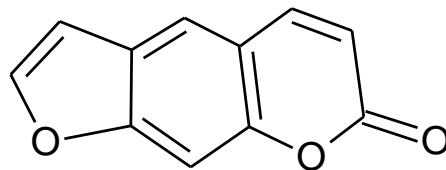


Figura 10. Estructura química del psolareno

La cumarina más simple es la que se encuentra como constituyente en el aceite de bergamota, un aceite esencial que aporta aroma al tabaco de pipa, el té y a otros productos. Las más tóxicas son producidas por hongos, por ejemplo, la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* (puede infectar cacahuete o maíz), quizá el carcinogénico más potente de las toxinas naturales.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral. Ejemplos de estos derivados

son la vainillina y el ácido salicílico (Figura 11) (actúa como regulador del crecimiento vegetal, implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos).

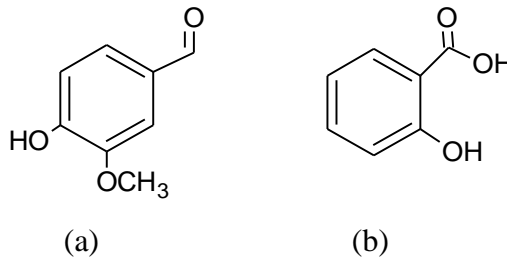


Figura 11. Estructura química de la (a) vainillina y (b) del ácido salicílico

Otro grupo de compuestos fenólicos son los flavonoides (Figura 12). Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación.

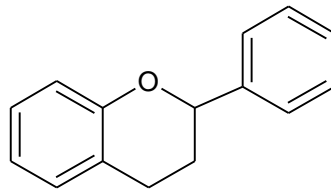


Figura 12. Estructura básica de los flavonoides

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas (Figura 13).

El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son pelargonidina (rojo-naranja), cianidina (rojo púrpura) y delphinidina (11).

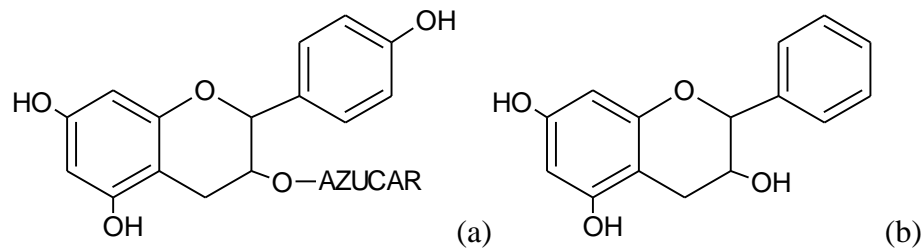


Figura 13. Estructura química de (a) antocianinas y (b) antocianidinas

En las flores también se encuentran flavonas y flavonoles que absorben a longitudes de onda más cortas que las antocianinas por lo que no son visibles para el ojo humano. Sin embargo los insectos que ven en el rango del UV responden a flavonas y flavonoles como señales de atracción.

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos).

Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que

contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente (12).

Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran los taninos en la piel. Sin embargo, los taninos del vino tinto tienen efecto beneficioso en la salud humana al bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que provoca vasoconstricción.

- **Alcaloides.**

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución (12).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (13).

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.

El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos, el exudado (látex) de la cápsula inmadura de *Papaver somniferon*. Este exudado contiene una mezcla de más de 20 alcaloides diferentes entre los que se encuentran la morfina y la codeína. Ambos alcaloides pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos que sintetizan a partir de la reticulina (Figura 14).

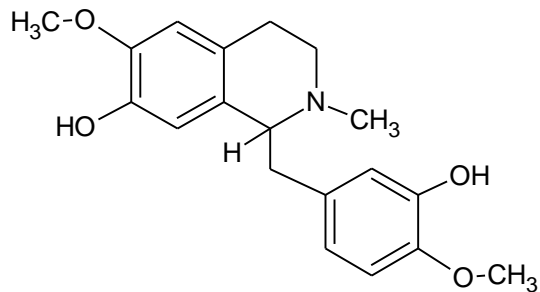


Figura 14. Estructura química de la reticulina

La heroína es un alcaloide semisintético formado por acetilación de la morfina (Figura 15).

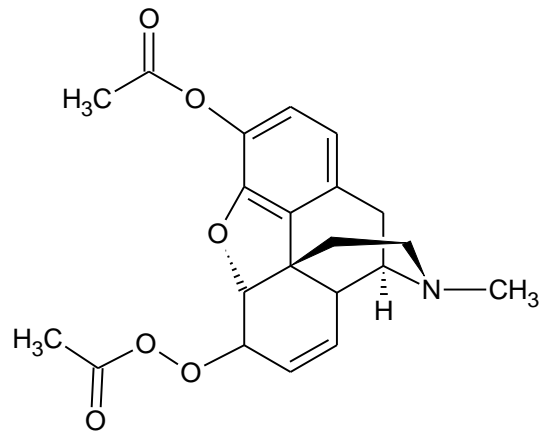


Figura 15. Estructura química de la heroína

Algunas solanáceas (los géneros *Datura*, *Hyoscyamus* y *Atropa*) contienen alcaloides tóxicos como la escopolamina presente en *Datura stramonium* o la atropina de *Hyoscyamus niger*.

La patata contiene el alcaloide solanina, un inhibidor de colinesterasa que interfiere en la transmisión nerviosa. Los tubérculos sometidos a alta intensidad de luz pueden llegar a sintetizar niveles tóxicos de solanina.

A continuación se muestra un resumen de las aplicaciones de algunos alcaloides (Tabla 2) (14).

Tabla 2. Aplicaciones de algunos alcaloides

Alcaloide	Planta	Uso
Ajmalina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antiarrítmico, inhibidor captura de glucosa por la mitocondria del tejido cardiaco
Atropina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Anticolinérgico, antídoto del gas nervioso
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Estimulante del sistema nervioso central
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Agente anticanceroso
Cocaína	<i>Erythroxylon coca</i>	Anestésico tópico, estimulante del sistema nervioso central, bloqueante adrenérgico, droga de abuso
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico y antitusivo
Coniína	<i>Conium maculatum</i>	Parálisis del sistema nervioso motor
Emetina	<i>Uragoga ipecacuanha</i>	Emético
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, narcótico, droga de abuso
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tóxico, insecticida en horticultura, droga de abuso
Pilocarpina	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Estimulante del sistema parasimpático
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i>	Tratamiento de la malaria
Sanguinarina	<i>Eschscholzia californica</i>	Antibacteriano (dentífricos)
Escopolamina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Narcótico, sedante
Estricnina	<i>Strychnos nux-vomica</i>	Veneno
Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antineoplásico

En general, los metabolitos secundarios presentan efectos significativos sobre el metabolismo animal y humano en bajas dosis. Por esta razón, muchos de ellos se emplean como drogas, venenos, saborizantes, materiales industriales, etc.

La manera más sencilla de identificar cualitativamente la presencia de núcleos de estos metabolitos secundarios es mediante el análisis fitoquímico preliminar, el cual consiste en pruebas de caracterización; generalmente una reacción química que produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un producto o de un complejo, que origina una manifestación de un cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, un ejemplo de este tipo de pruebas está relacionado con los alcaloides, flavonoides, terpenoides, entre otros (15,16,17).

3.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especies moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (17).

El oxígeno, es el principal radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados.

Entre las ROS destacan:

- **Radicales:** ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo (RO^{\cdot}), peroxilo (ROO^{\cdot}) y óxido de nitrógeno (NO^{\cdot})
- **No radicales:** peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete $^1\Delta O_2$ y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$).

Por lo tanto, el término estrés oxidativo hace referencia a un desequilibrio entre la generación de estas especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante de un organismo. Este desequilibrio a favor de los oxidantes conduce a un potencial daño oxidativo sobre biomoléculas (18,19).

Este estrés puede originarse por dos motivos fundamentales:

- a. Disminución de los niveles de antioxidantes debido a mutaciones que afectan la actividad de las enzimas antioxidantes, o a toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes.
- b. Incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de O_2 u otras toxinas que en sí mismas son especies reactivas (NO_2^{\cdot}).

Debido a la acción oxidante de las especies reactivas sobre los lípidos de membrana, las proteínas celulares y los ácidos nucleicos (ADN, ARN), las especies reactivas han sido asociadas con numerosas enfermedades crónicas y con el proceso de envejecimiento, entre las que se encuentran dos de las mayores causas de mortalidad en las sociedades occidentales; el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (20).

3.4 RADICALES LIBRES

Un radical libre (RL) es un átomo, molécula o compuesto que contiene un electrón no apareado (aquel que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), existen de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica son altamente reactivos (21). Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción, generando de esta forma reacciones en cadena. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media.

La generación de un RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores fisiológicos ya que son el resultado de los procesos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos y la respiración, por otro lado también son generados por factores ambientales tales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas, lo cual puede llevar a un aumento de la concentración de estas especies las cuales pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos (22).

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales de oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales (la presencia de un “*” en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical). De forma análoga existen Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS), de Cloro (RCIS) y de Bromo (RBrS). En la Tabla 3 se presentan las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del

Nitrógeno (RNS), que son los dos grandes grupos de especies reactivas implicados en la biología redox (22).

Tabla 3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) fisiológicas

ROS		SÍMBOLO	RNS	SÍMBOLO
RADICALES	Anión superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Óxido nítrico	NO^{\bullet}
	Hidroxilo	$^{\bullet}OH$	Dióxido	NO_2^{\bullet}
	Alcóxido	RO^{\bullet}	nitrógeno	
	Peróxido	ROO^{\bullet}		
NO RADICALES	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO^-$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2
	Ozono	O_3	Catión nitrosilo	NO^+
	Oxígeno singulete	$^1\Delta O_2$	Anión nitroxilo	NO^-
			Peroxinitritos alquilo	$ROONO$

Debido al propio funcionamiento del metabolismo aeróbico, pequeñas cantidades de ROS se generan constantemente en el organismo, la mayoría a partir de las cadenas de transporte de electrones. Destacan el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el oxígeno singulete ($^1\Delta O_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero el $O_2^{\bullet -}$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} , convirtiéndose este en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen en la Figura 16:

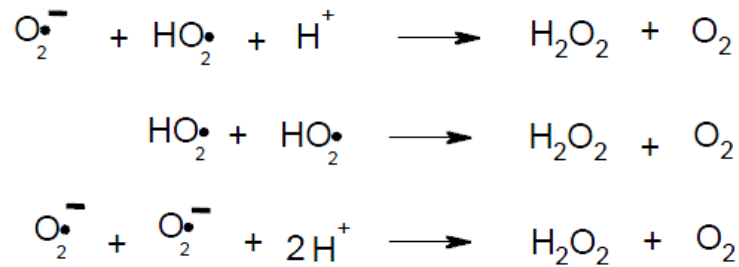


Figura 16. Mecanismo de reacción del radical superóxido

Las ROS producen acciones diversas sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glicósidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

Las primeras investigaciones sobre estas especies reactivas sobrevienen al año 1950, en cabeza de la Doctora Rebeca Gerschman, quien ya proponía la teoría de la toxicidad de los radicales libres de oxígeno, haciendo énfasis en que el ataque permanente de los RL a los tejidos podía afectar y dañar las estructuras de las células, las células así alteradas funcionarían inadecuadamente haciendo aparecer enfermedades. Gerschman adjudicaba a los radicales libres una relación

estrecha con algunas patologías, tales como cáncer y envejecimiento, sin dejar de tener en cuenta algunas situaciones en que los radicales libres están muy comprometidos, como: arterosclerosis, cataratas oculares, artritis, párkinson, alzhéimer, infarto del miocardio, esclerosis lateral amiotrófica, displasia broncopulmonar, entre otras (23,24). Esta teoría levantó un viento de polémica que se propagó por todos los círculos científicos del mundo (25).

La existencia de los radicales libres y su reconocimiento biológico tuvieron resistencia en los que sostenían y consideraban a la radiación X como reductora y al oxígeno como oxidante. Es recién en los últimos años, que la teoría es universalmente aceptada y por consiguiente la maquinaria farmacéutica y cosmética ha comenzado con la búsqueda y fabricación de productos y formulaciones antirradicales libres, los cuales permitan contrarrestar los efectos nocivos de estas especies reactivas.

3.5 ANTIOXIDANTES

Hemos visto que inherente al metabolismo aeróbico se produce la generación constante de especies reactivas, radicalarias y no radicalarias, que, aunque contribuyen a funciones básicas del organismo como señalización redox o acciones de defensa, pueden producir daños a nivel del ADN y del funcionamiento celular. Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por radicales libres, ROS y otras especies reactivas, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa, el llamado sistema de defensa antioxidante (26).

Pero, ¿qué es exactamente un antioxidante?, Gutteridge y Halliwell definieron “antioxidante” como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas

concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación de este sustrato”.

Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antirradicalaria debe cumplir con una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radicalaria (R^{\bullet}). De esta manera, al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un RL (27), pero este no es lo suficientemente reactivo para seguir promoviendo reacciones de propagación y se destruye o produce la unión con otro radical libre, originando entonces una molécula estable. Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 17).

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Se destacan por actuar a diferentes niveles en la secuencia oxidativa; pueden actuar disminuyendo la concentración de oxígeno, interceptando el oxígeno disuelto disponible, previniendo la iniciación de la reacción de secuestro de electrones, atacando iones catalíticos metálicos, descomponiendo productos primarios en compuestos no radicales o escindiendo la cadena para prevenir la continuación de la abstracción de hidrógeno del sustrato (28,29,30).

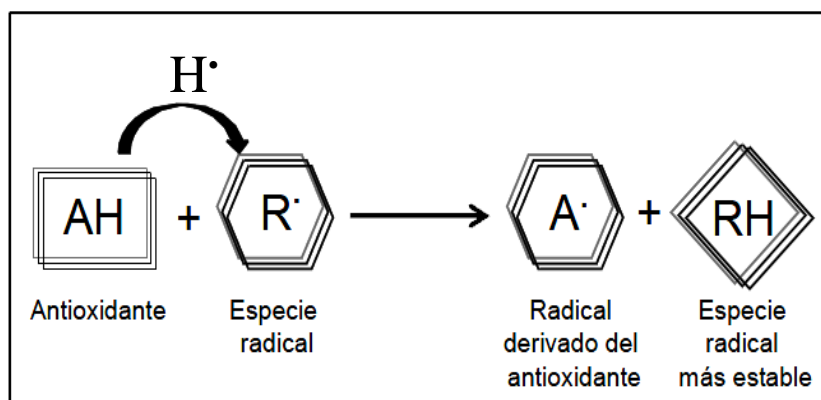


Figura 17. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes

Los mecanismos mediante los cuales se logra esta labor pueden ser enzimáticos, a través de antioxidantes llamados endógenos que incluyen a las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y la coenzima Q, o los antioxidantes exógenos, que ingresan al organismo por la vía de los alimentos. De igual manera, algunos metales, como Selenio, Cobre, Zinc y Magnesio (Tabla 4), que en ocasiones forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en este mecanismo de protección celular (20,21).

Tabla 4. Clasificación de antioxidantes

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutatión	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tiocítico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas: Superóxido dismutasa (SOD) Catalasa Glutatión peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

Entre los mecanismos desarrollados como defensa por los sistemas biológicos en ambientes oxigenados, se destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O₂ en los tejidos y a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, como se expuso en el párrafo anterior, así como ser un sistema reparador de moléculas. A continuación se resumen los mecanismos de defensa bioquímicos:

son extraídos de determinados alimentos interactúan de manera directa con la especie reactiva para producir complejos estables o de menor reactividad, mientras que en otras ejerce la función de co-substrato en la acción catalítica de algunas enzimas.

Sin embargo, la capacidad de nuestro organismo para “luchar” contra agresiones producidas por las moléculas oxidantes es limitada, por lo que necesita cierta ayuda externa. Los nutrientes básicos que ingerimos a través de la dieta (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) ayudan a los mecanismos de defensa internos contra todas las oxidaciones no deseadas, ya sea actuando como antioxidantes por si solos o haciendo de Cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos. Por este motivo, llevar una dieta equilibrada y variada es de vital importancia para mantener el equilibrio redox del organismo.

Además de todos los nutrientes básicos, a través de la dieta obtenemos también una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos, las llamadas sustancias fitoquímicas, que son compuestos procedentes del reino vegetal de estructura química y propiedades muy variadas, que juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud. Aunque el interés científico por estos compuestos es relativamente reciente (durante las últimas cuatro décadas), durante siglos han constituido el único remedio natural existente para el tratamiento de enfermedades. Multitud de alimentos de origen vegetal contienen extractos con compuestos con actividad antioxidante, por ejemplo, el té verde, el vino tinto o el chocolate.

De los antioxidantes exógenos (Tabla 4) podemos destacar que tienen como propiedades estructurales comunes el grupo fenólico, que cede el hidrógeno radicalario y permite la deslocalización del electrón sobre el anillo aromático, y la

presencia de grupos voluminosos unidos al anillo, cuyo impedimento estérico también contribuye a disminuir la reactividad del radical. Aquellos que tienen grupos más voluminosos son más estables, manteniéndose a lo largo del proceso, pero también menos efectivos de forma inmediata, por lo que en la práctica suelen utilizarse mezclas de varios antioxidantes (18).

Los compuestos más efectivos para atrapar radicales, generalmente poseen grupos $-OH$, $-NH_2$ o $-SH$, los cuales pueden intervenir en dos posibles mecanismos de reacción:

- Abstracción directa de un átomo de H, la cual es gobernada por la entalpía de disociación de los enlaces $Rx-H$ y $Radical-H$;
- Transferencia de un electrón, determinada por el potencial de ionización de $Rx-H$ y $Radical^*$.

3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL BIOENSAYO “IN VITRO”: ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES

La actividad antioxidante de una sustancia depende, entre otros factores, del sustrato atacado por los radicales y del mecanismo de esta interacción. La acción inhibitoria de la oxidación se describe por dos características cinéticas (27):

- **Efectividad:** Representa la posibilidad de bloqueo de la reacción de radicales, con radicales peróxido responsables de la etapa de inducción;
- **Fortaleza:** Expresa la posibilidad de que el inhibidor participe en otras reacciones.

Para analizar los antioxidantes en cualquier material vegetal se utilizan una diversidad de metodologías, algunas de las más comúnmente utilizadas son: inducción de oxidación de Ácido Linoléico, decoloración de β -caroteno, prueba de Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno (ORAC), y metodologías basadas en principios colorimétricos por reducción de radicales coloreados como el ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6) y el DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidracil); estos últimos son unos de los métodos más usados para medir la actividad de un compuesto antioxidante (31) y determinan de manera particular la capacidad de secuestrar radicales, las ventajas de estos ensayos son, principalmente, su fácil manipulación, evaluación de resultados, y la rápida determinación (32).

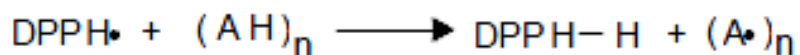
Existen diversas metodologías para determinar la actividad antioxidante de una mezcla compleja basadas en los parámetros que se utilizan para clasificarlos, entre ellos, se encuentran la solubilidad del antioxidante (lipofilicidad o hidrofílicidad), la naturaleza del mismo y su mecanismo de acción (reducción del radical o retraso en la oxidación), entre otros (33). Pero la aplicabilidad de cada uno de los procedimientos está determinada por las propiedades y características del método y de la matriz. Así, por ejemplo, para el grupo de alimentos, suero y fluidos fisiológicos, se aplican el método ORAC y ensayos de quimioluminiscencia.

3.6.1 Método del DPPH^{*} (2,2-Difenil-1-picrilhidracil)

Brand-Williams *et al.*, (1995) (33) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH^{*}) en una solución metanólica, el cual es un compuesto formado por radicales libres estables y se ha desarrollado para medir la capacidad inhibidora de algún antioxidante sobre los radicales libres (34,35).

El radical DPPH^{*} se caracteriza por ser una especie estable por el electrón desapareado que tiene en su estructura y porque no se dimeriza como en el caso de muchos otros radicales libres, esta característica le confiere un color púrpura intenso. Cuando una solución de DPPH^{*} se mezcla con una sustancia capaz de donar átomos H, en este caso el antioxidante, el radical se reduce, esto da lugar a la forma reducida de la molécula (Figura 19) formando la respectiva hidracina, DPPHH; y el color se torna de púrpura a amarillo. La reducción del DPPH^{*} se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. Así pues la capacidad antioxidante se puede medir con un espectrofotómetro ultravioleta visible a 515 nm, valor donde se tiene la mayor Absorbancia (36,37).

En consecuencia, la desaparición del DPPH^{*} proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con el siguiente esquema:



Esquema 2. Reacción entre el radical DPPH^{*} y un Antioxidante

Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A^{*}) puede interactuar con otro radical para formar moléculas

estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH* y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo.

Este método colorimétrico, es aplicable para antioxidantes lipo- e hidrosolubles. Para determinar el grado en que el antioxidante logra reducir se determina el EC₅₀, el cual es la concentración efectiva en el que el antioxidante logra reducir el 50% de los radicales presentes en solución.

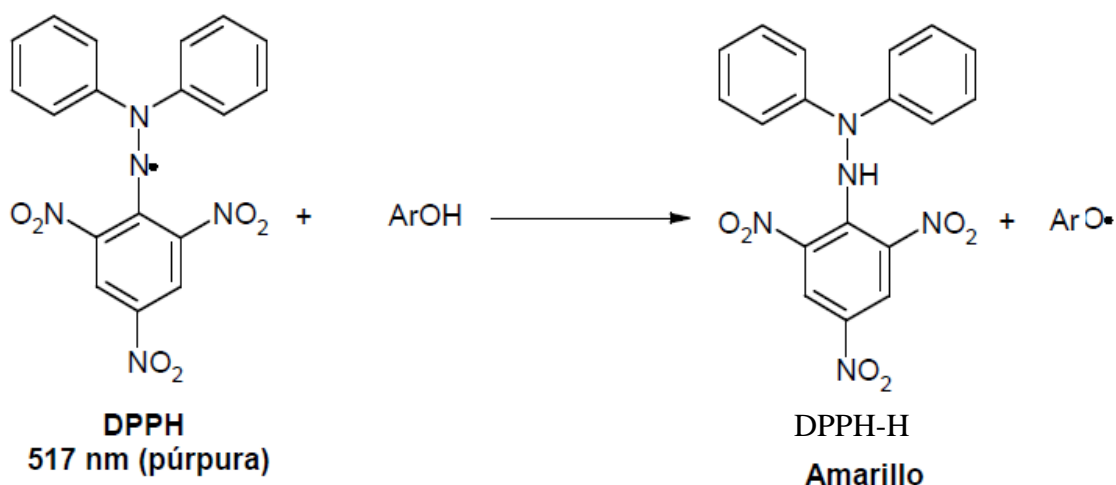


Figura 19. Estructura del DPPH*. Estructura original y Estructura reducida

Este método ha sido ampliamente utilizado para la evaluación in vitro de extractos naturales con potencial antioxidante, en el año 2008 en Perú, Ramos L. *et al.* (37), estudiaron extractos de 5 plantas nativas e introducidas, entre las cuales estaban las plantas conocidas popularmente como canela, camu camu, lagarto caspi, muña e hiporuro, de los cuales presento mayor actividad el extracto etanólico de canela, inhibiendo al radical DPPH* en un 97,59% a la concentración de 1 µg/mL en comparación con el ácido ascórbico (vitamina C) que presentó 92,82% en promedio. En otro estudio realizado también en Perú, Villanueva et al. (38), al

evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales, concluye que la actividad antioxidante obtenida por el método DPPH* está correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales, siendo muy elevada para el camu camu, recomendando así el consumo de estos frutos en una alimentación saludable para mejorar la calidad de vida.

En Colombia, esta metodología también ha sido implementada, estudios como el de ROJANO, B. *et al.*, determinan la actividad antioxidante del isoespintanol el cual presenta una muy buena actividad antirradicalaria comparada con el patrón de BHT cuando se hace reaccionar con el DPPH* (39).

3.6.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS*⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6))

El efecto protector de los antioxidantes y sustancias de referencia se determina, entre otros, por el método descrito por Re *et al.* (1999) (39), el cual se basa en la capacidad que tienen algunos compuestos para atrapar radicales, *i.e* ABTS*⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6)). La técnica se usa ampliamente para muestras biológicas, alimentos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipófila (40).

El compuesto cromóforo ABTS es una sustancia color azul/verde con máximo absorción a 432 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical ABTS*⁺, una vez generado, muestra un máximo de absorción a las longitudes de onda 415, 645, 734 y 815 nm. De todas ellas, las longitudes de onda empleadas más frecuentemente son 415 y 734 nm (41). Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS*⁺ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un

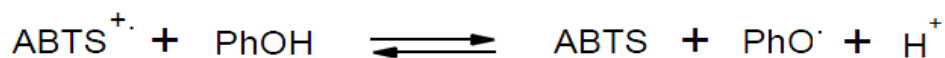
retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste (42).

El método original descrito por Miller *et al.* (1993) (43) emplea metamioglobina y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el ABTS para generar el radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. La muestra a analizar se añade antes de la formación del $\text{ABTS}^{+\cdot}$ por lo que se trata de un ensayo de inhibición. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales (41).

La modificación que propone Re *et al.* implica la producción directa del cromóforo azul/verde $\text{ABTS}^{+\cdot}$ por la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión preformado en el medio de reacción convierte esta técnica en una estrategia de decoloración. El grado de decoloración se puede medir a diferentes longitudes de onda, como se ha comentado, siendo la habitual la absorbancia a 734 nm (40,41,43.). Esta longitud de onda, próxima a la región infrarroja, reduce la posibilidad de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias e indica el porcentaje de inhibición del radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ como capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje de inhibición determina la actividad antioxidante como función de la concentración y del tiempo en comparación con la reactividad relativa del patrón.

El atrapamiento del catión-radical por interacción con la sustancia antioxidante, que se añade, una vez ha transcurrido un tiempo de 6 min, al sistema $\text{ABTS}^{+\cdot}$, se

detecta por una disminución de la absorbancia. En el Esquema 3, se observa la reacción entre una sustancia antioxidante y el catión-radical ABTS⁺ (44).

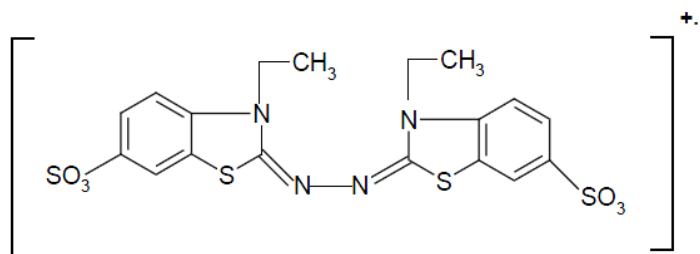


Esquema 3. Reacción entre el catión radical ABTS⁺ y un Antioxidante

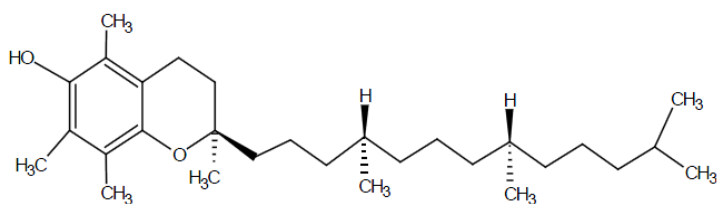
La actividad antioxidante de la sustancia se compara con la actividad del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), el compuesto análogo a la vitamina E (45,46), pero soluble en agua. En la Figura 20, se muestran las estructuras del ABTS⁺, vitamina E y Trolox.

Esta metodología se viene utilizando alrededor del mundo entero, en un estudio reciente realizado en Arkansas, se comparó las cinéticas de reacción y la actividad antioxidante expresándola en valor TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”) o Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox, de varios antioxidantes como aminotioles, amidotioles y metabolitos extraídos de fuentes naturales como la cúrcuma, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, entre otros, los cuales presentan valores TEAC un poco mayores que la sustancia de referencia Trolox (47), además se ha utilizado para estimar la Actividad antioxidante solamente de compuestos fenólicos, NENADIS, N. *et al.* (40), realizaron estudios que les permitieron hacer una relación directa estructura-actividad de los compuestos, con el fin de confirmar si podían hacer una apreciación cercana si ese tipo de sustancias iban a tener o no actividad antioxidante frente al cation radical ABTS⁺, estos ensayos se basaron en datos experimentales y cálculos teóricos. Todos los antioxidantes examinados (Derivados hidroxicinámicos, polifenoles simples, polihidroxibenzoatos y

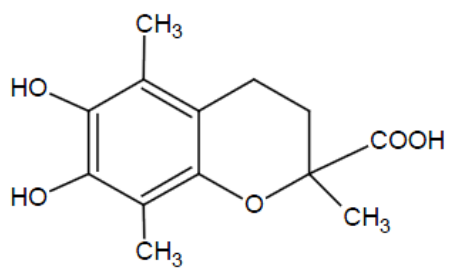
flavonoides) concordaron según los datos teóricos que iban a reaccionar con el catión radical ABTS (43).



ABTS⁺



Vitamina E (α -tocoferol)



Trolox[®]

Figura 20. Estructuras químicas del ABTS, vitamina E y Trolox

3.6.3 PRUEBA DE CAPACIDAD DE ABSORBANCIA DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ORAC)

El ORAC es un método que calcula la capacidad antioxidante especialmente de diferentes alimentos. Responde a las siglas en inglés de “Oxygen Radical Absorbance Capacity” y, bajo esta denominación, fue desarrollado por los investigadores del National Institute on Aging del National Institute of Health de EE.UU., debido a la inquietud científica por valorar la capacidad antioxidante, no de los componentes aislados si no del alimento en su integridad.

El método ORAC se desarrolló basándose en los trabajos de Glazer (48) y Ghiselli et al (49), para definirse posteriormente con las modificaciones de Cao *et al.* (50).

El ensayo ORAC se basa en la inhibición del radical peroxilo inducido por descomposición térmica de compuestos azo como el AAPH [2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro] (Figura 21). En el ensayo, el radical peroxilo reacciona con un compuesto fluorescente y forma un producto no fluorescente pudiendo ser cuantificado fácilmente por fluorescencia. Éste es el único método que registra la acción de la especie radicalcárica hasta el final y usa el área bajo la curva (AUC) de decaimiento de la capacidad antioxidante. De esta manera, la técnica considerada tanto el porcentaje de inhibición como la extensión del tiempo de ésta en un solo valor.

ORAC ha sido empleado en el análisis de sustancias puras, mezclas de antioxidantes naturales, además de tejidos y fluidos biológicos (51).

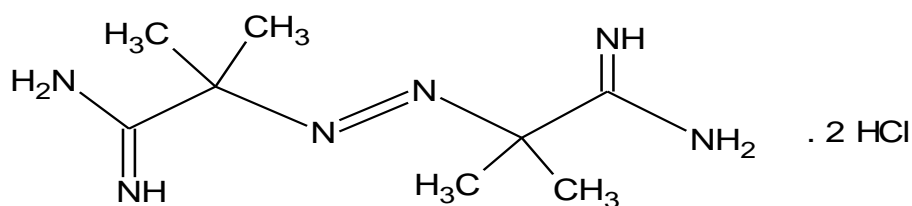


Figura 21. AAPH (2,2'-azo bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro)

Inicialmente, el método ORAC se realizaba con B-ficoeritrina (B-PE), una proteína fluorescente que posee diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, elevado campo de fluorescencia, sensibilidad a las especies ROS y solubilidad en agua. Sin embargo, la B-PE presenta una serie de inconvenientes: elevada variabilidad en la reactividad con radicales peroxilo, provocando inconsistencia de los resultados; no es fotoestable, por lo que transcurrido un cierto tiempo pierde totalmente el color; interacciona con los polifenoles (52), y además tiene un elevado precio. Todo ello provocó la aparición en el año 2001 de un método ORAC modificado que usa fluoresceína (FL) [3'6'-dihidroxy Spiro (isobenzofuran-1(3H),9(9H)-xanthen)-3-one] como compuesto fluorescente (53).

Este método determina en forma directa la capacidad antioxidante frente a una fuente radicalaria, ésta, es una técnica *in vitro* que utiliza la capacidad de donación del radical hidrógeno y mide la degradación oxidativa de la molécula fluorescente FL sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el AAPH. La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia (54).

El mecanismo de reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Para ello se usa un radical iniciador para generar el radical peroxilo (ROO·):



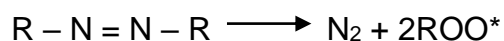
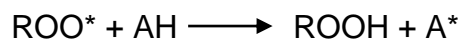


Figura 22. Generación del radical peroxilo

La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxilo. En presencia de un antioxidante, el radical capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante (AH), originando un compuesto hidroperóxido (ROOH) y un radical antioxidante estable (A^{*}). Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxilo es inhibida, es decir, en presencia de un antioxidante la disminución de la fluorescencia es más lenta. Las reacciones que tienen lugar se muestran en la Figura 23:



rápida

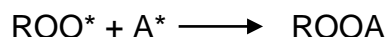


Figura 23. Reacciones que tiene lugar en el ensayo de ORAC

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, en la cual el antioxidante no está presente (Figura 24). La AUC del blanco se genera usando disolución tampón. Además se establece una recta de calibrado con diferentes concentraciones del estándar (Trolox) (55,56).

Este método se puede usar para medir la capacidad antioxidante de compuestos puros, y de extractos de origen vegetal, así como el contenido de antioxidantes de muestras biológicas como tejido musculoso de animales o plasma (57).

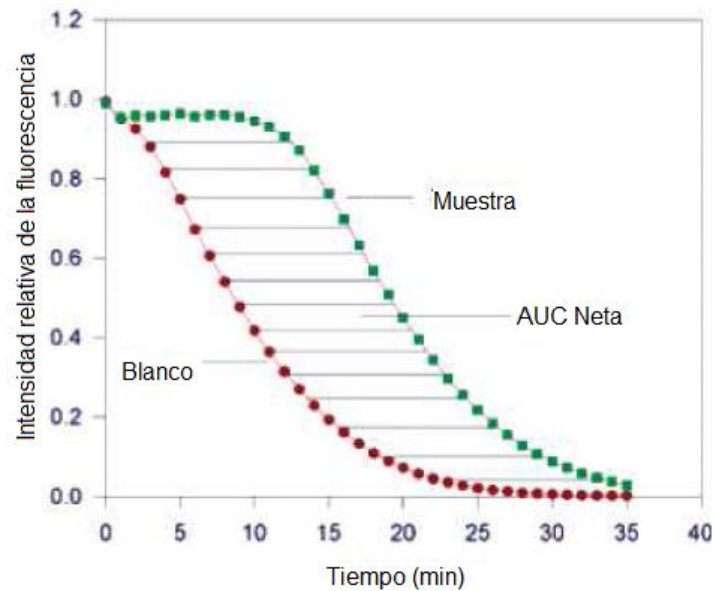


Figura 24. Actividad antioxidante ORAC de una muestra medida como AUC

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La experimentación juega un papel fundamental en todos los campos de la investigación y del proceso. El objetivo de la experimentación es obtener información de calidad; información que permita desarrollar nuevos productos y procesos, comprender mejor un sistema y tomar decisiones sobre como optimizarlo y mejorar su calidad, comprobar hipótesis científicas, etc.

El análisis de los resultados experimentales permitirá obtener conclusiones sobre el sistema en estudio y decidir actuaciones futuras. Tanto por la importancia de las decisiones que se pueden tomar, como por el coste elevado de la experimentación no parece adecuado dejar la elección de los experimentos y la evaluación de los resultados a la mera intuición del experimentador. Parece más razonable utilizar una metodología matemática y estadística que indique como planificar (diseñar, organizar) la secuencia de experimentos de una forma óptima, de modo que se minimice tanto el coste de la experimentación como la influencia del error experimental sobre la información buscada. Dicha planificación y análisis es el principal objetivo del Diseño Estadístico de Experimentos (58).

3.7.1 Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos es una metodología, basada en la estadística, destinada a la planificación y análisis de un experimento. El uso de esta técnica está aumentando actualmente en operaciones industriales y trabajos de investigación. De forma general, se aplica a sistemas en los cuales se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes controlables llamadas factores. Las respuestas además pueden estar influenciadas por otras variables que no son controladas por el experimentador.

El diseño de experimentos se basa en la planeación de un conjunto de pruebas experimentales, de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas acerca del sistema o proceso (59).

Las ventajas que ofrece el diseño de experimentos son:

- Proporciona una mayor información de los experimentos ya que se estudian simultáneamente los efectos de todos los factores de interés.
- Ofrece una propuesta ordenada de la información y son relativamente sencillos de analizar, disminuyendo los tiempos de análisis a la vez que, mejora la eficacia.
- Asegura más fiabilidad de la información otorgando mayor credibilidad y objetividad a los resultados.
- Permite acercarse al óptimo, estimar interacciones entre variables y proporcionan estimaciones de los efectos de las variables con una varianza reducida. De esta forma, se obtienen predicciones más reales no incluidas en los experimentos, como por ejemplo, la aparición de posibles interdependencias de variables.

En todo proceso intervienen distintos tipos de variables o factores como los que se definen a continuación:

- **Factores:** Cualquier influencia que afecta las variables de respuesta es controlada casi completamente por el experimentador; de esta variable se desean estudiar los efectos ya sea en una o en varias respuestas.
- **Nivel de un factor:** Es el número de alternativas o ajustes para cada factor.
- **Variable de respuesta:** medida cuantitativa de una unidad después de que el tratamiento es aplicado, su valor depende del tratamiento usado. Es la variable que se investiga y también es conocida como respuesta.

Un diseño experimental es algo más que un conjunto de condiciones de prueba; más bien es una secuencia de etapas o actividades que deben realizarse para

cumplir con éxito los objetivos que se persiguen. En este sentido, la actividad más importante y a la que se le debe dedicar mayor tiempo, es la planeación. A continuación se muestran las etapas del diseño de experimentos (60).

Las etapas en el diseño de un experimento son las siguientes:

1. Reconocimiento y establecimiento del problema
2. Selección de los factores y niveles de cada uno de estos
3. Selección de la variable de respuesta
4. Determinación del diseño experimental que debe llevarse a cabo
5. Realización del experimento para la obtención de los datos de la respuesta
6. Análisis estadístico de los datos
7. Conclusiones y recomendaciones.

3.7.2 Diseño Factorial

En el diseño factorial se estudia el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas o características de calidad, es decir, lo que se busca es estudiar la relación entre los factores y la respuesta, con la finalidad de conocer mejor como es esta relación y generar conocimiento que permita tomar decisiones que mejoren el desempeño del proceso.

En el arreglo factorial, los puntos experimentales o tratamientos se forman por las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Por ejemplo, los diseños factoriales 2^k consisten en k factores, todos con dos niveles de prueba y el diseño 3^k consiste de k factores cada uno con tres niveles de prueba (61).

3.7.3 Modelos Matemáticos

3.7.3.1 Diseño 2^k factorial

Un diseño factorial es una estrategia experimental que consiste en cruzar los niveles de todos los factores en todas las combinaciones posibles. Los diseños de tipo 2^k son diseños factoriales a dos niveles. En este caso, los valores correspondientes a los dos niveles se codifican asignando al nivel bajo el valor -1 y al alto el +1. Este diseño, en el cual “k” representa los factores necesarios para cada análisis, es útil para estimar interacciones y efectos principales. Las combinaciones de los factores de nivel para diseños 2^2 y 2^3 se pueden representar como las esquinas de un cuadrado o de un cubo, respectivamente. Estos dos ejemplos se ilustran en la Figura 25:

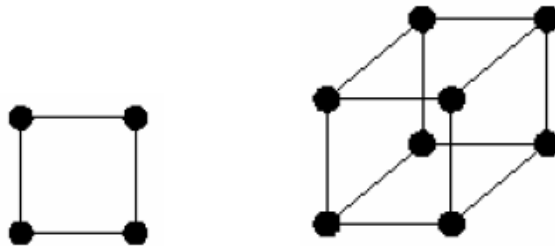


Figura 25. Diseño 2^k factorial para $k = 2$ y $k = 3$

3.7.3.2 Diseño Factorial 2^3

Para conocer el efecto de un factor es suficiente con hacerlo variar entre dos valores. Los más adecuados son los extremos de su dominio experimental: entre el nivel -1 y el +1. Y además esta variación se debe realizar para cada posible combinación de los valores de los demás factores. Esto permitirá descubrir si el

efecto depende de qué valor tomen los otros factores. Todas estas combinaciones están contempladas en el diseño factorial completo 2^3 de la Tabla 5; en total ocho experimentos (61,62).

Tabla 5. Matriz de experimentos de un diseño factorial completo 2^3 , plan de experimentación y respuestas medidas

Matriz de Experimentos				Respuesta
1	-	-	-	Y1
2	+	-	-	Y2
3	-	+	-	Y3
4	+	+	-	Y4
5	-	-	+	Y5
6	+	-	+	Y6
7	-	+	+	Y7
8	+	+	+	Y8

Una vez se dispone de los resultados experimentales se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Los tests estadísticos permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental. Si se construye un modelo de superficies de respuesta, se pueden calcular los coeficientes por el método de los mínimos cuadrados y se puede evaluar el modelo realizando réplicas de ciertos experimentos y aplicando el test ANOVA, este se puede realizar con el paquete estadístico PASW Statistics 18 (versión 18.0.0), el cual es un sistema amplio y flexible de análisis estadístico y gestión de información que capaz de trabajar con datos procedentes de distintos formatos generando, desde sencillos gráficos de distribuciones y estadísticos descriptivos hasta análisis estadísticos complejos que nos permitirán descubrir

relaciones de dependencia e interdependencia, establecer clasificaciones de sujetos y variables y predecir comportamientos. (59).

Actualmente este tipo de diseños es muy utilizado con el fin de optimizar protocolos de extracción de moléculas antiradicalarias, como el implementado por Bover, L. denominado, "Estudio y cuantificación de la actividad antioxidante de flores comestibles" el cual pretendió, estudiar, comparar y determinar el mejor disolvente, la mejor concentración, y comprobar si había algún efecto del pH en la extracción (53).

3.7.4 Robustez del Método

El estudio de la robustez se utiliza para optimizar y ver la criticidad del valor de los parámetros del método. La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado por pequeñas variaciones deliberadas en el método y provee un indicio de su veracidad durante su uso normal (55).

3.8 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL

3.8.1 Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido consiste en la separación de los constituyentes de una disolución líquida por contacto con otro líquido inmiscible que disuelve selectivamente a uno o varios de los constituyentes de la disolución original; esta técnica involucra transferencia de masa de una fase líquida a una segunda fase líquida inmiscible.

La transferencia del componente disuelto se puede mejorar por la adición de agentes saladores o "formadores de complejos" al disolvente de extracción. En

algunos casos se puede utilizar una reacción química para mejorar la transferencia como por ejemplo, el empleo de una solución cáustica acuosa (como una solución de hidróxido de sodio), para extraer fenoles de una corriente de hidrocarburos. Un concepto más complicado de la extracción líquido-líquido se utiliza en un proceso para separar completamente dos solutos. Un disolvente primario de extracción se utiliza para extraer uno de los solutos presentes en una mezcla (en forma similar al agotamiento en destilación) y un disolvente lavador se utiliza para depurar el extracto libre del segundo soluto (semejante a la rectificación en destilación).

Para que el proceso de separación de buenos resultados, el disolvente y el solvente o líquido acarreador debe ser inmisible o a lo más parcialmente soluble en el rango de temperatura y concentraciones del problema. Por su parte, un buen disolvente debe ser capaz de disolver al soluto en mayor proporción que el solvente y debe poder recuperarse con cierta facilidad, por ejemplo por destilación (62).

3.8.2 Extracción En Fase Sólida

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) es un método conveniente para preparación de muestras para análisis cromatográfico, ya que requiere una pequeña cantidad de muestra y bajo volumen de disolventes orgánicos, mientras que el tratamiento se realiza en un muy corto período de tiempo que en otras técnicas.

Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable, se utilizan para eliminar los contaminantes de la muestra o para fraccionar los analitos antes de un análisis. La SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta

retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen. Esta técnica es altamente selectiva y versátil debido a la gran cantidad de fases introducidas en los últimos diez años (62,63).

La técnica SPE se rige básicamente por las siguientes etapas:

1. Activación. El primer paso es la activación, en la que se utiliza un solvente para "humidificar" la fase.

2. Acondicionamiento. La fase estacionaria SPE se acondiciona con el mismo solvente de la matriz, por ejemplo, con matrices acuosas el solvente es agua. El acondicionamiento permite "alinearse" la fase estacionaria, permitiendo la interacción entre el analito y esta. Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SPE. Para maximizar las interacciones la muestra deben cargarse en el adsorbente de SPE a aproximadamente 3 ml/min. Este caudal puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de SPE mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

4. Elución. La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado y a un caudal aproximado de 1 ml/min. El adsorbente de SPE y las interacciones analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

3.8.3 Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases, es un método de separación de mezclas complejas, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase móvil (gas inerte como N₂, He, H₂) y la otra es la estacionaria, constituida por un sólido o un líquido soportado sobre las paredes de la columna, la cual se encuentra localizada dentro del horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos del análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos en la muestra y del grado de separación requerido. En la entrada, la columna está conectada a un inyector, en donde se introduce una porción de la muestra a analizar. La muestra entra en la columna y los analitos pasan a través de ella a diferentes velocidades, emergiendo a distintos tiempos de acuerdo estrictamente con su temperatura de ebullición. Los analitos que eluyen de la columna pasan a un detector, el cual registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad (64).

La cromatografía de gases separa los compuestos de una mezcla, pero para su identificación se hace necesario implementar otras técnicas espectroscópicas como son la espectroscopía infrarroja (IR), la cual permite identificar los metabolitos presentes en mayor proporción por la presencia de bandas características de absorción; resonancia magnética nuclear (RMN), empleada en la caracterización de nuevos metabolitos previo su aislamiento; y la más ampliamente aplicada, cromatografía de gases con detector de masas (GC-EM) (65,66).

En la actualidad, el detector espectrométrico de masas acoplado al cromatógrafo de gases constituye una herramienta indispensable para determinar la composición de una muestra compleja. En esta unión se obtienen espectros de masas de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica.

En la Figura 26, se observan las principales partes de un CG: gas portador, puerto de inyección, columna capilar, horno termostataado y el detector.

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas, permite hacer un análisis rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas. Este sistema de GC/MS consta de tres bloques: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y un sistema de datos (Figura 27) (66,67).

El sistema de datos, convierte las señales procedentes del espectrómetro de masas, en cromatogramas y espectros de masas, permitiendo obtener información estructural de los componentes de la esencia, de acuerdo con el patrón de fragmentación del compuesto (68,69).

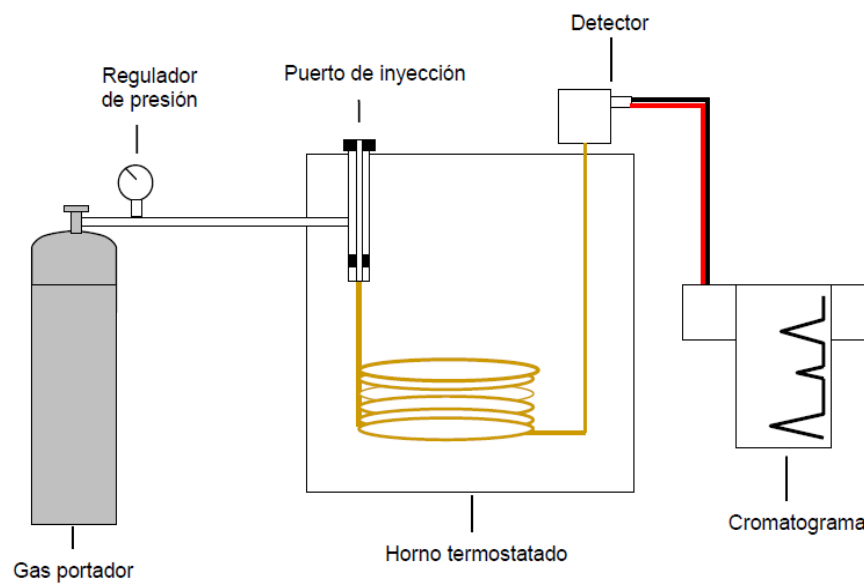


Figura 26. Principales partes de un cromatógrafo de gases

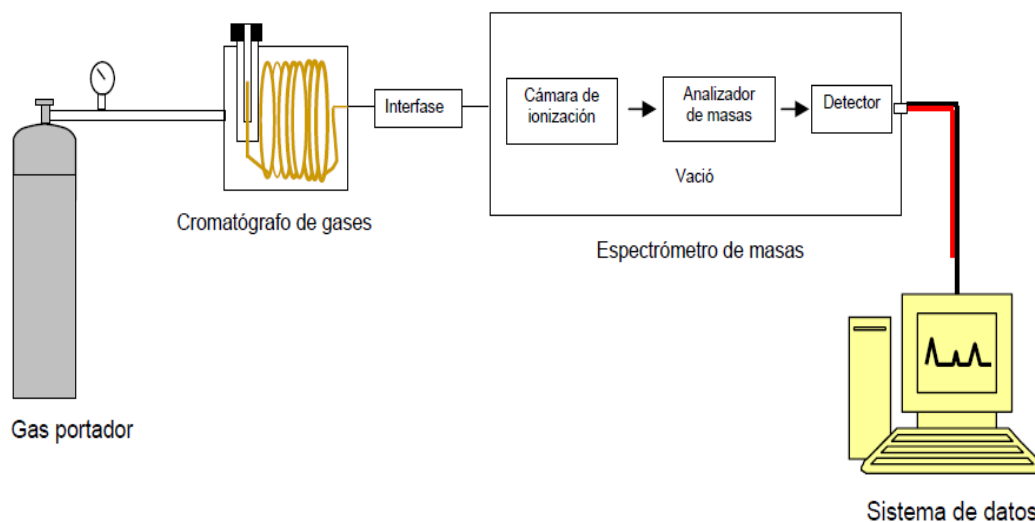


Figura 27. Principales partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas

Algunos estudios que se han realizado sobre antioxidantes han involucrado la técnica de cromatografía de gases con detector de masas con el fin de identificar los metabolitos que presentan actividad antioxidativa (65,66,67), es el caso de Guzmán, M. *et al*, quienes desarrollaron un estudio titulado, “Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en córdoba” (70), y el estudio “Eugenia Dysenterica DC: actividad antioxidante, Perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles”, realizado por Neuza *et al*, logrando identificar y cuantificar los ácidos grasos que daban actividad antioxidante a esta planta (71).

4. METODOLOGÍA

4.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

En el desarrollo de los procesos enmarcados en la metodología propuesta se utilizaron reactivos y solventes grado reactivo para la extracción y análisis de las muestras de jugo de fique (*Furcraea sp.*).

Tabla 6. Lista de reactivos, solventes y equipos

Reactivos	Ácido acético
	Hidróxido de amonio
	Nitrato de bismuto pentahidratado
	Acido nítrico
	Yoduro de potasio
	Acido clorhídrico
	Dietilamina
	Cloroformo
	Subnitrato de bismuto
	Acido acético
	Yoduro de potasio
	Acido pícrico
	Hidróxido de sodio
	Acido sulfúrico
	Sulfato férrico
	Piridina
	Metilacetona
	Formamida
	Ciclohexano
	M-dinitrobenceno
	Acido tricloroacético
	Carbonato de sodio
	4-Amino antipirina
Ferrocianuro de potasio	
Formiato de etilo	

Tabla 6. Lista de reactivos, solventes y equipos (Continuación)

Solventes	Hexano
	Acetato de etilo
	Butanol
	Metanol
Equipos	Rota evaporador BUCHI WATHERBATH B-480
	Espectrofotómetro ultravioleta visible GENESIS 6
	pH-metro 744 Metrohm
	Centrifugadora Hermle Labortechnik Z200A-6000rpm
	Ultrasonido Branson 2510R-MTH
	Lámpara ultravioleta UV GL-58 handheld 254/365 nm
	Lector de placas Modulus™ II Microplate Multimode Reader modelo 9310-011 (Turner Biosystems, North Mary Avenue, CA, USA).

4.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La recolección de la muestra de jugo de fique se realizó en el sector de Miraflores del municipio de Totoró Cauca, el cual se encuentra ubicado al oriente del departamento del Cauca a una distancia aproximadamente a 36 Km de Popayán. Esta localizado a una altura de 2.750 m.s.n.m., con una temperatura media de 14 grados centígrados, entre los 2°38´ de latitud norte y 2°15´ longitud Oeste. Su clima predominante es frío, y una precipitación pluvial anual de 2000 mm (72).

4.3 RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA

El jugo de Fique se recolectó después de la molienda del material vegetal, en el sector de Miraflores del municipio de Totoró, (Cauca). El jugo recolectado se centrifugó y conservó máximo por un día bajo refrigeración protegido de la luz.

4.4 EXTRACCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL JUGO DE FIQUE PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA

4.4.1 Extracción Líquido-Líquido

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción de los antioxidantes, se aplicó un diseño experimental 2³. Las siguientes variables fueron consideradas: cantidad de solvente, tiempo de extracción y pH. El diseño experimental completo se observa en la Tabla 7 y su representación geométrica se muestra en la Figura 28.

Tabla 7. Diseño de Experimentos 2³

Combinación	pH	Cantidad solvente (mL)	Tiempo extracción (min)	Respuesta
1	4.40	25	30	Y1
pH	7.12	25	30	Y2
Cantidad de solvente	4.40	50	30	Y3
Tiempo de extracción	4.40	25	90	Y4
Cantidad de solvente- Tiempo de extracción	4.40	50	90	Y5
pH-Tiempo de extracción	7.00	25	90	Y6
pH-Cantidad de solvente	7.00	50	30	Y7
pH-Cantidad de solvente- Tiempo de extracción	7.00	50	90	Y8

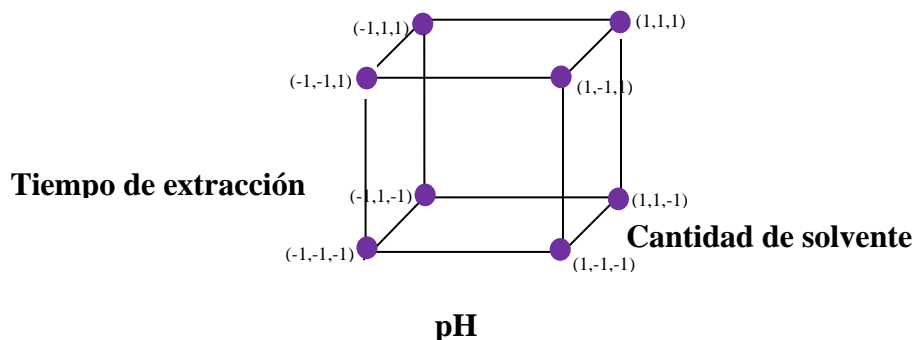


Figura 28. Diseño factorial 2³ y su representación geométrica

Las variables se fijaron teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Las extracciones Líquido-Líquido se realizaron siguiendo la metodología utilizada en el departamento de Química de la Universidad de Jaen (España) por el Doctor Joaquín Altarejos (Esquema 4), en el que se planteaba inicialmente realizar la extracción a partir de 25g de material sólido ya que comúnmente los antioxidantes son extraídos de material vegetal seco, debido a que la matriz a evaluar se encontraba en estado líquido se tomó una cantidad de 25 mL de jugo de fique, se adoptaron como valores mínimos las cantidades de solvente (25 mL) y tiempo de extracción (30 min) sugeridas en la metodología citada, y como puntos máximos se tomaron valores de 50 mL de solvente y 90 minutos de extracción.

En cuanto al pH, existen numerosas referencias bibliográficas respecto a su influencia en la actividad antioxidante (73,74). Por lo que en el presente trabajo interesa confirmar si la variación del pH influye en la extracción de metabolitos con capacidad antioxidante, al trabajar con el pH inicial al cual se encuentra el jugo (4.40) y como máximo valor a pH neutro. El rango de pH escogido es un intervalo en el que se encuentran muchos alimentos.

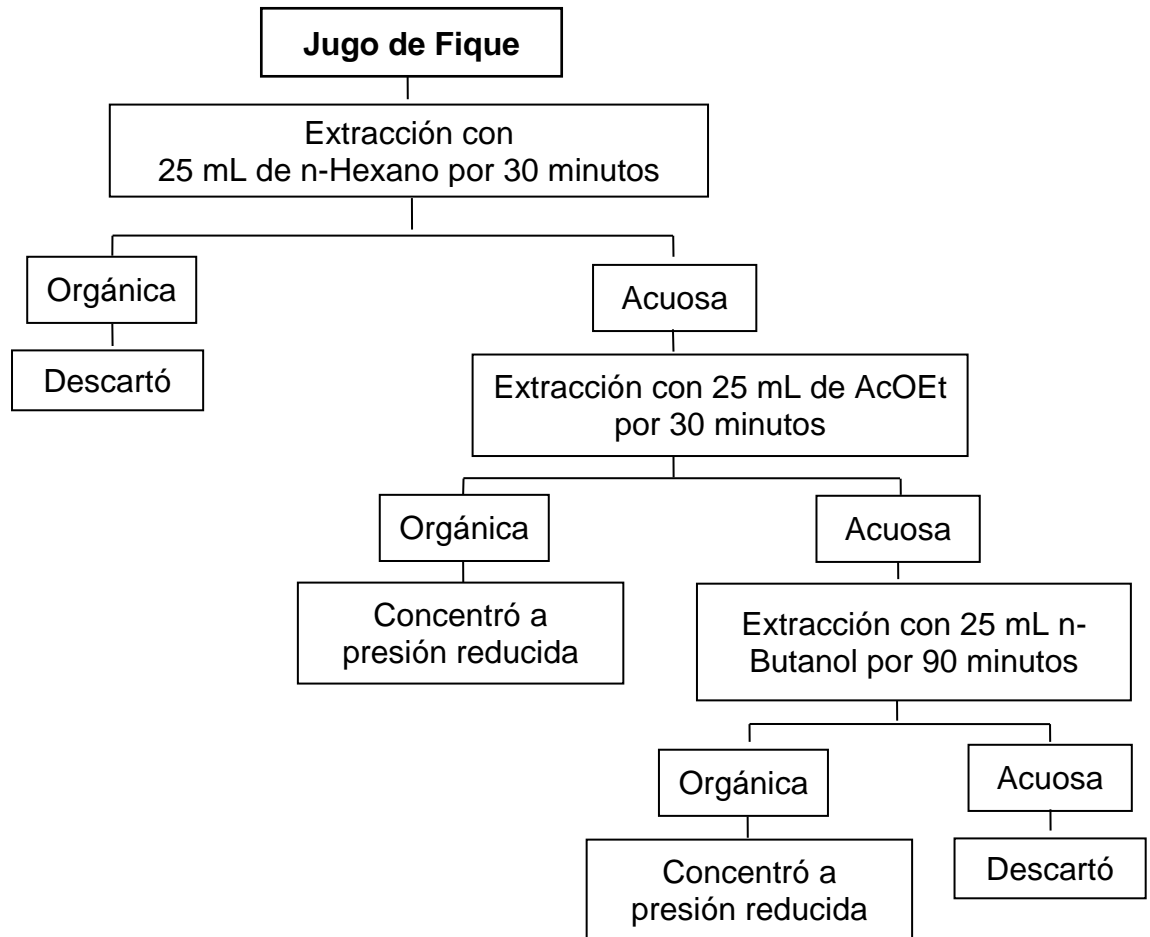
Se realizaron extracciones Líquido-Líquido (Figura 29), siguiendo la metodología mostrada en el Esquema 4, a partir de 25 mL de jugo de fique con n-Hexano y Acetato de etilo, cada una con 25 mL de solvente por 30 minutos, la fase acuosa se volvió a extraer con 25 mL de n-Butanol por 90 minutos, estas dos últimas fracciones se rotaevaporaron en un equipo Rotavapor Buchi waterbath B-480 (Figura 30); con el fin de obtener los extractos secos para evaluar la capacidad atrapadora de radicales libres mediante los métodos del DPPH^{*}, ABTS⁺ y ORAC.



Figura 29. Montaje de extracción líquido-líquido



Figura 30. Eliminación del solvente por medio de rotaevaporación



Esquema 4. Diagrama de flujo de Extracción Líquido-Líquido

4.4.2 Extracción por SPE

La extracción por SPE, se realizó utilizando una fase estacionaria C₁₈, el cartucho fue acondicionando previamente con Agua desionizada, n-Butanol y Acetato de etilo.

El jugo de fique fue previamente desengrasado con 25 mL de n-Hexano y posteriormente adicionando al cartucho a un flujo de 3 mL/min y a continuación se

eluyó con 4 mL de n-Butanol y 4 mL de Acetato de Etilo a un flujo de 1 mL/min (Figura 31).



Figura 31. Extracción por SPE

Las extracciones se realizaron por triplicado y a las fracciones obtenidas se les evaluó la actividad antioxidante por medio de los métodos descritos anteriormente.

4.4.3 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico (Tabla 8) se realizó tanto al jugo como a los extractos obtenidos que presentaron mayor Actividad Antioxidante, siguiendo la metodología sugerida por Sanabria (10) y Domínguez (16).

Tabla 8. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en los extractos

NÚCLEOS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS Y/O REACTIVOS
Alcaloides	Dragendorff Mayer
Glicósidos Cardiotónicos	Baljet
Cumarinas	Emerson
Flavonoides	Shinoda
Taninos	Cloruro férrico
Saponinas y Sapogeninas	Agua caliente
Triterpenoides y/o esteroides	Liebermann-Burchard

4.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL BIOENSAYO “IN VITRO”: ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES.

4.5.1 Ensayo de Decoloración del Radical DPPH*

La actividad antioxidante de las fracciones del jugo de fique y la sustancia de referencia Hidroxitolueno butilado (BHT), se evaluó como una medida de la capacidad de donar hidrógeno o su habilidad de secuestrar el radical estable DPPH*; siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams *et al* (33).

El procedimiento desarrollado se describe a continuación:

Se prepara una solución patrón de DPPH en metanol, disolviendo 2,9 mg de DPPH en 100mL de MeOH, la cual se almacena a 0°C, en un recipiente ámbar recubierto con papel aluminio, la cual debe tener una absorbancia de 0.8 ± 0.2 a 515 nm.

Posteriormente, se preparan varias disoluciones de DPPH* en metanol con concentraciones comprendidas entre 8.14 y 27.38 ppm, y se toman medidas de absorbancia a 515 nm con las que se prepara una recta de calibrado.

Las concentraciones de los extractos y de la sustancia pura (BHT), se preparan por triplicado y la medición se lleva a cabo a través de la técnica fotométrica visible.

El cálculo de la capacidad atrapadora de radicales libres se realiza empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ De Inhibición} = \frac{[1 - (\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco muestra})] \times 100}{\text{Absorbancia Blanco}}$$

Ecuación 1. Capacidad de decoloración del radical DPPH*

Un valor igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora y un valor cercano a 0 indica una reducida capacidad (75).

El porcentaje de inhibición se registra cuando la reacción ha llegado al estado estacionario, la concentración de antioxidantes en el estado estacionario es

aquella a la cual la absorbancia medida a través del tiempo no cambia o su variación es menor de 10%, y la concentración del radical, es la concentración inicial medida antes de agregar la sustancia antioxidante. Posteriormente, la capacidad de atrapar el radical se determina con base en una gráfica de porcentaje remanente de DPPH* vs EC (Concentración efectiva) (76).

La concentración efectiva se haya con la siguiente ecuación:

$$EC = \frac{\text{mg del antioxidante en el estado estacionario}}{\text{mg de DPPH}^* \text{ en el estado estacionario}}$$

Ecuación 2. Cálculo de la Concentración Efectiva (EC)

A partir de la gráfica mencionada anteriormente se puede determinar el valor de EC₅₀, es decir, la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50%, la concentración inicial del DPPH*, esta medida se usa con el fin de tener un parámetro de referencia entre los extractos y la sustancia de referencia.

4.5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DEL JUGO DE FIQUE USANDO EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS*

Preparación del catión radical ABTS*, 19.20 mg de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencensulfónico-6) y 3.31 mg de persulfato de potasio, se disuelven en 5 mL de agua grado HPLC. La solución se deja reaccionar por 24 horas bajo refrigeración y protegida de la luz. Posteriormente, una alícuota de la solución se diluye en etanol, hasta conseguir una absorbancia de 0.70±0.5 a 750 nm.

Los extractos se prepararon a una concentración 3250 ppm para los metabolitos extraídos con Acetato de etilo, para los extraídos con n-Butanol mediante extracción L-L, a una concentración 350 ppm y los extraídos con n-Butanol mediante SPE, a una concentración de 600 ppm, usando una mezcla metanol: agua (70:30) como solvente. La absorbancia se midió cada minuto por seis minutos después de la adición de una alícuota de 20 μ L del extracto, a 200 μ L de la solución del catión-radical ABTS⁺ (22).

Los datos espectroscópicos fueron obtenidos en un espectrofotómetro para microplacas Modulus™ II Microplate Multimode Reader modelo 9310-011(Figura 32).



Figura 32. Lector placas Modulus™ II Microplate Multimode

La capacidad antioxidante de las sustancias de referencia BHA y Vitamina E y de las fracciones del jugo de fique, fue determinada como la actividad antioxidante total (TAA) y expresada como mmol de Trolox por Kg de sustancia utilizada.

4.5.3 Ensayo de la Capacidad de Absorbancia de Los Radicales Libres de Oxígeno (ORAC)

La reacción fue llevada a cabo con 25 μL de buffer de fosfato 75 mM (pH 7.4), y la mezcla final de reacción fue de 300 μL . Las soluciones de los Antioxidante (25 μL) y fluoresceína (150 μL ; 12 mM, concentración final) fueron puestas en la microplaca. La mezcla fue preincubada por 18 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. La solución de AAPH (25 μL ; 153 mM, concentración final) fue adicionada rápidamente usando una pipeta multicanal. La microplaca fue inmediatamente colocada en el equipo y la fluorescencia reportada cada dos minutos por hora y media. La microplaca fue agitada automáticamente por cada lectura. Un blanco (FL+AAPH) de la solución de antioxidante usando buffer de fosfato y cinco soluciones de calibración usando Trolox (2.25-25.25 ppm, concentración final) como antioxidante fue también fueron llevadas a cabo en cada ensayo.

Los datos fueron exportados del lector de placas Modulus™ II Microplate Multimode Reader a Excel para los cálculos. Las curvas de antioxidantes (fluorescencia vs tiempo) fueron primero normalizadas a la curva del blanco correspondiente para el mismo ensayo multiplicando los datos originales por el factor de $\text{fluorescencia}_{\text{blanco}, t=0} / \text{fluorescencia}_{\text{muestra}, t=0}$. De las curvas normalizadas, se calculó el área bajo la curva (AUC) así:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0$$

Ecuación 3. Cálculo del área bajo la curva (AUC)

Donde f_0 es el valor inicial de la fluorescencia al minuto 0 y f_i es la fluorescencia leída al tiempo i .

El AUC NETA correspondiente a la muestra y a las sustancias de referencia (BHA y Vitamina E) fue calculado restando el AUC correspondiente al blanco. La regresión de la ecuación entre AUC NETA y la concentración del antioxidante fue calculada para todas las muestras. Los valores de ORAC-FL fueron expresados como equivalentes de Trolox utilizando una curva estándar para cada ensayo. Finalmente los resultados fueron expresados en mg Equivalentes de Trolox/mg de muestra (44, 47).

4.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES EN LAS FRACCIONES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA POR LA TÉCNICA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA DE GASES CON DETECTOR DE MASAS.

La identificación de metabolitos secundarios se realizó por comparación con las bibliotecas de espectros de Masas NIST, adquiridas por el centro de investigación CIBIMOL de la Universidad Industrial de Santander, este procedimiento se llevó a cabo en las fracciones con mayor actividad antioxidativa en un equipo de GC-MS (Agilent Technologies 6890 Plus acoplado a un detector selectivo e masas (MSD, Agilent Technologies 5973)) de alta resolución, bajo las siguientes condiciones:

Tabla 9. Condiciones del GC-MS de alta resolución

Equipo	GC Agilent Technologies 6890- MSD 5973
Columna	DB-5MS
Temperatura del Inyector	250°C
Interfase GC-MSD	280°C
Programa de Temperatura del horno	150 °C (5min) hasta 270 °C , 4 °C/min
Energía de Ionización	70eV
Temperatura cámara de ionización	230°C

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS 2³

Al proceso completo de extracción Líquido-Líquido se le implementó un diseño factorial completo 2³ usando el software estadístico PASW Statistics 18 (versión 18.0.0), en la aplicación del análisis factorial de varianza se muestran los valores del estadístico F y los niveles correspondientes de probabilidad se asumen en un intervalo del 95%.

Por la prioridad de las interacciones sobre los efectos principales, primero se analizarán las gráficas de interacción, por tanto, en la Tabla 10 de ANOVA para la fracción de AcOEt** se muestran solo los resultados de las interacciones dobles.

Tabla 10. ANOVA en las interacciones dobles en la fracción de AcOEt

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F*
Cantidad de solvente-Tiempo de extracción	14,660	1	14,660	0,054
pH-Tiempo de extracción	1494,365	1	1494,365	5,479
pH-Cantidad de solvente	59,951	1	59,951	0,220

* Valor crítico $F_{1,64} = 4.00$ ($P = 0.05$)

** Para ver el ANOVA completo del AcOEt remitirse al ANEXO 1, Tabla 1

La Tabla 10 pone en evidencia que la interacción pH – Tiempo de extracción es la que presenta mayor significancia, en ese sentido se realizaron las gráficas de interacción para 25 y 50mL de solvente con el fin de tener un mejor entendimiento de las mismas (Figura 33).

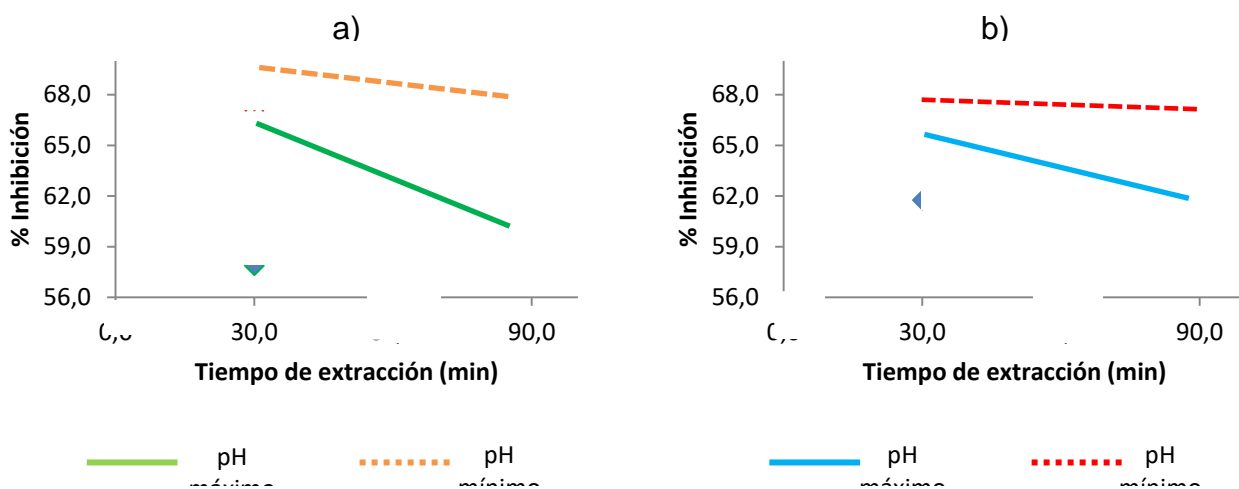


Figura 33. Efecto de interacción pH-Tiempo de extracción para a) 25mL y b) 50mL de AcOEt

La Figura 33 muestra como varía el porcentaje de Inhibición al modificar el tiempo de extracción, trabajando a un pH de 4.40 (línea punteada) y 7.12 (línea continua). Estas líneas indican que el tiempo de extracción produce una disminución del % de Inhibición al pasar de un nivel mínimo a uno máximo.

Ahora bien, en la Figura 33 a) se realizó el análisis de ANOVA a un tiempo de extracción mínimo en los dos niveles de pH, así mismo, para un tiempo de extracción máximo (Ver ANEXO 1, Tabla 2 y 3), obteniéndose que para 30 y 90 min, el pH afecta de manera significativa el % de Inhibición. De igual manera, al realizar el ANOVA (Ver ANEXO 1, Tabla 4) a un pH mínimo en los dos

niveles de tiempo de extracción se observa que no existe diferencia significativa. De ahí que los mejores tratamientos sean pH (4.40) y tiempo de extracción (30min) ó pH (4.40) y tiempo de extracción (90min).

Del mismo modo, en la Figura 33 b) se observa que cuando el Tiempo de extracción está en su nivel máximo el pH afecta de manera significativa el % de Inhibición, por el contrario, cuando el tiempo de extracción se encuentra en su nivel mínimo, prácticamente es igual trabajar con los dos pH (Ver ANEXO 1, Tabla 5 (F = 20.60) y 6 (F = 1.47), respectivamente). También, se elaboró un ANOVA (Ver ANEXO 1, Tabla 7, F=5.15) a un pH mínimo para 30 y 90min de extracción, resultando una diferencia significativa a estos dos niveles de tiempos de extracción.

Ahora bien, con el fin de establecer la cantidad de solvente a trabajar, se realizó un ANOVA de un factor (Ver ANEXO 1, Tabla 8, F = 1.90), resultando la no diferencia significativa entre las dos cantidades de solvente.

Así, en la elección del mejor tratamiento se eligen los niveles que resultan más convenientes desde el punto de vista económico, productivo y operativo; en este caso se trabajó con el tiempo de extracción de 30min, un pH de 4.40 y 25mL de solvente.

Por otro lado, según se aprecia en la Tabla 11 de ANOVA para la fracción de n-BuOH**, existe una interacción significativa entre el pH – Tiempo de extracción, por lo que se procedió a realizar la graficas de interacción (Figura 34.).

** Para ver el ANOVA completo del 1-BuOH remitirse al ANEXO 2, Tabla 1

Tabla 11. ANOVA de las interacciones dobles para la fracción de n-BuOH

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F*
Cantidad de solvente-Tiempo de extracción	504,027	1	504,027	1,614
pH-Tiempo de extracción	4799,688	1	4799,688	15,373
pH-Cantidad de solvente	3,626	1	3,626	0,012

* Valor crítico $F_{1,64} = 4.00$ ($P = 0.05$)

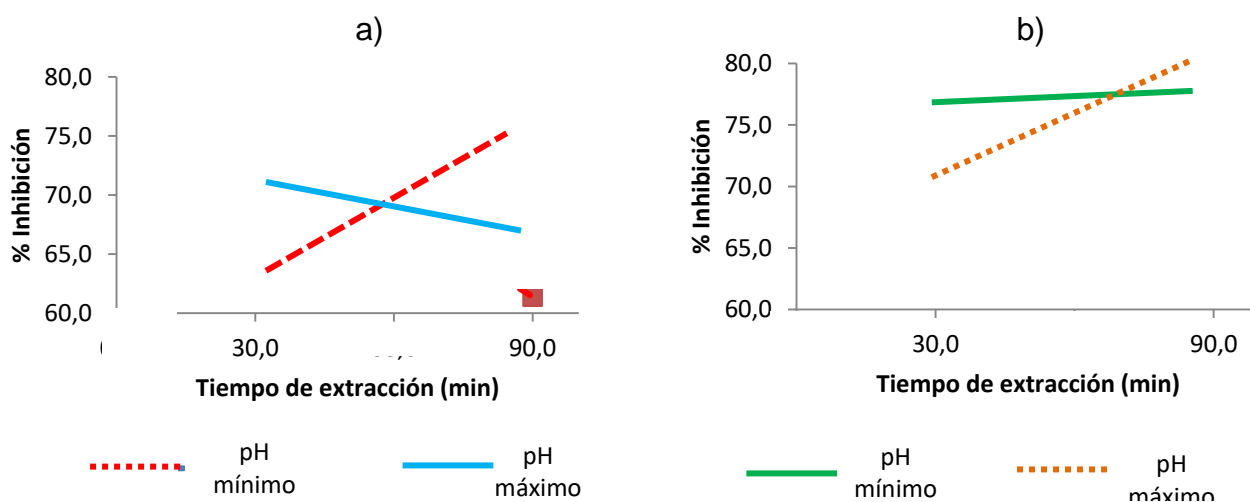


Figura 34. Efecto de interacción pH-Tiempo de extracción para a) 25mL y b) 50mL de n-BuOH, respectivamente

En la figura 34 se observa que los factores no son independientes entre sí, puesto que no existe un paralelismo entre las líneas, dándose una interacción manifiesta entre los factores.

Entonces, acorde a la figura 34 a), el tiempo de extracción hace descender los valores del % de Inhibición cuando se encuentra a un $pH_{\text{máximo}}$ (línea continua), por el contrario, cuando el pH es mínimo (línea punteada) hace aumentar los porcentajes de Inhibición, en ese sentido, se realizó el ANOVA a un tiempo de extracción mínimo a los dos niveles de pH, este mismo proceso se hizo para un tiempo de extracción máximo, resultando una diferencia significativa entre los niveles de pH a 30 y 90 min (Ver ANEXO 2, Tabla 2 ($F=96.28$) y 3 ($F=93.84$), respectivamente), en ese sentido, el máximo porcentaje de Inhibición se obtiene cuando el tiempo de extracción es 90min y pH 4.40.

Por otra parte en la figura 34 b) se puede afirmar que cuando el tiempo de extracción es 90min, el pH no afecta de manera significativa el porcentaje de inhibición, por el contrario, cuando el tiempo de extracción es 30min, el pH tiene un efecto considerable sobre el porcentaje (Ver ANEXO 2, Tabla 3 ($F = 1.13$) y 4 ($F = 18.33$), respectivamente). Del mismo modo, se realizó un ANOVA a un pH mínimo a los dos niveles de tiempo de extracción (Ver ANEXO 2, Tabla 5, $F=0.14$). De esta manera, si lo que se quiere es aumentar el porcentaje de Inhibición, se puede utilizar los tratamientos de Tiempo de extracción (30min), pH (4,40) ó tiempo de extracción (90min), pH (4.40).

Ahora bien, para establecer la cantidad de solvente a trabajar, se realizó un ANOVA de un factor (Ver ANEXO 2, Tabla 6, $F = 2.74$), dando como resultado la no diferencia significativa entre las dos cantidades de solvente.

Con la interpretación hecha de las gráficas de interacción a las diferentes cantidades de solvente, ya se tiene un conocimiento básico sobre el proceso de extracción con n-BuOH.

Ya optimizadas las variables en estudio, las condiciones óptimas de trabajo para las fracciones de AcOEt y n-BuOH se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones óptimas en la extracción líquido-líquido

MUESTRA	PARÁMETROS	CONDICIONES
Fracción de AcOEt	pH	4,4
	Cantidad de solvente (mL)	25
	Tiempo de extracción (min)	30
Fracción de n-BuOH	pH	4,4
	Cantidad de solvente (mL)	25
	Tiempo de extracción (min)	90

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción líquido-líquido se realizó el estudio de la robustez del método.

En primer lugar para el AcOEt se encuentra que el factor que más influye sobre la variable de respuesta es la cantidad de solvente, por lo tanto, los tratamientos evaluados y sus resultados correspondientes se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados de los tres tratamientos para evaluar la robustez de las condiciones del AcOEt

Tratamiento	pH	Tiempo de extracción (min)	Cantidad de solvente (mL)	% Inhibición
1	4.4	30	25	60.319 ± 0.575
2	4.4	30	20	59.876 ± 0.498
3	4.4	30	15	59.072 ± 0.374

De acuerdo a la Tabla 13 no se encontró ninguna diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 ó 1 y 3 (Ver ANEXO 3, Tabla 1 y 2), es decir, que el método de extracción líquido-líquido con el AcOEt en las condiciones óptimas encontradas es robusto, esto implica que se puede sustituir la cantidad de 25 a 15 mL de solvente ahorrando recursos.

Por otro lado, para el n-BuOH se encuentra que el factor que más influye sobre el porcentaje de Inhibición es el tiempo de extracción, de ahí que los tratamientos y el resultado de ellos se muestren en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de los tres tratamientos para evaluar la robustez de las condiciones del n-BuOH

Tratamiento	pH	Tiempo de extracción (min)	Cantidad de solvente (mL)	% Inhibición
1	4.4	90	25	80.448 ± 0.378
2	4.4	120	25	79.580 ± 0.202
3	4.4	150	25	79.746 ± 0.402

Acorde a la Tabla 14 no se encuentra diferencia significativa entre los tratamientos (Ver ANEXO 3, Tabla 3 y 4), por lo tanto, el método de la extracción líquido-líquido

con el n-BuOH en las condiciones óptimas encontradas es robusto y se establece como tiempo de extracción 90 min.

5.2 TAMIZAJE FITOQUIMICO

En el análisis fitoquímico preliminar se evaluó cualitativamente, la presencia de metabolitos secundarios, los cuales responden químicamente frente a los reactivos específicos en cada caso, los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados tamizaje fitoquímico para las fracciones del Jugo de Figue

SUSTANCIA	PRUEBA	Jugo de Figue	Fracción de AcOEt (L-L)	Fracción n-BuOH (L-L)	Fracción de n-BuOH (SPE)
Alcaloides	Dragendorff	+	-	-	-
	Mayer	+	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos	Baljet	++	+	+	+
Cumarinas	NaOH	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+
Saponinas y Sapogeninas	Ensayo de agua caliente	+	-	+	+
Terpenoides y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+	+	+	+
Taninos	Prueba de FeCl ₃	+	+	-	-

(+) = Respuesta positiva para ese metabolito en el extracto

(++) = Respuesta positiva para ese metabolito en el extracto con un mayor precipitado

(-) = Respuesta negativa para ese metabolito en el extracto

De las pruebas efectuadas para determinar cualitativamente metabolitos secundarios podemos destacar que el Jugo presenta resultados positivos en todos los ensayos exceptuando la prueba para Cumarinas, mientras en ninguna de las fracciones se presentan alcaloides. Además los taninos solo están presentes en el extracto de AcOEt, a diferencia de las saponinas que se encuentran en las fracciones Butanólicas. Mientras que Glucósidos, Flavonoides y Terpenoides se encuentran en todas las fracciones orgánicas, de estas familias de metabolitos, los Taninos, Flavonoides y Terpenoides tienen gran importancia en la actividad antioxidante y sus interacciones podrían tener un efecto sinérgico o ser independientes una de otra, a las cuales se les puede atribuir dicha actividad biológica de las fracciones.

5.3 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Los resultados obtenidos de la extracción por SPE de los antioxidantes a partir del Jugo de Fique se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultado de la Extracción en Fase Sólida

MUESTRA	% de Inhibición
Fracción de AcOEt	2,394 ± 0,286
Fracción de n-BuOH	68,599 ± 0,411

En la interpretación de los resultados obtenidos de la SPE (Tabla 16), se presenta un mayor porcentaje de Inhibición en la fracción de n-BuOH, es decir, que los compuestos de interés están siendo extraídos en esta fracción, mientras que en la

fracción de AcOEt la reacción no sucedió, dando un bajo porcentaje de inhibición, causado por efectos de dilución de la solución de DPPH*, sin generar cambio de color, por lo que no se presenta una respuesta para tener en cuenta.

5.4 MÉTODO DEL DPPH*

Para este estudio, la concentración inicial de DPPH* ($32.143 \text{ ppm} \pm 0.453$) en el medio de reacción fue calculada mediante la interpolación en una curva de calibración de soluciones de DPPH* medidas a 515 nm, utilizando concentraciones desde 8.141-27.382 ppm (Figura 35.).

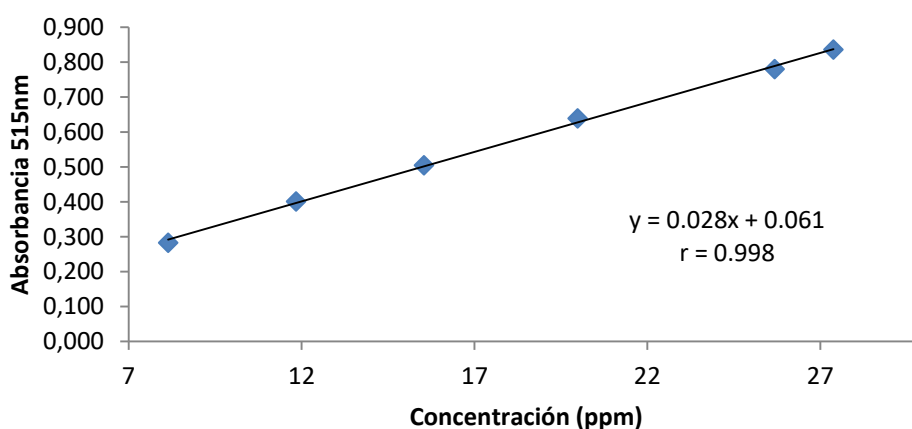


Figura 35. Curva de Calibración del DPPH*

Para cada concentración de las fracciones de jugo y el antioxidante de referencia (BHT) se graficó la cinética de la reacción (Absorbancia, en función del tiempo), medida cada 5min hasta transcurrir 15 min, posteriormente, las mediciones se realizaron cada 15min, hasta que la reacción alcanzó el estado estacionario ($\Delta A = 10\%$), como se observa en las Figuras 36 - 39.

La absorbancia de la solución disminuye dependiendo de la actividad antirradicalaria del antioxidante como también en la velocidad de reacción entre el DPPH* y el mismo antioxidante.

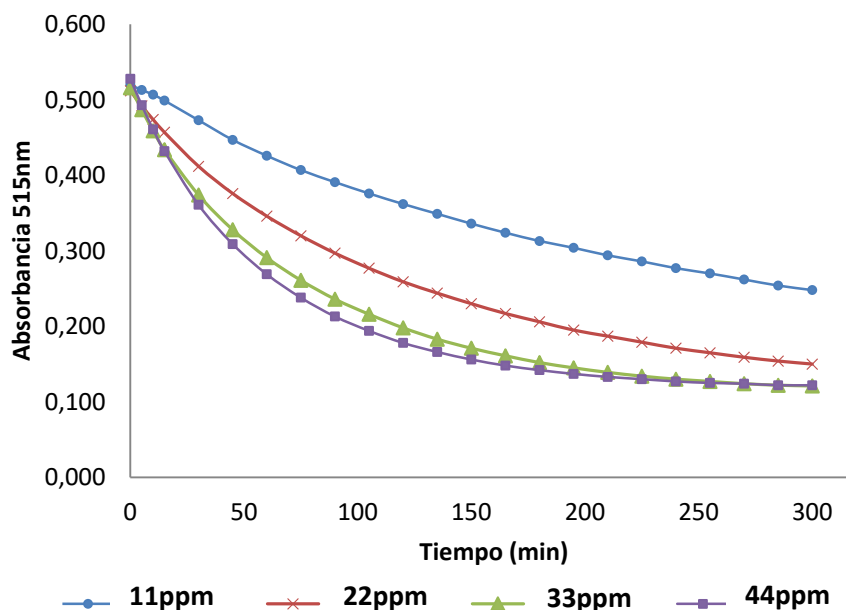


Figura 36. Cinética de Reaccion del BHT

La Figura 36 representa gráficamente el cambio de la absorbancia al transcurrir el tiempo de reacción entre las diferentes concentraciones del patrón (11 – 44 ppm) y el radical DPPH*. El BHT presentó un comportamiento cinético lento alcanzando el estado estacionario a los 300min después que inicia la reacción, acorde a lo reportado por Brand-Williams (33). Este comportamiento es lento pero relativamente fuerte ya que da un alto porcentaje de inhibición a bajas concentraciones del compuesto de referencia.

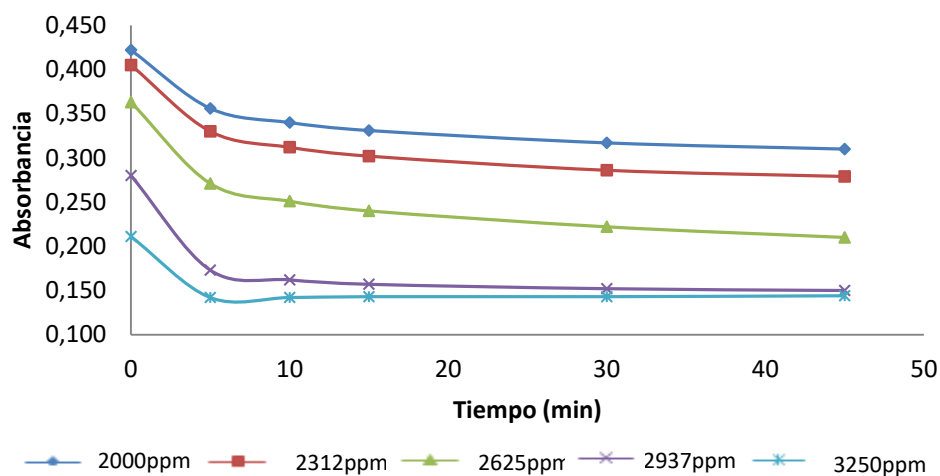


Figura 37. Cinética de Reacción de la fracción AcOEt obtenida por extracción líquido-líquido

La Figura 37 visualiza el cambio de la absorbancia de las concentraciones (2000-3250 ppm) de la fracción de AcOEt conseguida por la extracción líquido-líquido; el estado estacionario en esta fracción fue alcanzado a los 45min, mostrando un comportamiento cinético lento.

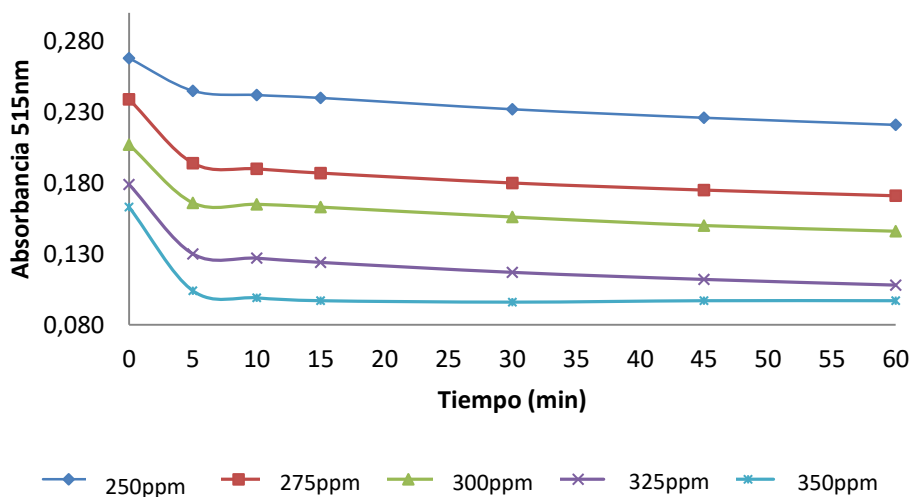


Figura 38. Cinética de Reacción de la fracción n-BuOH obtenida extracción líquido-líquido.

Por otro lado, en la Figura 38, se trazó el cambio de absorbancia a las concentraciones (250-300 ppm) de la fracción de n-BuOH conseguida por la extracción líquido-líquido, el estado estacionario es logrado a los 60min, exhibiendo de igual manera un comportamiento cinético lento.

De la misma manera, se realizó el seguimiento de la absorbancia a las diferentes concentraciones (400-550 ppm) de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE, esta fracción exhibe un comportamiento cinético lento, debido a que su estado estacionario es alcanzado a los 75min (Figura 39.).

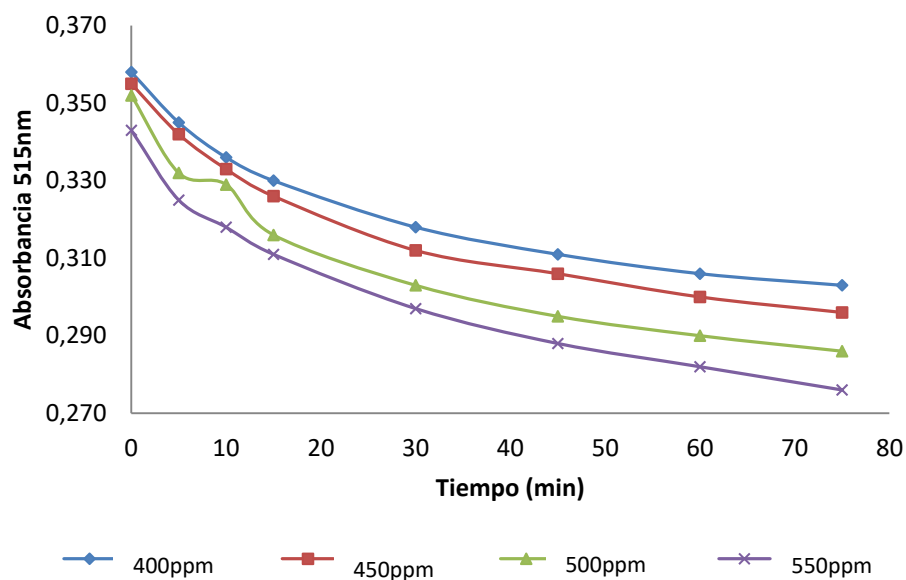


Figura 39. Cinética de Reacción de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE

A diferencia de las fracciones obtenidas por extracción líquido-líquido, la Figura 39 no muestra una disminución de la absorbancia brusca a los 5 minutos y alcanza el estado estacionario a un tiempo mas prolongado que las fracciones representadas en las Figuras 37 y 38. Además su comportamiento es similar a la sustancia de referencia BHT.

A partir de los resultados obtenidos de las Figuras 35 - 39, se realizaron las representaciones gráficas del porcentaje del radical DPPH* remanente en el estado estacionario frente a la relación mg del Antioxidante (AO) y mg de DPPH*_o (Figura 40.), estas nos permite determinar el valor de EC₅₀, es decir, la cantidad de antioxidante presente en la muestra necesaria para disminuir la concentración inicial del DPPH* en un 50%, este parámetro se usa con el fin de tener una medida de referencia entre los extractos.

De acuerdo con las gráficas de desaparición del DPPH* en función de la cantidad de Antioxidante (Figura 40), la fracción de AcOEt (48.09 mgAO/mgDPPH*_o) y n-BuOH obtenida por SPE (21.44 mgAO/mgDPPH*_o) presentaron la más baja actividad antirradicalaria comparada con la sustancia utilizada como antioxidante de referencia (BHT). Se debe tener en cuenta que el BHT es un compuesto puro, mientras que las fracciones son productos crudos, es decir, tal como se obtuvieron del proceso de extracción sin un posterior fraccionamiento para aislar los componentes que realmente son los responsables de la actividad de los extractos.

Por otra parte, el extracto de n-BuOH obtenido por extracción líquido-líquido presentó la más alta actividad antioxidante (Figura 41.).

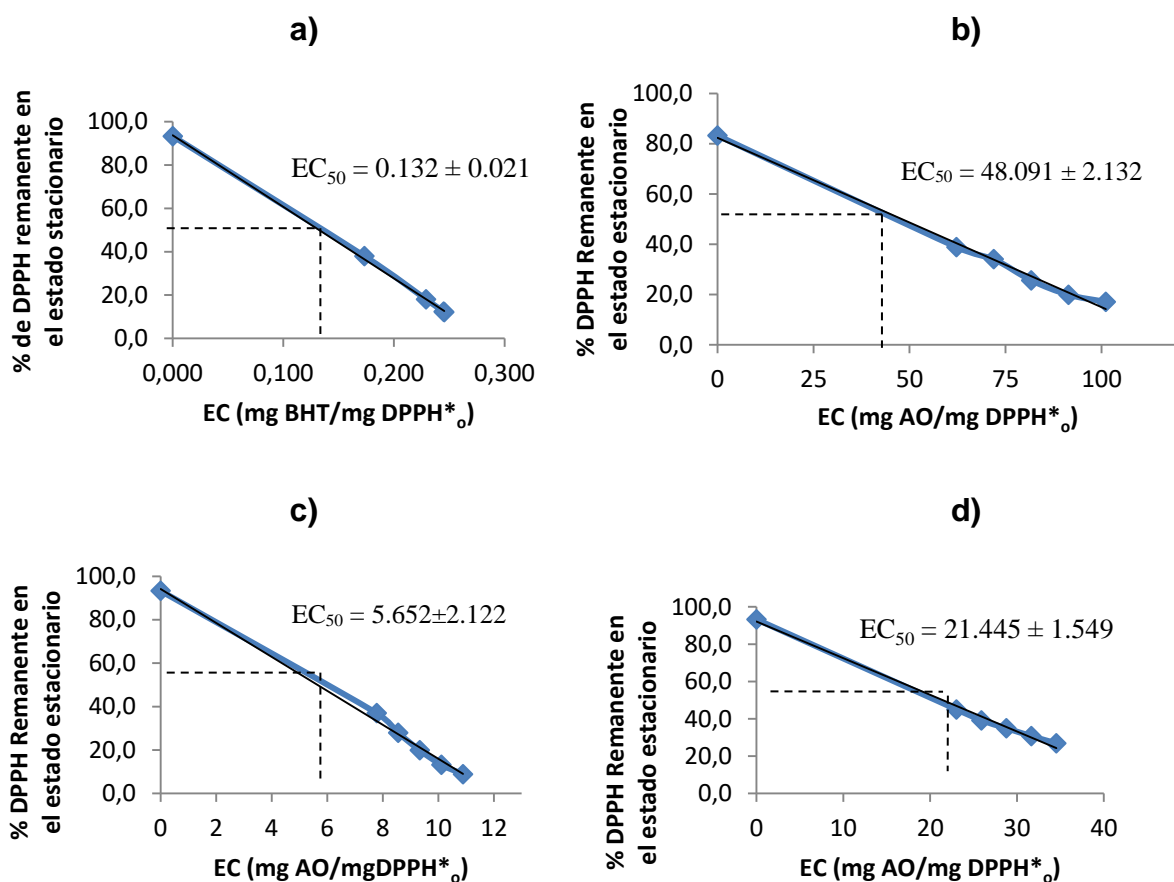


Figura 40. Desaparición del DPPH* en función del número de miligramos de Antioxidante/miligramos de DPPH*. **a)** Patrón de BHT, **b)** Fracción de AcOEt obtenida por extracción L-L, **c)** fracción de n-BuOH obtenida por extracción L-L y **d)** Fracción de n-BuOH obtenida por SPE

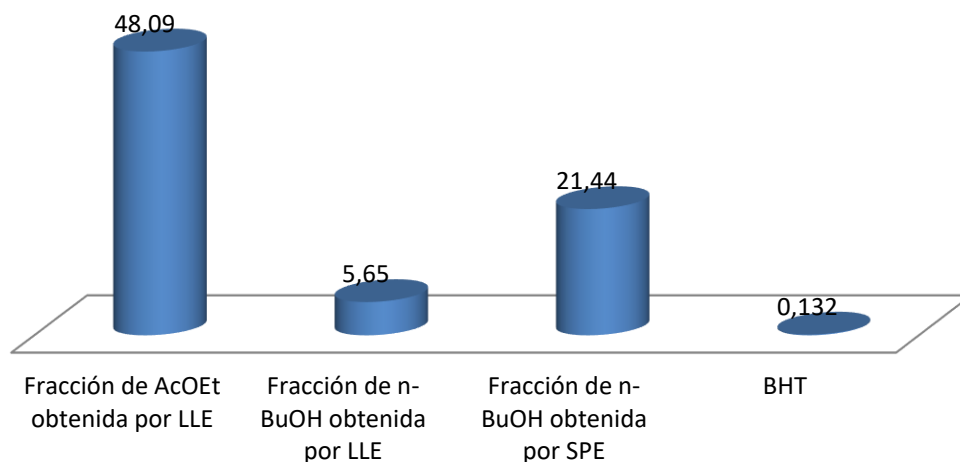


Figura 41. Comparación de las fracciones del jugo de Figue y la sustancia de referencia

En ese sentido, varios reportes, han mostrado una relación cercana entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos, dependiente de la estructura y el grado de hidroxilación de los anillos aromáticos, por ejemplo un sustituyente en la posición orto al grupo hidroxilo forma un enlace intramolecular de hidrógeno, el cual es energéticamente favorable, resultando una fácil donación de átomos de hidrógeno hacia los radicales libres (77,78,79). En el presente estudio y acorde al tamizaje fitoquímico, la actividad antioxidativa se puede atribuir a la composición química de los mismos, debido a la presencia de Flavonoides que son capaces de donar fácilmente hidrógenos para reducir el radical DPPH*.

Cabe resaltar que se encontraron reportes en la literatura de estudios de la Actividad Antioxidante por el método del DPPH* a las especies *Smilax excelsa L*, *Yucca periculosa* y *Allium cepa* pertenecientes a la familia *Agavaceae*, donde sus actividades fueron buenas al compararlas con los antioxidantes de referencia usados (80,81,82).

5.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DEL JUGO DE FIQUE USANDO EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION-RADICAL ABTS⁺

En el método del catión-radical ABTS⁺, la disminución de la absorbancia fue medida entre los minutos uno (1) y seis (6), después de iniciada la reacción.

La Figura 42 ilustra la actividad antioxidante del Trolox usado como patrón de referencia con el ABTS⁺. Se observa una disminución lineal de la absorbancia con respecto a la concentración de Trolox (1.032 - 30.036 ppm) utilizado.

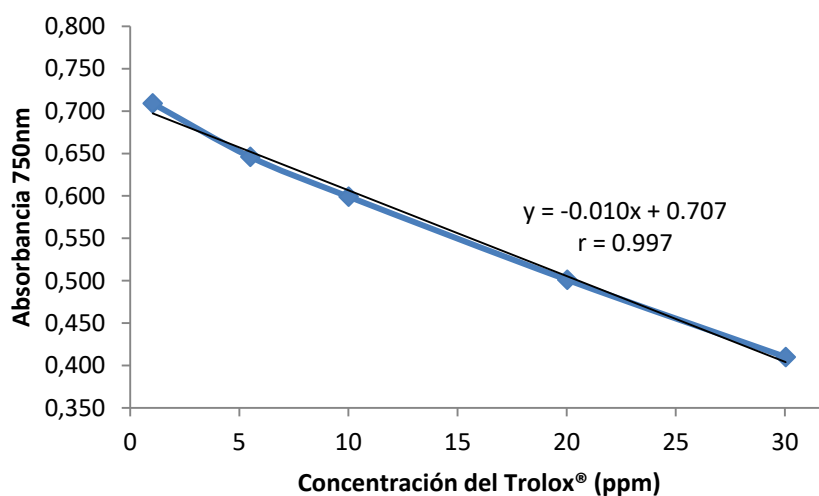


Figura 42. Absorbancia del catión radical ABTS⁺, en función de la concentración del Trolox

La capacidad antioxidante de las sustancias de referencia vitamina E y BHA y las fracciones de AcOEt y n-BuOH, fue determinada como la actividad antioxidante total (TAA) y expresada como mmol Trolox por kg de sustancia utilizada.

La Figura 43 muestra que las fracciones del AcOEt (5.479 ± 0.931 mmol Trolox /Kg sustancia) y n-BuOH (22.118 ± 0.597 mmol Trolox /Kg sustancia) obtenidas por la extracción líquido-líquido y la fracción butanólica (8.945 ± 0.386 mmol Trolox /Kg sustancia) obtenida por SPE presentaron baja capacidad secuestradora del catión radical $ABTS^{+*}$ en comparación con los compuestos utilizados como referentes (Vitamina E, BHA).

Entre las fracciones, la butanólica obtenida por extracción líquido-líquido mostró una actividad más alta frente al catión-radical $ABTS^{+*}$, comprobando su mayor capacidad antirradicalaria de acuerdo con lo observado por el método del DPPH*.

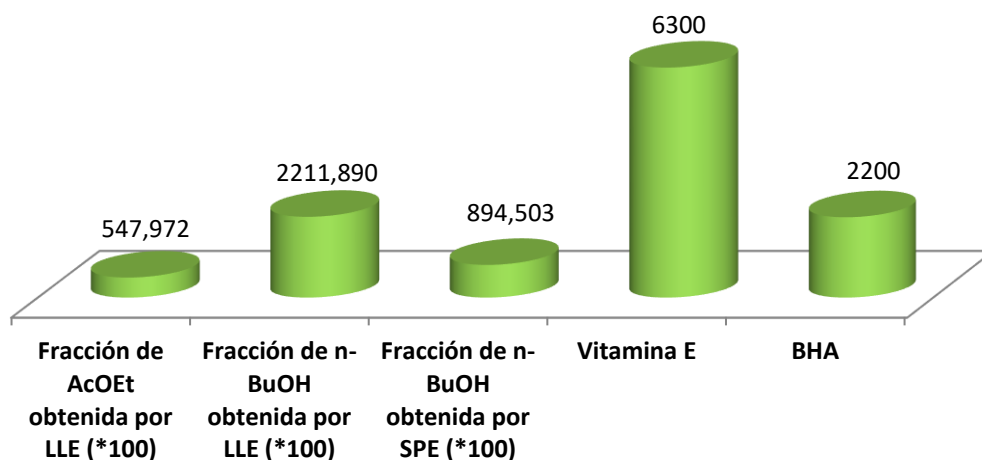


Figura 43. Comparación de las Actividades Antioxidantes totales de las fracciones del Jugo de Figue y sustancias de referencia (mmol Trolox/Kg sustancia) por el método $ABTS^{+*}$

La alta correlación entre los dos métodos podría ser resultado parcialmente de un mecanismo similar de los antioxidantes, es decir, compuestos fenólicos con la habilidad de donar hidrógenos a los radicales libres.

5.6 PRUEBA DE CAPACIDAD DE ABSORBANCIA DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO (ORAC)

En este caso la actividad antioxidante fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita por Cao et al (50), empleando Fluoresceína como sustrato de oxidación y como oxidante, el generador de radicales libres peroxilo, AAPH [2,2-Azobis(2-metilpropionarmidina)]. El grado de protección se mide con un medidor de fluorescencia y se cuantifica en equivalentes de Trolox. El Trolox es un análogo de la vitamina E que se usa como medida estándar.

El método es calibrado mediante patrones de Trolox, para obtener una recta de regresión lineal (Tabla 17 y Figura 44.), que permitirá obtener la concentración de Trolox correspondiente a una determinada disminución de fluorescencia. Para su determinación se emplean siete patrones de Trolox con concentraciones de 2.25, 9.25, 11.25, 13.25, 17.25, 19.25 y 25.25 ppm. La recta obtenida es $Y = 0.976 X + 7.5027$ (Tabla 17, Figura 44), la cual se obtiene después de calcular las áreas bajo la curva de cada patrón, partiendo de las lecturas de fluorescencia del ensayo (Tabla 18 - Anexo 4).

Los datos obtenidos son las áreas bajo las curvas de fluorescencia, aproximadas por el método de los trapecios. El AUC se calcula mediante la Ecuación 3... descrita en el apartado 4.5.3.

La disminución de la fluorescencia se calcula de la siguiente manera,

Disminución fluorescencia, $AUC\ NETA = AUC - AUC_{bl}$

Donde: AUC: Área bajo la curva de la muestra del pocillo

AUC_{bl}: Área bajo la curva del blanco

Tabla 17. Recta de calibrado patrones de Trolox

MUESTRA	$\Sigma f_i/f_o$	AUC	AUC NETA
Blanco	16.3	17.3	-
Trolox 2.25 ppm	9.9	27.2	9.9
Trolox 9.25 ppm	33.8	33.8	16.5
Trolox 11.25 ppm	34.0	35.0	17.7
Trolox 13.25 ppm	36.7	37.7	20.4
Trolox 17.25 ppm	39.8	41.8	24.5
Trolox 19.25 ppm	43.5	44.5	27.2
Trolox 25.25 ppm	47.0	49.0	31.7

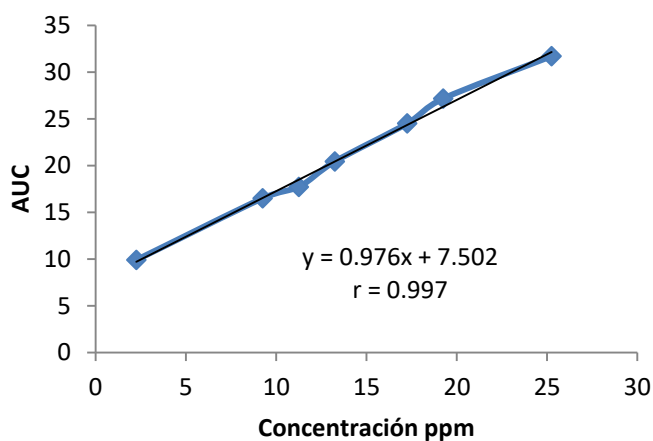


Figura 44. Recta de calibrado patrones de Trolox

La Figura 45 es la representación de la curva de decaimiento de la fluorescencia usada para la determinación de las áreas bajo la curva de los estándares y las muestras. El AUC de cada muestra fue usada para determinar los valores obtenidos de Equivalentes Trolox de una curva de calibración obtenida graficando la concentración de Trolox versus el valor de AUC neto. Se demuestra una buena correlación entre la protección y la concentración de Trolox ($r = 0.997$). La cinética de reacción del Trolox exhibe un decaimiento de la fluorescencia dependiente de la concentración. En presencia del Trolox, la molécula de fluoresceína fue protegida de los radicales dañinos inducidos por el AAPH. Esto puede ser visto a lo largo del tiempo de fluorescencia y por la intensidad de fluorescencia a más altas concentraciones de Trolox.

Tabla 18. Seguimiento de la reacción de los patrones de Trolox para determinar el valor ORAC

Tiempo (s)	2.25 ppm	9.25 ppm	11.25 ppm	13.25 ppm	17.25 ppm	19.25 ppm	25.25 ppm
0	33428.0	34866.7	35773.6	35210.2	34454.7	33509.8	33856.6
119	33274.3	34701.3	35656.2	35073.9	34302.9	33313.5	33713.1
241	32076.4	34558.8	35495.3	34902.2	34126.3	33120.2	33590.5
362	32075.2	34392.6	35342.9	34794.4	33975.7	32969.2	33483.3
485	32006.0	34225.7	35221.8	34644.7	33846.4	32862.3	33346.5
606	31265.9	34092.8	35033.4	34524.4	33715.3	32689.7	33172.7
727	31275.6	33955.9	34902.2	34379.5	33600.3	32570.6	33059.3
849	31286.0	33798.2	34811.0	34253.6	33498.1	32444.9	32929.1
970	31157.4	33520.1	34670.1	34110.0	33351.6	32341.6	32829.3
1092	30765.9	33140.2	34495.3	33954.5	33212.0	32210.4	32671.6
1214	30548.7	32699.8	34279.3	33735.3	33083.8	32111.1	32588.4
1335	30005.2	32250.7	34049.6	33598.7	32947.9	31988.1	32497.8
1457	29786.6	31739.8	33751.2	33437.5	32773.3	31878.2	32396.1
1578	29547.3	31201.5	33420.6	33295.1	32539.5	31812.8	32299.1
1700	29005.2	30690.0	33102.3	33055.2	32329.6	31693.8	32178.4
1821	28878.1	30190.0	32632.0	32784.6	32040.0	31578.3	32168.4
1943	28124.3	29746.2	32212.8	32431.2	31712.6	31456.2	32099.1
2064	27985.4	29303.4	31924.8	32077.7	31372.5	31301.1	32062.4
2185	27543.9	28766.3	31487.0	31705.9	31043.0	31146.7	32002.3
2308	27012.6	28185.1	31014.8	31345.2	30849.6	30964.3	31961.4
2430	26884.6	27653.8	30526.1	30861.6	30533.2	30781.5	31892.1
2553	26056.8	27097.7	29856.9	30405.8	30146.7	30592.0	31791.3

Tabla 18. Seguimiento de la reacción de los patrones de Trolox para determinar el valor ORAC (Continuación)

Tiempo (s)	2.25 ppm	9.25 ppm	11.25 ppm	13.25 ppm	17.25 ppm	19.25 ppm	25.25 ppm
2675	25366.3	26517.3	29096.0	30177.8	29759.5	30399.8	31731.4
2799	24606.2	25744.9	28386.8	30092.9	29379.7	30189.4	31680.1
2922	23654.6	25000.0	27386.4	29820.0	29047.8	30063.8	31657.3
3046	22976.6	24267.6	26380.0	29421.1	28860.1	29945.1	31643.5
3170	21525.0	23444.4	24684.3	28404.0	28661.0	29841.6	31546.9
3295	20765.5	22679.1	23540.5	27334.9	28410.4	29801.0	31443.6
3420	20135.3	21867.7	22471.8	26378.5	28204.1	29744.6	31355.1
3546	19754.3	21076.9	21458.1	25484.2	27846.6	29712.5	31266.0
3672	18673.2	20282.0	20453.1	24519.9	27440.3	29654.0	31242.1
3799	17665.3	19500.4	19573.0	23544.1	27111.9	29572.6	31255.7
3925	16264.7	18766.7	18779.7	22596.9	26721.6	29423.7	31196.6
4053	15034.7	18041.9	18018.4	21634.9	26230.5	29250.6	31141.2
4180	13962.9	17365.0	17264.4	20690.8	25601.6	29018.9	31065.5
4308	13002.6	16706.8	16495.6	19806.0	24823.6	28718.1	30981.7
4436	12136.0	16066.3	15752.6	18922.4	24022.7	28337.8	30885.5
4564	11331.2	15464.1	15037.9	18104.3	23208.8	27894.8	30917.6
4693	10595.6	14915.4	14349.5	17296.4	22349.2	27355.8	30959.4
4821	9948.5	14383.8	13658.4	16537.5	21535.7	26713.2	31065.7
4951	9354.2	13828.9	13000.0	15773.5	20698.5	25947.8	31044.1
5081	8817.2	13304.3	12333.3	15040.7	19942.0	25167.8	31021.3
5210	8330.4	12791.2	11750.6	14344.8	19167.0	24376.4	31012.6
5340	7879.0	12296.8	11177.6	13676.2	18412.9	23613.3	30900.7
5470	7481.3	11807.0	10612.0	13037.7	17684.2	22878.6	30843.5
5601	7121.0	11342.7	10068.9	12406.0	16975.4	22128.3	30832.7
5731	6769.7	10898.6	9558.4	11812.7	16304.9	21393.5	30735.4
5862	6453.9	10477.6	9064.2	11258.3	15658.4	20705.0	30707.5
5992	6164.7	10083.3	8598.9	10723.0	15040.1	20032.2	30712.7
6124	5899.9	9687.3	8160.8	10218.3	14424.4	19370.8	30610.3

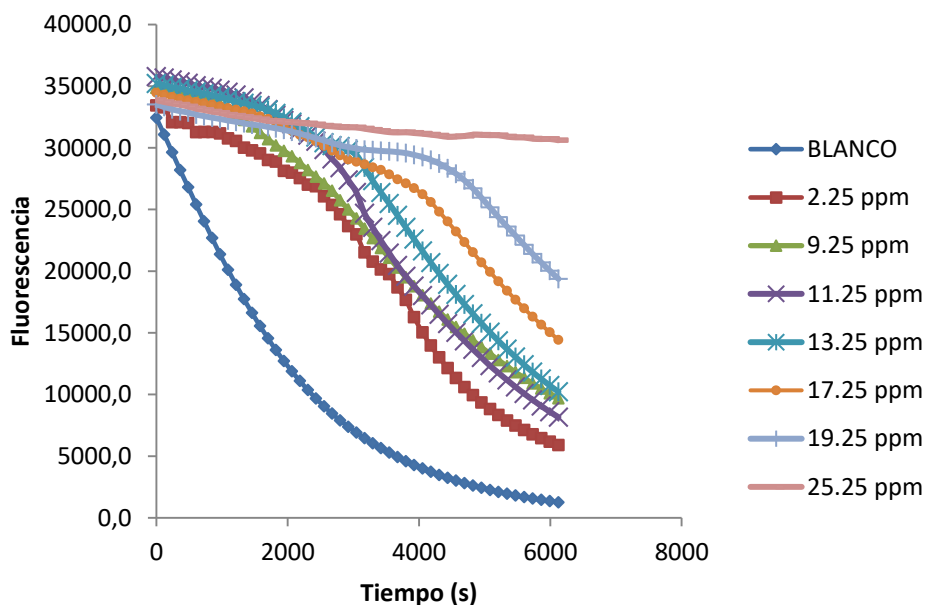


Figura 45. Reacción de los patrones de Trolox para determinar el valor ORAC

En la Figura 45 se muestra el proceso de la reacción llevada a cabo en el ensayo ORAC, se puede ver claramente que a medida que aumenta la concentración del antioxidante Trolox, la fluorescencia se mantiene por más tiempo, mientras que los patrones de baja concentración permiten que la molécula fluorescente sea atacada por los radicales libres peroxilo generados por el AAPH que es evidenciado por la disminución de su fluorescencia.

El mismo ensayo se realizó a patrones de BHA y α -Tocoferol o Vitamina E y a las fracciones obtenidas del jugo de Fique, en la Tabla 19 se encuentra los valores de fluorescencia observados para estas reacciones.

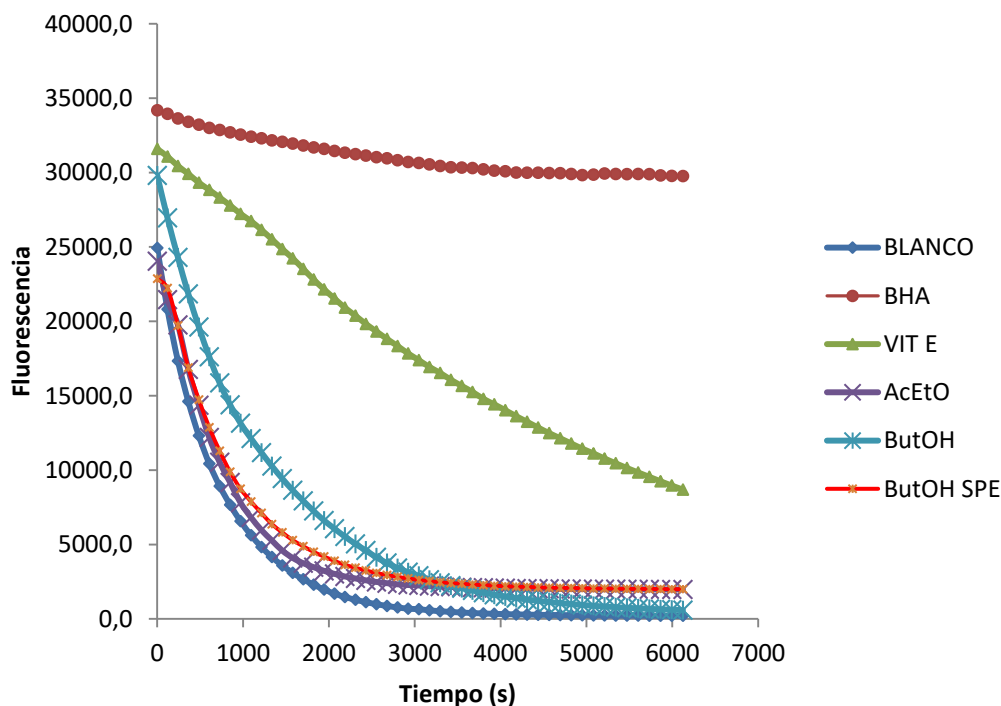
Tabla 19. Seguimiento de la reacción de los patrones BHA y α -Tocoferol o Vitamina E y de las fracciones obtenidas para determinar el valor ORAC

Tiempo (s)	BHA	VIT E	AcEtO	ButOH	ButOH SPE
0	34191.3	31590.2	24040.0	29807.8	22868.1
119	33947.2	31076.5	21461.0	26957.4	22234.8
241	33639.2	30441.0	19757.8	24305.0	19716.9
362	33408.9	29911.9	16770.9	21845.0	16884.3
485	33217.2	29320.8	14364.8	19618.8	14737.9
606	33003.4	28835.1	12194.9	17618.3	12878.5
727	32859.0	28323.8	10533.2	15860.5	11290.7
849	32703.6	27788.7	9172.3	14395.6	9883.7
970	32556.6	27228.0	7812.5	13153.8	8739.3
1092	32412.0	26737.1	6823.7	12126.6	7887.2
1214	32301.0	26149.3	5969.0	11179.5	7114.3
1335	32167.9	25520.1	5275.1	10273.6	6371.5
1457	32068.5	24856.8	4590.3	9428.2	5812.9
1578	31944.1	24230.8	4098.3	8648.6	5290.5
1700	31820.9	23528.6	3743.9	7940.2	4887.1
1821	31690.4	22811.1	3477.6	7255.6	4503.5
1943	31592.5	22152.9	3229.1	6618.3	4190.7
2064	31455.2	21536.3	3025.8	6068.2	3900.0
2185	31337.8	20922.3	2852.9	5536.2	3638.8
2308	31239.8	20384.7	2718.0	5042.7	3438.5
2430	31139.3	19826.5	2593.2	4598.5	3255.1
2553	31036.0	19322.6	2482.3	4137.1	3088.8
2675	30954.3	18820.7	2399.6	3758.6	2947.4
2799	30826.3	18344.0	2323.3	3420.4	2824.8
2922	30716.2	17840.7	2277.1	3141.5	2717.8
3046	30642.0	17395.7	2244.7	2900.0	2616.3
3170	30551.9	16933.8	2200.7	2636.0	2537.4
3295	30438.4	16534.6	2174.9	2431.6	2465.2
3420	30358.3	16071.9	2156.8	2238.0	2406.5
3546	30336.1	15661.8	2130.9	2066.0	2359.6
3672	30301.3	15255.7	2105.0	1912.4	2308.0
3799	30221.8	14793.1	2098.2	1766.3	2270.5
3925	30134.2	14423.0	2074.1	1626.7	2229.5
4053	30091.8	14030.9	2061.2	1503.7	2196.1
4180	30005.9	13627.8	2045.4	1396.8	2166.7
4308	29993.0	13248.3	2035.4	1300.6	2149.2
4436	29992.1	12860.0	2032.6	1213.6	2122.3
4564	29974.6	12488.2	2027.5	1133.1	2096.6
4693	29963.3	12142.7	2014.7	1059.6	2087.8
4821	29909.0	11793.0	2011.4	994.8	2075.8
4951	29828.8	11441.7	2007.6	935.4	2062.0
5081	29863.7	11122.6	2002.8	881.7	2045.9
5210	29935.6	10780.8	1997.1	833.0	2039.9
5340	29906.9	10460.7	1995.6	787.9	2033.9
5470	29891.5	10144.6	1984.6	748.1	2019.6
5601	29909.5	9843.6	1991.7	712.1	2018.1

Tabla 19. Seguimiento de la reacción de los patrones BHA y α -Tocoferol o Vitamina E y de las fracciones obtenidas para determinar el valor ORAC (Continuación)

Tiempo (s)	BHA	VIT E	AcEtO	ButOH	ButOH SPE
5731	29894.0	9547.7	1983.7	677.0	2013.0
5862	29808.1	9250.4	1978.5	645.4	2006.0
5992	29776.2	8965.4	1979.0	616.5	1996.0
6124	29760.0	8689.1	1978.0	590.0	1996.5

Figura 46. Reacción de patrones y fracciones obtenidas para determinar el valor ORAC



Las sustancias BHA y α -Tocoferol o Vitamina E son reconocidos antioxidantes, el primero sintético y el segundo natural, estos presentan una muy buena inhibición

de los radicales peroxilo presentes en la reacción y permiten que la fluorescencia se mantenga como se muestra en la Figura 46, mientras que los extractos obtenidos no logran una buena protección de la fluoresceína produciendo un decaimiento de la curva.

Los datos es obtuvieron de la misma manera que las AUC NETAS (Tabla 20) de la curva de calibración de Trolox según las fluorescencias mostradas en la Tabla 21.

Tabla 20. Área bajo la curva AUC para patrones y extractos

MUESTRA	AUC NETA
BHA	29.2
Vitamina E	13.3
AcEtO	10.2
ButOH	11.0
ButOH-SPE	10.8

Para la realización de este ensayo, ...se ha proseguido tal y como se describe en el subapartado 4.5.3., obteniendo los resultados visualizados en la Tabla 21.

Los resultados de este método son expresados en [equivalentes en miligramos de Trolox/g muestra seca inicial] (mgeq Trolox/g muestra). También se puede expresar en [equivalentes en milimoles de Trolox/g muestra seca inicial] (meq Trolox/g muestra).

El cálculo de los Equivalentes Trolox (TE) en mg/L para cada muestra se hizo utilizando la regresión lineal de la curva ($Y = 0.976 X + 7.5027$) como se muestra

en la Figura 44. Por ejemplo, si la curva neta AUC_{Muestra} es 29.2, el valor ORAC de la solución es 22.2 mg TE/L.

El valor ORAC en mg equivalentes Trolox/g de la muestra se calcula así:

Ecuación 4. Cálculo de los equivalentes Trolox en la muestra

$$\text{mg Equivalentes Trolox/g} = (\text{mg TE/L}) / (\text{mg}_{\text{muestra}} / \text{L}_{\text{solvente}})$$

$\text{mg}_{\text{muestra}}$ y $\text{L}_{\text{solvente}}$ son los litros de solvente para disolver los gramos de la muestra usadas para preparar la solución de la muestra o la concentración de esta.

Tabla 21. Valor ORAC para muestras y patrones

PATRONES/MUESTRAS	AUC	ORAC (mg TE/L)	ORAC (mg TE/g)
BHA	29.2	22.2	0.222±0.009
VIT E	13.3	5.9	0.059±0.007
AcEtO	10.2	2.8	0.014±0.002
ButOH	11.0	3.6	0.036±0.003
ButOH-SPE	10.8	3.4	0.034±0.003

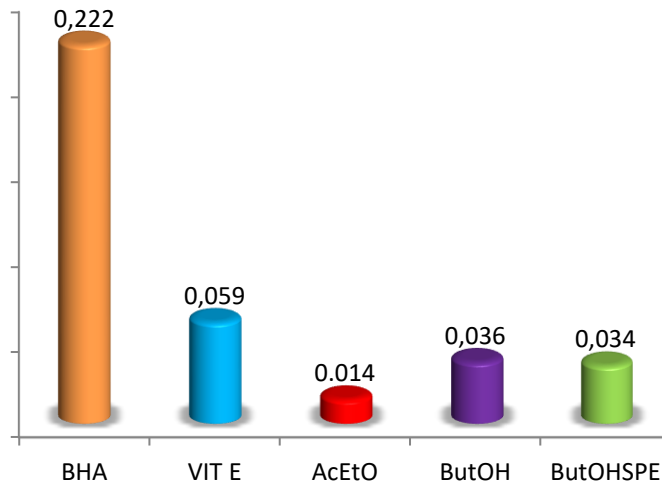


Figura 47. Valor ORAC de las sustancias utilizadas como referencia y de los extractos obtenidos del jugo de Figue

Como podemos observar en la Figura 47, las fracciones evaluadas presentan un valor inferior de Equivalente Trolox con respecto a las sustancias de referencia, lo que indica que su capacidad de protección es poca frente a los radicales peroxilo generados por el AAPH. Todos los extractos evaluados mostraron una baja actividad en el ensayo del ORAC en comparación con el BHA y la Vitamina E, lo que demuestra que los extractos analizados no regeneraron las especies oxidadas y tampoco tuvieron un adecuado mecanismo para atrapar este tipo de radicales libres como si lo hicieron los antioxidantes utilizados como referencia.

5.7 DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA EN LAS FRACCIONES DE n-BuOH POR GC-MS

En la Figura 48, se registran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC con detector de Masas de la fracción de n-BuOH obtenida por la extracción Líquido-Líquido.

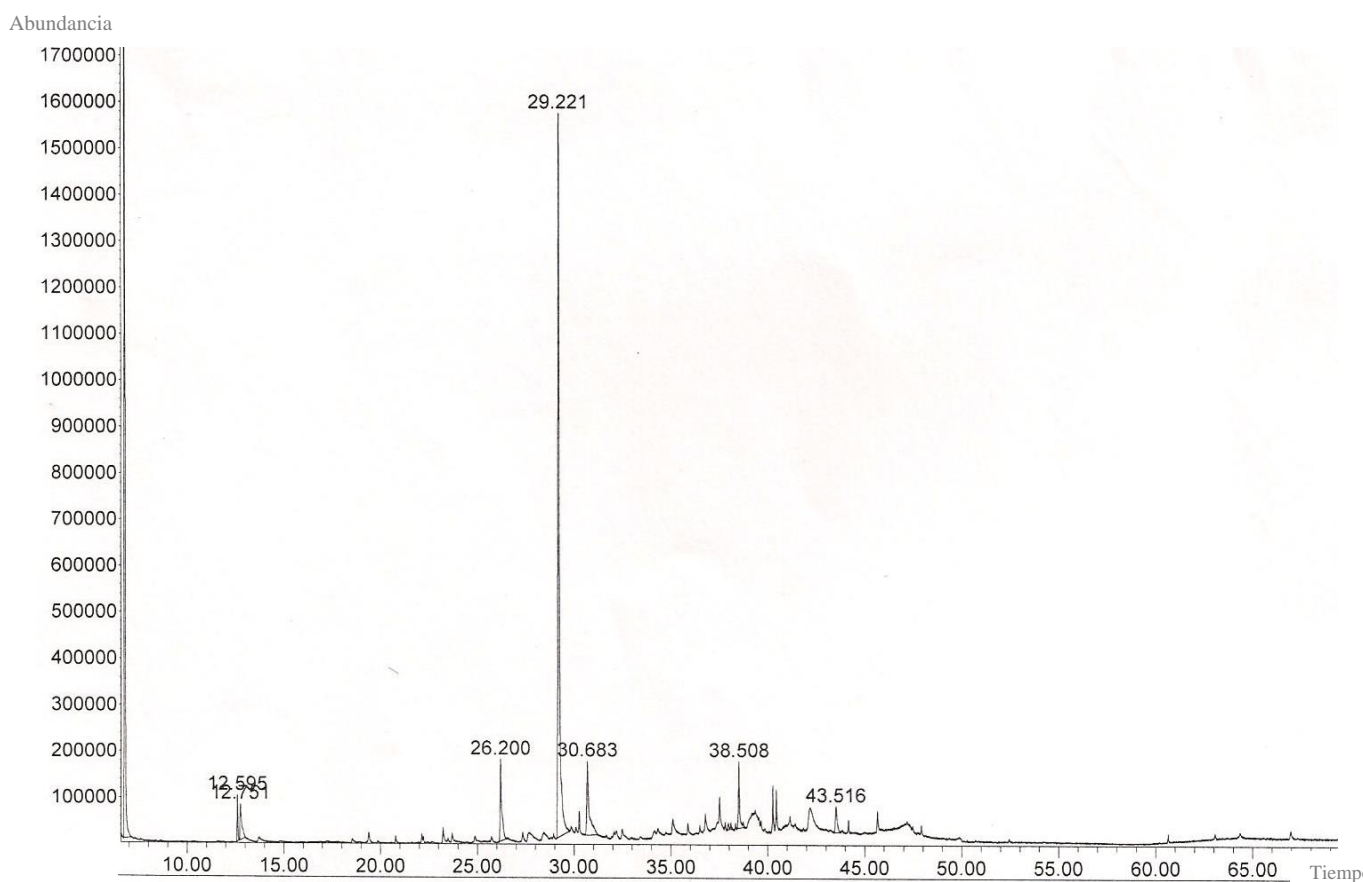


Figura 48. Cromatograma de la fracción de n-BuOH obtenido por extracción Líquido-Líquido

En la Tabla 22, se muestran las composiciones químicas y las cantidades relativas de la fracción de n-BuOH.

Tabla 22. Composición de la fracción de n-BuOH lograda por extracción líquido – líquido

Pico No.	Compuestos	Tiempo de retención (min)	Cantidad relativa (%)
1	Oxalato de dimetilo	12.954	1.288
2	Furfural	12.752	2.081
3	2,3 – Dihidro -3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	26.199	4.193
4	5-(Hidroximetil)-2-furaldehído	29.223	36.288
5	N.I.*	30.682	6.030
6	Compuesto oxigenado, M+ 150	38.509	3.157
7	p-Hidroxifenilacetato de metilo	43.515	1.492

* N.I. = No identificado

El componente mayoritario obtenido de la fracción butanólica de la extracción líquido–líquido fue 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído, en la Figura 49 se presenta el espectro de masas de este compuesto.

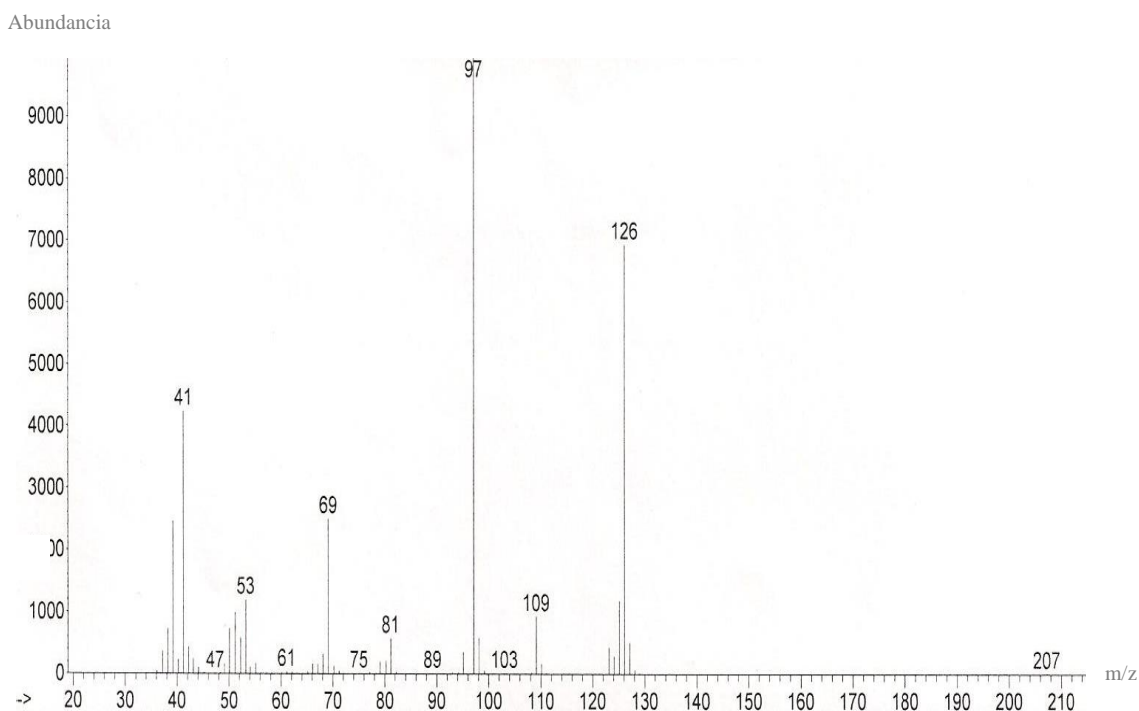


Figura 49. Espectro de masas del 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído

Las rutas de ionización disociativa por impacto de electrones a 70eV, se observan en el esquema 5. El ión molecular corresponde al fragmento $C_6H_6O_3^+$ ubicado en m/z 126, el cual por pérdida de CHO da origen al fragmento $C_5H_5O_2^+$ con m/z 97, el cual por la pérdida de una molécula de monóxido de carbono forma el catión $C_4H_5O^+$ con m/z 69.

Ahora bien, para la fracción de n-BuOH obtenida por la extracción en fase sólida se observa su perfil cromatográfico en la Figura 50.

Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído

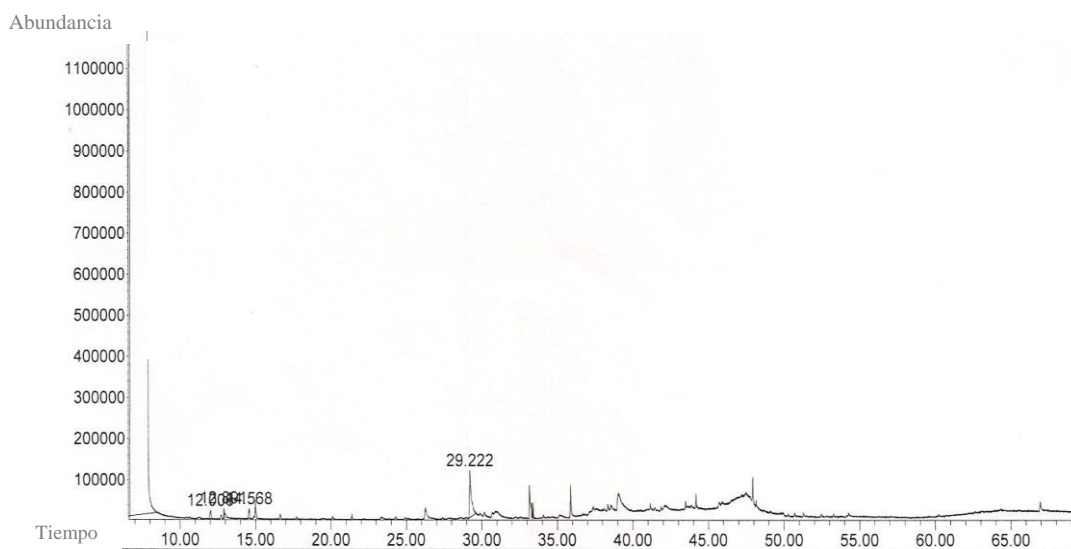
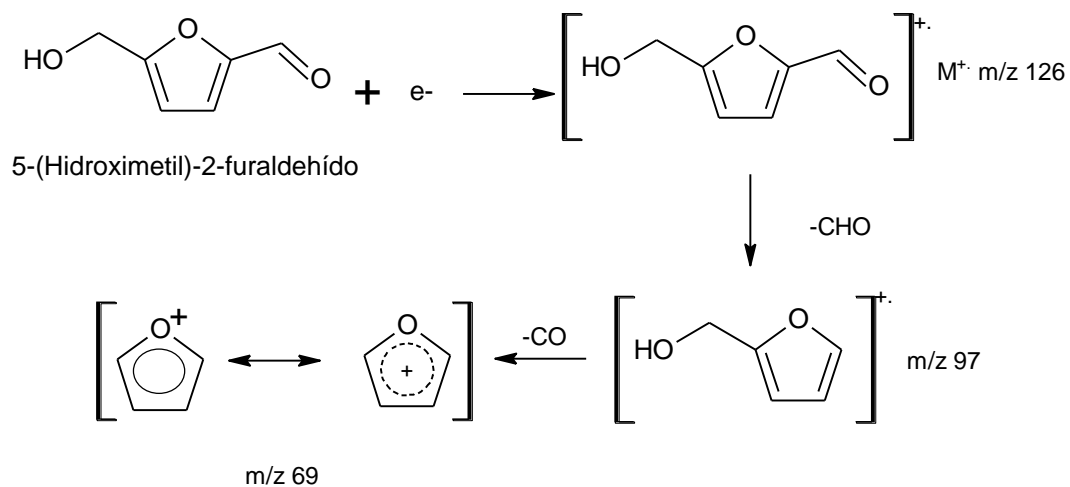


Figura 50. Cromatograma de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE

En la Tabla 23 se muestran los componentes y sus cantidades relativas de la fracción de n-BuOH obtenida por SPE.

Tabla 23. Composición de la fracción de n-BuOH lograda por SPE

Pico No.	Compuestos	Tiempo de retención (min)	Cantidad relativa (%)
1	Acetato de butilo	12.005	0.013
2	Furfural	12.891	0.009
3	Heptanona	14.569	0.013
4	5-(Hidroximetil)-2-furaldehído	29.223	0.107

El mayor componente de la fracción butanólica por la SPE es el 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído (0.107%), este compuesto también se presentó en la fracción de n-BuOH obtenida por extracción líquido-líquido pero con una cantidad relativa mayor (36.288%).

En un estudio realizado por Christine Wu de la Escuela de Estomatología de la Universidad de Illinois se extrajeron compuestos a partir de pasas sin semillas los cuales ayudaron a prevenir la salud dental y de las encías, entre los cuales se encontraron el ácido oleanólico, el aldehído, betulina, ácido betulínico y el 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído, presente en las fracciones butanólicas, los cuales fueron clasificados como compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante (83).

De igual manera, se encontró Furfural en las fracciones obtenidas por los dos métodos de extracción, aunque de este compuesto no se encontraron estudios sobre la actividad antioxidante.

Cabe resaltar, que los compuestos identificados en las fracciones butanólicas por la técnica analítica de GC con detector de masas no concuerdan con el tipo de metabolitos secundarios que usualmente se conocen como antioxidantes (flavonoides, terpenoides, entre otros), debido a que esta técnica no fue la más apropiada para la identificación preliminar de los componentes que podrían ser responsables de dicha actividad, ya que estos son compuestos que tienen pesos moleculares elevados lo cual probablemente no permitió la volatilización y detección por esta técnica.

CONCLUSIONES

- Mediante la implementación del diseño de experimentos 2^3 se logró establecer las condiciones óptimas de la extracción Líquido-Líquido de los antioxidantes para las fracciones de AcOEt y n-BuOH, las cuales son pH (4.40), cantidad de solvente (15mL), tiempo de extracción (30min) y pH (4.40), cantidad de solvente (25mL), tiempo de extracción (90min), respectivamente.
- La extracción en Fase Sólida, permitió obtener solo una fracción con actividad antioxidante. La fracción de n-BuOH fue la más activa, mientras que la de AcOEt no presentó Inhibición, debido a que la mayoría de compuestos fueron eluidos con el n-BuOH.
- En el Tamizaje Fitoquímico realizado a las fracciones obtenidas del jugo de Fique con AcOEt y n-BuOH no se detectó la presencia de alcaloides, mientras que las pruebas cualitativas dieron prueba positiva para Glicósidos, Flavonoides, Terpenoides y Saponinas, estos últimos solo en el BuOH; de los cuales es conocida el gran poder antioxidante de los Flavonoides y Terpenos, son a estos metabolitos a los que se puede atribuir la Actividad Antioxidante de las fracciones.
- La efectividad antirradicalaria de las fracciones del Jugo de Fique estudiados por método de decoloración del radical DPPH* fue menor que la observada para antioxidante de referencia, (BHT). La fracción más activa fue la de n-BuOH (5.65 ± 2.122 mg AO/mgDPPH*o) obtenida por la extracción Líquido-Líquido, seguida de la butanólica (21.44 ± 1.459 mg AO/mgDPPH*o) lograda por la SPE y por último la de AcOEt (48.09 ± 2.132 mg AO/mgDPPH*o).

- Las fracciones de AcOEt y n-BuOH obtenidas del Jugo presentaron una baja capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ en comparación con las sustancias antioxidantes evaluadas como referencia (Vitamina E y BHA). Entre ellas, el n-BuOH (22.118±0.597mmol Trolox /Kg sustancia) obtenido por la extracción L-L fue la mejor; estos resultados comprueban su mayor capacidad antiradicalaria de acuerdo al método del DPPH*.
- El Trolox fue usado como compuesto de referencia para la actividad antioxidativa mediante el método ORAC, este reaccionó rápidamente con los radicales peroxilo y ofreció protección de la molécula de fluoresceína por un cierto periodo hasta que fue consumido. Esto fue medido en un largo tiempo de fluorescencia en donde se comparó la intensidad de la fluorescencia de la fluoresceína en presencia del Trolox con el blanco donde no se adicionaron antioxidantes. La cinética de reacción del Trolox mostro una inhibición del decaimiento de la fluorescencia dependiente de la concentración. Una buena línea de correlación entre la protección neta y la concentración del Trolox fue demostrada ($r^2= 0.9949$).
- El resultado del daño inducido por los radicales peroxilo se evidencia por un decrecimiento exponencial de la intensidad de la fluorescencia por un periodo de reacción de 90 min, la pérdida de fluorescencia en presencia de un radical libre fue un índice del daño oxidativo de la molécula de fluoresceína. Los extractos investigados en este estudio con radicales peroxilo mostraron un comportamiento inferior al del Trolox. Estos extractos presentaron poca protección que fue también correlacionada con la concentración de las sustancias de referencia utilizadas. La actividad antioxidante de las muestras decrecieron en el siguiente orden: Trolox>BHA>Vitamina E>ButOH>ButOH-SPE>AcOEt. Todos los extractos tuvieron una menor actividad en el ensayo del ORAC en comparación con el BHA y la Vitamina E.

BIBLIOGRAFÍA

1. AMAROWICZ, R., PEGG, R. *et al.* Free-radical scavenging capacity of selected plant species from the Canadian prairies. 2004. Food Chemistry. **84**. p. 551-562.
2. KOSAR, M., BOZAN, B *et al.* Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. 2007. Food Chemistry. **103**. p 952-953.
3. DAGUA, C., DAGUA, D. *et al.* Evaluación de los efluentes provenientes de la agroindustria del Fique en el municipio de Totoró-Cauca. 2008. Facultad de Ciencias Agropecuarias. **6**. p 48-54.
4. MOJICA, A., PAREDES, J. El cultivo de fique en el departamento de Santander. 2004. Centro regional de estudios económicos de Bucaramanga.
5. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL-COMITÉS TÉCNICO Y DIRECTIVO NACIONALES Y REGIONALES DE CADEFIQUE. Guía ambiental del subsector fiquero. Bogotá. 2006. p 21-27.
6. MUÑOZ, D., CABRERA, G. El Fique como aislante térmico. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Marzo de 2007. **5**. p. 10.
7. HOSTETTMAN, K., MARSTON, A.; Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Saponins. Cambridge University Press. New York, NY. 1995. p. 548.

8. SHARAPIN, N. (2000). Sapogeninas esteroideas: Materia prima para la fabricación de hormonas esteroideas. En: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Pinzón, R. Cyted. Colombia. p. 96-98.
9. BENAVIDES, O; BACCA, D. Avances del estudio fitoquímico cualitativo del jugo de la planta de fique (*Furcraea macrophylla*) cultivada en Nariño (Colombia). XVIII Congreso Italo Latinoamericano de etnomedicina. SILAE. La Habana (Cuba). Septiembre de 2009.
10. SANABRIA, A. Análisis Fitoquímico Preliminar "Metodología y su aplicación en la evolución de 40 plantas de la familia "Compositae". Universidad Nacional de Colombia. 1983. p 69-71.
11. GARCÍA, A. y PÉREZ, E. Metabolismo secundario de las plantas. Reduca. Serie Fisiología Vegetal. **3**. 2009. p. 119-145.
12. BRUNETON, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza. 2001. p. 96-108.
13. CSEKE, L., KIRAKOSYAN, A., *et al.* Natural products from Plants. Second Edition. CRC press. Boca Raton, USA. 2006.
14. CUTLER, S. y CUTLER, H. Biologically Active Natural Products: pharmaceuticals. CRC Press. Boca Raton, USA. 1999.
15. BILBAO, M.R. Análisis Fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Armenia. 2000. p 181.
16. DOMINGUEZ, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa., México. 1973. p 70-71.

17. HARBONE, J. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. Londres. 1998.
18. GIMENEZ, A. *Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo*. Tesis doctoral (Medicina y Cirugía). Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Radiología y Medicina Física. Barcelona. 2004. p. 9.
19. KANDASWAMI, C., MIDDLETON, E. *Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids*, *Free Radical in Diagnostic Medicine. A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Armstrong D. Plenum Press. New York. 1994. **336**. p.351-376.
20. BAST, A., HAENEN, G. *Zin en onzin van antioxidanta*, *Pharm. Weekbl.* 1991. **126**. p. 2S-13S.
21. PANIAGUA, M., PRIETO, B., *et al.* *El envejecimiento y los radicales libres*. 2004. *Ciencias*. **75**. p. 38, 40.
22. UGARTONDO, V. *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares*. Universidad de Barcelona. Facultad de farmacia. 2009. p. 5-29.
23. SHUKER, D., ATKIN, W. *et al.* *Malondialdehyde-DNA adducts in relation to diet and disease risk-a brief overview of recent results*. *IARC Sci.* **156**. 2002. p. 475-480.

24. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. Free radicals in Biology and Medicine. 1999. p. 105-125.
25. FLÓREZ, S., GALLEGO, J. *et al.* Revisión los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 2002. **6**. p 271-272.
26. OZSOY, N., CAN, A *et al.* Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. 2008. *Food Chemistry*. **110**. p. 571.
27. YANISHLIEVA, N., MARINOVA, E.M. *et al.* Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. 1999. *Food Chemistry*. **64**. p. 59-66.
28. PORTUGAL, R., PASTOR, J. Determinación del efecto antioxidante in vitro del *Lepidium peruvianum* Chacón (MACA) Arequipa. Universidad Católica Santa María. Perú. 2003. p. 15-24.
29. Stop al envejecimiento. Disponible en Internet: <http://www.institutobiologico.com/seminarios/stop%20al%20envejecimiento.htm>. Fecha de consulta 10 de abril de 2008.
30. Antioxidantes y radicales libres en tabaquismo. Disponible en Internet: <http://www.tabaquismo.freehosting.net/RADICALES/Antioxidantes.htm>. Fecha de consulta 11 de abril de 2009.
31. MARTINEZ, J. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Universidad tecnológica de la mixteca. México. 2007. p. 4-11.

32. FLOREZ, I., FORERO, C. Fracciones antioxidantes a partir de residuos de la producción de jugos y pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth) con CO₂ supercrítico. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad del Valle. Facultad de Ingenierías. Escuela de Ingeniería Química. 2007. p 13,17-18.
33. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., *et al.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995. **28**. p. 25-30.
34. GONZALES, M., SOTO, M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano. *Revista Fitotécnica de México*. 2007. **30:(1)**. p. 43-49.
35. GARCÍA, F. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral europea (Doctor europeo). Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2005. p. 17.
36. AVELLO, M., PASTENE, E. Actividad antioxidante de infusos de ugni molinae turcz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2005. **4**. p. 33-39.
37. RAMOS, L., CASTAÑEDA, B. *et al.* Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista académica del Perú. Salud*. 2008. **15**. p. 42-45.
38. VILLANUEVA, T., CODENZO, H. *et al.* Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cascara de camu-camu

(*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). Ciencia y tecnología de alimentos. Campinas. 2010. p. 151-158.

39. ROJANO, B., GAVIRIA, C. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, revista de la facultada de química farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. 2008. **15**. p. 173-181.
40. RE, R., PELLIGRINI, N. *et al.* Antioxidant activity applying and improved ABTS⁺ radical-cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1999. **16**. p. 1231-1237.
41. NENADIS, N., WANG, L. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS⁺ Assay. *J. Agric. Food Chem.* **52**. 2004. p. 4669-4674.
42. KUSKOSKI, E., ASUERO, A. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. 2005. *Ciencia y tecnología de alimentos*. **25 (4)**. p. 726-732.
43. MILLER, N. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 1993. **84 (4)**. p. 407-412.
44. DAVALOS, A., GOMEZ, C. *et al.* Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Agricultural and Food Chemistry*. 2004. **52**. p. 48-52.
45. SCHLESIER, K., HARWAT, M. *et al.* Assessment of antioxidant activity by using different in Vitro methods. *Free Rad. Res.* 2002. **36(2)**. p. 177-187.

46. CAMPOS, A., LIAAI, E. Kinetic of the reaction between 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS) derive radical cations and phenols. 1996. Free Rad. Biol. Med. Chile. **7**. p. 119-224.
47. GUERRERO, A., PANIZO, G. Actividades y fitoprotectora de la secreción de *Cryptomphalus aspersa*. Industria farmacéutica. 2000. p. 1-13.
48. GLAZER, A. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. Methods in Enzymology. 1990. **186**. p. 161-168.
49. GHISELLI, A. et al. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Radical Biology & Medicine. **18** (1). 1995. p. 29-36.
50. CAO, G., ALESSIO, H. et al. Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants. Free Radical Biology & Medicine. 1993. **14**. p. 303.
51. SÁNCHEZ, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology Internacional. 2002. **8 (3)**. p. 121-137.
52. CASADEVALL, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Universidad de Barcelona. Departamento de farmacia. 2009. p. 14.
53. Bover, L. Estudio y cuantificación de la actividad antioxidante de flores comestibles. Universidad Politécnica de Cataluña. 2009. p.30-95.

54. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. **49 (10)**. p. 4619-1626.
55. PRIOR, R., WU, X. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53 (10)**. 2005. p. 4290-4302.
56. PRAKASH, D., SINGH, B., UPADHYAY, G. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenol from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*. 2007. **102**. p. 1389-1393.
57. KUSKOKI, M. ASUERO, G. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciencia y tecnología de alimentos*. 2004. **24:(4)**. p. 691-693.
58. Introducción al diseño estadístico de experimentos. Disponible en internet: <http://ocw.univalle.edu.co/disenostadisticoexperimentos.pdf>. Fecha de consulta 16 de Agosto de 2010.
59. GUTIERREZ, H., VARA, R. Análisis y Diseño de experimentos. 2004. Capítulo 5.
60. Capítulo 4 Diseño de Experimentos. Disponible en internet: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lat/valenzuela_c_f/capitulo_4.html#. Fecha de consulta 16 de Agosto de 2010.
61. El diseño factorial completo 2^k. Disponible en internet: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/doecast.pdf>. Fecha de consulta 16 de Agosto de 2010.

62. THURMAN, E., Mills, M. Liquid and Solid-Phase Extraction: principles and practice. In: Series Chemical Analysis. 1998. p. 125.
63. HORACK, J., Majors, R. Perspectives from the leading edge in solid phase extraction. LC-GC Int 6. 1993. p 208-213.
64. GROB, R. Modern practice of Gas Chromatography. 1995. p 324-325.
65. SCHREIER, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Chromatographic Methods. 1984. Sr. Alfred Hüthig Verlag, New York.
66. SANDRA, P., BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huething Verlag. 1987. p. 435.
67. ADAMS, R., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 2004. Ed. Allured Publishing Corporation. Illinois. p. 469.
68. McNAIR, H., MILLER, J. Basic gas chromatography. Ed. Hohn Wiley & Sons. New York. 1997. p. 154-156.
69. McLAFFERTY, F., TURECEK. F. Interpretation of mass spectra. San Diego: University Science Books. 1993. p. 374.
70. GUZMÁN, M. et al. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en córdoba. Revista Ciencia y Tecnología. **2**. 2009. p. 63-68.

71. NEUZA, J., MORENO, M. et al. Eugenia Dysterica DC: Actividad Antioxidante, Perfil de Ácidos Grasos y Determinación de Tocoferoles. Revista Chilena de Nutrición. **37 (2)**. 2010. p. 208-212.
72. ARBELAEZ, R. Plan Territorial de salud. 2008. Alcaldía de Totoró. p. 26.
73. YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H. et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. 1998. Biosci. Biotech. Biochem. **62 (6)**. p. 1201-1204.
74. RUENROENGLIN, N. et al. Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. International Journal of Molecular Sciences. **9 (7)**. 2008. p. 1333-1341.
75. DA PORTO, C., CALLIGARIS, S. et al. Antirradical Properties of Comercial Cognacs Assessed by the DPPH· Test. 2000. Food Chem. **48**. p. 4241-4245.
76. LABRINEA, E. GEORGIU, C. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. Analytical Chimical Acta. **526 (1)**. 2004. p. 63-68.
77. KULISIC. T., RADONIC. A. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. 2004. Food Chemistry. **85** p. 633-640.

78. PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO. Manual de técnicas de investigación. Marzo 1995. Actividad Atrapadora de Radicales libres.
79. Velioglu, V.S., Mazza, G. et al. Anti-oxidative activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998. **46**. p. 4113–4117.
80. OZSOY, N., CAN, A. et al. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. (2008). *Food Chemistry*. **110**. p 571-583.
81. ARIAS, L., TAMAYO, J. et al Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de hojas y flores de la *Turnera Ulmifolia* L. 2010. *Química Viva*. **1**. p. 25-29.
82. RICHARD, B., JACE, D. Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *J. Agric. Food Chem.* **57**. 2009. p.1156-1161.
83. <http://www.sld.cu/servicios/aldia/view.php?idn=12555>. Fecha de consulta 1 de Noviembre de 2010.

ANEXOS

ANEXO 1.

ANOVAS PARA LA FRACCIÓN DE AcOEt

Tabla 1. ANOVA factorial para la fracción de AcOEt

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F*
pH	508,733	1	508,733	1,865
Cantidad de solvente	2128,489	1	2128,489	7,804
Tiempo de extracción	286,627	1	286,627	1,051
Cantidad de solvente-Tiempo de extracción	14,660	1	14,660	0,054
pH-Tiempo de extracción	1494,365	1	1494,365	5,479
pH-Cantidad de solvente	59,951	1	59,951	0,220
pH-Cantidad de solvente-Tiempo de extracción	2708,825	1	2708,825	9,931
Error	17456,347	64	272,755	
Total	24657,996	71		

* Valor crítico $F_{1,64} = 4.00$ ($P = 0.05$)

Tabla 2. ANOVA para 25mL de solvente para un tiempo de extracción de 30min

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	63.532	1	63.532	12.77
Intra grupos	79.594	16	4.974	
Total	143.128	17		

* Valor crítico $F_{1,16} = 4.49$ ($P = 0.05$)

Tabla 3. ANOVA para 25mL de solvente para un tiempo de extracción de 90min

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	424.113	1	424.113	93.41
Intra grupos	72.643	16	4.540	
Total	496.757	17		

* Valor crítico $F_{1,16} = 4.49$ ($P = 0.05$)

Tabla 4. ANOVA para 25mL de solvente a un pH de 4.40 en los dos niveles de tiempo de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	1.380	1	1.380	0.27
Intra grupos	67.645	13	5.203	
Total	69.025	14		

* Valor crítico $F_{1,13} = 4.67$ ($P = 0.05$)

Tabla 5. ANOVA para 50mL de solvente para un tiempo de extracción de 90min

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	112.243	1	112.243	20.60
Intra grupos	70.843	13	5.449	
Total	183.087	14		

* Valor crítico $F_{1,13} = 4.67$ ($P = 0.05$)

Tabla 6. ANOVA para 50mL de solvente, para un tiempo de extracción de 30min

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	5.09701	1	5.097	1.47
Intra grupos	45.157	13	3.473	
Total	50.254	14		

* Valor crítico $F_{1,13} = 4.67$ ($P = 0.05$)

Tabla 7. ANOVA para 50mL de solvente a un pH de 4.40 en los dos niveles de tiempo de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	12.068	1	12.068	5.15
Intra grupos	37.508	16	2.344	
Total	49.577	17		

* Valor crítico $F_{1,16} = 4.49$ ($P = 0.05$)

Tabla 8. ANOVA para comparar 25 y 50mL de solvente

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	7.120	1	7.120	1.90
Intra grupos	59.960	16	3.747	
Total	67.080	17		

* Valor crítico $F_{1,16} = 4.49$ ($P = 0.05$)

ANEXO 2.

ANOVAS PARA LA FRACCIÓN DE n-BuOH

Tabla 1. ANOVA factorial para la fracción de n-BuOH

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F*
pH	2452,651	1	2452,651	7,856
Cantidad de solvente	1024,696	1	1024,696	3,282
Tiempo de extracción	2523,910	1	2523,910	8,084
Cantidad de solvente- Tiempo de extracción	504,027	1	504,027	1,614
pH-Tiempo de extracción	4799,688	1	4799,688	15,373
pH-Cantidad de solvente	3,626	1	3,626	0,012
pH-Cantidad de solvente-Tiempo de extracción	603,877	1	603,877	1,934
Error	19981,545	64	312,212	
Total	31894,020	71		

* Valor crítico $F_{1,64} = 4.00$ ($P = 0.05$)

Tabla 2. ANOVA para 25mL de solvente a un tiempo de extracción de 30min

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	299.329	1	299.329	96.28
Intra grupos	40.416	13	3.108	
Total	339.746	14		

* Valor crítico $F_{1,13} = 4.67$ ($P = 0.05$)

Tabla 3. ANOVA para 25mL de solvente a un tiempo de extracción de 90min.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	475.029	1	475.029	93.84
Intra grupos	80.991	16	5.061	
Total	556.019	17		

* Valor crítico $F_{1,16} = 4.49$ ($P = 0.05$)

Tabla 3. ANOVA para 50mL de solvente a un tiempo de extracción de 90min.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	6.212	1	6.212	1.13
Intra grupos	82.673	15	5.511	
Total	88.886	16		

* Valor crítico $F_{1,15} = 4.54$ ($P = 0.05$)

Tabla 4. ANOVA para 50mL de solvente a un tiempo de extracción de 30min.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	74.121	1	74.121	18.33
Intra grupos	52.582	13	4.044	
Total	126.704	14		

* Valor crítico $F_{1,13} = 4.67$ ($P = 0.05$)

Tabla 5. ANOVA para 50mL de solvente a un pH de 4.40 a los dos niveles de tiempo de extracción.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	0.755	1	0.755	0.14
Intra grupos	63.845	12	5.320	
Total	64.601	13		

* Valor crítico $F_{1,12} = 4.75$ ($P = 0.05$)

Tabla 6. ANOVA para comparar 25 y 50mL de solvente.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	18.574	1	18.574	2.74
Intra grupos	101.833	15	6.788	
Total	120.407	16		

* Valor crítico $F_{1,15} = 4.54$ ($P = 0.05$)

ANEXO 3.

ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Tabla 1. ANOVA de AcOEt para comparar el tratamiento pH (4.40), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (25mL) y pH (4.4), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (20mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	0	1	0	0.00
Intra grupos	3.306	10	0.330	
Total	3.306	11		

* Valor crítico $F_{1,10} = 4.96$ ($P = 0.05$)

Tabla 2. ANOVA de AcOEt para comparar el tratamiento pH (4.40), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (25mL) y pH (4.4), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (15mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	0	1	0	0.00
Intra grupos	3.306	10	0.330	
Total	3.306	11		

* Valor crítico $F_{1,10} = 4.96$ ($P = 0.05$)

Tabla 3. ANOVA de n-BuOH para comparar el tratamiento pH (4.40), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (25mL) y pH (4.4), Tiempo (120min), Cantidad de solvente (25mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	2.262	1	2.262	2.46
Intra grupos	9.182	10	0.918	
Total	11.444	11		

* Valor crítico $F_{1,10} = 4.96$ ($P = 0.05$)

Tabla 4. ANOVA de n-BuOH para comparar el tratamiento pH (4.40), Tiempo (90min), Cantidad de solvente (25mL) y pH (4.4), Tiempo (120min), Cantidad de solvente (25mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F*
Entre grupos	1.552	1	1.552	1.04
Intra grupos	14.798	10	1.479	
Total	16.350	11		

* Valor crítico $F_{1,10} = 4.96$ ($P = 0.05$)

ANEXO 4.

DATOS ORAC

Tabla 1. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 2.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
33428.0	1096.7	3.1	31689.2	1.0
33274.3	1161.1	3.3	31566.5	1.0
32076.4	1186.6	3.4	31412.0	1.0
32075.2	1185.2	3.4	31314.9	1.0
32006.0	1207.0	3.5	31180.2	1.0
31265.9	1202.7	3.5	31072.0	1.0
31275.6	1227.7	3.6	30941.6	0.9
31286.0	1226.8	3.6	30828.2	0.9
31157.4	1214.0	3.6	30699.0	0.9
30765.9	1223.5	3.7	30559.1	0.9
30548.7	1179.7	3.6	30361.7	0.9
30005.2	1171.7	3.6	30238.8	0.9
29786.6	1119.4	3.5	30093.8	0.9
29547.3	1102.4	3.5	29965.6	0.9
29005.2	1073.8	3.5	29749.7	0.8
28878.1	1144.8	3.8	29506.1	0.8
28124.3	1227.0	4.1	29188.0	0.7
27985.4	1381.2	4.7	28869.9	0.7
27543.9	1392.2	4.8	28535.3	0.7
27012.6	1430.6	5.1	28210.7	0.7
26884.6	1466.6	5.3	27775.4	0.7
26056.8	1504.5	5.6	27365.2	0.7
25366.3	1548.2	5.8	27160.0	0.6
24606.2	1558.2	6.1	27083.6	0.6
23654.6	1629.5	6.5	26838.0	0.6
22976.6	1648.2	6.8	26479.0	0.5
21525.0	1569.4	6.7	25563.6	0.5
20765.5	1524.7	6.7	24601.4	0.5
20135.3	1532.6	7.0	23740.6	0.4
19754.3	1573.0	7.5	22935.7	0.4
18673.2	1622.1	8.0	22067.9	0.4
17665.3	1677.1	8.6	21189.7	0.3
16264.7	1748.8	9.3	20337.2	0.3
15034.7	1814.6	10.1	19471.4	0.2
13962.9	1869.2	10.8	18621.7	0.2
13002.6	1899.6	11.4	17825.4	0.2
12136.0	1924.8	12.0	17030.1	0.2
11331.2	1963.1	12.7	16293.9	0.1
10595.6	2035.7	13.6	15566.8	0.1
9948.5	2040.6	14.2	14883.7	0.1

Tabla 1. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 2.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo	
9354.2	2041.2	14.8	14196.1	0.1	
8817.2	2046.9	15.4	13536.6	0.1	
8330.4	2029.7	15.9	12910.3	0.1	
7879.0	2048.0	16.7	12308.6	0.1	
7481.3	2041.2	17.3	11733.9	0.1	
7121.0	2044.4	18.0	11165.4	0.1	
6769.7	2039.8	18.7	10631.4	0.1	
6453.9	2047.6	19.5	10132.4	0.1	
6164.7	2049.2	20.3	9650.7	0.1	
5899.9	2042.3	21.1	9196.5	0.1	
CONCENTRACION 2.25 ppm			$\Sigma fi/fo$	26.2	
			FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)		0.9
			AUC		27.2
			AUC NETA		9.9

Tabla 2. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 9.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
34866.7	1096.7	3.1	31380.0	1.0
34701.3	1161.1	3.3	31231.1	1.0
34558.8	1186.6	3.4	31102.9	1.0
34392.6	1185.2	3.4	30953.4	1.0
34225.7	1207.0	3.5	30803.1	1.0
34092.8	1202.7	3.5	30683.5	1.0
33955.9	1227.7	3.6	30560.3	1.0
33798.2	1226.8	3.6	30418.4	1.0
33520.1	1214.0	3.6	30168.1	1.0
33140.2	1223.5	3.7	29826.2	0.9
32699.8	1179.7	3.6	29429.8	0.9
32250.7	1171.7	3.6	29025.6	0.9
31739.8	1119.4	3.5	28565.8	0.9
31201.5	1102.4	3.5	28081.4	0.9
30690.0	1073.8	3.5	27621.0	0.9
30190.0	1144.8	3.8	27171.0	0.9
29746.2	1227.0	4.1	26771.5	0.9
29303.4	1381.2	4.7	26373.0	0.8
28766.3	1392.2	4.8	25889.6	0.8
28185.1	1430.6	5.1	25366.5	0.8
27653.8	1466.6	5.3	24888.4	0.8
27097.7	1504.5	5.6	24388.0	0.7

Tabla 2. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 9.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
26517.3	1548.2	5.8	23865.6	0.7
25744.9	1558.2	6.1	23170.4	0.7
25000.0	1629.5	6.5	22500.0	0.7
24267.6	1648.2	6.8	21840.8	0.7
23444.4	1569.4	6.7	21100.0	0.6
22679.1	1524.7	6.7	20411.2	0.6
21867.7	1532.6	7.0	19680.9	0.6
21076.9	1573.0	7.5	18969.2	0.6
20282.0	1622.1	8.0	18253.8	0.6
19500.4	1677.1	8.6	17550.3	0.5
18766.7	1748.8	9.3	16890.0	0.5
18041.9	1814.6	10.1	16237.7	0.5
17365.0	1869.2	10.8	15628.5	0.5
16706.8	1899.6	11.4	15036.1	0.5
16066.3	1924.8	12.0	14459.6	0.4
15464.1	1963.1	12.7	13917.7	0.4
14915.4	2035.7	13.6	13423.8	0.4
14383.8	2040.6	14.2	12945.4	0.4
13828.9	2041.2	14.8	12446.0	0.4
13304.3	2046.9	15.4	11973.9	0.3
12791.2	2029.7	15.9	11512.1	0.3
12296.8	2048.0	16.7	11067.1	0.3
11807.0	2041.2	17.3	10626.3	0.3
11342.7	2044.4	18.0	10208.4	0.3
10898.6	2039.8	18.7	9808.7	0.3
10477.6	2047.6	19.5	9429.8	0.2
10083.3	2049.2	20.3	9075.0	0.2
9687.3	2042.3	21.1	8718.6	0.2
CONCENTRACION 9.25 ppm	$\Sigma fi/fo$			32.8
	FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)			0.9
	AUC			33.8
	AUC NETA			16.5

Tabla 3. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 11.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
35773.6	428.7	1.2	32196.2	1.0
35656.2	343.3	1.0	32090.6	1.0
35495.3	328.8	0.9	31945.7	1.0
35342.9	278.5	0.8	31808.6	1.0

Tabla 3. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 11.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
35221.8	297.0	0.8	31699.6	1.0
35033.4	217.5	0.6	31530.1	1.0
34902.2	243.6	0.7	31412.0	1.0
34811.0	306.9	0.9	31329.9	1.0
34670.1	320.2	0.9	31203.1	1.0
34495.3	330.8	1.0	31045.8	1.0
34279.3	301.8	0.9	30851.4	1.0
34049.6	380.4	1.1	30644.7	1.0
33751.2	437.9	1.3	30376.1	0.9
33420.6	567.4	1.7	30078.5	0.9
33102.3	766.5	2.3	29792.1	0.9
32632.0	882.5	2.7	29368.8	0.9
32212.8	1090.0	3.4	28991.5	0.9
31924.8	1277.9	4.0	28732.4	0.9
31487.0	1488.3	4.7	28338.3	0.9
31014.8	1782.9	5.7	27913.3	0.9
30526.1	2114.5	6.9	27473.5	0.9
29856.9	2336.4	7.8	26871.2	0.8
29096.0	2285.8	7.9	26186.4	0.8
28386.8	1952.2	6.9	25548.1	0.8
27386.4	1797.8	6.6	24647.8	0.8
26380.0	1746.1	6.6	23742.0	0.7
24684.3	2105.6	8.5	22215.8	0.7
23540.5	2175.2	9.2	21186.5	0.7
22471.8	2230.1	9.9	20224.6	0.6
21458.1	2259.3	10.5	19312.3	0.6
20453.1	2355.8	11.5	18407.8	0.6
19573.0	2211.5	11.3	17615.7	0.5
18779.7	2005.7	10.7	16901.7	0.5
18018.4	1801.8	10.0	16216.6	0.5
17264.4	1721.8	10.0	15537.9	0.5
16495.6	1701.0	10.3	14846.0	0.5
15752.6	1677.3	10.6	14177.4	0.4
15037.9	1665.7	11.1	13534.1	0.4
14349.5	1663.3	11.6	12914.5	0.4
13658.4	1624.2	11.9	12292.6	0.4
13000.0	1577.6	12.1	11700.0	0.4
12333.3	1558.4	12.6	11100.0	0.3
11750.6	1550.8	13.2	10575.5	0.3
11177.6	1537.6	13.8	10059.8	0.3
10612.0	1518.2	14.3	9550.8	0.3
10068.9	1484.4	14.7	9062.0	0.3
9558.4	1455.1	15.2	8602.6	0.3
9064.2	1417.3	15.6	8157.8	0.3
8598.9	1386.3	16.1	7739.0	0.2
8160.8	1356.1	16.6	7344.7	0.2

Tabla 3. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 11.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
CONCENTRACION 11.25 ppm			$\sum fi/fo$	34.0
			FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)	0.9
			AUC	35.0
			AUC NETA	17.7

Tabla 4. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 13.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
35210.2	741.2	2.1	31689.2	1.0
35073.9	724.6	2.1	31566.5	1.0
34902.2	698.5	2.0	31412.0	1.0
34794.4	665.6	1.9	31314.9	1.0
34644.7	673.5	1.9	31180.2	1.0
34524.4	651.4	1.9	31072.0	1.0
34379.5	575.1	1.7	30941.6	1.0
34253.6	589.0	1.7	30828.2	1.0
34110.0	576.0	1.7	30699.0	1.0
33954.5	539.2	1.6	30559.1	1.0
33735.3	469.8	1.4	30361.7	1.0
33598.7	458.8	1.4	30238.8	1.0
33437.5	473.1	1.4	30093.8	0.9
33295.1	520.9	1.6	29965.6	0.9
33055.2	582.2	1.8	29749.7	0.9
32784.6	731.5	2.2	29506.1	0.9
32431.2	874.7	2.7	29188.0	0.9
32077.7	1075.2	3.4	28869.9	0.9
31705.9	1206.9	3.8	28535.3	0.9
31345.2	1431.3	4.6	28210.7	0.9
30861.6	1652.3	5.4	27775.4	0.9
30405.8	1861.3	6.1	27365.2	0.9
30177.8	1883.7	6.2	27160.0	0.9
30092.9	1689.1	5.6	27083.6	0.9
29820.0	1556.9	5.2	26838.0	0.8
29421.1	1328.6	4.5	26479.0	0.8
28404.0	1703.2	6.0	25563.6	0.8
27334.9	2150.9	7.9	24601.4	0.8
26378.5	2253.9	8.5	23740.6	0.7
25484.2	1976.2	7.8	22935.7	0.7
24519.9	1875.2	7.6	22067.9	0.7
23544.1	1808.4	7.7	21189.7	0.7

Tabla 4. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 13.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo	
22596.9	1778.7	7.9	20337.2	0.6	
21634.9	1735.8	8.0	19471.4	0.6	
20690.8	1721.7	8.3	18621.7	0.6	
19806.0	1704.3	8.6	17825.4	0.6	
18922.4	1712.0	9.0	17030.1	0.5	
18104.3	1700.3	9.4	16293.9	0.5	
17296.4	1675.8	9.7	15566.8	0.5	
16537.5	1640.4	9.9	14883.7	0.5	
15773.5	1625.2	10.3	14196.1	0.4	
15040.7	1618.4	10.8	13536.6	0.4	
14344.8	1599.2	11.1	12910.3	0.4	
13676.2	1570.8	11.5	12308.6	0.4	
13037.7	1561.2	12.0	11733.9	0.4	
12406.0	1534.7	12.4	11165.4	0.4	
11812.7	1510.7	12.8	10631.4	0.3	
11258.3	1482.1	13.2	10132.4	0.3	
10723.0	1459.7	13.6	9650.7	0.3	
10218.3	1428.6	14.0	9196.5	0.3	
CONCENTRACION 13.25 ppm			$\Sigma fi/fo$	36.7	
			FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)		0.9
			AUC		37.7
			AUC NETA		20.4

Tabla 5. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 17.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
34454.7	809.6	2.3	31009.3	1.0
34302.9	811.2	2.4	30872.6	1.0
34126.3	826.4	2.4	30713.6	1.0
33975.7	850.2	2.5	30578.1	1.0
33846.4	873.2	2.6	30461.8	1.0
33715.3	839.2	2.5	30343.7	1.0
33600.3	853.2	2.5	30240.3	1.0
33498.1	825.2	2.5	30148.3	1.0
33351.6	807.7	2.4	30016.5	1.0
33212.0	773.2	2.3	29890.8	1.0
33083.8	783.6	2.4	29775.4	1.0
32947.9	775.7	2.4	29653.1	1.0
32773.3	738.1	2.3	29496.0	1.0
32539.5	707.8	2.2	29285.6	1.0

Tabla 5. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 17.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
32329.6	592.1	1.8	29096.6	1.0
32040.0	572.0	1.8	28836.0	0.9
31712.6	522.4	1.6	28541.3	0.9
31372.5	537.4	1.7	28235.2	0.9
31043.0	610.1	2.0	27938.7	0.9
30849.6	1017.5	3.3	27764.6	0.9
30533.2	1231.2	4.0	27479.9	0.9
30146.7	1410.7	4.7	27132.1	0.9
29759.5	1658.1	5.6	26783.5	0.9
29379.7	1929.9	6.6	26441.7	0.9
29047.8	2124.0	7.3	26143.0	0.9
28860.1	2265.3	7.8	25974.1	0.9
28661.0	2502.8	8.7	25794.9	0.8
28410.4	2607.6	9.2	25569.4	0.8
28204.1	2608.6	9.2	25383.7	0.8
27846.6	2536.5	9.1	25061.9	0.8
27440.3	2405.4	8.8	24696.3	0.8
27111.9	2096.4	7.7	24400.7	0.8
26721.6	1767.6	6.6	24049.4	0.8
26230.5	1552.7	5.9	23607.5	0.8
25601.6	1505.5	5.9	23041.5	0.8
24823.6	1496.6	6.0	22341.2	0.8
24022.7	1539.7	6.4	21620.5	0.7
23208.8	1607.5	6.9	20887.9	0.7
22349.2	1603.0	7.2	20114.2	0.7
21535.7	1618.7	7.5	19382.1	0.7
20698.5	1620.7	7.8	18628.6	0.6
19942.0	1617.5	8.1	17947.8	0.6
19167.0	1567.3	8.2	17250.3	0.6
18412.9	1571.4	8.5	16571.6	0.6
17684.2	1552.7	8.8	15915.8	0.5
16975.4	1552.7	9.1	15277.9	0.5
16304.9	1559.8	9.6	14674.4	0.5
15658.4	1559.0	10.0	14092.6	0.4
15040.1	1533.7	10.2	13536.1	0.4
14424.4	1529.0	10.6	12982.0	0.4
CONCENTRACION 17.25 ppm			Σfi/fo	40.8
			FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)	0.9
			AUC	41.8
			AUC NETA	24.5

Tabla 6. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 19.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
33509.8	293.2	0.9	33509.8	1.0
33313.5	323.5	1.0	33313.5	1.0
33120.2	346.7	1.0	33120.2	1.0
32969.2	371.7	1.1	32969.2	1.0
32862.3	382.7	1.2	32862.3	1.0
32689.7	405.0	1.2	32689.7	1.0
32570.6	412.7	1.3	32570.6	1.0
32444.9	390.6	1.2	32444.9	1.0
32341.6	397.4	1.2	32341.6	1.0
32210.4	377.4	1.2	32210.4	1.0
32111.1	371.0	1.2	32111.1	1.0
31988.1	403.8	1.3	31988.1	1.0
31878.2	390.5	1.2	31878.2	1.0
31812.8	404.8	1.3	31812.8	0.9
31693.8	454.1	1.4	31693.8	0.9
31578.3	443.4	1.4	31578.3	0.9
31456.2	440.7	1.4	31456.2	0.9
31301.1	417.0	1.3	31301.1	0.9
31146.7	367.1	1.2	31146.7	0.9
30964.3	360.4	1.2	30964.3	0.9
30781.5	410.1	1.3	30781.5	0.9
30592.0	489.5	1.6	30592.0	0.9
30399.8	576.0	1.9	30399.8	0.9
30189.4	674.9	2.2	30189.4	0.9
30063.8	746.0	2.5	30063.8	0.9
29945.1	805.5	2.7	29945.1	0.9
29841.6	837.3	2.8	29841.6	0.9
29801.0	791.7	2.7	29801.0	0.9
29744.6	721.2	2.4	29744.6	0.9
29712.5	680.4	2.3	29712.5	0.9
29654.0	601.7	2.0	29654.0	0.9
29572.6	592.2	2.0	29572.6	0.9
29423.7	602.8	2.0	29423.7	0.9
29250.6	699.1	2.4	29250.6	0.9
29018.9	870.3	3.0	29018.9	0.9
28718.1	1071.0	3.7	28718.1	0.9
28337.8	1323.3	4.7	28337.8	0.8
27894.8	1564.4	5.6	27894.8	0.8
27355.8	1781.9	6.5	27355.8	0.8
26713.2	1951.2	7.3	26713.2	0.8
25947.8	2062.8	7.9	25947.8	0.8
25167.8	2093.9	8.3	25167.8	0.8
24376.4	2111.0	8.7	24376.4	0.7
23613.3	2132.5	9.0	23613.3	0.7
22878.6	2175.1	9.5	22878.6	0.7
22128.3	2235.1	10.1	22128.3	0.7
21393.5	2273.1	10.6	21393.5	0.6

Tabla 6. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 19.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo			
20705.0	2298.8	11.1	20705.0	0.6			
20032.2	2346.3	11.7	20032.2	0.6			
19370.8	2366.1	12.2	19370.8	0.6			
CONCENTRACION 19.25 ppm				$\Sigma fi/fo$	43.5		
				FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)			1.0
				AUC			44.5
				AUC NETA			27.2

Tabla 7. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 25.25ppm

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
33856.60	3844.21	11.35	30470.9	1.0
33713.06	3838.09	11.38	30341.8	1.0
33590.49	3812.06	11.35	30231.4	1.0
33483.28	3805.88	11.37	30134.9	1.0
33346.53	3735.14	11.20	30011.9	1.0
33172.70	3685.69	11.11	29855.4	1.0
33059.26	3683.64	11.14	29753.3	1.0
32929.09	3685.80	11.19	29636.2	1.0
32829.34	3648.74	11.11	29546.4	1.0
32671.55	3608.32	11.04	29404.4	1.0
32588.40	3597.10	11.04	29329.6	1.0
32497.79	3528.32	10.86	29248.0	1.0
32396.08	3480.69	10.74	29156.5	1.0
32299.14	3452.71	10.69	29069.2	1.0
32178.35	3438.56	10.69	28960.5	1.0
32168.41	3470.38	10.79	28951.6	1.0
32099.09	3478.95	10.84	28889.2	1.0
32062.40	3510.65	10.95	28856.2	1.0
32002.30	3534.97	11.05	28802.1	1.0
31961.40	3555.10	11.12	28765.3	1.0
31892.05	3594.21	11.27	28702.8	1.0
31791.26	3568.09	11.22	28612.1	1.0
31731.36	3555.59	11.21	28558.2	1.0
31680.06	3557.01	11.23	28512.1	1.0
31657.26	3502.07	11.06	28491.5	1.0
31643.51	3537.27	11.18	28479.2	1.0
31546.90	3522.07	11.16	28392.2	1.0
31443.60	3505.88	11.15	28299.2	1.0
31355.11	3464.54	11.05	28219.6	1.0

Tabla 7. Seguimiento de la reacción para determinar el valor ORAC-Trolox 25.25ppm (Continuación)

PROMEDIO	DESVEST	% DESVEST	PROMEDIO NORMALIZADO	fi/fo
31266.00	3385.29	10.83	28139.4	1.0
31242.14	3331.92	10.66	28117.9	0.9
31255.73	3355.09	10.73	28130.2	0.9
31196.55	3377.39	10.83	28076.9	0.9
31141.19	3389.88	10.89	28027.1	0.9
31065.54	3397.23	10.94	27959.0	0.9
30981.71	3386.66	10.93	27883.5	0.9
30885.50	3370.46	10.91	27797.0	0.9
30917.64	3445.93	11.15	27825.9	0.9
30959.39	3474.12	11.22	27863.4	0.9
31065.65	3482.91	11.21	27959.1	0.9
31044.09	3497.69	11.27	27939.7	0.9
31021.25	3550.61	11.45	27919.1	0.9
31012.60	3614.58	11.66	27911.3	0.9
30900.65	3611.73	11.69	27810.6	0.9
30843.45	3515.46	11.40	27759.1	0.9
30832.73	3443.90	11.17	27749.5	0.9
30735.36	3418.06	11.12	27661.8	0.9
30707.49	3380.20	11.01	27636.7	0.9
30712.66	3415.23	11.12	27641.4	0.9
30610.33	3401.95	11.11	27549.3	0.9
CONCENTRACION 25.25 ppm			Σfi/fo	48.0
			FLUORESCENCIA (BLANCO, t=0/MUESTRA t=0)	0.9
			AUC	49.0
			AUC NETA	31.7