



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Optimización de extracción de antioxidantes de zarandaja (*Lablab purpureus* L.)

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Cevallos Caillagua, Lizett del Cisne

DIRECTORA: Guamán Balcázar, María del Cisne, Mg. Sc.

LOJA-ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister Sc.

Guamán Balcázar, María del Cisne

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Optimización de extracción de antioxidantes de zarandaja (*Lablab purpureus* L.)**” realizado por Cevallos Caillagua Lizett del Cisne, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2016

f).....
Mg. Sc. María del Cisne Guamán Balcázar

C.I:

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Lizett del Cisne Cevallos Caillagua declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Optimización de extracción de antioxidantes de zarandaja (*Lablab purpureus* L.)”, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo la Mg. Sc. María del Cisne Guamán Balcázar directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Lizett del Cisne Cevallos Caillagua

1105024481

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi madre Guirnalda que es mi guía, ya que con su sabiduría, conocimientos y consejos acertados de la experiencia, observación en un lenguaje afectuoso y claro me han ayudado a formar mis valores y principios encaminados a formarme en una persona útil a la sociedad, hoy su esfuerzo y el mío lo veo reflejado en la obtención de mi título. Gracias mamita por fijar en mi un sentimiento profundo de responsabilidad ligados a todos tus pensamientos y palabras.

A mis familiares que han formado parte de mi formación espiritual y educacional, a mis compañeras por compartir las aulas universitarias.

AGRADECIMIENTO

Ante todo quiero dar gracias a Dios por ayudarme durante toda mi vida estudiantil, porque él ha sido quien me ha guiado por los verdaderos caminos, resaltando los dones espirituales que han fortalecido mis principios y valores.

Dejo constancia de mis agradecimientos por sus reconocidos méritos a todos los catedráticos de esta la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera muy especial a mi tutora de proyecto Mg. Sc. María del Cisne Guamán, quién aportado con sus conocimientos, enseñanzas y experiencias, en fin todo aquello que me ha orientado al desarrollo y culminación de este proyecto.

A los Mg. Sc. Geovanny Figueroa y Dr. Miguel Ángel Meneses quienes han aportado con su profesionalismo y responsabilidad, cualidades que resaltan de un verdadero maestro para así asimilar reglas orientadoras en este desarrollo de mi proyecto.

A mis amigas y hermanas Fabiana y Marena, gracias por su apoyo y ánimo brindados desde la parte experimental hasta la escritura de mi trabajo.

Por último a la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme estudiar y formarme académicamente con el fin de llegar a ser una gran profesional y ser útil a la sociedad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ix
ÍNDICE DE ECUACIONES	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1 REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1 Zarandaja (<i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet)	6
1.1.1 Composición química y valor nutricional.	6
1.1.2 Propiedades y usos.	7
1.1.3 Producción de zarandaja.	7
1.2 Antioxidantes y radicales libres	8
1.2.1 Estrés oxidativo	9
1.3 Compuestos fenólicos	10
1.4 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante	10
1.4.1 Fenoles totales.	11
1.4.2 FRAP	11
1.4.3 ABTS	11
1.4.4 DPPH.	12
1.5 Optimización de experimentos	12
1.6 Cinética de extracción	13
2 OBJETIVOS DEL PROYECTO	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS	16

3.1 Preparación y obtención de la materia prima.....	17
3.2 Determinación del contenido de humedad.....	17
3.3 Diseño experimental.....	17
3.4 Preparación de extractos.....	18
3.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante.....	19
3.5.1 Fenoles totales	19
3.5.2 ABTS (ácido 2, 2'-azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico).....	20
3.5.3 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhydrazil)	21
3.5.4 FRAP	22
4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
4.1 Desarrollo del método	25
4.2 Fenoles totales.....	26
4.2.1 Optimización del método.....	26
4.2.2 Cinética de extracción.....	27
4.3 ABTS.....	29
4.3.1 Optimización del método.....	29
4.3.2 Cinética de extracción.....	30
4.4 DPPH	32
4.4.1 Optimización del método.....	32
4.4.2 Cinética de extracción.....	33
4.5 FRAP	34
4.5.1 Optimización del método.....	34
4.5.2 Cinética de extracción.....	36
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA	41
ANEXOS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Zarandaja Lablab purpureus (L.).....	6
Figura 2: Interacción entre radicales libres y antioxidantes.....	9
Figura 3: Procedimiento para Fenoles totales (Folin-Ciocalteu)	20
Figura 4: Procedimiento para ensayo ABTS	21
Figura 5: Procedimiento para ensayo DPPH.....	22
Figura 6: Procedimiento para ensayo FRAP.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Información nutricional de la zarandaja por cada 100g	7
Tabla 2: Clasificación de los antioxidantes exógenos y endógenos	8
Tabla 3: Variables que se utilizaron para la realización de los extractos	18
Tabla 4: Número de extractos con las condiciones	18
Tabla 5: Resultados de la cuantificación de los 15 extractos de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP	25
Tabla 6: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza fenoles totales	26
Tabla 7: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza ABTS	29
Tabla 8: Condiciones óptimas para solvente, temperatura y condiciones de trabajo para relación muestra/solvente que maximiza DPPH	32
Tabla 9: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza FRAP	35
Tabla 10: Resultados del porcentaje de pérdida de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP con respecto al valor óptimo, utilizando la ecuación de superficie de respuesta de los 4 métodos	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Diagrama estandarizado de pareto para fenoles totales.....	26
Gráfica 2: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en fenoles totales.....	27
Gráfica 3: Resultados que se obtuvieron durante el análisis de fenoles totales a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min.....	28
Gráfica 4: Diagrama estandarizado de pareto para ABTS	29
Gráfica 5: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en ABTS.....	30
Gráfica 6: Resultados que se obtuvieron durante el análisis ABTS a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min	31
Gráfica 7: Diagrama estandarizado de pareto para DPPH.....	32
Gráfica 8: Resultados del análisis de optimización para la elección de relación muestra/solvente en DPPH	33
Gráfica 9: Resultados que se obtuvieron durante el análisis DPPH a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min.	34
Gráfica 10: Diagrama estandarizado de pareto para FRAP.....	35
Gráfica 11: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en FRAP.....	36
Gráfica 12: Resultados que se obtuvieron durante el análisis FRAP a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min.....	37

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta fenoles totales.....	27
Ecuación 2: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta ABTS.....	30
Ecuación 3: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta DPPH.....	33
Ecuación 4: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta FRAP.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Determinación de humedad.....	48
Anexo 2.- Fenoles totales (Método Folin-Ciocalteu).....	49
Anexo 3.- ABTS.....	55
Anexo 4.- DPPH.....	60
Anexo 5.- FRAP.....	64
Anexo 6.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de fenoles totales....	71
Anexo 7.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de ABTS.....	74
Anexo 8.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de DPPH.....	77
Anexo 9.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de FRAP.....	80
Anexo 10.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de fenoles totales.....	83
Anexo 11.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de ABTS.....	86
Anexo 12.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de DPPH.....	89
Anexo 13.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de FRAP.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs:	Absorbancia
Ac:	Ácido
b:	Intersección
Conc:	Concentración
CV:	Coeficiente de variación
DS:	Desviación estándar
EAG:	Equivalentes de ácido gálico
Eq:	Equivalente químico
ET:	Equivalentes de Trólox
EtOH:	Etanol
g:	Gramo
h:	Horas
H₂O:	Agua
L:	Litro
M/Sol:	Muestra/Solvente
M:	Molar
m:	Pendiente
MeOH:	Metanol
mg:	Miligramo
min:	Minutos
mL:	Mililitro
N:	Normal
nm:	Nanómetros
PM:	Promedio
Rel:	Relación

Rep: Repetición
rpm: Revoluciones por minuto
Sol: Solvente
Temp: Temperatura
Vol: Volumen
W: Peso
x: Concentración
y: Absorbancia
%: Porcentaje
°C: Grados centígrados
μL: Microlitro
μmol: Micromol

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo la evaluación del contenido fenólico, actividad antioxidante y optimización de parámetros de extracción en la zarandaja *Lablab purpureus* (L.). La muestra fue proveniente de la parroquia Malacatos, perteneciente al cantón y provincia de Loja. Para la obtención de los extractos se trabajó con 3 variables: % de etanol, temperatura y relación muestra/solvente en tres niveles cada una. Posteriormente se realizó las mediciones del contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por medio de los ensayos ABTS, DPPH y FRAP.

Se determinó que las condiciones óptimas para fenoles totales fueron: solvente H₂O, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min con un valor de 369.26 ± 5.26 mg EAG/100g, los valores en la capacidad antioxidante dependiendo el ensayo fueron; ABTS 20.11 ± 0.87 μ mol ET/g, DPPH 41.58 ± 1.18 μ mol ET/g y FRAP 5.60 ± 0.08 μ mol ET/g, a las condiciones óptimas de: ABTS solvente 20% EtOH, temperatura 60°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min; DPPH solvente 80% EtOH, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 6.66 g/93.33 mL y tiempo 90 min; FRAP solvente H₂O, temperatura 38°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.

Palabras clave: *Lablab purpureus*, capacidad antioxidante, optimización, fenoles totales.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the phenolic content, antioxidant activity and optimization of extraction parameters on the zarandaja *Lablab purpureus* (L.). The sample was from the parish of Malacatos, belonging to the canton and province of Loja. To obtain the extracts, three variables were used: ethanol %, temperature and sample / solvent in three levels each. Subsequently measurements of the total phenol content was performed by the Folin-Ciocalteu and method antioxidant activity it was measured by the ABTS assays, DPPH and FRAP.

It was determined that the optimum conditions for total phenols were: solvent H₂O, temperature 28°C, sample/solvent 25 g/75 mL and time 90 min with a value of 369.26 ± 5.26 mg EAG / 100g, values in the antioxidant capacity Depending on the trial they were; ABTS 20.11 ± 0.87 µmol ET/g, DPPH 41.58 ± 1.18 µmol ET/g and FRAP 5.60 ± 0.08 µmol ET/g to the optimum conditions of: ABTS solvent 20% EtOH, temperature 60°C, sample /solvent 25 g/75 mL and time 90 min; for DPPH solvent 80% EtOH, temperature 28°C, sample/solvent 6.66 g/ 93.33 mL and time 90 min; for FRAP solvent H₂O, temperature 38°C sample/solvent 25 g/75 mL and time 90 min.

Keywords: *Lablab purpureus*, antioxidant capacity, optimization, total phenols.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la optimización de la extracción de antioxidantes de la zarandaja *Lablab purpureus* (L.), el mismo que se encuentra dividido en seis capítulos, en el primero se expone la revisión de literatura, en el segundo se presenta los objetivos del proyecto, el tercero da a conocer los métodos con los que se trabajó, en el cuarto los resultados y discusiones, en el quinto las conclusiones del trabajo y en el sexto las recomendaciones.

En el Ecuador el sector agrícola no se encuentra explotado en su totalidad, es por eso que el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, desarrolló “La Política Agropecuaria Ecuatoriana”, con el fin de promover el desarrollo territorial rural sostenible, el mismo que hace mención al cultivo de productos entre estos la zarandaja, maíz y maní, específicamente en los cantones Celica, Pindal y Espíndola de la provincia de Loja (MAGAP, 2015).

La zarandaja con nombre científico *Lablab purpureus* (L.) es una planta herbácea nativa de África y Asia, cultivada en los trópicos y regiones templadas, e introducida en algunos países como Panamá, Bolivia, Colombia y Ecuador (Pengelly & Maas, 2001).

Esta legumbre posee una composición química muy variada como: flavonoides, quercetina, taninos, polifenoles (Kamatchi Kala et al., 2010; Motalib et al., 2012), por lo que es fuente de antioxidantes naturales los mismos que impiden o retrasan la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos y previenen la formación de radicales libres (Zamora, 2007) que provocan el envejecimiento y enfermedades degenerativas asociadas con el cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias, daños al ADN que pueden resultar en mutagénesis (Devasagayam et al., 2004; Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001).

Por lo cual, el objetivo del presente estudio es contribuir a la valorización de los alimentos tradicionales zarandaja (*Lablab purpureus* L.), mediante la optimización de parámetros de extracción de compuestos fenólicos, cuantificación de fenoles totales y la determinación de actividad antioxidante, favoreciendo el consumo local y su futuro aprovechamiento industrial.

La muestra con la que se trabajó fue proveniente de la parroquia Malacatos, perteneciente al cantón y provincia de Loja, a ésta se le redujo su tamaño de partícula. Para la obtención de los extractos se trabajó con el método por maceración dinámica, utilizando tres variables (% de etanol, temperatura y relación muestra/solvente). Para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de dichos extractos se utilizó tres métodos: ABTS, DPPH y FRAP (Mercado, Carrillo, Wall-Medrano, López, & Álvarez, 2013; Sanchez-Moreno, 2002), y para determinar el contenido fenólico se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros, & Hawkins, 2006).

Finalmente para la optimización de la extracción se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR), con el fin de encontrar las combinaciones de las variables estudiadas que maximicen la cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante.

1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Zarandaja (*Lablab purpureus* (L.) Sweet)

La zarandaja (figura 1) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Fabaceae, conocida con nombres comunes como: frijol jacinto, frijol egipcio, y en Japón Fuji mame (Valenzuela & Smith, 2002). Se reconocen hasta 3 subespecies: *purpureus*, *benghalensis* y *uncinatus*. (Lumbreras, 2001).



Figura 1: Zarandaja *Lablab purpureus* (L.)
Fuente: La autora

Esta leguminosa es nativa de África y Asia, cultivada en los trópicos y regiones templadas, e introducida en algunos países como Panamá, Bolivia, Colombia y Ecuador (Pengelly & Maas, 2001). En el Ecuador el cultivo de la zarandaja no se encuentra explotado, ya que son pocos los lugares en donde se realizan las cosechas del mismo, esto depende de la variedad, la zona de producción y el nivel tecnológico empleado (MAGAP, 2015).

1.1.1 Composición química y valor nutricional.

Esta legumbre presenta una composición de aminoácidos bien equilibrada, así también es fuente de antioxidantes naturales cuyos valores de contenido de flavonoides son 42.55 ± 5.77 y 32.09 ± 0.36 mg/g de quercetina, fenoles totales 0.21 - 0.32 g/100 g, taninos 0.23 - 0.40 g/100g, ácido fítico 314 – 421 mg/100 g, cianuro de hidrógeno 0.22 - 0.33 mg/100g y actividad de inhibidor de tripsina 24.30 a 34.56 TIU mg/proteína (Kamatchi Kala et al., 2010; Motalib et al., 2012).

La zarandaja contiene grandes cantidades de vitaminas (niacina y ácido ascórbico) minerales, taninos e inhibidores de tripsina, en la tabla 1 se detalla los componentes de esta leguminosa (Kamatchi Kala et al., 2010; USDA, 2012).

Tabla 1: Información nutricional de la zarandaja por cada 100g

COMPONENTES	VALOR
Carbohidratos totales (%)	54.2 – 63.3
Proteínas (%)	22.4 – 31.3
Calcio (mg)	36 – 53.5
Fibra (%)	4.98 - 6.90
Fósforo (mg)	388 – 483
Fósforo fitato (mg)	282 – 380
Hierro (mg)	5.95 – 6.90

Fuente: Deka & Sarkar. (1990) ; Kamatchi Kala et al. (2010)

Elaboración: La autora

1.1.2 Propiedades y usos.

- Uno de los usos que se describe con mayor reincidencia es en la producción de forraje, para la alimentación del ganado debido a su alto valor nutricional (Lumbreras, 2001).
- Motalib et al. (2012) mencionan que posee una actividad antiinflamatoria significativa por ser una potencial fuente de antioxidantes naturales, también posee grandes cantidades de vitaminas y minerales, taninos e inhibidores de tripsina; por lo que es aconsejable que los granos sean remojados o cocidos antes de su consumo.
- El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2012) indica que *Lablab purpureus* (L.), se la usa como cultivo de cobertura ya que fijan el nitrógeno y mejora la calidad del suelo, también menciona que a esta leguminosa se la utiliza como cultivo ornamental en la industria de flores.

1.1.3 Producción de zarandaja.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016) menciona que en algunos países como en Kenia su mayor uso es en el sector a pequeña escala principalmente como una fuente de granos para el consumo humano.

En el Ecuador no se registran estudios de manera específica sobre la zarandaja, solo se habla de manera general para promover el desarrollo territorial rural sostenible mediante la siembra de algunas legumbres, por lo que resulta difícil reportar la producción que existe en el país, ya que solo hace mención a los cultivos permanentes (ejemplo plátano, banano, etc.) y cultivos transitorios (ejemplo arroz, maíz duro seco o choclo, etc.) (INEC, 2014)

El Sistema de información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (SINAGAP, 2012) presenta datos estadísticos en la provincia de Loja sobre el fréjol seco que es una legumbre representativa en la provincia, al 2012 la superficie sembrada fue 5967 hectáreas, superficie cosechada de 5574 hectáreas, una producción de 1166 toneladas métricas y un rendimiento de 0.21 toneladas métricas/hectáreas.

1.2 Antioxidantes y radicales libres

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en ciertos alimentos como verduras, frutas y legumbres (Coronado et al., 2015), éstos se dividen en exógenos y endógenos detallados en la tabla 2. La ingestión de los mismos coadyuvan en procesos de defensa, ya que previenen la formación de radicales libres (Zamora, 2007).

Tabla 2: Clasificación de los antioxidantes exógenos y endógenos

Antioxidantes Exógenos	Antioxidantes Endógenos
Ácido ascórbico	Glutatión
Alfa- tocoferol	Coenzima Q
Beta-carotenos, carotenos, luteína, licopeno y zeaxantina	Proteínas: ceutoplasma, lactoferrina, transferrina y ferritina.
Flavonoides: Flavonoles: quercetina Flavonas: apigenina Flavanonas: hesperidina Isoflavonoides: Genisteína Antocianinas: Cianidina Calconas	Enzimas: glutatión (reductasa, transferasa, peroxidasa), superóxido dismutasa, catalasa, glucosa 6-fosfato-dehidrogenasa, NADPH-FADH+H.
Cofactores enzimáticos	Uratos
Minerales: selenio, cobre, zinc, hierro, magnesio.	Bilirrubina

Fuente: Porras-Loaiza & López-Malo. (2009)

Elaboración: La autora

Coronado et al. (2015) indican que un radical libre es la “figura química” que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados, es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena. Como se muestra en la figura 2, la formación de dicho radical más la interacción de un antioxidante estabiliza la macromolécula logrando que no sea perjudicial a la célula.

Los principales tipos son: radical superóxido ($\dot{O}_2^-$), radical hidroxilo ($OH\dot{}$), radical óxido hiponitroso ($NO\dot{}$) y radical peróxido ($ROO\dot{}$), éstos atacan a las estructuras de las células en el cuerpo, y por consecuencia provocan el envejecimiento y enfermedades degenerativas asociadas con el cáncer, arterosclerosis, diabetes, enfermedades respiratorias, daño al hígado, artritis reumatoide, cataratas, enfermedades inflamatorias del intestino, desórdenes del sistema nervioso central, mal de Parkinson, SIDA y otras (Devasagayam et al., 2004; Rodríguez et al., 2001).

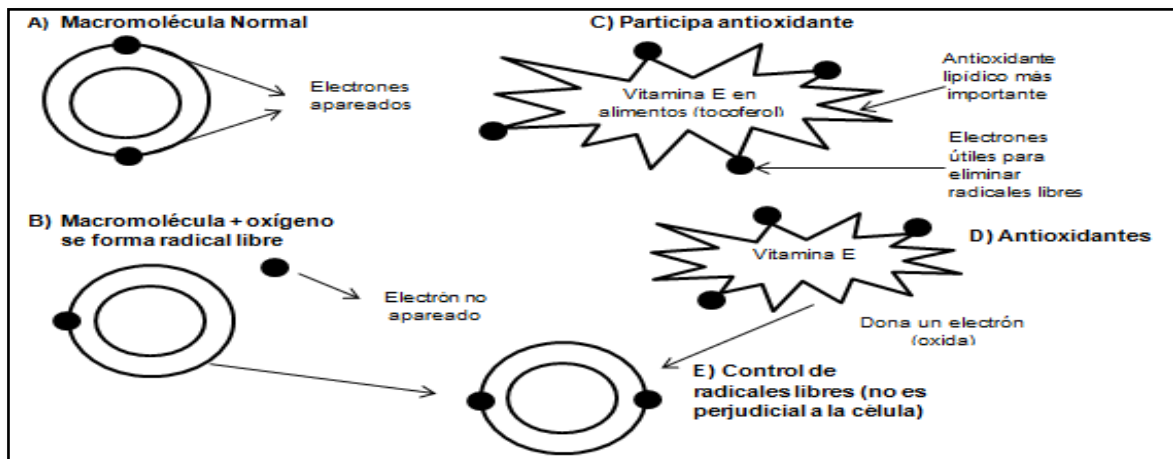


Figura 2: Interacción entre radicales libres y antioxidantes
Fuente: Coronado et al. (2015)

1.2.1 Estrés oxidativo.

Cuando existe un incremento excesivo de radicales en la célula, aparece el estrés oxidativo, desencadenando daños a las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Avello & Uwalsky, 2006).

Así mismo Coronado et al. (2015) mencionan que en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno), este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular.

1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias que constituyen un grupo de metabolitos que provienen de vegetales, cuya característica es la de tener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Pokorny, Yanishlieva, & Gordon, 2004); poseen capacidad antioxidante y se involucran con procesos que benefician a la salud como: prevenir el cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras patologías; por ende constituyen una parte fundamental en la dieta humana y animal (Bravo, 1998).

Es importante señalar que dichos compuestos se relacionan con la calidad sensorial de los alimentos y son responsables de las propiedades organolépticas como lo son el color, sabor, astringencia y aroma (Porras-Loaiza & López-Malo, 2009).

Según Decker. (1997) la acción antioxidante que presentan los compuestos fenólicos está íntimamente relacionado con su capacidad para quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos.

Por otro lado, forman un grupo de sustancias químicas que engloban más de 8000 compuestos diferentes (I. Martínez, Periago, & Ros, 2000), los tres grupos con mayor jerarquía son los flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles (Porras-Loaiza & López-Malo, 2009).

1.4 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante

En los últimos años se ha demostrado un gran interés en el estudio de la actividad antioxidante y consumo de los alimentos que la contienen, ya que dan beneficios a la salud, neutralizando los radicales libres y retrasando el proceso de envejecimiento combatiendo la degeneración, muerte de las células (Gutierrez, Ledesma, Garcia, & Grajales, 2007) y menor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares o degenerativas (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005).

Para la determinación de actividad antioxidante en alimentos se han desarrollado una gran cantidad de métodos entre estos ABTS, DPPH y FRAP, y para estimar la cantidad de fenoles se utiliza el método Folin-Ciocalteu. Dichos métodos se basan en distintos aspectos por ejemplo, ABTS mide la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, DPPH mide la actividad antioxidante de compuestos poco polares y FRAP mide el poder antioxidante reductor del hierro (Mercado et al., 2013; Restrepo, Narváez, & Restrepo, 2009). Por lo tanto hoy en día a pesar de la gran cantidad de métodos existentes para la

determinación de antioxidantes, se hace uso de los mencionados con anterioridad ya que dan resultados factibles y no tienen mucha complicación al momento de la medición de los mismos.

1.4.1 Fenoles totales.

Es un ensayo desarrollado por Folin y Ciocalteu que tiene carácter reductor, se hace uso de una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) (Kuskoski et al., 2005).

Los compuestos fenólicos como los tocoferoles, toco-trienoles y flavonoides presentan una mayor capacidad para capturar los radicales, por lo que se ve en la necesidad de determinar el contenido total de fenoles totales (Cardeño et al., 2007).

1.4.2 FRAP.

En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta, ya que se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} (ión férrico) a Fe^{2+} (ión ferroso) a un pH bajo que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado, es decir cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia que es medida a 593nm (Benzie & Strain, 1996).

Es importante señalar que este ensayo es de bajo costo, los reactivos son fáciles al momento de su preparación, los resultados tienen alta reproductibilidad y el procedimiento es sencillo y rápido.

1.4.3 ABTS.

El ensayo de ABTS (2,2-azinobis (2etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico), muestra una buena estabilidad en ciertas condiciones, puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Kuskoski et al., 2005), dicho ensayo basa su método en reacciones de tipo redox, es decir por transferencia de electrones y por transferencia de átomos de H (Restrepo et al., 2009).

Kuskoski et al. (2005) también comentan que el radical ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio),

enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica, por lo tanto este ensayo se fundamenta en que los antioxidantes causan la oxidación del radical ABTS.

1.4.4 DPPH.

El ensayo menciona que DPPH es un radical que se puede conseguir sin haberlo preparado con anterioridad y que puede disolverse en medio orgánico; por otra parte dicha técnica se fundamenta en la reducción de la absorbancia del radical DPPH, por antioxidantes (Kuskoski et al., 2005).

1.5 Optimización de experimentos

Optimización es mejorar y aumentar el rendimiento de un proceso o sistema con el fin de obtener el máximo beneficio de él. En química analítica se define como un medio para descubrir las condiciones para aplicar a un procedimiento que produce la mejor respuesta posible (Baş & Boyacı, 2007; Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008).

Los estudios de optimización puede llevarse a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), que es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que mide una variable de interés, para encontrar combinaciones variables que maximicen o minimicen la respuesta óptima del producto (Bezerra et al., 2008; Nwabueze, 2010).

Las variables utilizadas en el presente estudio (porcentaje de solvente, temperatura, relación muestra/solvente) son importantes al momento de la determinación de capacidad antioxidante y contenido fenólico. Bucic et al. (2009) mencionan que para una mejor eficiencia en la extracción de antioxidantes (optimización) en uvas existe una influencia del solvente y temperatura, en dicho estudio la capacidad de extracción más alta se observó a la temperatura de 80°C y la más baja a 25°C, con porcentajes de etanol de 50% - 96%. Una de las ventajas del uso de etanol para la extracción de antioxidantes es su afinidad química con los compuestos polifenólicos y además es un solvente seguro para el uso en la industria alimentaria (Shi et al., 2005). Por otro lado según Pinelo et al. (2005) un factor que influye en la eficacia de extracción de compuestos fenólicos es la relación muestra/solvente mientras mayor sea ésta, aunque todo depende de la muestra con la que se trabaje.

Se dice que la optimización de compuestos fenólicos es influenciada por el tiempo de extracción y temperatura, por lo que son parámetros importantes a considerar con el fin

de minimizar la energía que se utiliza durante el proceso (Robards, 2003; Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007).

1.6 Cinética de extracción

La cinética de extracción se estudia con la finalidad de evaluar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos en cierto periodo de tiempo (Guamán-Balcázar, Setyaningsih, Palma, & Barroso, 2015). La respuesta de éste sistema depende en mayor cantidad de la interacción de ciertas variables como son la temperatura y concentración del solvente (Almajano, Gómez, & Corral, 2013).

Por lo tanto en un estudio es de mucha importancia acortar el tiempo para dicha extracción por dos razones: la primera es que algunos compuestos fenólicos son sensibles y se degradan cuando se extraen a altas temperaturas durante periodos prolongados (Setyaningsih, Palma, & Barroso, 2012) y la segunda se debe a que se logra una disminución del uso energético (Dai & Mumper, 2010; Palma & Taylor, 1999; Spigno et al., 2007).

Por lo general a la cinética de extracción se la realiza luego de la optimización, con la finalidad de disminuir variables y número de extracciones, logrando así un ahorro de material y reactivos a utilizar (Guamán-Balcázar et al., 2015; Setyaningsih et al., 2012).

2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

General:

- Contribuir a la valorización de los alimentos tradicionales, favoreciendo el consumo local y su futuro aprovechamiento industrial.

Específicos:

- Optimizar parámetros de extracción de compuestos fenólicos
- Cuantificar fenoles totales
- Determinar actividad antioxidante utilizando los métodos ABTS, DPPH y FRAP

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación y obtención de la materia prima

Se trabajó con el grano seco de zarandaja *Lablab purpureus* (L.), el cual fue adquirido en la parroquia de Malacatos, perteneciente al cantón y provincia de Loja.

Al grano deshidratado libre de impurezas se redujo su tamaño de partícula utilizando el molino Retsch ZM200 a una velocidad de 1400 rpm, posteriormente la harina obtenida se la empacó al vacío con el fin de conservar sus propiedades.

3.2 Determinación del contenido de humedad

La determinación de humedad en la zarandaja se la realizó de acuerdo al método AOAC Official Method 925.10, el cual consistió en secar la cápsula vacía en la estufa (3 horas) a una temperatura de $130^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, luego se colocó en el desecador por 30 min y seguidamente se pesó (m), posteriormente en la misma se pesaron 2 g de la muestra (m_1), el tiempo de secado 1 hora a la misma temperatura, con un posterior traslado al desecador (30min) y luego el pesaje (m_2), este procedimiento se realizó hasta que existió 1 mg de diferencia entre el último peso con el actual (Horwitz & Latimer, 2005).

$$\% \text{Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

De donde:

m_1 : Peso de la cápsula con muestra

m_2 : Peso de la muestra seca

m : Peso de la cápsula vacía

Los cálculos correspondientes a humedad se los detalla en el anexo 1.

3.3 Diseño experimental

El análisis estadístico se lo realizó en el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06, utilizando un diseño Box-Behnken. Las variables utilizadas fueron: porcentaje de solvente, relación muestra/solvente y temperatura.

Los límites usados en dichas variables se deben a que en un estudio realizado por Bucic et al. (2009) mencionan que trabajaron con porcentajes de etanol de 50 a 96% y como sus resultados fueron mejores con 50% se optó por trabajar con un rango de 40 a 80% de EtOH, en el mismo estudio utilizaron un rango de temperatura de 25 - 80°C, pero como

algunos compuestos fenólicos se degradan a altas temperaturas (Setyaningsih et al. 2012), se óptó por trabajar con un rango de 20 – 60°C. En cuanto a la relación muestra/solvente no se trabajó con una relación mayor a 25 g/75 mL, debido a que la muestra no se homogenizaba con el solvente.

Para la optimización se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR), todas las experimentaciones se realizaron por duplicado.

3.4 Preparación de extractos

Para la obtención de los extractos se pesó la muestra zarandaja y se adicionó el solvente, posteriormente se colocó a la temperatura de trabajo con agitación durante 1 hora, luego se sometió a centrifugación durante 30 min a 2800 rpm, el sobrenadante se almacenó a -20°C, hasta su posterior cuantificación de fenoles totales y capacidad antioxidante. En la tabla 3 y 4 se muestran los niveles de los factores y las combinaciones.

Tabla 3: Variables que se utilizaron para la realización de los extractos.

VARIABLES	-1	0	1
Solvente (% EtOH)	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Relación Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

Tabla 4: Número de extractos con las condiciones.

Extractos	Variables		
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol (g/mL)
1	1	0	-1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	1
8	-1	1	0
9	1	1	0
10	0	1	-1
11	0	1	1
12	1	-1	0
13	-1	-1	0
14	0	-1	-1
15	0	-1	1

Fuente: Programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06

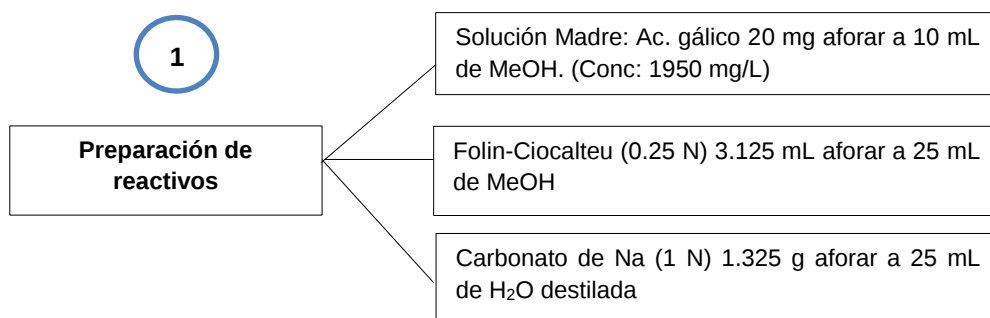
Una vez que se determinaron las condiciones óptimas se realizó la cinética de extracción con la finalidad de comprobar si el tiempo utilizado en los extractos iniciales fue el óptimo, para la misma se utilizaron las condiciones de fenoles totales (Agua, temperatura 28°C y relación muestra/solvente 25 g/75 mL) y 6 tiempos (30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min), ya que si se hubiese hecho la cinética de todos los métodos sería más extenso el trabajo. Las condiciones con las que se trabajó, resultados y análisis estadístico de los mismos; se muestran en los anexos 10, 11, 12 y 13.

3.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante

Para evaluar el contenido de compuestos fenólicos de un alimento se realizó el análisis de fenoles totales, y para determinar la capacidad antioxidante se utilizaron 3 métodos que fueron: FRAP, DPPH y ABTS (Martínez et al., 2012).

3.5.1 Fenoles totales

Se realizó la determinación de fenoles totales utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Thaipong et al. (2006) cuyo fin es medir compuestos fenólicos presentes en la muestra (zarandaja), los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra. Es importante señalar que se trabajó con diferentes factores de dilución según el extracto, ya que cada uno tuvo diferente concentración. En la figura 3 se detalla el procedimiento y en el anexo 2 se describen los cálculos.



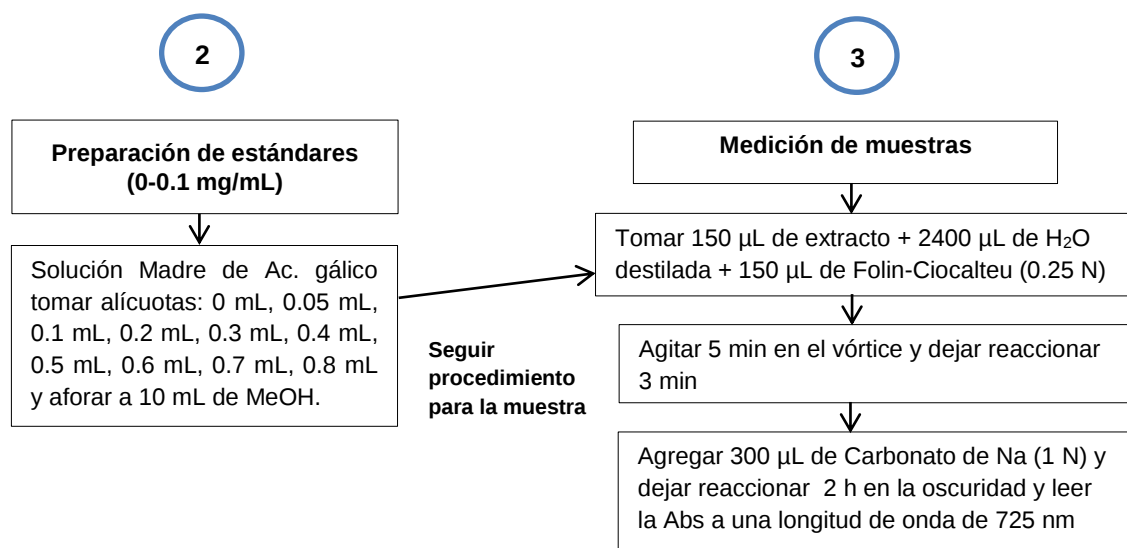


Figura 3: Procedimiento para Fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

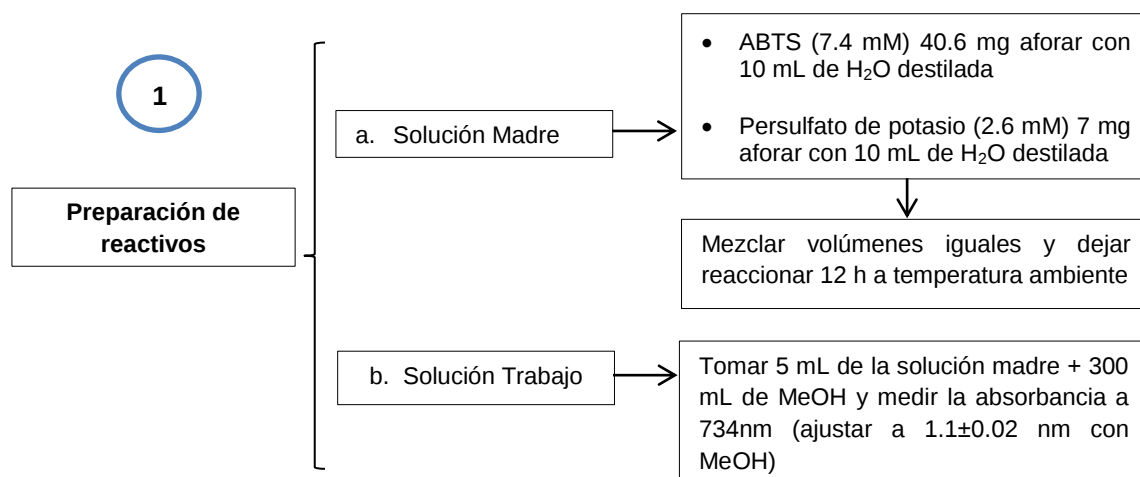
Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.5.2 ABTS (ácido 2, 2'-azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico)

Para la realización del ensayo ABTS se tomó a consideración lo descrito por (Arnao et al. (2001) con algunas modificaciones realizadas por Thaipong et al. (2006), cuyos resultados se expresan como micromoles equivalentes de Trólox por gramos de muestra.

Es importante señalar que se trabajó con factores de dilución 5, 10 y 15. En la figura 4 se detalla el procedimiento y en el anexo 3 se describen los cálculos.



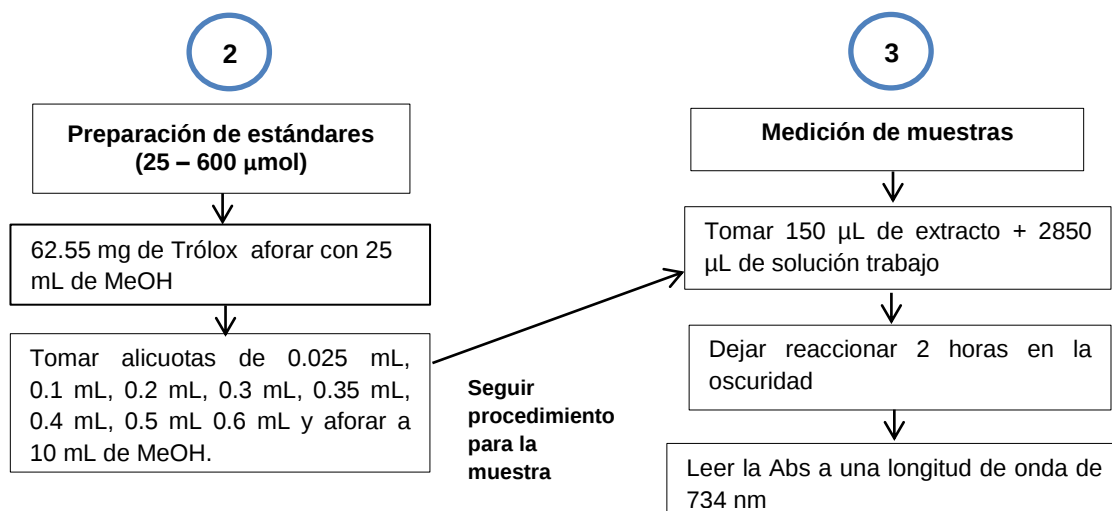
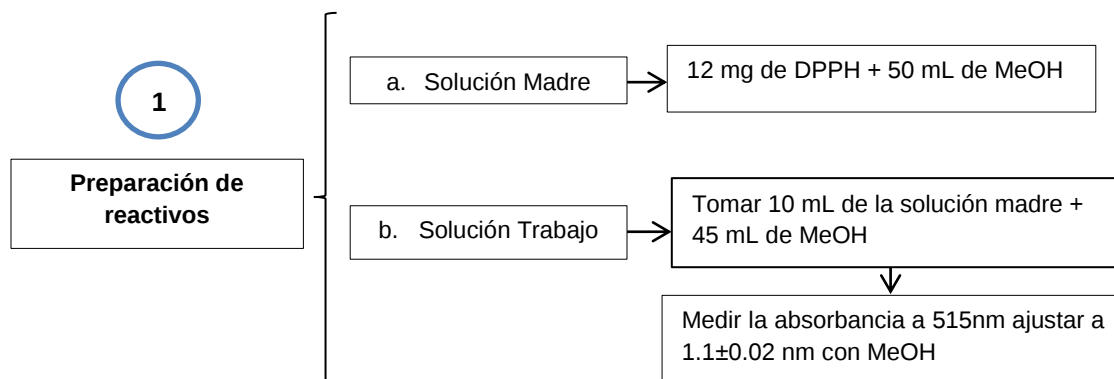


Figura 4: Procedimiento para ensayo ABTS
Fuente: Arnao et al. (2001); Thaipong et al. (2006)
Elaboración: La autora

3.5.3 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Para la realización del ensayo DPPH se lo hizo de acuerdo con el método de Brand-Williams et al. (1995) con algunas reformas efectuadas por Thaipong et al. (2006), los resultados se expresan como micromoles equivalentes de Trólox por gramo de muestra. Éste método tiene como fundamento evaluar la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres, siendo el DPPH• un radical libre estable, soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno (Mercado et al., 2013).

En la figura 5 se detalla el procedimiento y en el anexo 4 se describen los cálculos.



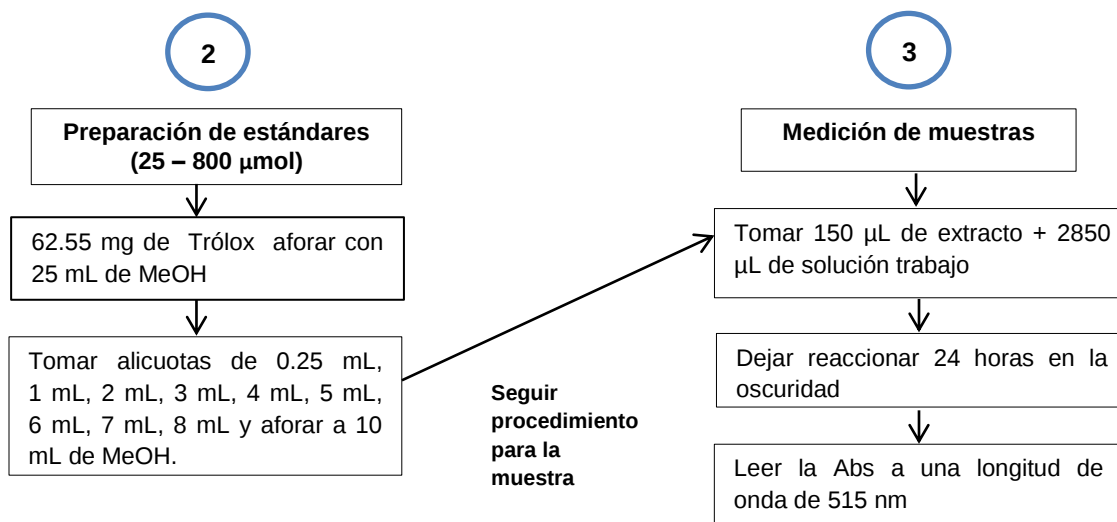
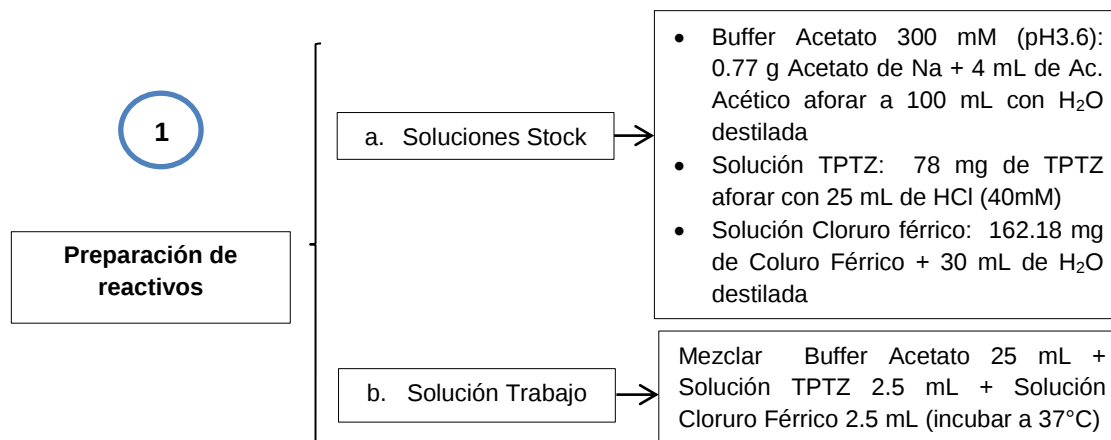


Figura 5: Procedimiento para ensayo DPPH
Fuente: Brand-Williams et al. (1995); Thaipong et al. (2006)
Elaboración: La autora

3.5.4 FRAP

El ensayo FRAP se lo hizo de acuerdo a Benzie & Strain. (1996) con algunas reformas efectuadas por Thaipong et al. (2006), los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra. Éste método tiene como fundamento determinar la capacidad antioxidante de forma indirecta, ya que se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} (ión férrico) a Fe^{2+} (ión ferroso) (Benzie & Strain, 1996). Es importante señalar que se trabajó en algunos casos con extractos puros y otros con factores de dilución de 2.5 y 5, ya que cada uno tuvo diferente concentración. En la figura 6 se detalla el procedimiento y en el anexo 5 se describen los cálculos.



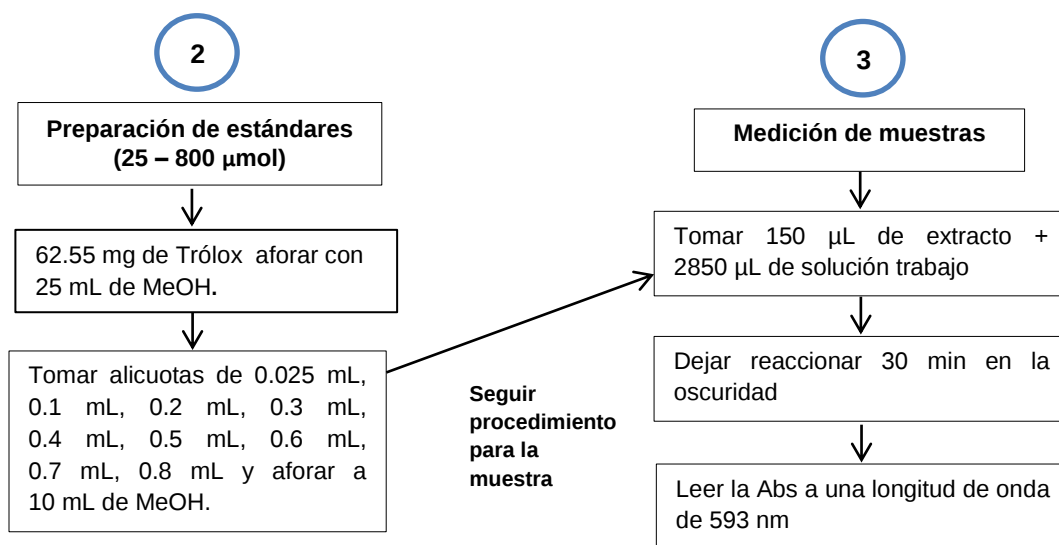


Figura 6: Procedimiento para ensayo FRAP

Fuente: Benzie & Strain. (1996); Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Desarrollo del método

Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante se muestran en la tabla 5 y en los anexos 6,7,8 y 9.

Tabla 5: Resultados de la cuantificación de los 15 extractos de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP

#	Variables			Resultados			
				Fenoles Totales	ABTS	DPPH	FRAP
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol (g/mL)	(mg EAG/100g)	(μ mol ET/g)	(μ mol ET/g)	(μ mol ET/g)
1	80	40	10/90	21.01 $\pm$ 1.43	9.23 $\pm$ 0.41	2.38 $\pm$ 0.05	1.50 $\pm$ 0.01
2	60	40	20/80	39.35 $\pm$ 0.88	8.72 $\pm$ 0.08	1.59 $\pm$ 0.01	2.18 $\pm$ 0.03
3	60	40	20/80	36.72 $\pm$ 0.70	9.05 $\pm$ 0.15	1.50 $\pm$ 0.02	2.13 $\pm$ 0.01
4	60	40	20/80	40.85 $\pm$ 0.88	8.42 $\pm$ 0.18	1.68 $\pm$ 0.02	2.20 $\pm$ 0.02
5	40	40	10/90	66.57 $\pm$ 0.95	14.39 $\pm$ 1.00	2.52 $\pm$ 0.05	3.58 $\pm$ 0.03
6	40	40	25/75	79.27 $\pm$ 1.32	15.22 $\pm$ 0.31	0.97 $\pm$ 0.004	5.04 $\pm$ 0.01
7	80	40	25/75	19.71 $\pm$ 0.63	3.32 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.01
8	40	60	20/80	51.22 $\pm$ 2.12	13.65 $\pm$ 0.15	0.66 $\pm$ 0.03	2.14 $\pm$ 0.03
9	80	60	20/80	25.04 $\pm$ 0.91	4.02 $\pm$ 0.25	1.08 $\pm$ 0.01	1.42 $\pm$ 0.05
10	60	60	10/90	51.41 $\pm$ 7.55	11.83 $\pm$ 0.22	1.85 $\pm$ 0.14	2.17 $\pm$ 0.06
11	60	60	25/75	40.20 $\pm$ 2.51	9.76 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.002	1.95 $\pm$ 0.02
12	80	20	20/80	16.99 $\pm$ 0.28	5.63 $\pm$ 0.02	2.24 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.009
13	40	20	20/80	62.10 $\pm$ 3.00	12.87 $\pm$ 0.13	1.90 $\pm$ 0.07	3.03 $\pm$ 0.05
14	60	20	10/90	27.99 $\pm$ 3.65	10.20 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.08	1.63 $\pm$ 0.02
15	60	20	25/75	36.63 $\pm$ 1.45	8.24 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.01	1.43 $\pm$ 0.04

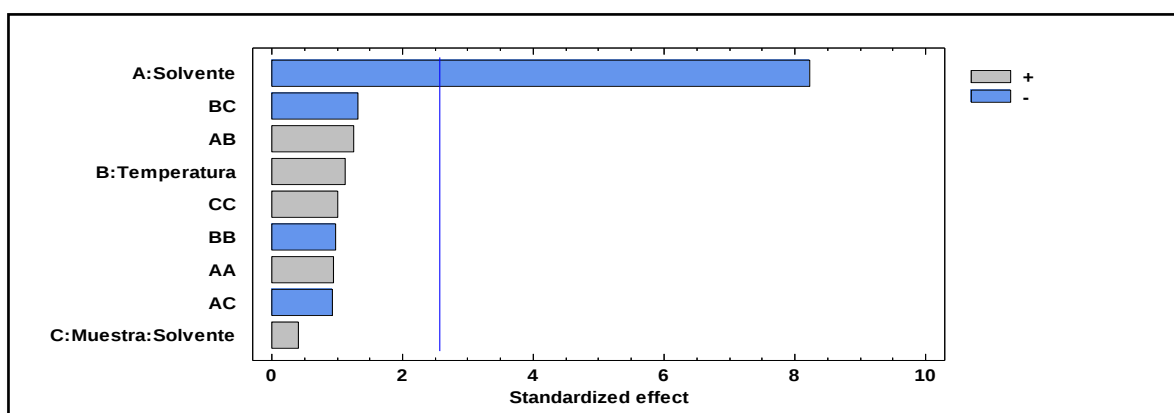
Elaboración: La autora

En la tabla 5, se observaron los valores más altos (resaltados) en fenoles totales, ABTS y FRAP, el porcentaje de solvente se encuentra en el límite inferior (40% EtOH), la temperatura en el punto intermedio (40°C) y relación muestra/solvente en el límite superior (25 g/75 mL). En cuanto a DPPH, el porcentaje de etanol se encuentra en el límite inferior (40% EtOH), la temperatura en el punto intermedio (40°C) y relación muestra/solvente en el límite inferior (10 g/90 mL). En un estudio realizado por Bucić et al. (2009) a las semillas de uva, mencionan que trabajaron con similares condiciones al presente estudio con respecto a EtOH, llegando a la conclusión que los mejores resultados fueron utilizando 50% EtOH.

4.2 Fenoles totales

4.2.1 Optimización del método

En la Gráfica 1, se presenta el diagrama de Pareto, el cual establece un orden de prioridades para poder elegir la variable que más afecta en la cantidad de fenoles totales obtenidos. Se puede observar que el solvente fue la única variable que influyó en la extracción de compuestos fenólicos, por lo tanto a menor porcentaje de etanol mayor extracción de dichos compuestos.



Gráfica 1: Diagrama estandarizado de Pareto para fenoles totales

Elaboración: Programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06

El análisis de superficie de respuesta, predice que las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos fueron: EtOH al 40%, temperatura 28°C y relación muestra solvente 25 g/75 mL. Debido a que el solvente está en el límite inferior y ya que es la única variable que afecta significativamente, se decidió trabajar con H₂O, EtOH al 20 y 40%, utilizando las condiciones óptimas de: temperatura 28°C, la misma que está dentro del rango utilizado en un estudio realizado por Bucic et al. (2009) en el cual la temperatura de extracción fue de 25 a 80°C, y relación muestra/solvente 25 g/75 mL, no se trabaja con una relación superior ya que se encuentra dentro del límite de estudio. Los valores óptimos y las condiciones a trabajar se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza fenoles totales.

Factor	Óptimo	Trabajar
Solvente (% EtOH)	40	H ₂ O, 20, 40
Temperatura (°C)	28	28
Muestra/Solvente (g/mL)	25/75	25/75

Elaboración: La autora

En la ecuación 1, se muestra la relación entre la concentración de etanol y la cantidad de fenoles totales.

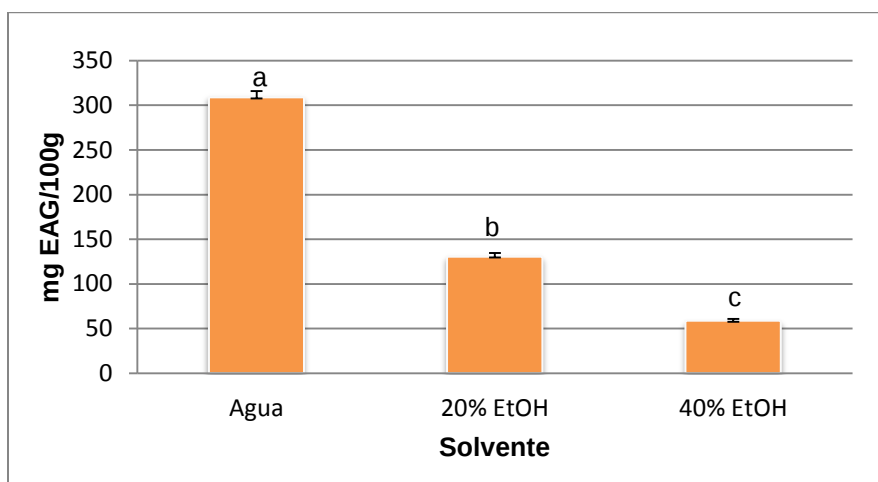
Ecuación 1: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta fenoles totales.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
Fenoles totales mg EAG/100g	$y = 38.975 - 22.0519 * X_1 + 3.02 * X_2 + 1.10438 * X_3 + 3.725 * X_1^2 + 4.73125 * X_1 * X_2 - 3.49875 * X_1 * X_3 - 3.86125 * X_2^2 - 4.965 * X_2 * X_3 + 3.94625 * X_3^2$

X_1 = solvente, X_2 = temperatura, X_3 = relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

Luego de haber realizado extracciones utilizando tres niveles de porcentaje solvente (agua, 20% y 40% de EtOH), en la gráfica 2, se puede observar que la mayor extracción de fenoles totales se realizó utilizando el solvente agua.



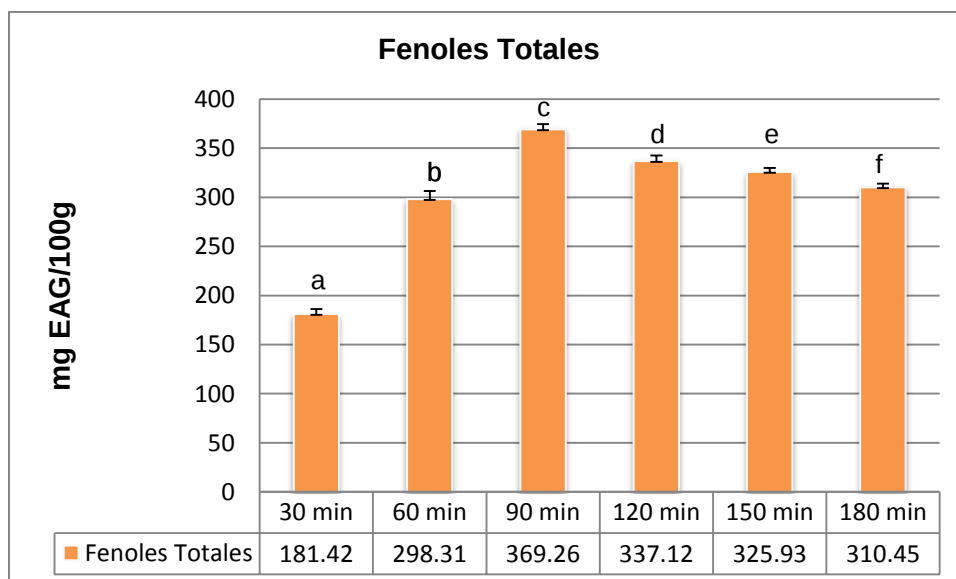
Gráfica 2: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en fenoles totales. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.2.2 Cinética de extracción

Luego de haber obtenido las condiciones óptimas de extracción, en la gráfica 3 se puede observar los valores de la cuantificación de fenoles totales a diferentes tiempos de extracción 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, y 180 min; dando como resultado que el mejor tiempo para la obtención de extractos fue 90 min (369.26 ± 5.26 mg EAG/100g).

Es importante mencionar que para realizar la cinética de extracción con los métodos ABTS, DPPH y FRAP, se tomó de referencia las condiciones de trabajo de fenoles totales: solvente H_2O , temperatura $28^\circ C$ y relación muestra/solvente 25 g/75 mL.



Gráfica 3: Resultados que se obtuvieron durante el análisis de fenoles totales a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

Las condiciones óptimas de extracción, que se determinaron para fenoles totales fueron: solvente H₂O, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.

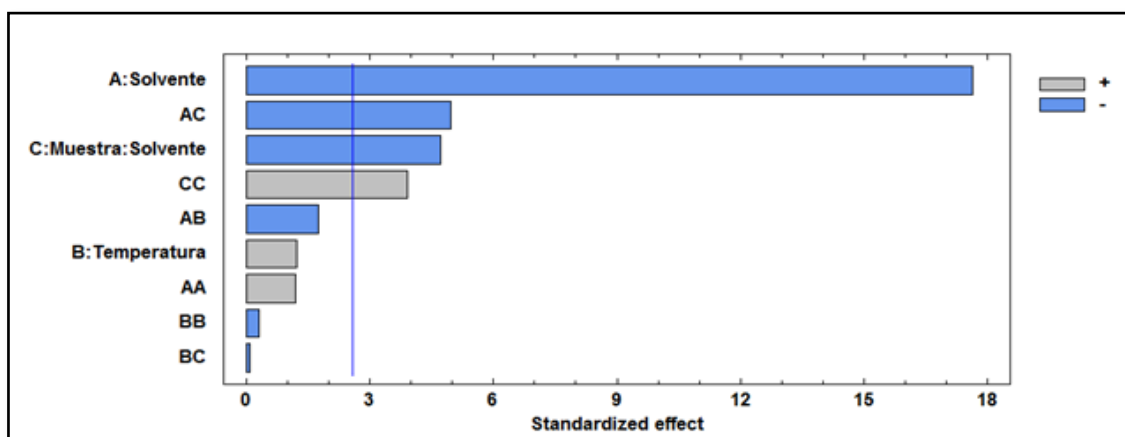
Aguilera et al. (2013) en su estudio realizado a diferentes legumbres entre estas la zarandaja *Lablab purpureus* (L.), analizó el contenido de fenoles totales encontrando un resultado de 170 ± 0.03 mg EAG/100g, éste valor difiere con los resultados obtenidos en el presente estudio (369.26 ± 5.26 mg EAG/100g) ya que en el presente se hizo uso de agua en contraste con dicho autor que utilizó metanol como solvente y 20°C, es importante resaltar que en ambos casos se obtuvieron los extractos por maceración dinámica. En el trabajo realizado por Kamath et al. (2015) obtuvieron extractos de zarandaja por centrifugación utilizando como solvente acetona, obteniendo como resultado 44 ± 0.02 mg EAG/100g, valor inferior al obtenido en nuestro estudio. En la extracción de fenoles totales, el solvente es un parámetro importante, pues la extracción con H₂O dió valores superiores a los obtenidos con metanol y acetona.

En relación con otras legumbres los valores en el contenido de compuestos fenólicos es similar, por ejemplo en: fríjol caupí 370 ± 0.03 mg EAG/100g, Jack bean 360 ± 0.02 mg EAG/100g e inferior a mucuna 4630 ± 0.12 mg EAG/100g (Aguilera et al., 2013).

4.3 ABTS

4.3.1 Optimización del método

En la Gráfica 4, se presenta el diagrama de Pareto, el cual establece un orden de prioridades para poder elegir la variable que más afecta en la actividad antioxidante. Se puede observar que el solvente y relación muestra/solvente fueron las variables que influyeron en dicha actividad, por lo tanto a menor porcentaje de etanol mayor actividad antioxidante.



Gráfica 4: Diagrama estandarizado de pareto para ABTS

Elaboración: Programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06

El análisis de superficie de respuesta, predice que las condiciones óptimas para medir la actividad antioxidante con el análisis ABTS fueron: EtOH al 40%, temperatura 60°C y relación muestra solvente 25 g/75 mL. Debido a que el solvente está en el límite inferior y ya que es la única variable que afecta significativamente, se decidió trabajar con H₂O, EtOH al 20 y 40%, utilizando las condiciones óptimas de: temperatura de 60°C y relación muestra/solvente 25 g/75 mL, ya que se encuentra dentro del límite de estudio. Los valores óptimos y las condiciones a trabajar se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza ABTS.

Factor	Óptimo	Trabajar
Solvente (% EtOH)	40	H ₂ O, 20, 40
Temperatura (°C)	60	60
Muestra/Solvente (g/mL)	25/75	25/75

Elaboración: La autora

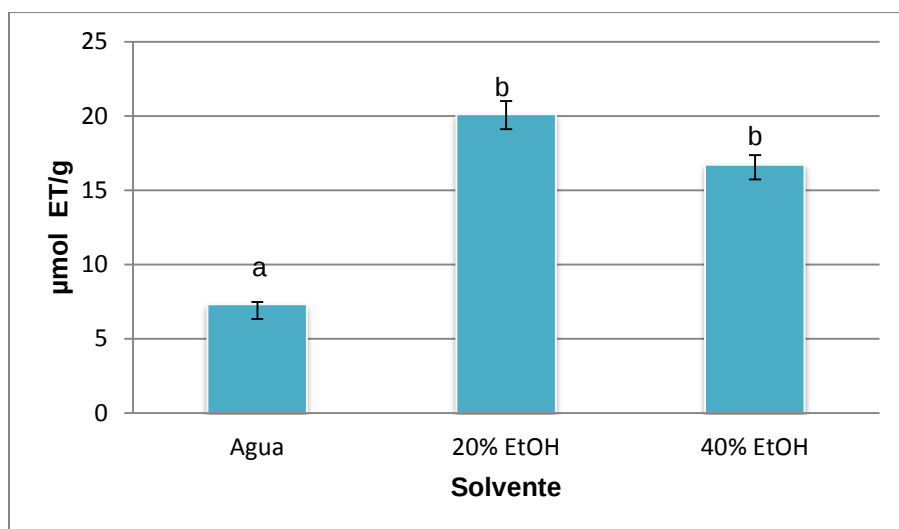
En la ecuación 2, se muestra la relación entre la concentración de etanol y la actividad antioxidante.

Ecuación 2: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta ABTS.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
ABTS μM ET/g	$y = 8.73538 - 4.23976 \cdot X_1 + 0.290865 \cdot X_2 - 1.13755 \cdot X_3 + 0.422067 \cdot X_1^2 - 0.598077 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1.6849 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.110144 \cdot X_2^2 - 0.0259615 \cdot X_2 \cdot X_3 + 1.38726 \cdot X_3^2$
X ₁ = solvente, X ₂ = temperatura, X ₃ = relación muestra/solvente	

Elaboración: La autora

Luego de haber realizado extracciones utilizando tres niveles de porcentaje solvente (agua, 20% y 40% de EtOH), en la gráfica 5, se puede observar que la mayor extracción se realizó utilizando 20% de EtOH, obtener mayor actividad antioxidante,

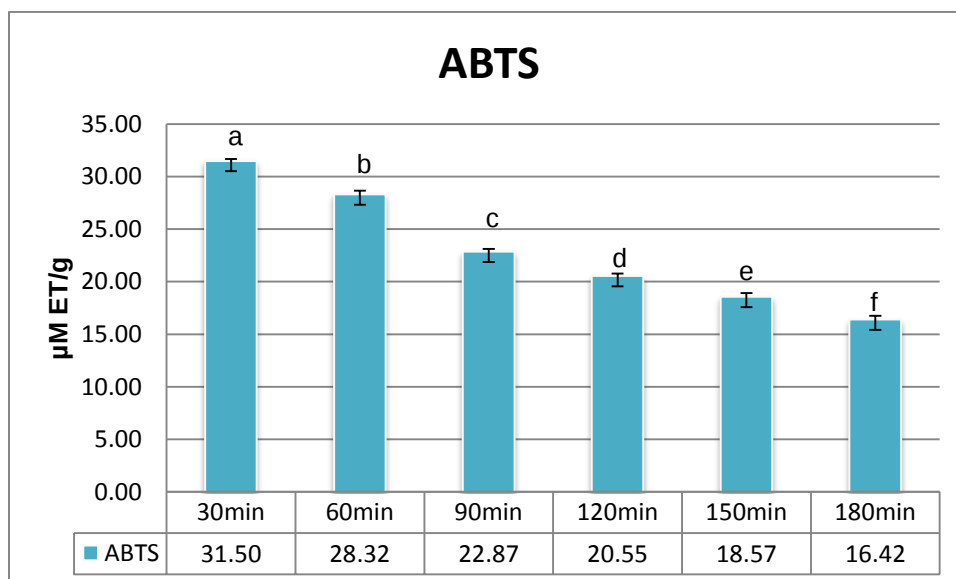


Gráfica 5: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en ABTS. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa

Elaboración: La autora

4.3.2 Cinética de extracción

En la gráfica 6 se puede observar los valores obtenidos del análisis ABTS a diferentes tiempos de extracción 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, y 180 min; dando como resultado que el mejor tiempo para la obtención de extractos fue en 30 min. Por otro lado como el propósito es encontrar un solo tiempo para la determinación de la capacidad antioxidante se escogió 90min (22.87 ± 0.23 μmol ET/g), ya que fué el mejor tiempo obtenido para fenoles totales, DPPH y FRAP.



Gráfica 6: Resultados que se obtuvieron durante el análisis ABTS a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

Las condiciones óptimas de extracción, que se determinaron para ABTS fueron: solvente 20% EtOH, temperatura 60°C, relación muestra/solvente 25g/75mL y tiempo 30 min.

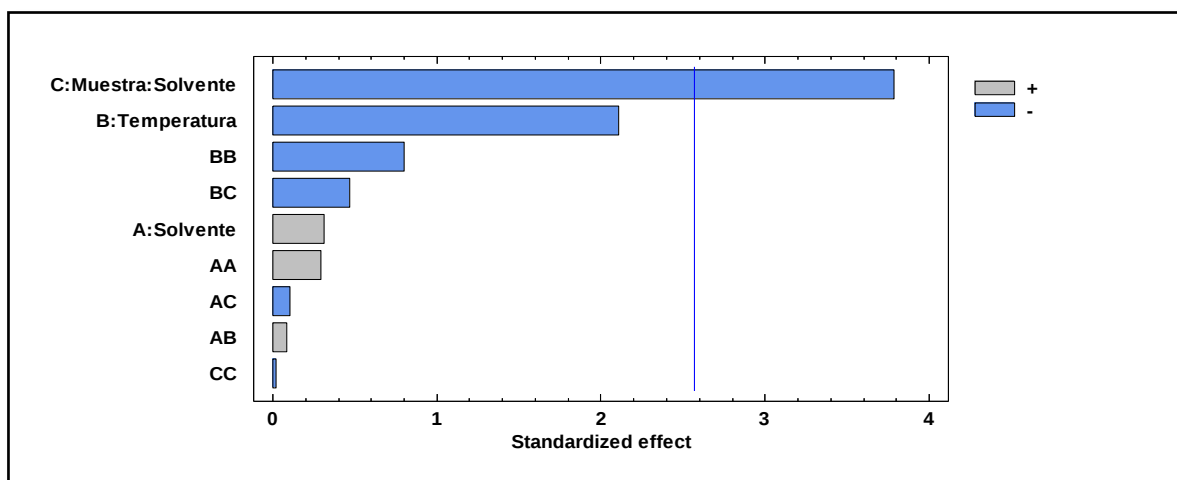
Marathe et al. (2011) en su estudio realizado a diferentes variedades de legumbres de consumo habitual en la India, entre estas la zarandaja *Lablab purpureus* (L.), determinaron un valor de 6 - 12 $\mu\text{mol ET/g}$, éste valor puede diferir con los resultados obtenidos en el presente estudio ($20.11 \pm 0.87 \mu\text{mol ET/g}$) ya que en este estudio se utilizó etanol al 20% en contraste con dicho autor que trabajó con: metanol al 80% y 20°C, es importante resaltar que en ambos casos se obtuvieron los extractos por maceración dinámica.

En relación con otras legumbres el valor obtenido es bajo con respecto a *Cicer arietinum* L. $35.80 \pm 16.33 \mu\text{mol ET/g}$, y alto con respecto a *Pisum sativum* L. $13.67 \pm 0.45 \mu\text{mol ET/g}$ (Nithiyantham, Selvakumar, & Siddhuraju, 2012).

4.4 DPPH

4.4.1 Optimización del método

En la Gráfica 7, se presenta el diagrama de Pareto, el cual establece un orden de prioridades para poder elegir la variable que más afecta en la actividad antioxidante. Se puede observar que la relación muestra/solvente fué la única variable que influyó en dicha actividad.



Gráfica 7: Diagrama estandarizado de Pareto para DPPH

Elaboración: Programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06

El análisis de superficie de respuesta, predice que las condiciones óptimas para medir la actividad antioxidante con el análisis DPPH fueron: EtOH al 80%, temperatura 28°C y relación muestra/solvente 10 g/90 mL. Debido a que la relación muestra/solvente está en el límite inferior y ya que es la única variable que afecta significativamente, se decidió trabajar con relación de 10 g/90 mL, 6.66 g/93.34 mL y 5 g/95 mL, utilizando las condiciones óptimas de: solvente EtOH al 80% y temperatura de 28°C. Los valores óptimos y las condiciones a trabajar se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Condiciones óptimas para solvente, temperatura y condiciones de trabajo para relación muestra/solvente que maximiza DPPH.

<i>Factor</i>	<i>Óptimo</i>	<i>Trabajar</i>
Solvente (% EtOH)	80	80
Temperatura (°C)	28	28
Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	10/90, 6.66/93.34, 5/95

Elaboración: La autora

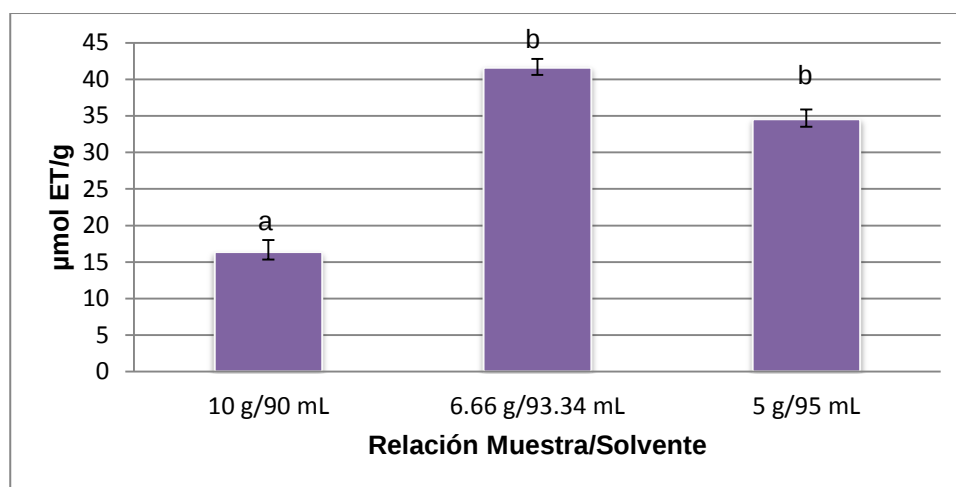
En la ecuación 3, se muestra la relación entre muestra/solvente y la actividad antioxidante.

Ecuación 3: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta DPPH.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
DPPH μM ET/g	$y = 1.59547 - 0.336562 * X_2 - 0.60585 * X_3 + 0.0500625 * X_1 - 0.189083 * X_2^2 - 0.105375 * X_2 * X_3 + 0.0185 * X_2 * X_1 - 0.00530833 * X_3^2 - 0.022875 * X_3 * X_1 + 0.0689167 * X_1^2$
X ₁ = solvente, X ₂ = temperatura, X ₃ = relación muestra/solvente	

Elaboración: La autora:

Luego de haber realizado extracciones utilizando tres niveles de relación muestra/solvente 10 g/90 mL, 6.66 g/93.34 mL, 5 g/95 mL, en la gráfica 8 se puede observar que la mayor extracción se realizó utilizando la relación muestra/solvente 6.66 g/93.34 mL, para obtener mayor actividad antioxidante.

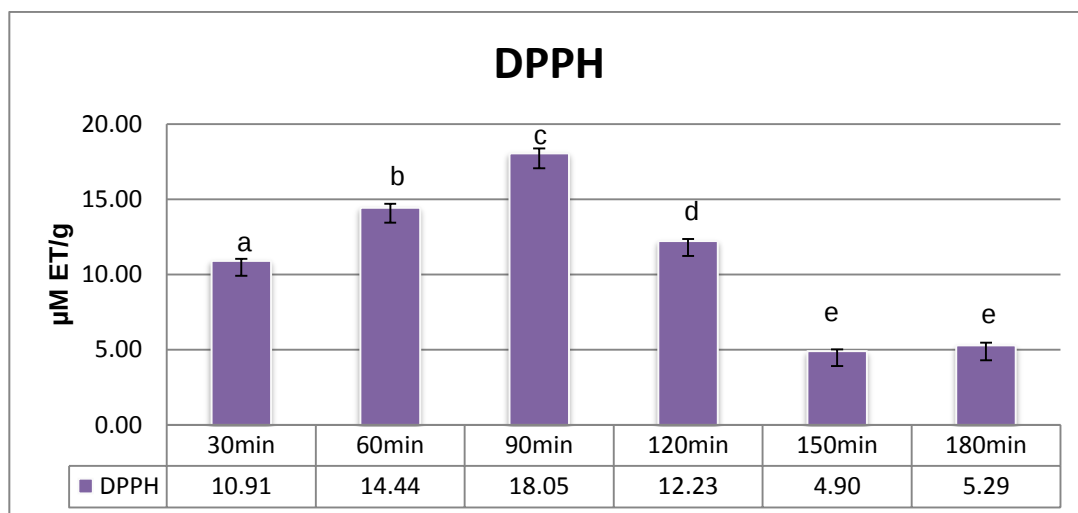


Gráfica 8: Resultados del análisis de optimización para la elección de relación muestra/solvente en DPPH. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.4.2 Cinética de extracción

En la gráfica 9 se puede observar los valores obtenidos del análisis DPPH a diferentes tiempos de extracción 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, y 180 min; dando como resultado que el mejor tiempo fue 90min (18.05 ± 0.31 μmol ET/g).



Gráfica 9: Resultados que se obtuvieron durante el análisis DPPH a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

Las condiciones óptimas de extracción que se determinaron para DPPH fueron: solvente 80% EtOH, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 6.66 g/93.34 mL y tiempo 90 min.

Aguilera et al. (2013) en su estudio realizado a diferentes legumbres entre estas la zarandaja *Lablab purpureus* (L.), analizaron la actividad antioxidante encontrando un valor de 3 $\mu\text{mol ET/g}$, éste valor puede diferir con los resultados obtenidos ($41.58 \pm 1.18 \mu\text{mol ET/g}$), ya que en el presente estudio utilizó etanol al 80% en contraste con dichos autores que trabajaron con: metanol al 80% y 20°C, es importante resaltar que en ambos casos se obtuvieron los extractos por maceración dinámica.

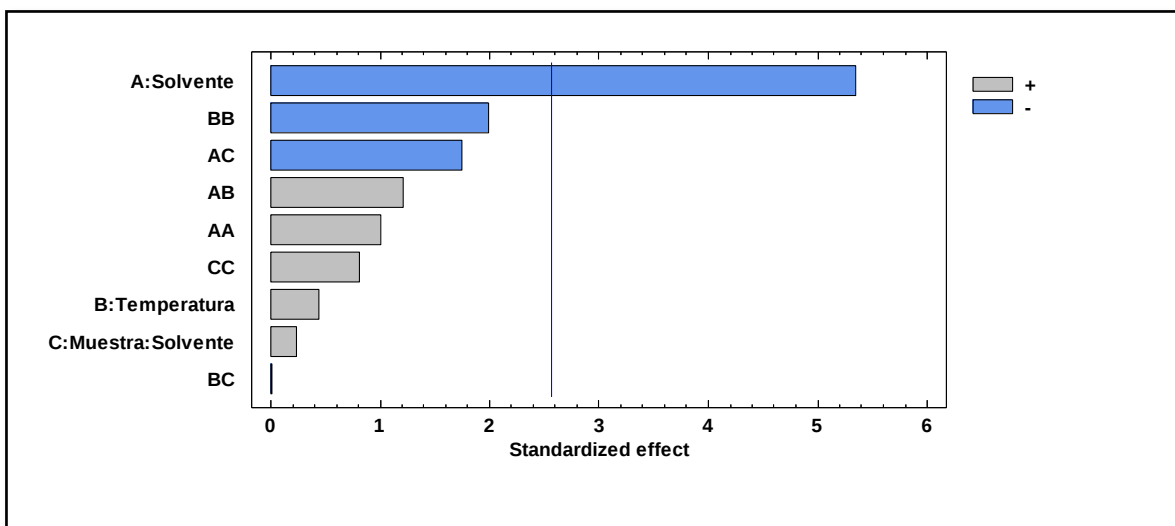
En relación con otras legumbres el valor obtenido es alto y varía dependiendo la especie por ejemplo en: guisante amarillo varió entre 0.03 - 2.75 $\mu\text{mol ET/g}$; guisante verde de 0.01 - 1.28 $\mu\text{mol ET/g}$; frijol negro de 0.78 - 19.23 $\mu\text{mol ET/g}$; garbanzos de 0.30 - 2.36 $\mu\text{mol ET/g}$; lentejas de 0.91 - 19.61 $\mu\text{mol ET/g}$; soja negro 1.04 - 17.93 $\mu\text{mol ET/g}$; soja amarilla de 0 - 1.83 $\mu\text{mol ET/g}$ y alubia roja 0.97 - 19.36 $\mu\text{mol ET/g}$ (Xu & Chang, 2007).

4.5 FRAP

4.5.1 Optimización del método

En la Gráfica 10, se presenta el diagrama de Pareto, el cual establece un orden de prioridades para poder elegir la variable que más afecta en la actividad antioxidante. Se

puede observar que el solvente fue la única variable que influyó en dicha actividad, por lo tanto a menor porcentaje de etanol mayor actividad antioxidante.



Gráfica 10: Diagrama estandarizado de pareto para FRAP

Elaboración: Programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 15.2.06

El análisis de superficie de respuesta, predice que las condiciones óptimas para medir la actividad antioxidante con el análisis FRAP fueron: EtOH al 40%, temperatura 38°C y relación muestra solvente 25 g/ 75 mL. Debido a que el solvente está en el límite inferior y ya que es la única variable que afecta significativamente, se decidió trabajar con H₂O, EtOH al 20 y 40%, utilizando las condiciones óptimas de: temperatura de 38°C y relación muestra/solvente (25 g/75 mL). Los valores óptimos y las condiciones a trabajar se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Condiciones óptimas para temperatura, relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para solvente que maximiza FRAP.

<i>Factor</i>	<i>Óptimo</i>	<i>Trabajar</i>
Solvente (% EtOH)	40	H ₂ O, 20, 40
Temperatura (°C)	38	38
Muestra/Solvente (g/mL)	25/75	25/75

Elaboración: La autora

En la ecuación 4, se muestra la relación entre la concentración de etanol y la actividad antioxidante.

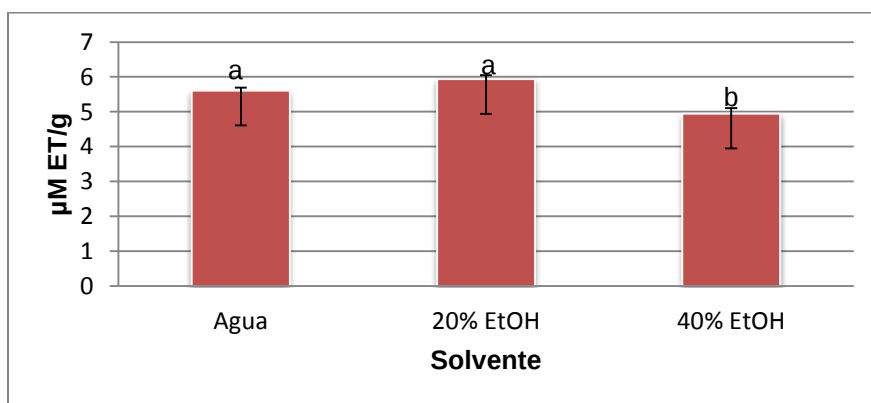
Ecuación 4: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta FRAP.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
FRAP μM ET/g	$y = 2.17259 + 0.0950972 \cdot X_2 + 0.0488125 \cdot X_3 - 1.14831 \cdot X_1 - 0.629463 \cdot X_2^2 - 0.00470833 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0.367083 \cdot X_2 \cdot X_1 + 0.256537 \cdot X_3^2 - 0.5315 \cdot X_3 \cdot X_1 + 0.317454 \cdot X_1^2$

X_1 = solvente, X_2 = temperatura, X_3 = relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

Luego de haber realizado extracciones utilizando tres niveles de porcentaje solvente (agua, 20% y 40% de EtOH), en la gráfica 11 se puede observar que la mayor extracción se realizó utilizando 20% de EtOH, sin embargo no existe diferencia significativa con el agua; por lo tanto se escoge el agua con el fin de obtener mayor actividad antioxidante.

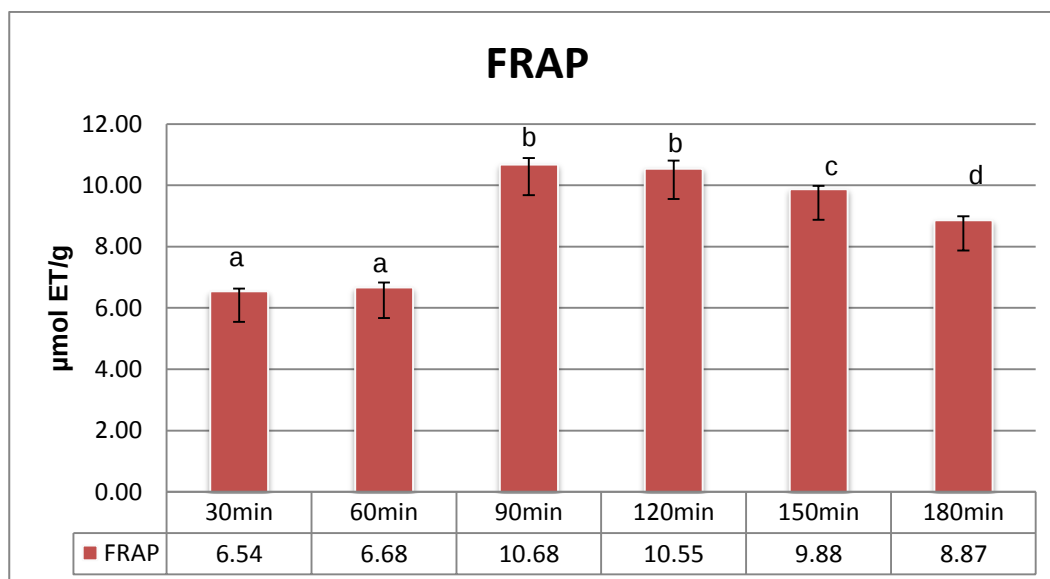


Gráfica 11: Resultados del análisis de optimización para la elección del solvente en FRAP. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.5.2 Cinética de extracción

Se trabajó con seis tiempos de extracción desde 30 a 180 min; dando como resultado que el mejor tiempo para la obtención de extractos fue en 90 min (10.68 ± 0.20 μmol ET/g).



Gráfica 12: Resultados que se obtuvieron durante el análisis FRAP a diferentes tiempos desde 30 min hasta 180 min. Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

Las condiciones óptimas de extracción que se determinaron para FRAP fueron: solvente H₂O, temperatura 38°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.

Aguilera et al. (2013) en su estudio realizado a diferentes legumbres entre estas la zarandaja *Lablab purpureus* (L.), analizaron la actividad antioxidante encontrando un valor de 10 $\mu\text{mol ET/g}$, éste valor puede diferir con los resultados obtenidos en el presente estudio ($5.60 \pm 0.08 \mu\text{mol ET/g}$), ya que se utilizó H₂O en contraste con dichos autores que trabajaron con metanol y 20°C, es importante resaltar que en ambos casos se obtuvieron los extractos por maceración dinámica.

En relación con otras legumbres el valor obtenido es alto con respecto a la arveja amarilla 0.54 - 1.59 $\mu\text{mol ET/g}$; guisante verde 0.62 - 1.16 $\mu\text{mol ET/g}$; soja negro 1.27 - 9.93 $\mu\text{mol ET/g}$; soja amarillo 0.13 - 0.34 $\mu\text{mol ET/g}$; frijol rojo 2.85 - 9.22 $\mu\text{mol ET/g}$; garbanzos 0.73 - 1.13 $\mu\text{mol ET/g}$ y bajo con respecto a frijol negro 1.13 - 11.03 $\mu\text{mol ET/g}$ y lentejas 1.08 - 10.65 $\mu\text{mol ET/g}$ (Xu & Chang, 2007).

Debido a que las condiciones óptimas obtenidas fueron diferentes para fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP en la tabla 10 se muestra el reemplazo de las condiciones de cada método en la ecuación de superficie de respuesta (ecuación 1, 2, 3 y 4) de los mismos,

observando que en la ecuación del análisis de FRAP que se encuentra resaltado, existió una menor pérdida del porcentaje con respecto al valor original (fenoles totales 1.68%, ABTS 5.76%; DPPH 53.38%), por lo tanto para la cuantificación de fenoles totales y determinación de actividad antioxidante, se llegó a escoger una sola condición de extracción (40% de etanol, temperatura de 38°C y relación muestra/solvente 25 g/75 mL), las mismas que coinciden con las condiciones expuestas en la tabla 5 en los métodos de fenoles totales, ABTS y FRAP, con la leve diferencia en la temperatura 40°C.

Tabla 10: Resultados del porcentaje de pérdida de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP con respecto al valor óptimo, utilizando la ecuación de superficie de respuesta de los 4 métodos.

Métodos	Sol	Temp	M/Sol	Ecuación Fenoles Totales	Ecuación ABTS	Ecuación DPPH	Ecuación FRAP	% de diferencia con respecto al valor original			
								Fenoles Totales	ABTS	DPPH	FRAP
Fenoles totales	-1	-0.57	1	75.85	14.80	1.22	4.42	-	7.84	48.81	1.73
ABTS	-1	1	0.99	62.71	16.06	0.38	3.56	17.32	-	84.10	20.95
DPPH	1	-0.56	-1	18.61	9.25	2.39	1.61	75.45	42.41	-	64.05
FRAP	-1	-0.21	1	74.57	15.13	1.11	4.50	1.68	5.76	53.38	-

Elaboración: La autora

CONCLUSIONES

- Como resultado del presente estudio se puede decir que la zarandaja *Lablab purpureus* (L.) Sweet contiene compuestos fenólicos, cuyo valor en el contenido de fenoles totales fue 369.26 ± 5.26 mg EAG/100g y capacidad antioxidante según los ensayos: ABTS presenta un valor de 20.11 ± 0.87 μ mol ET/g, DPPH 41.58 ± 1.18 μ mol ET/g y FRAP 5.60 ± 0.08 μ mol ET/g.
- Las mejores condiciones para la extracción de fenoles totales según los estudios realizados en la presente investigación fueron: solvente H₂O, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.
- Las mejores condiciones para la determinación de actividad antioxidante en ABTS fueron solvente 20% EtOH, temperatura 60°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min; para DPPH fueron solvente 80% EtOH, temperatura 28°C, relación muestra/solvente 6.66 g/93.34 mL y tiempo 90 min; y para FRAP fueron solvente H₂O, temperatura 38°C relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.
- En base a las ecuaciones de diseño se determinó que las condiciones óptimas para extraer la mayor cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante fueron: 40% de etanol, temperatura de 38°C, relación muestra/solvente 25 g/75 mL y tiempo 90 min.
- De las tres variables estudiadas, el porcentaje de etanol fue la variable que tuvo influencia en la extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por dos de los tres métodos ABTS y FRAP.

RECOMENDACIONES

- En vista que hay pocos estudios de los compuestos individuales en la zarandaja se recomienda hacer el análisis HPLC.
- Mejorar el diseño estadístico, de tal manera que en la variable muestra/solvente, se elijan valores equidistantes.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, Y., Díaz, M. F., Jiménez, T., Benítez, V., Herrera, T., Cuadrado, C., ... Martín-Cabrejas, M. A. (2013). Changes in Nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8120–8125. <http://doi.org/10.1021/jf4022652>
- Almajano, M. P., Gómez, F. S., & Corral, J. J. (2013). Estudio cinético de la extracción Sólido-Líquido de los compuestos polifenólicos del Residuo del Aguacate. *Jornades De Recerca De L'Euetib*, 3, 131–138.
- Arnao, M. ., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239–244.
- Avello, M., & Uwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*, (494), 161–172. <http://doi.org/10.4067>
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. ., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 28, 25–30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Bucić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga Marijan. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2394–2401.
- Cardeño, A., Molina, M., Miranda, I., Garcia, G., Morales, J., & Stashenko, E. (2007). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de

- Salvia aratocensis, Salvia Sochensis, Bidens reptans y Montanoa ovalifolia. *Scientia et Technica*, 33, 205–207.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <http://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Decker, E. (1997). Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutrition Reviews*, 55(11), 396–398.
- Deka, R. ., & Sarkar, C. . (1990). Nutrient composition and antinutritional factors of Dolichos lablab L. seeds. *Food Chemistry*, 38(4), 239–246. [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90180-C](http://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90180-C)
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52, 794–804. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00149-5](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00149-5)
- FAO. (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>. Fecha de acceso: 17 de abril del 2016.
- Guamán-Balcázar, M. C., Setyaningsih, W., Palma, M., & Barroso, C. G. (2015). Ultrasound-assisted extraction of resveratrol from functional foods: Cookies and jams. *Applied Acoustics*, 103, 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.07.008>
- Gutierrez, A., Ledesma, L., Garcia, I., & Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Publica*, 33(1), 1–7. <http://doi.org/10.1590/S0864-34662007000100008>
- Horwitz, W., & Latimer, G. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (18th ed.). USA: AOAC International.
- INEC. (2014). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC-2014. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>. Fecha de acceso: 12 de abril del 2016.

- Kamatchi Kala, B., Tresina Soris, P., Mohan, V. R., Vadivel, V., Kamatchi, K. B., Tresina, S. P., ... Kamatchi Kala.B., Tresina Soris.P., Mohan, V. . and V. . V. (2010). Nutrient and Chemical Evaluation of Raw Seeds of Five Varieties of Lablab purpureus (L .) Sweet. *Advances in Bioresearch*, 1, 44–53.
- Kamath, S. D., Arunkumar, D., Avinash, N. G., & Samshuddin, S. (2015). Determination of total phenolic content and total antioxidant activity in locally consumed food stuffs in Moodbidri, Karnataka, India. *Advances in Applied Science Research*, 6(6), 99–102.
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia, Tecnología Y Alimentos.*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lumbreras, E. L. (2001). Sobre el Fríjol Flamenco o Careto - Lablab Purpureus (L .) Sweet - en tierras Valencianas. *Flora Montiberica*, 17(4), 12–20.
- MAGAP. La Política Agropecuaria Ecuatoriana (2015). Retrieved from <http://www.agricultura.gob.ec/la-politica-agropecuaria-ecuatoriana-hacia-el-desarrollo-territorial-rural-sostenible-2015-2025/>. Fecha de acceso: 5 de mayo del 2016.
- Marathe, S. A., Rajalakshmi, V., Jamdar, S. N., & Sharma, A. (2011). Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2005–2012. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.039>
- Martínez, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 5–18.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520–1526. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.057>
- Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., López, J., & Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 36–46. <http://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>

- Motalib, M., Habib, R., Hasan, R., Nayeem, J., Nizam, U., & Rana, S. (2012). Anti-Inflammatory, antioxidant and cytotoxicity potential of methanolic extract of two Bangladeshi bean *Lablab Purpureus* (L.) Sweet white and purple. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(03), 776–781.
- Nithiyanantham, S., Selvakumar, S., & Siddhuraju, P. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.04.003>
- Nwabueze, T. U. (2010). Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9), 1768–1776. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>
- Palma, M., & Taylor, L. T. (1999). Statistical design for optimization of extraction of polyphenols from an inert matrix using carbon dioxide-based fluids. *Analytica Chimica Acta*, 391, 321–329. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00210-X](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00210-X)
- Pengelly, B., & Maas, B. (2001). *Lablab purpureus* (L .) Sweet – diversity , potential use and determination of a core collection of this multi-purpose tropical legume. *Genetic Resources and Crop Evolution*, (48), 261–272.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111–2117. <http://doi.org/10.1021/jf0488110>
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2004). *Antioxidantes de los alimentos Aplicaciones prácticas*. (Acribia, Ed.) (4th ed.). Zaragoza-España.364-380
- Porras-Loaiza, A. P., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Departamento de Ingeniería Química y Alimentos*, 3(1), 121–134.
- Restrepo, D., Narváez, C., & Restrepo, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Quimica Nova*, 32(6), 1517–1522.
- Robards, K. (2003). *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables*. *Journal of Chromatography A* (Vol. 1000).

[http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00058-X](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00058-X)

- Rodríguez, J., Menéndez, J., & Trujillo, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30, 1–23.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- Setyaningsih, W., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). A new microwave-assisted extraction method for melatonin determination in rice grains. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 340–346. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.02.012>
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., & Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolic from plant material for functional foods - engineering and technology. *Food Reviews International*, 21(1), 139–166. <http://doi.org/10.1081/FRI-200040606>
- SINAGAP. (2012). Sistema de información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Retrieved from <http://sinagap.agricultura.gob.ec/estadisticas>. Fecha de acceso: 22 de abril del 2016.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- USDA, U. S. D. of A. (2012). Lablab (Lablab purpureus) Plant Guide. Retrieved from http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_lapu6.pdf. Fecha de acceso: 2 de abril del 2016.
- Valenzuela, H., & Smith, J. (2002). Lablab Purpureus. *Sustainable Agriculture Green Manure Crops*, 2, 1–3.
- Xu, B., & Chang, S. (2007). A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), 159–166.

Zamora, J.-D. (2007). Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1).

ANEXOS

Anexo 1.- Determinación de humedad

Peso	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Cap (g)	23.37	31.01
Cap+m (g)	25.37	33.02
1	25.21	32.88
2	25.18	32.84
3	25.16	32.82
4	25.16	32.82
5	25.16	32.82
6	25.16	32.82
7	25.15	32.81
8	25.14	32.80
9	25.13	32.79
10	25.13	32.79
Humedad:	11.59	11.42
Promedio:	11.51 %	

$$\%Humedad = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

De donde:

m_1 : Peso de la cápsula con muestra

m_2 : Peso de la muestra seca

m : Peso de la cápsula vacía

➤ **Cálculo de humedad para la muestra 1:**

$$\%Humedad = \frac{25.37 - 25.13}{25.37 - 23.37} \times 100$$

$$\%Humedad = 11.59$$

➤ **Cálculo de humedad para la muestra 2:**

$$\%Humedad = \frac{33.02 - 32.79}{33.02 - 31.01} \times 100$$

$$\%Humedad = 11.42$$

Anexo 2.- Fenoles totales (Método Folin-Ciocalteu)

a. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ Solución madre

20 mg Ac. Gálico ——— 10 mL MeOH

X ——— 25 mL MeOH

= 50 mg Ac. Gálico aforar a 25 ml de MeOH

✓ Folin-Ciocalteu

C1. $V_1 = C_2 \cdot V_2$

$$V_1 = \frac{0.25 \text{ N} \times 25 \text{ mL}}{2 \text{ N}}$$

$V_1 = 3.12 \text{ mL}$ aforar a 25 mL de MeOH

✓ Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)

Peso molecular

Na: $23 \times 2 = 46$

C: $12 \times 1 = 12$

O: $16 \times 3 = 48$

106 g/mol

Equivalente químico

$$\text{Eq} = \frac{106}{2}$$

$\text{Eq} = 53 \text{ g}$

Regla de tres para conocer cuánto hay que pesar de Carbonato de Sodio para aforar a 25mL de agua destilada.

53 g ——— 1000 mL

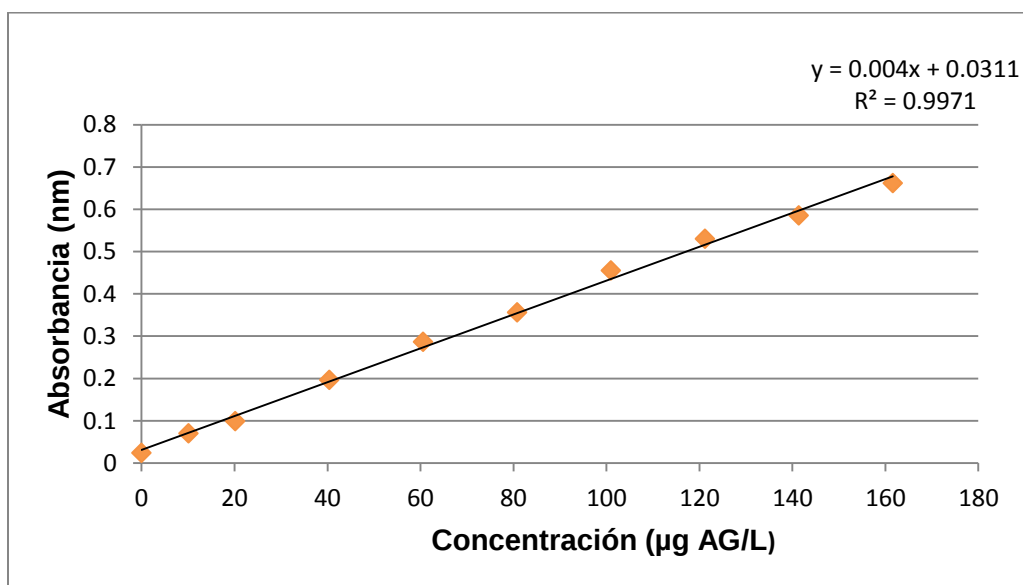
x ——— 25 mL

= 1.32 g de Na_2CO_3

b. Curva de calibración

FENOLES TOTALES						
W AG (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. Madre (mg/L)	(µg AG/L)
0.05	170.12	99	25	2.02	2020.20	202020.20

C2	V1	V2	
AG (mg/L)	Alicuota (mL)	Aforo (mL)	Abs (nm)
0	0	10	0.02
10.10	0.05	10	0.07
20.20	0.1	10	0.09
40.40	0.2	10	0.19
60.60	0.3	10	0.28
80.80	0.4	10	0.35
101.01	0.5	10	0.45
121.21	0.6	10	0.53
141.41	0.7	10	0.58
161.61	0.8	10	0.66



c. Datos de la cuantificación de fenoles totales

#	Variables			Abs (nm)	Relación Muestra Solvente		Factor de Dilución			Conc (mg/L)	Conc (mg EAG/100g)	PROMEDIO (mg EAG/100g)	SD	CV
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol g/mL		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.12	10	90	—————			22.22	20.00	21.01	1.43	6.81
				0.12	10	90				24.47	22.02			
2	0	0	0	0.19	20	80	2	3	5	39.97	39.97	39.35	0.88	2.24
				0.18	20	80	2	3	5	38.72	38.72			
3	0	0	0	0.17	20	80	2	3	5	36.22	36.22	36.72	0.70	1.92
				0.18	20	80	2	3	5	37.22	37.22			
4	0	0	0	0.19	20	80	2	3	5	41.47	41.47	40.85	0.88	2.16
				0.19	20	80	2	3	5	40.22	40.22			
5	-1	0	-1	0.32	10	90	—————			73.22	65.90	66.57	0.95	1,43
				0.33	10	90				74.72	67.25			
6	-1	0	1	0.24	25	75	1	4	5	52.22	78.33	79.27	1.32	1.67
				0.24	25	75	1	4	5	53.47	80.21			
7	1	0	1	0.28	25	75	—————			64.22	19.26	19.71	0.63	3.22
				0.30	25	75				67.22	20.16			
8	-1	1	0	0.24	20	80	2	3	5	52.72	52.72	51.22	2.12	4.14
				0.23	20	80	2	3	5	49.72	49.72			

9	1	1	0	0.27	20	80	—————			60.97	24.39	25.04	0.91	3.67
				0.28	20	80				64.22	25.69			
10	0	1	-1	0.11	10	90	2	3	5	20.47	46.06	51.41	7.55	14.69
				0.13	10	90	2	3	5	25.22	56.75			
11	0	1	1	0.25	25	75	2	3	5	55.97	41.98	40.20	2.51	6.26
				0.23	25	75	2	3	5	51.22	38.41			
12	1	-1	0	0.19	20	80	—————			41.97	16.79	16.99	0.28	1.66
				0.20	20	80				42.97	17.19			
13	-1	-1	0	0.27	20	80	2	3	5	59.97	59.97	62.10	3.01	4.83
				0.28	20	80	2	3	5	64.22	64.22			
14	0	-1	-1	0.16	10	90	—————			33.97	30.57	27.99	3.65	13.07
				0.14	10	90				28.22	25.40			
15	0	-1	1	0.22	25	75	2	3	5	47.47	35.60	36.63	1.45	3.98
				0.23	25	75	2	3	5	50.22	37.66			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Relación Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

d. Ejemplo de cálculos para determinar la concentración de fenoles totales expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por cien gramos de muestra (mgEAG/100g)

- ✓ Primero se determina la concentración que está expresada en (mg/L) utilizando la ecuación de la recta que da la curva de calibración y remplazando valores.

$$y = mx + b$$

De donde:

y = Absorbancia (nm)

m = Pendiente

x = Concentración

b = Intersección

$$y = 0.004x + 0.03$$

$$x = \frac{0.12 - 0.03}{0.004}$$

$$x = 22.22 \frac{mg}{L}$$

d. Luego se determina la concentración expresada en (mg EAG/100g)

- Sin factor de dilución (ejemplo del extracto #1)

$$22.22 \text{ mg} \quad \text{—————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{—————} \quad 90 \text{ mL}$$

$$= 2.00 \text{ mg}$$

$$2.00 \text{ mg} \quad \text{—————} \quad 10 \text{ g}$$

$$X \quad \text{—————} \quad 100g$$

$$= 20.00 \text{ mg EAG/100g}$$

- Con factor de dilución 5 (ejemplo del extracto #6)

$$52.22 \text{ mg} \quad \text{—————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{—————} \quad 5 \text{ mL}$$

$$= 0.26 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{rcl}
 0.26 \text{ mg} & \text{—————} & 1 \text{ mL} \\
 \times & \text{—————} & 75 \text{ mL} \\
 & & = 19.58 \text{ mg}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 19.58 \text{ mg} & \text{—————} & 25 \text{ g} \\
 \times & \text{—————} & 100 \text{ g} \\
 & & = 78.33 \text{ mg EAG/100g}
 \end{array}$$

NOTA: Los mismos cálculos se aplican para la optimización y cinética.

Anexo 3.- ABTS

a. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ Solución madre ABTS

Peso molecular: 548.68 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 548.68 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.0074 \text{ M} \end{array}$$

$$= 4.06 \text{ g}$$

$$\begin{array}{rcl} 4.06 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 10 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.04 \text{ g ó } 40.60 \text{ mg ABTS aforar a } 10 \text{ mL de H}_2\text{O destilada}$$

✓ Persulfato de Potasio

Peso molecular: 270.322 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 270.32 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.0026 \text{ M} \end{array}$$

$$= 0.70 \text{ g}$$

$$\begin{array}{rcl} 0.70 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 10 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.007 \text{ g ó } 7.02 \text{ mg Persulfato de K aforar a } 10 \text{ mL de H}_2\text{O destilada}$$

✓ Trolox

Peso molecular: 250.29 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 250.29 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.01 \text{ M} \end{array}$$

$$= 2.50 \text{ g}$$

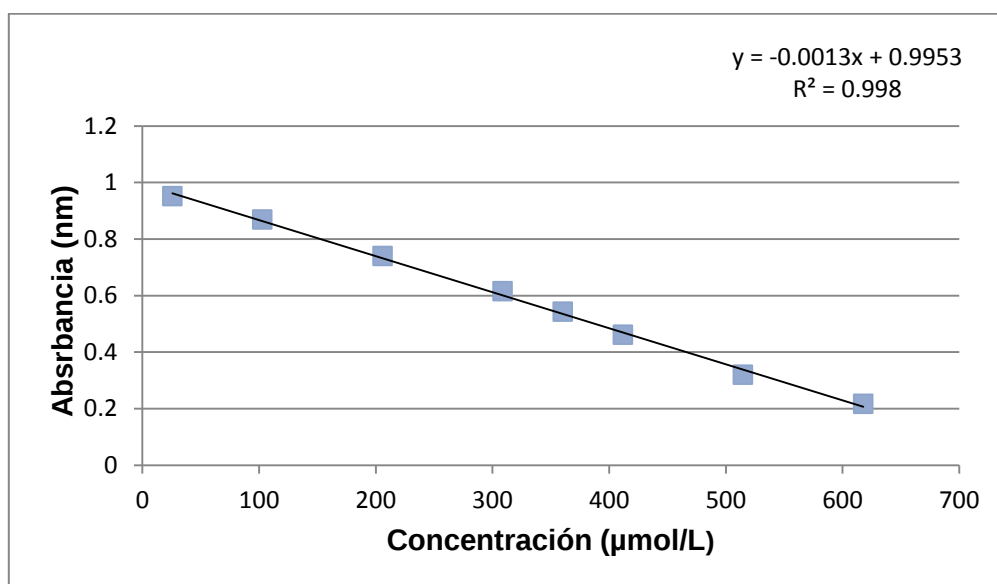
$$\begin{array}{rcl} 2.50 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 25 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.06 \text{ g ó } 62.55 \text{ mg de Trolox aforar a } 25 \text{ mL de MeOH}$$

b. Curva de calibración

ABTS					
W Trolox (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	μmol/L
0.0625	250.29	97	25	2.57	10297.33

TR(μm)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	TR (μmol/L)	Abs (nm)
25	0.025	10	25.74	0.95
100	0.1	10	102.97	0.86
200	0.2	10	205.94	0.73
300	0.3	10	308.92	0.61
350	0.35	10	360.40	0.54
400	0.4	10	411.89	0.46
500	0.5	10	514.86	0.32
600	0.6	10	617.84	0.21



c. Datos de la cuantificación de ABTS

#	Variables			Abs (nm)	Relación Muestra/Solvente		Factor de Dilución			C(μmol/L)	C (μmol ET/g)	PROMEDIO (μmol ET/g)	SD	CV
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol (g/mL)		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.73	10	90	1	4	5	198.69	8.94	9.23	0.41	4.50
				0.72	10	90	1	4	5	211.76	9.52			
2	0	0	0	0.42	20	80	1	4	5	439.46	8.78	8.72	0.08	0.99
				0.43	20	80	1	4	5	433.30	8.66			
3	0	0	0	0.40	20	80	1	4	5	457.92	9.15	9.05	0.15	1.68
				0.41	20	80	1	4	5	447.15	8.94			
4	0	0	0	0.45	20	80	1	4	5	414.84	8.29	8.42	0.18	2.19
				0.43	20	80	1	4	5	427.92	8.55			
5	-1	0	-1	0.55	10	90	1	4	5	335.61	15.10	14.39	1.00	6.97
				0.60	10	90	1	4	5	304.07	13.68			
6	-1	0	1	0.54	25	75	1	14	15	343.30	15.44	15.22	0.31	2.09
				0.56	25	75	1	14	15	333.30	14.99			
7	1	0	1	0.71	25	75	1	4	5	217.92	3.26	3.32	0.08	2.45
				0.70	25	75	1	4	5	225.61	3.38			
8	-1	1	0	0.54	20	80	1	9	10	344.07	13.76	13.65	0.15	1.11
				0.55	20	80	1	9	10	338.69	13.54			
9	1	1	0	0.72	20	80	1	4	5	210.23	4.20	4.02	0.25	6.21
				0.74	20	80	1	4	5	192.53	3.85			
10	0	1	-1	0.64	10	90	1	4	5	266.38	11.98	11.83	0.22	1.86
				0.65	10	90	1	4	5	259.46	11.67			
11	0	1	1	0.57	25	75	1	9	10	323.30	9.69	9.76	0.09	1.00

				0.56	25	75	1	9	10	327.92	9.83			
12	1	-1	0	0.63	20	80	1	4	5	281.00	5.62	5.63	0.02	0.38
				0.62	20	80	1	4	5	282.53	5.65			
13	-1	-1	0	0.57	20	80	1	9	10	324.07	12.96	12.87	0.13	1.01
				0.58	20	80	1	9	10	319.46	12.77			
14	0	-1	-1	0.70	10	90	1	4	5	225.61	10.15	10.20	0.07	0.71
				0.69	10	90	1	4	5	227.92	10.25			
15	0	-1	1	0.64	25	75	1	9	10	271.76	8.15	8.24	0.13	1.58
				0.63	25	75	1	9	10	277.92	8.33			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Relación Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

d. Ejemplo de cálculos para determinar la concentración de ABTS expresado en micromoles equivalentes de Trólox por gramos de muestra ($\mu\text{mol ET/g}$).

- ✓ Primero se determina la concentración que está expresada en ($\mu\text{mol/L}$) utilizando la ecuación de la recta que da la curva de calibración y remplazando valores.

$$y = mx + b$$

De donde:

y = Absorbancia (nm)

m = Pendiente

x = Concentración

b = Intersección

$$y = -0.0013x + 0.99$$

$$x = \frac{-0.73 + 0.99}{0.0013}$$

$$x = 198.69 \frac{\mu\text{M}}{\text{L}}$$

e. Luego se determina la concentración expresada en ($\mu\text{mol ET/g}$)

- Con factor de dilución 5 (ejemplo del extracto #1)

$$198.69 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$\times \quad \text{————} \quad 5 \text{ mL}$$

$$= 0.99 \mu\text{mol}$$

$$0.99 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 1 \text{ mL}$$

$$\times \quad \text{————} \quad 90 \text{ mL}$$

$$= 89.41 \mu\text{mol}$$

$$89.41 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 10 \text{ g}$$

$$\times \quad \text{————} \quad 1 \text{ g}$$

$$= 8.94 \mu\text{mol ET/g}$$

NOTA: Los mismos cálculos se aplican para la optimización y cinética.

Anexo 4.- DPPH

a. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ Solución madre DPPH

24 mg DPPH ————— 100 mL MeOH

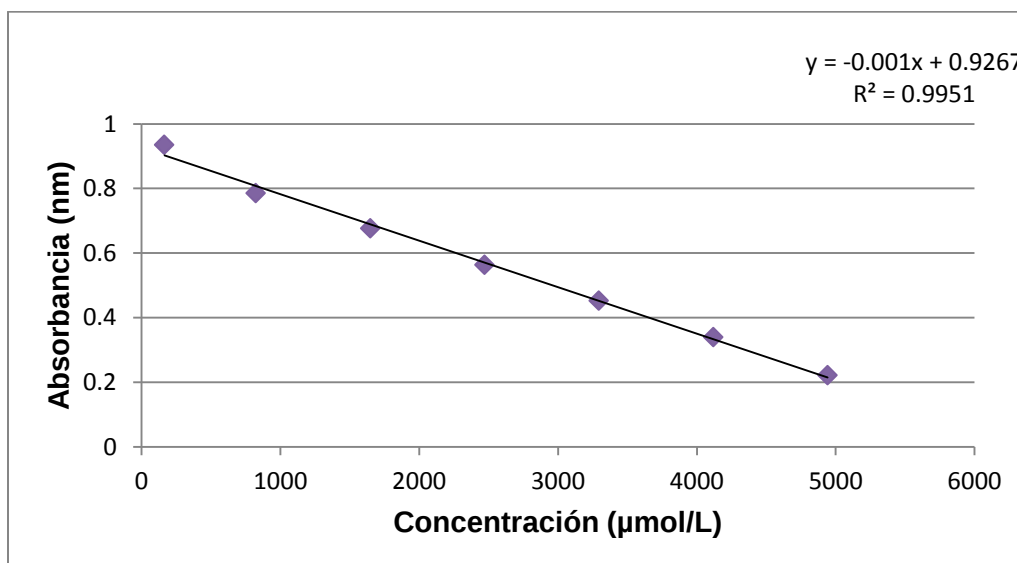
X ————— 50 mL MeOH

= 12 mg de DPPH aforar a 50 mL de MeOH

b. Curva de calibración

DPPH					
W Trolox (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	($\mu\text{mol/L}$)
0.06	250.29	97	25	2.57	10297.33

Alicuotas (ml)	Aforo (mL)	TR ($\mu\text{mol/L}$)	Abs (nm)
0.4	25	164.75	0.93
2	25	823.78	0.78
4	25	1647.57	0.67
6	25	2471.36	0.56
8	25	3295.14	0.45
10	25	4118.93	0.33
12	25	4942.72	0.22



c. Datos de la cuantificación de DPPH

#	Variables			Abs (nm)	Relación Muestra/Solvente		Conc ($\mu\text{mol/L}$)	Conc ($\mu\text{mol ET/g}$)	PROMEDIO ($\mu\text{mol ET/g}$)	SD	CV
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol (g/mL)		Muestra (g)	Solvente (mL)					
1	1	0	-1	0.65	10	90	269.70	2.42	2.38	0.05	2.39
				0.66	10	90	260.70	2.34			
2	0	0	0	0.53	20	80	395.70	1.58	1.59	0.01	1.23
				0.52	20	80	402.70	1.61			
3	0	0	0	0.54	20	80	379.70	1.51	1.50	0.02	1.50
				0.55	20	80	371.70	1.48			
4	0	0	0	0.50	20	80	426.70	1.70	1.68	0.02	1.67
				0.51	20	80	416.70	1.66			
5	-1	0	-1	0.65	10	90	275.70	2.48	2.52	0.05	2.27
				0.64	10	90	284.70	2.56			
6	-1	0	1	0.60	25	75	324.70	0.97	0.97	0.004	0.43
				0.60	25	75	326.70	0.98			
7	1	0	1	0.68	25	75	244.70	0.73	0.75	0.02	3,10
				0.67	25	75	255.70	0.76			
8	-1	1	0	0.76	20	80	160.70	0.64	0.66	0.03	4.68
				0.75	20	80	171.70	0.68			
9	1	1	0	0.65	20	80	273.70	1.09	1.08	0.01	1.56
				0.65	20	80	267.70	1.07			
10	0	1	-1	0.71	10	90	216.70	1.95	1.85	0.14	7.56
				0.73	10	90	194.70	1.75			
11	0	1	1	0.65	25	75	269.70	0.80	0.80	0.002	0.26

				0.65	25	75	268.70	0.80			
12	1	-1	0	0.35	20	80	567.70	2.27	2.24	0.03	1.38
				0.37	20	80	556.70	2.22			
13	-1	-1	0	0.46	20	80	463.70	1.85	1.90	0.07	3.71
				0.43	20	80	488.70	1.95			
14	0	-1	-1	0.73	10	90	191.70	1.72	1.78	0.08	4.63
				0.72	10	90	204.70	1.84			
15	0	-1	1	0.53	25	75	389.70	1.16	1.16	0.01	0.91
				0.54	25	75	384.70	1.15			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Relación Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

d. Ejemplo de cálculos para determinar la concentración de DPPH expresado en micromoles equivalentes de Trólox por gramo de muestra (μmol ET/g)

- ✓ Primero se determina la concentración que está expresada en (μmol/L) utilizando la ecuación de la recta que da la curva de calibración y remplazando valores.

$$y = mx + b$$

De donde:

y = Absorbancia (nm)

m = Pendiente

x = Concentración

b = Intersección

$$y = -0.001x + 0.92$$

$$x = \frac{-0.65 + 0.92}{0.001}$$

$$x = 269.70 \frac{\mu M}{L}$$

- ✓ Luego se determina la concentración expresada en (μmol ET/g)

- Sin factor de dilución (ejemplo del extracto 1)

$$269.70 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{————} \quad 90 \text{ mL}$$

$$= 24.27 \mu\text{mol}$$

$$24.27 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 10 \text{ g}$$

$$X \quad \text{————} \quad 1 \text{ g}$$

$$= 2.42 \mu\text{mol ET/g}$$

NOTA: Los mismos cálculos se aplican para la optimización y cinética.

Anexo 5.- FRAP

a. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ Solución Stock

Acetato de Sodio

$$\begin{array}{rcl} 3.1 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 250 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.77 \text{ g}$$

Buffer Acetato (300 mM): 0.77g acetato de sodio + 4 ml Ac. Acético aforar a 250 mL de H₂O destilada

Ac. Acético

$$\begin{array}{rcl} 16 \text{ mL} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 250 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 4 \text{ mL}$$

✓ TPTZ (10 mM ó 0.01 M)

Peso molecular: 312.3 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 312.3 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.01 \text{ M} \end{array}$$

$$= 3.12 \text{ g}$$

$$\begin{array}{rcl} 3.12 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 25 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.078 \text{ g ó } 78 \text{ mg aforar a } 25 \text{ mL de HCl (40 mM)}$$

✓ HCl (40 mM ó 0.04 M)

Peso molecular: 36.5 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 36.5 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.04 \text{ M} \end{array}$$

$$= 1.46 \text{ g}$$

$$\begin{array}{rcl} 1.46 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 500 \text{ mL} \end{array}$$

$$= 0.73 \text{ g}$$

$$V = \frac{m}{d}$$

$$V = \frac{0.73}{1.199}$$

$$V = 0.60 \text{ mL}$$

$$0.60 \text{ mL} \text{ ————— } 37 \%$$

$$x \text{ ————— } 100 \%$$

= 1.64 ml de HCl aforar a 500 mL de H₂O destilada

- ✓ Cloruro Férrico (20 mM ó 0.02 M)
Peso molecular: 270.2 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 270.2 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.02 \text{ M} \end{array}$$

$$= 5.49 \text{ g}$$

$$\begin{array}{rcl} 5.40 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 30 \text{ mL} \end{array}$$

= 0.16 g ó 162.18 mg de cloruro férrico aforar a 30 mL de H₂O destilada.

- ✓ Trolox
Peso molecular: 250.29 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 250.29 \text{ g/mol} & \text{—————} & 1 \text{ M} \\ X & \text{—————} & 0.01 \text{ M} \end{array}$$

$$= 2.50 \text{ g}$$

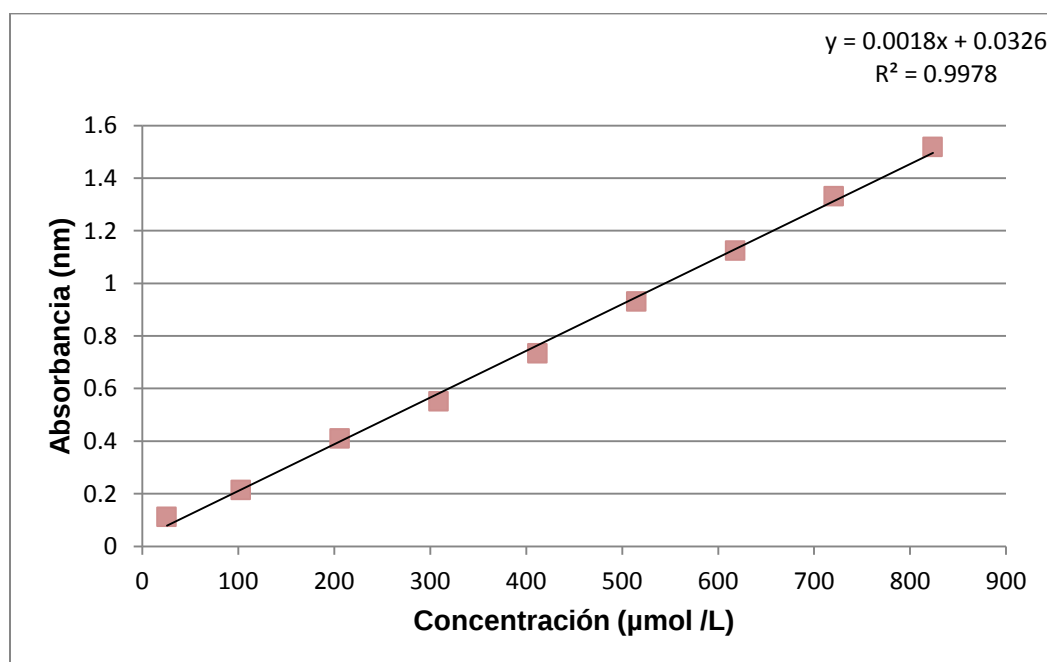
$$\begin{array}{rcl} 2.50 \text{ g} & \text{—————} & 1000 \text{ mL} \\ X & \text{—————} & 25 \text{ mL} \end{array}$$

= 0.06 g ó 62.55 mg de Trólox aforar a 25 mL de MeOH

b. Curva de calibración

FRAP					
W Trolox (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. (μmol Trolox/L)
0.06	250.29	97	25	2.57	10297.33

C2	V1	V2	
TR(μmol/L)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Abs (nm)
25.74	0.025	10	0.11
102.97	0.1	10	0.21
205.94	0.2	10	0.41
308.92	0.3	10	0.55
411.89	0.4	10	0.73
514.86	0.5	10	0.93
617.84	0.6	10	1.12
720.81	0.7	10	1.33
823.78	0.8	10	1.51



c. Datos de la cuantificación de FRAP

#	Variables			Abs (nm)	Relación Muestra/ Solvente		Factor de Dilución			Conc. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. ($\mu\text{mol ET/g}$)	PROMEDIO ($\mu\text{mol ET/g}$)	SD	CV
	Sol (%)	Temp (°C)	M/Sol (g/mL)		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.33	10	90				166.33	1.49	1.50	0.01	0.93
				0.33	10	90				168.55	1.51			
2	0	0	0	0.42	20	80	2	3	5	220.22	2.20	2.18	0.03	1.44
				0.42	20	80	2	3	5	215.77	2.15			
3	0	0	0	0.41	20	80	2	3	5	214.11	2.14	2.13	0.01	0.73
				0.41	20	80	2	3	5	211.88	2.11			
4	0	0	0	0.43	20	80	2	3	5	222.44	2.22	2.20	0.02	1.06
				0.42	20	80	2	3	5	219.11	2.19			
5	-1	0	-1	0.74	10	90				395.77	3.56	3.58	0.03	0.88
				0.75	10	90				400.77	3.60			
6	-1	0	1	0.63	25	75	1	4	5	335.77	5.03	5.04	0.01	0.35
				0.64	25	75	1	4	5	337.44	5.06			
7	1	0	1	0.53	25	75				277.44	0.83	0.84	0.01	2.22
				0.54	25	75				286.33	0.85			
8	-1	1	0	0.41	20	80	2	3	5	211.88	2.11	2.14	0.03	1.64
				0.42	20	80	2	3	5	216.88	2.16			
9	1	1	0	0.69	20	80				366.88	1.46	1.42	0.05	4.18
				0.65	20	80				345.77	1.38			
10	0	1	-1	0.20	10	90	2	3	5	94.66	2.13	2.17	0.06	2.84
				0.21	10	90	2	3	5	98.55	2.21			
11	0	1	1	0.49	25	75	2	3	5	258.55	1.93	1.95	0.02	1.35
				0.50	25	75	2	3	5	263.55	1.97			

12	1	-1	0	0.40	20	80				209.11	0.83	0.84	0.009	1.11
				0.41	20	80				212.44	0.84			
13	-1	-1	0	0.58	20	80	2	3	5	306.88	3.06	3.03	0.05	1.81
				0.57	20	80	2	3	5	299.11	2.99			
14	0	-1	-1	0.35	10	90				179.66	1.61	1.63	0.02	3.46
				0.36	10	90				183.00	1.64			
15	0	-1	1	0.38	25	75	2	3	5	195.22	1.46	1.43	0.04	2.87
				0.37	25	75	2	3	5	187.44	1.40			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Relación Muestra/Solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

e. Ejemplo de cálculos para determinar la concentración de FRAP expresado como micromoles equivalentes de Trólox por gramo de muestra ($\mu\text{mol ET/g}$).

- ✓ Primero se determina la concentración que está expresada en ($\mu\text{mol/L}$) utilizando la ecuación de la recta que da la curva de calibración y remplazando valores.

$$y = mx + b$$

De donde:

y = Absorbancia (nm)

m = Pendiente

x = Concentración

b = Intersección

$$y = 0.0018x + 0.03$$

$$x = \frac{0.33 - 0.03}{0.0018}$$

$$x = 166.33 \frac{\mu}{L}$$

f. Luego se determina la concentración expresada en ($\mu\text{mol ET/g}$)

- Sin factor de dilución (ejemplo del extracto 1)

$$166.33 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{————} \quad 90 \text{ mL}$$

$$= 14.97 \mu\text{mol}$$

$$14.97 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 10 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{————} \quad 1 \text{ mL}$$

$$= 1.4970 \mu\text{mol}$$

- Con factor de dilución 5 (ejemplo del extracto 2)

$$215.77 \mu\text{mol} \quad \text{————} \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \text{————} \quad 5 \text{ mL}$$

$$= 1.078 \mu\text{mol}$$

$$\begin{array}{rcl}
 1.078 \text{ } \mu\text{mol} & \text{—————} & 2 \text{ mL} \\
 \times & \text{—————} & 80 \text{ mL} \\
 & & = 43.15 \text{ } \mu\text{mol}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 43.15 \text{ } \mu\text{mol} & \text{—————} & 20 \text{ g} \\
 \times & \text{—————} & 1 \text{ g} \\
 & & = 2.15 \text{ } \mu\text{mol ET/g}
 \end{array}$$

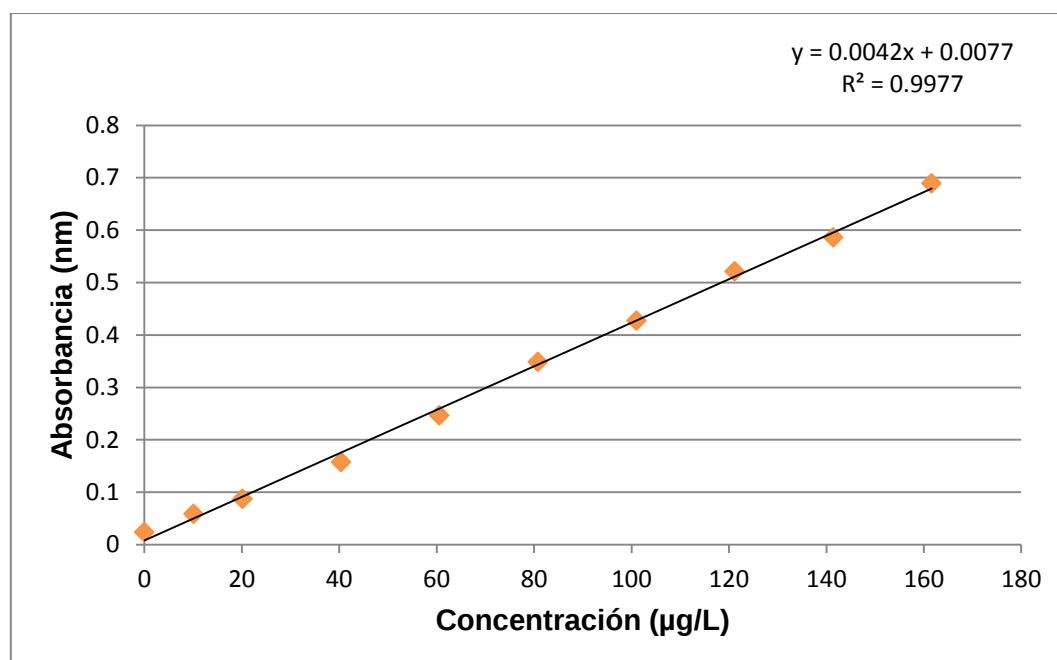
NOTA: Los mismos cálculos se aplican para la optimización y cinética.

Anexo 6.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de fenoles totales

a. Curva de calibración

FENOLES TOTALES						
W AG (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. Madre (mg/L)	(µg AG/L)
0.05	170.12	99	25	2.02	2020.20	2020202.02

C2		V1	V2
AG (µmol/L)	Abs (nm)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)
0	0.02	0	10
10.10	0.05	0.05	10
20.20	0.08	0.1	10
40.40	0.15	0.2	10
60.60	0.24	0.3	10
80.80	0.34	0.4	10
101.01	0.42	0.5	10
121.21	0.52	0.6	10
141.41	0.58	0.7	10
161.61	0.68	0.8	10



b. Datos de la optimización (fenoles totales)

#	Variable (%EtOH) a 28°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (mg/L)	Conc. (mg EAG/100g)	PM (mg EAG/100g)	SD	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	H ₂ O	0.44	25	75	1	9	10	104.59	313.78	308.78	7.07	2.29
		0.43	25	75	1	9	10	101.26	303.78			
2	20%	0.36	25	75	1	4	5	85.07	127.60	130.46	4.04	3.09
		0.38	25	75	1	4	5	88.88	133.32			
3	40%	0.32	25	75	2	3	5	76.02	57.01	58.53	2.14	3.66
		0.34	25	75	2	3	5	80.07	60.05			

c. Análisis de la optimización (fenoles totales)

%solvente	Rep 01	Rep 02	PROM	SD	CV
H ₂ O	313.78	303.78	308.78	7.07	2.29
20	127.60	133.32	130.46	4.04	3.09
40	57.01	60.053	58.53	2.14	3.66

NOTA: Se elige el solvente H₂O ya que el resultado que presenta es el más alto en comparación al solvente de 20 y 40%.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	617.57	308.78	50
Fila 2	2	260.92	130.46	16.32
Fila 3	2	117.07	58.53	4.60
Columna 1	3	498.41	166.13	17595.84
Columna 2	3	497.16	165.72	15638.60

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	66398.20	2	33199.10	939.50	0.001	19
Columnas	0.26	1	0.26	0.007	0.93	18.51
Error	70.67	2	35.33			
Total	66469.14	5				

LSD 6.20 4.85 **30.11**

		H ₂ O	20%	40%
		308.78	130.46	58.53
H ₂ O	308.78	0	178.32	250.25
20%	130.46	178.32	0	71.92
40%	58.53	250.25	71.92	0

H₂O es diferente estadísticamente a 20%

H₂O es diferente estadísticamente a 40%

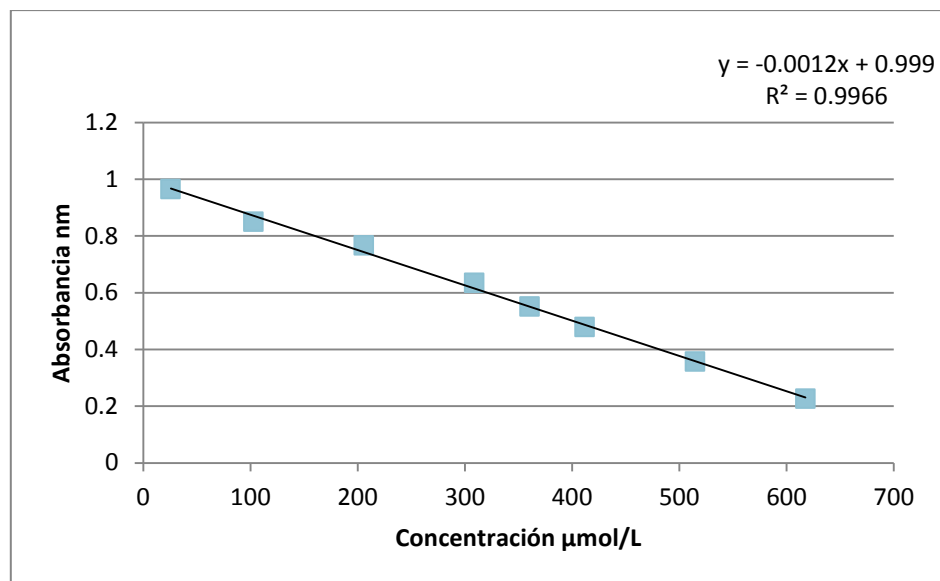
20% es diferente estadísticamente a 40%

Anexo 7.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de ABTS

a. Curva de calibración

ABTS					
W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	μmol/L
0.063	250.29	97	25	2.57	10297.33

Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	TR (μmol/L)	ABS (nm)
0.025	10	25.74	0.96
0.1	10	102.97	0.84
0.2	10	205.94	0.76
0.3	10	308.92	0.63
0.35	10	360.40	0.55
0.4	10	411.89	0.47
0.5	10	514.86	0.35
0.6	10	617.84	0.22



b. Datos de la optimización (ABTS)

#	Variable (% EtOH) a 60°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (μmol/L)	Conc. (μmol ET/g)	PM (μmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	H ₂ O	0.42	25	75	1	4	5	480.83	7.21	7.32	0.15	2.17
		0.40	25	75	1	4	5	495.83	7.43			
2	20%	0.44	25	75	1	14	15	460.83	20.73	20.11	0.87	4.34
		0.47	25	75	1	14	15	433.33	19.50			
3	40%	0.56	25	75	1	14	15	361.66	16.27	16.72	0.63	3.80
		0.54	25	75	1	14	15	381.66	17.17			

c. Análisis de la optimización (ABTS)

%solvente	Rep01	Rep02	PROM	SD	CV
H ₂ O	7.21	7.43	7.32	0.15	2.17
20	20.73	19.5	20.11	0.87	4.34
40	16.27	17.17	16.72	0.63	3.80

NOTA: Se elige el solvente al 20% ya que posee el valor más alto, y porque es más barato utilizar etanol al 20% que al 40%.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	14.65	7.32	0.02
Fila 2	2	40.23	20.11	0.76
Fila 3	2	33.45	16.72	0.40
Columna 1	3	44.22	14.74	47.49
Columna 2	3	44.11	14.70	40.95

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	175.70	2	87.85	147.16	0.006	19
Columnas	0.002	1	0.002	0.003	0.95	18.51
Error	1.19	2	0.59			
Total	176.90	5				

LSD 6.20 0.63 **3.91**

		H ₂ O	20%	40%
		7.32	20.11	16.72
H ₂ O	7.32	0	12.79	9.4
20%	20.11	12.79	0	3.39
40%	16.72	9.4	3.39	0

H₂O es diferente estadísticamente a 20%

H₂O es diferente estadísticamente a 40%

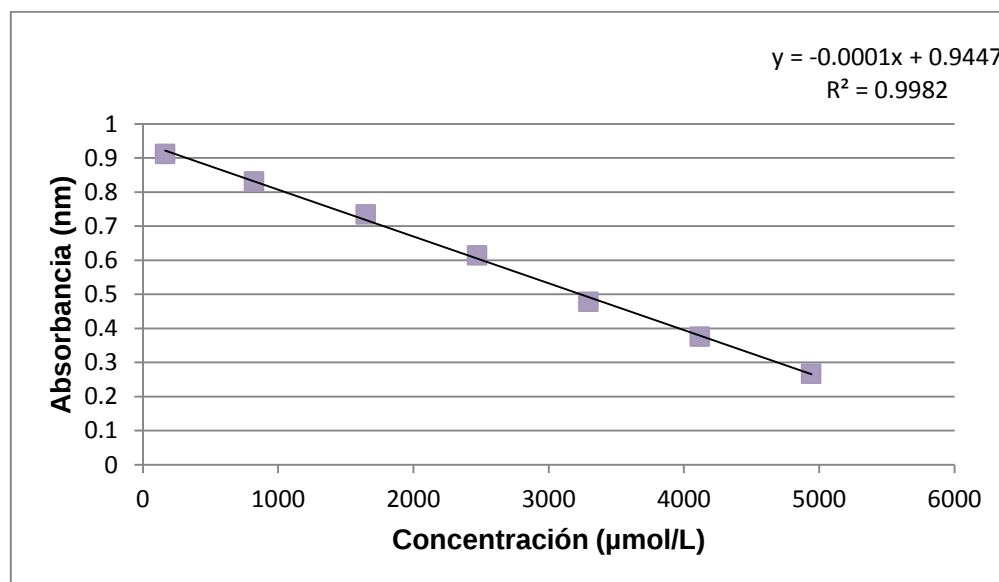
20% no es diferente estadísticamente con 40%

Anexo 8.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de DPPH

a. Curva de calibración

DPPH					
W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	($\mu\text{mol/L}$)
0.06	250.29	97	25	2.57	10297.33

Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	TR ($\mu\text{mol/L}$)	ABS (nm)
0.4	25	164.75	0.91
2	25	823.78	0.83
4	25	1647.57	0.73
6	25	2471.36	0.61
8	25	3295.14	0.47
10	25	4118.93	0.37
12	25	4942.72	0.26



b. Datos de la optimización (DPPH)

#	Variables (g) a 28°C y 80% EtOH	Abs (nm)	Muestra solvente		Conc (μmol/L)	Conc (μmol ET/g)	PM (μmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)					
1	10	0.77	10	90	1687.00	15.18	16.35	1.65	10.11
		0.75	10	90	1947.00	17.52			
2	6.66	0.64	6.66	93.34	3027.00	42.42	41.58	1.18	2.86
		0.65	6.66	93.34	2907.00	40.74			
3	5	0.75	5	95	1867.00	35.47	34.52	1.34	3.89
		0.76	5	95	1767.00	33.57			

c. Análisis de la optimización (DPPH)

Relación muestra/solvente	Rep 01	Rep02	PROM	SD	CV
10 g/90 mL	15.18	17.52	16.35	1.65	10.11
6.66 g/ 93.34 mL	42.42	40.74	41.58	1.18	2.86
5 g/95 mL	35.47	33.57	34.52	1.34	3.89

NOTA: Se elige la relación muestra/solvente 1:15 ya que posee el valor más alto.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	32.70	16.35	2.73
Fila 2	2	83.16	41.58	1.41
Fila 3	2	69.04	34.52	1.80
Columna 1	3	93.07	31.02	200.33
Columna 2	3	91.83	30.61	141.34

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	677.67	2	338.83	118.89	0.008	19
Columnas	0.25	1	0.25	0.09	0.79	18.51
Error	5.70	2	2.85			
Total	683.63	5				

LSD 6.20 1.37 **8.55**

		10 g/90 mL	6.66 g/93.34 mL	5 g/ 95 mL
		16.35	41.58	34.52
10 g/90 mL	16.35	0	25.22	18.17
6.66 g/93.34 mL	41.58	25.22	0	7.05
5 g/ 95 mL	34.52	18.17	7.05	0

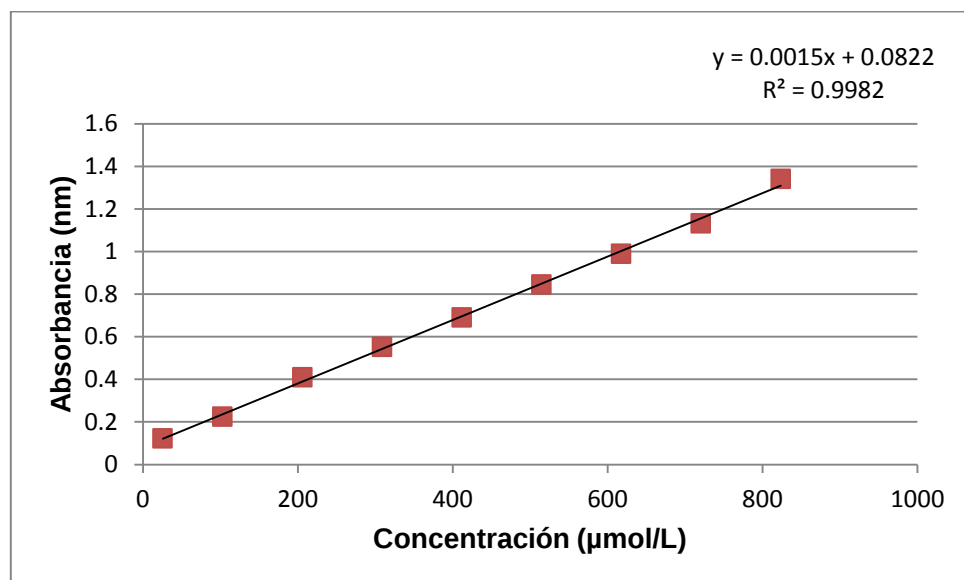
1:10 es diferente estadísticamente a 1:15
 1:10 es diferente estadísticamente a 1:20
 1:15 no es diferente estadísticamente de 1:20
 1:10 es diferente estadísticamente a 1:20
 1:15 no es diferente estadísticamente de 1:20

Anexo 9.- Resultados de Optimización y su posterior análisis de FRAP

a. Curva de calibración

FRAP					
W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	(μmol Trolox/L)
0.06	250.29	97	25	2.57	10297.33

C2	V1	V2	
TR($\mu\text{mol/L}$)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	ABS (nm)
25.74	0.025	10	0.12
102.97	0.1	10	0.22
205.94	0.2	10	0.40
308.92	0.3	10	0.55
411.89	0.4	10	0.69
514.86	0.5	10	0.84
617.84	0.6	10	0.98
720.81	0.7	10	1.13
823.78	0.8	10	1.34



b. Datos de la optimización (FRAP)

#	Variable (%EtOH) a 38°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc (μmol/L)	Conc (μmol ET/g)	PM (μmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	H ₂ O	0.64	25	75	1	4	5	377.86	5.66	5.60	0.08	1.51
		0.63	25	75	1	4	5	369.86	5.54			
2	20%	0.66	25	75	1	4	5	391.20	5.86	5.94	0.10	1.78
		0.68	25	75	1	4	5	401.20	6.01			
3	40%	0.56	25	75	1	4	5	322.53	4.83	4.94	0.15	3.14
		0.58	25	75	1	4	5	337.20	5.05			

c. Análisis de la optimización (FRAP)

%solvente	Rep 01	Rep02	PROM	SD	CV
H ₂ O	5.66	5.54	5.60	0.08	1.51
20	5.86	6.01	5.94	0.10	1.78
40	4.83	5.05	4.94	0.15	3.14

NOTA: Se elige el solvente H₂O ya que posee uno de los valores más altos y la diferencia con el valor del solvente al 20% no es significativo.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	11.21	5.60	0.007
Fila 2	2	11.88	5.94	0.01
Fila 3	2	9.89	4.94	0.02
Columna 1	3	16.37	5.45	0.29
Columna 2	3	16.62	5.54	0.23

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	1.02	2	0.51	31.80	0.03	19
Columnas	0.01	1	0.01	0.64	0.50	18.51
Error	0.03	2	0.01			
Total	1.06	5				

LSD 6.20 0.10 **0.64**

		H ₂ O	20%	40%
		5.60	5.94	4.94
H ₂ O	5.60	0	0.33	0.66
20%	5.94	0.33	0	0.99
40%	4.94	0.66	0.99	0

H₂O no es diferente estadísticamente con 20%

H₂O es diferente estadísticamente a 40%

20% es diferente estadísticamente a 40%

Anexo 10.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de fenoles totales

Para la realización de cinética se utilizaron las mismas condiciones para todos extractos las cuales fueron: 0% Etanol, 28°C y relación 25 g/75 mL, a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

a. Datos de cinética (fenoles totales)

#	Variable	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (mg/L)	Conc. (mg EAG/100g)	PM (mg EAG/100g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30 min	0.51	25	75	1	4	5	121.74	182.60	181.42	4.75	2.62
		0.50	25	75	1	4	5	117.45	176.17			
		0.52	25	75	1	4	5	123.64	185.46			
2	60 min	0.43	25	75	1	9	10	102.45	307.35	298.31	8.12	2.72
		0.42	25	75	1	9	10	98.64	295.92			
		0.41	25	75	1	9	10	97.21	291.64			
3	90 min	0.52	25	75	1	9	10	122.45	367.35	369.26	5.26	1.42
		0.51	25	75	1	9	10	121.74	365.21			
		0.53	25	75	1	9	10	125.07	375.21			
4	120 min	0.48	25	75	1	9	10	113.88	341.64	337.12	5.54	1.64
		0.47	25	75	1	9	10	110.31	330.92			
		0.48	25	75	1	9	10	112.93	338.78			
5	150 min	0.47	25	75	1	9	10	110.07	330.21	325.93	3.97	1.22
		0.46	25	75	1	9	10	108.40	325.21			
		0.45	25	75	1	9	10	107.45	322.35			
6	180 min	0.44	25	75	1	9	10	103.64	310.92	310.45	3.59	1.15
		0.43	25	75	1	9	10	102.21	306.64			
		0.44	25	75	1	9	10	104.60	313.78			

b. Análisis de Cinética (fenoles totales)

TIEMPO	Rep 01	Rep02	Rep03	PROM	SD	CV
30 min	182.60	176.17	185.46	181.42	4.75	2.62
60 min	307.35	295.92	291.64	298.31	8.12	2.72
90 min	367.35	365.21	375.21	369.26	5.26	1.42
120 min	341.64	330.92	338.78	337.12	5.54	1.64
150 min	330.21	325.21	322.35	325.93	3.97	1.22
180 min	310.92	306.64	313.78	310.45	3.59	1.15

NOTA: El mejor tiempo para la extracción es de 90min

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	544.25	181.41	22.61
Fila 2	3	894.92	298.30	65.98
Fila 3	3	1107.78	369.26	27.72
Fila 4	3	1011.35	337.11	30.78
Fila 5	3	977.78	325.92	15.81
Fila 6	3	931.35	310.45	12.92
Columna 1	6	1840.10	306.68	4174.11
Columna 2	6	1800.10	300.01	4247.53
Columna 3	6	1827.25	304.54	4183.18

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	62811.47	5	12562.29	590.61	5.11407E-12	3.32
Columnas	139.002	2	69.50	3.26	0.080901245	4.10
Error	212.69	10	21.26			
Total	63163.172	17				

LSD 2.63 3.76 **9.91**

		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		181.41	298.30	369.26	337.11	325.92	310.45
30 min	181.41	0.0	116.9	187.8	155.7	325.9	129.0
60 min	298.30	116.9	0.0	71.0	38.8	27.6	12.1
90 min	369.26	144.5	27.6	43.3	11.2	0.0	15.5
120 min	337.11	187.8	71.0	0.0	32.1	43.3	58.8
150 min	325.92	155.7	38.8	32.1	0.0	11.2	26.7
180 min	310.45	129.0	12.1	58.8	26.7	15.5	0.0

Todos son estadísticamente diferentes

Anexo 11.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de ABTS

Para la realización de cinética se utilizaron las mismas condiciones para todos extractos las cuales fueron: 0% Etanol, 28°C y relación 25 g/75 mL, a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

a. Datos de cinética (ABTS)

#	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30 min	0.37	25	75	1	19	20	522.50	31.35	31.50	0.18	0.57
		0.36	25	75	1	19	20	528.33	31.70			
		0.37	25	75	1	19	20	524.17	31.45			
2	60 min	0.43	25	75	1	19	20	471.67	28.30	28.32	0.32	1.14
		0.42	25	75	1	19	20	477.50	28.65			
		0.43	25	75	1	19	20	466.67	28.00			
3	90 min	0.54	25	75	1	19	20	376.67	22.60	22.87	0.23	1.03
		0.53	25	75	1	19	20	384.17	23.05			
		0.54	25	75	1	19	20	382.50	22.95			
4	120 min	0.58	25	75	1	19	20	344.17	20.65	20.55	0.21	1.06
		0.59	25	75	1	19	20	338.33	20.30			
		0.58	25	75	1	19	20	345.00	20.70			
5	150 min	0.62	25	75	1	19	20	315.00	18.90	18.57	0.35	1.89
		0.63	25	75	1	19	20	303.33	18.20			
		0.62	25	75	1	19	20	310.00	18.60			
6	180 min	0.67	25	75	1	19	20	267.50	16.05	16.42	0.33	2.02
		0.66	25	75	1	19	20	278.33	16.70			
		0.66	25	75	1	19	20	275.00	16.50			

b. Análisis de Cinética (ABTS)

TIEMPO	Rep 01	Rep02	Rep03	PROM	SD	CV
30 min	31.35	31.7	31.45	31.50	0.18	0.57
60 min	28.3	28.65	28	28.32	0.32	1.14
90 min	22.6	23.05	22.95	22.87	0.23	1.03
120 min	20.65	20.3	20.7	20.55	0.21	1.06
150 min	18.9	18.2	18.6	18.57	0.35	1.89
180 min	16.05	16.7	16.5	16.42	0.33	2.02

NOTA: El mejor tiempo para la extracción es de 90min

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	94.5	31.5	0.03
Fila 2	3	84.95	28.31	0.10
Fila 3	3	68.6	22.86	0.05
Fila 4	3	61.65	20,55	0.04
Fila 5	3	55.7	18.56	0.12
Fila 6	3	49.25	16.41	0.11
Columna 1	6	137.85	22.97	33.72
Columna 2	6	138.6	23.1	35.51
Columna 3	6	138.2	23.03	32.65

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	508.57	5	101.71	1124.26	2.06682E-13	3.32
Columnas	0.04	2	0.02	0.25	0.776518845	4.10
Error	0.90	10	0.09			
Total	509.52	17				

LSD 2.63 0.24 **0.64**

		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		31.50	28.31	22.86	20.55	18.56	16.41
30 min	31.50	0	3.18	8.63	10.95	18.56	15.08
60 min	28.31	3.18	0	5.45	7.76	9.75	11.9
90 min	22.86	8.63	5.45	0	2.31	4.3	6.45
120 min	20.55	10.95	7.76	2.31	0	1.98	4.13
150 min	18.56	12.93	9.75	4.3	1.98	0	2.15
180 min	16.41	15.08	11.9	6.45	4.13	2.15	0

Todos son estadísticamente diferentes

Anexo 12.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de DPPH

Para la realización de cinética se utilizaron las mismas condiciones para todos extractos las cuales fueron: 0% Etanol, 28°C y relación 25 g/75 mL, a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

a. Datos de cinética (DPPH)

#	Variable	Abs (nm)	Muestra solvente		Conc (μmol/L)	Conc (μmol ET/g)	PM (μmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)					
1	30 min	0.58	25	75	3607.00	10.82	10.91	0.13	1.19
		0.57	25	75	3687.00	11.06			
		0.58	25	75	3617.00	10.85			
2	60 min	0.46	25	75	4787.00	14.36	14.44	0.24	1.72
		0.45	25	75	4907.00	14.72			
		0.47	25	75	4747.00	14.24			
3	90 min	0.34	25	75	6027.00	18.08	18.05	0.31	1.75
		0.33	25	75	6117.00	18.35			
		0.35	25	75	5907.00	17.72			
4	120 min	0.53	25	75	4077.00	12.23	12.23	0.12	0.98
		0.54	25	75	4037.00	12.11			
		0.53	25	75	4117.00	12.35			
5	150 min	0.78	25	75	1627.00	4.88	4.90	0.12	2.47
		0.78	25	75	1597.00	4.79			
		0.77	25	75	1677.00	5.03			
6	180 min	0.76	25	75	1757.00	5.27	5.29	0.18	3.41
		0.77	25	75	1707.00	5.12			
		0.76	25	75	1827.00	5.48			

b. Análisis de Cinética (DPPH)

TIEMPO	Rep 01	Rep02	Rep03	PROM	SD	CV
30 min	10.82	11.06	10.85	10.91	0.13	1.19
60 min	14.36	14.72	14.24	14.44	0.24	1.72
90 min	18.08	18.35	17.72	18.05	0.31	1.75
120 min	12.23	12.11	12.35	12.23	0.12	0.98
150 min	4.88	4.79	5.03	4.90	0.12	2.47
180 min	5.27	5.12	5.48	5.29	0.18	3.41

NOTA: el más óptimo para la extracción es de 90min

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	32.73	10.91	0.01
Fila 2	3	43.32	14.44	0.06
Fila 3	3	54.15	18.05	0.09
Fila 4	3	36.69	12.23	0.01
Fila 5	3	14.70	4.90	0.01
Fila 6	3	15.87	5.29	0.03
Columna 1	6	65.64	10.94	26.64
Columna 2	6	66.15	11.02	28.44
Columna 3	6	65.67	10.94	24.71

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	398.59	5	79.71	1751.69	2.25985E-14	3.32
Columnas	0.02	2	0.01	0.29	0.747304645	4.10
Error	0.45	10	0.04			
Total	399.07	17				

LSD 2.63 0.17 **0.45**

		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		10.91	14.44	18.05	12.23	4.90	5.29
30 min	10.91	0	3.53	7.14	1.32	4.901	5.62
60 min	14.44	3.53	0	3.61	2.21	9.54	9.15
90 min	18.05	7.14	3.61	0	5.82	13.15	12.76
120 min	12.23	1.32	2.21	5.82	0	7.33	6.94
150 min	4.90	6.01	9.54	13.15	7.33	0	0.39
180 min	5.29	5.62	9.15	12.76	6.94	0.39	0

30 min es diferente estadísticamente a 1h, 1h30, 2h, 2h30,3h

1h es diferente estadísticamente a 1h30, 2h, 2h30,3h

1h30 es diferente estadísticamente a 2h, 2h30, 3h

2h es diferente estadísticamente a 2h30, 3h

2h30 no es diferente estadísticamente con 3h

Anexo 13.- Resultados de Cinética y su posterior análisis de FRAP

Para la realización de cinética se utilizaron las mismas condiciones para todos extractos las cuales fueron: 0% Etanol, 28°C y relación 25 g/75 mL, a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

a. Datos de cinética (FRAP)

#	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc (μmol/L)	Conc (μmol ET/g)	PM (μmol ET/g)	DS	CV
			Rel. Muestra (g)	Rel. Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30 min	0.73	25	75	1	4	5	431.87	6.47	6.54	0.09	1.38
		0.74	25	75	1	4	5	443.20	6.64			
		0.73	25	75	1	4	5	433.87	6.50			
2	60 min	0.40	25	75	1	9	10	217.20	6.51	6.68	0.15	2.26
		0.42	25	75	1	9	10	227.20	6.81			
		0.41	25	75	1	9	10	223.20	6.69			
3	90 min	0.61	25	75	1	9	10	353.87	10.61	10.68	0.20	1.94
		0.62	25	75	1	9	10	363.87	10.91			
		0.60	25	75	1	9	10	350.53	10.51			
4	120 min	0.60	25	75	1	9	10	348.53	10.45	10.55	0.25	2.40
		0.6	25	75	1	9	10	345.20	10.35			
		0.62	25	75	1	9	10	361.20	10.83			
5	150 min	0.58	25	75	1	9	10	333.20	9.99	9.88	0.10	1.07
		0.57	25	75	1	9	10	326.53	9.79			
		0.57	25	75	1	9	10	327.87	9.83			
6	180 min	0.51	25	75	1	9	10	291.20	8.73	8.87	0.12	1.37
		0.53	25	75	1	9	10	299.20	8.97			
		0.52	25	75	1	9	10	296.53	8.89			

b. Análisis de Cinética (FRAP)

TIEMPO	Rep 01	Rep02	Rep03	PROM	SD	CV
30 min	6.47	6.64	6.50	6.54	0.09	1.38
60 min	6.51	6.81	6.69	6.68	0.15	2.26
90 min	10.61	10.91	10.51	10.68	0.20	1.94
120 min	10.45	10.35	10.83	10.55	0.25	2.40
150 min	9.99	9.79	9.83	9.88	0.10	1.07
180 min	8.73	8.97	8.89	8.87	0.12	1.37

NOTA: El mejor tiempo para la extracción es de 90min

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	19.63	6.54	0.008
Fila 2	3	20.02	6.67	0.02
Fila 3	3	32.04	10.68	0.04
Fila 4	3	31.64	10.54	0.06
Fila 5	3	29.62	9.87	0.01
Fila 6	3	26.60	8.86	0.01
Columna 1	6	52.79	8.79	3.61
Columna 2	6	53.50	8.91	3.28
Columna 3	6	53.28	8.88	3.56

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	52.01	5	10.40	364.72	5.62066E-11	3.32
Columnas	0.04	2	0.02	0.77	0.487823312	4.10
Error	0.28	10	0.02			
Total	52.34	17				

LSD 2.63 0.13 **0.36**

		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		6.54	6.67	10.68	10.54	9.87	8.86
30 min	6.54	0	0.13	4.13	4.00	9.87	2.32
60 min	6.67	0.13	0	4.00	3.87	3.2	2.19
90 min	10.68	4.13	4.00	0	0.13	0.80	1.81
120 min	10.54	4.00	3.87	0.13	0	0.67	1.68
150 min	9.87	3.33	3.2	0.80	0.67	0	1.00
180 min	8.86	2.32	2.19	1.81	1.68	1.00	0

30 min no es diferente estadísticamente con 1h
30 min es diferente estadísticamente a 1h30, 2h, 2h30,3h
1h es diferente estadísticamente a 1h30,2h,2h30,3h
1h30 no es diferente estadísticamente con 2h
1h30 es diferente estadísticamente a 1h, 2h30,3h
2h es diferente estadísticamente a 2h30, 3h
2h30 es diferente estadísticamente a 3h

