



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Zaquinaula Iñahuazo, Fabián Efraín

**DIRECTOR:** Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, 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 DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mg. Sc.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales” realizado por Fabián Efraín Zaquinaula Ñahuazo ha sido orientado y revisado durante su ejecución, y cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre del 2016.

f).....

Mg. Sc. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

C.I: .....

## DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Fabián Efraín Zaquinaula Iñahuazo declaro ser autor del presente trabajo de titulación: ‘Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales’ de la Titulación de Bioquímica Y Farmacia, siendo Mg. Sc. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado director 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 Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Loja, Octubre del 2016

F: .....

Zaquinaula Iñahuazo Fabián Efraín

C.I: 1900465764

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser el creador de todo, por guiarme, bendecirme y acompañarme día a día en el transcurso de mi vida.

A mis padres por su apoyo, comprensión, sacrificio, amor y constante aliento en todo momento, sobre todo por creer en mí; todo lo que soy se lo debo a ustedes. En especial a mi madre Elsie, la distancia nunca significó que estuviese alejada de mí.

A mis hermanos que con igual cariño han sabido inspirarme a más cada día, especialmente Elvis, todo lo que hago lo haré para tu beneficio.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, siempre en primer lugar, por todas las bendiciones que me brinda, por el don de fe que me ha concedido y por permitirme hacer realidad uno más de mis sueños.

Al Mg. Sc. Geovanny Figueroa Hurtado, quien como director de tesis ha sabido compartir sus conocimientos y experiencia, para poder guiarme correctamente en la realización de este proyecto, gracias también por su paciencia y ayuda.

A los Ingenieros: María Del Cisne Guamán y Felipe Reyes, por su colaboración como miembros del jurado de tesis, que han sabido guiar esta investigación con sus observaciones y sugerencias, por su tiempo y dedicación.

A mis profesores, los cuales han sido mis maestros en todos estos años y han sabido despejar mis inquietudes con sus conocimientos, durante mi crecimiento académico, en especial a la Bq. Andrea Vintimilla, gracias por tanta paciencia.

A mi familia, por ser el motor en toda mi vida, por creer en mí y por su cariño infalible.

## TABLA DE CONTENIDOS

CARÁTULA .....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	II
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
NOMENCLATURA .....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
1.1.  Firigüelo ( <i>Vigna unguiculata</i> ) .....	6
1.2.  Zarandaja ( <i>Dolichos lablab</i> ) .....	7
1.3.  Amaranto ( <i>Amaranthus spp.</i> ).....	8
1.4.  Radicales libres, estrés oxidativo y antioxidantes .....	9
1.5.  Extracción de antioxidantes .....	12
1.6.  Determinación de la capacidad antioxidante .....	13
1.6.1.  DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil). .....	13
1.6.2.  ABTS. ....	14
1.6.3.  FRAP.....	14
1.7.  Contenido de Fenoles Totales.....	15
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
2.1.  Muestras .....	17

2.2.	Reactivos .....	17
2.3.	Método Experimental .....	17
2.3.1.	Preparación de las muestras. ....	17
2.3.2.	Determinación de humedad.....	18
2.3.3.	Extracción de antioxidantes.....	18
2.3.4.	Cuantificación de la capacidad antioxidante. ....	19
2.3.5.	Determinación de fenoles totales.....	22
2.4.	Análisis estadístico.....	23
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
3.1.	Análisis DPPH.....	27
3.2.	Análisis ABTS .....	29
3.3.	Análisis del Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP).....	31
3.4.	Análisis de Fenoles Totales .....	32
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
	Anexo A. Determinación de humedad .....	44
	Anexo B. Cuantificación de la capacidad antioxidante (DPPH).....	46
	Anexo C. Cuantificación de la capacidad antioxidante (ABTS) .....	50
	Anexo D. Cuantificación de la capacidad antioxidante (FRAP) .....	54
	Anexo E. Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu .....	58
	Anexo F. Análisis estadístico.....	62

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS Y FIGURAS

<b>Fotografía 1.</b> Firigüelo .....	7
<b>Fotografía 2.</b> Zarandaja .....	8
<b>Fotografía 3.</b> Amaranto .....	9
<b>Figura 1.</b> Preparación de extractos .....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama del método DPPH .....	20
<b>Figura 3.</b> Diagrama del método ABTS .....	21
<b>Figura 4.</b> Diagrama del método FRAP .....	22
<b>Figura 5.</b> Diagrama del método Fenoles Totales .....	23

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Análisis DPPH en amaranto, firigüelo y zarandaja .....	28
<b>Gráfica 2.</b> Análisis ABTS en amaranto, firigüelo y zarandaja .....	30
<b>Gráfica 3.</b> Análisis FRAP en amaranto, firigüelo y zarandaja .....	32
<b>Gráfica 4.</b> Análisis de Fenoles Totales en amaranto, firigüelo y zarandaja .....	34

## NOMENCLATURA

**ABTS:** 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**FRAP:** Capacidad de reducción férrica del ion

**TPTZ:** 2, 4, 6 - tripiridil-s-triazina

**TROLOX:** Ácido 6- hidroxil-2, 5, 7, 8- tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico

**MeOH=** Metanol

**HCl:** Ácido clorhídrico

**H<sub>2</sub>O=** Agua

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de sodio

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:** Persulfato de potasio

**FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O:** Cloruro férrico hexahidratado

**Fe<sup>2+</sup>=** Hierro (estado de oxidación ferroso)

**Fe<sup>3+</sup>=** Hierro (estado de oxidación férrico)

**μmol ET/g:** Micromoles equivalentes de trolox/gramo de muestra

**mg EAG/100 g:** Miligramos equivalentes de ácido gálico/100 gramos de muestra

**FT:** Fenoles totales

**Abs:** Absorbancia

**BF:** Base fresca

**BS:** Base seca

**Co:** Concentración luego de aplicación de pendiente e intersección

**Cf=** Concentración final en μmol ET/g; o en mg EAG/100 g

**ET=** Estándar

**ST=** Sólidos totales

**g:** Gramo

**mg:** Miligramo

**L:** Litro

**ml:** Mililitro

**μL:** Microlitro

**N:** Normal

**M:** Molar

**mM:** Milimolar

**$\mu$ M:** Micromolar

**rpm:** Revoluciones por minuto

**nm:** Nanómetro

## RESUMEN

En la presente investigación se trabajó con tres tipos de especies vegetales, las cuales incluyeron 2 legumbres distintas: firigüelo (*Vigna unguiculata*) y zarandaja (*Dolichos lablab*); y un pseudocereal: amaranto (*Amaranthus spp*). Se analizó muestras de distinto lugar de procedencia. Se realizaron extracciones secuenciales con metanol/agua (50:50 v/v) y acetona/agua (70:30 v/v) y ambas extracciones se combinaron, y a partir de ésta se cuantificó la capacidad antioxidante. Las muestras de firigüelo provenientes del cantón Macará de la ciudad de Loja presentaron el mayor potencial antioxidante en los métodos: ABTS (27,5  $\mu\text{mol ET/g BS}$ ), DPPH (27,8  $\mu\text{mol ET/g BS}$ ), FRAP (18,3  $\mu\text{mol ET/g BS}$ ) y contenido de fenoles totales (288 mg EAG/100 g BS). Todas las muestras estudiadas demostraron ser fuentes importantes de antioxidantes, sin embargo, dependiendo del lugar de procedencia de la muestra se obtuvo mayor o menor resultado, lo cual fue analizado estadísticamente.

**Palabras clave:** capacidad antioxidante, fenoles totales, ABTS, DPPH, FRAP.

## ABSTRACT

In the present investigation we worked with three types of plant species, which included 2 different legumes: cowpea (*Vigna unguiculata*) and hyacinth bean (*Dolichos lablab*); and a pseudocereal: amaranth (*Amaranthus spp*). There were two samples of each species with different place of origin. Sequential extractions were performed with methanol/water (50:50 v/v) and acetone/water (70:30 v/v) and both extractions were combined, and from this the antioxidant capacity was quantified. The samples of cowpea from the Macará canton of the city of Loja presented the highest antioxidant potential in the methods: ABTS (27,5  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ), DPPH (27,8  $\mu\text{mol ET/g DW}$ ), FRAP (18,3  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) and total phenol content (288 mg GAE/100 g DW). All the samples studied proved to be important sources of antioxidants, however, depending on the place of origin of the sample, a higher or lower result was obtained, which was analyzed statistically.

**Key words:** antioxidant capacity, total phenols, ABTS, DPPH, FRAP.

## INTRODUCCIÓN

La producción de granos andinos es un recurso vital en el aspecto alimenticio de la población mundial, sin embargo, muchos de sus beneficios no son conocidos por gran parte de la población (Sven Jacobsen & Sherwood, 2002). El consumo de legumbres se correlaciona con beneficios positivos para la salud tales como propiedades hipocolesterolemiantes, anticancerígenas e hipoglucemiantes (Cardador, Loarca, & Piña, 2002).

Ecuador a pesar de ser un país geográficamente pequeño, cada km<sup>2</sup> de éste alberga una gran cantidad de plantas, es por tal motivo que Ecuador está entre los 17 países más biodiversos del mundo, con más de 16000 especies de plantas (Coba & Tivi, 2010). Además, se determinó que en Ecuador existen 5172 plantas útiles, de las cuales 3118 especies han sido usadas durante siglos por numerosas comunidades con fines medicinales, y la mayoría de estas plantas medicinales son hierbas, arbustos y árboles (De La Torre, Balslev, Navarrete, & Macía, 2008). Los cultivos andinos, tanto granos, tubérculos, raíces, frutales, aromáticas y medicinales, tienen un gran potencial de transformación en productos procesados, sin embargo, es muy importante que en esta transformación, no se pierdan los numerosos beneficios que conlleva el consumirlos (S Jacobsen, Mujica, & Ortiz, 2003).

Tal es el caso del firigüelo, amaranto y zarandaja, en los cuales se ha comprobado que contienen sustancias que ayudan a la supervivencia de la planta, además de ejercer un efecto antioxidante, por tal motivo su consumo es de gran beneficio, ya que pueden ser útiles en la prevención de muchas patologías, entre éstas, diversos tipos de cáncer (Escudero, Albarracín, Lucero López, & Giménez, 2011; Ojeda, 1991; Vargas & Villamil, 2012).

La tecnología médica ha avanzado significativamente en proporcionar información sobre las enfermedades, su fisiopatología, tratamiento, y más importante aún, su prevención; es así por ejemplo, la participación de los procesos oxidativos y producción de radicales libres en el desarrollo de patologías, y como los antioxidantes nos brindan una protección contra las mismas (Venereo-Gutiérrez, 2002),

Se han realizado estudios que proporcionan valiosa información acerca de las propiedades antioxidantes de muchas variedades de granos y cereales, sin embargo, en nuestro país y aún más en nuestra ciudad esos estudios son escasos (Kraujalis,

Venskutonis, Pukalskas, & Kazernavičiute, 2013; Marathe, Rajalakshmi, Jamdar, & Sharma, 2011). El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la capacidad antioxidante y los fenoles totales de extractos obtenidos a partir de muestras de legumbres y cereales como el firigüelo, zarandaja y amaranto; y de esta manera proporcionar valiosa información que pueda incentivar su consumo local. Para lo cual se dividió esta investigación por capítulos, los cuales contienen temas y subtemas. El primer capítulo o marco teórico tuvo un enfoque justamente teórico, donde se analizaron estudios y antecedentes en general referentes al problema de investigación. El siguiente capítulo titulado Materiales y métodos, se centra en la parte práctica de la investigación, explicando los materiales y reactivos que se usarán, al igual que la metodología a seguir, la cual fue ya determinada por otros autores en investigaciones previas. En el último capítulo, nos enfocamos en los resultados obtenidos, su interpretación y comparación con estudios previos, para lo cual también nos servimos de la ayuda de gráficas.

Es importante destacar la facilidad de conseguir las muestras vegetales analizadas, ya que al ser productos que se cosechan en la provincia de Loja, se pueden conseguir con facilidad en los principales mercados comerciales a precios bajos, sin embargo, un inconveniente fue que, al no haber investigaciones científicas sobre el potencial antioxidante en estas muestras en nuestro país, se tuvo que tomar como referencia para la comparación de resultados, investigaciones realizadas en otros países. Al final de esta investigación pudimos determinar la capacidad antioxidante y fenoles totales de las muestras mencionadas, corroborando que son una fuente importante de antioxidantes, y proporcionando información valiosa que pueda incentivar su consumo e impulsar otras investigaciones similares.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### 1.1. Firigüelo (*Vigna unguiculata*)

También conocida como frejol caupí o frijol de Castilla (Fotografía 1); es una leguminosa de la familia de las Fabáceas, originaria de África e India, y ampliamente cultivada en áreas tropicales y subtropicales (Araméndiz-Tatis & Combatt-caballero, 2016). Es cultivada para el consumo humano y animal, siendo un alimento básico que proporciona distintos beneficios, como fuente de proteínas, vitaminas, entre otros, y siendo básica en muchos países, especialmente para poblaciones de bajos recursos económicos, debido a la facilidad y bajo costo de producción (Nassourou, Njintang, Noubissié, Nguimbou, & Bell, 2016; De la Pava S & Sepúlveda-cano, 2015).

Estudios realizados en esta planta han comprobado la existencia de compuestos con propiedades antioxidantes, algunos de los cuales son esenciales para la misma planta (Cardona-Ayala & Jarma-Orozco, 2013), y que ejercen una función protectora contra algunas especies altamente reactivas, igualmente se encontraron algunos compuestos fenólicos como: ácido caféico, ácido gálico, pirogagol, ácido 4-hidroxibenzoico, y también se encontró la presencia de flavonoides (Ayedemi & Olorunsanya, 2012; Urarte, Asensio, Tellechea, Pires, & Moran, 2014). En un estudio comparativo sobre la capacidad antioxidante de diferentes variedades de legumbres, realizado por Marathe et al. (2011) se comprobó que entre ciertos tipos de firigüelo, el contenido de fenoles totales varía desde  $148 \pm 2,8$  mg EAG/ 100 g muestra, hasta  $637,8 \pm 5,4$  mg EAG/ 100 g muestra, mostrando que las variedades de firigüelo estudiadas presentan desde un contenido moderado de compuestos fenólicos, hasta un alto contenido fenólico, sin embargo, este contenido total de compuestos fenólicos depende de múltiples factores (Arranz-Martínez, 2010)

La hidrólisis enzimática en el firigüelo, generan fracciones peptídicas con propiedades farmacológicas, estas sustancias son capaces de regular eventos fisiopatológicos asociados al síndrome metabólico, como por ejemplo, reguladores de la enzima convertidora de angiotensina para reducir la presión arterial, como secretagogos de insulina o como hipolipemiantes (Melorose, Perroy, & Careas, 2015), es por esto, que el consumo de firigüelo está asociado con una disminución en el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, por ejemplo diabetes, además de ayudar en situaciones de presión arterial alterada e hiperlipidemias (Figuerola, María, & Avendaño, 2008)



**Fotografía 1.** Firigüelo  
**Fuente:** El autor

### **1.2. Zarandaja (*Dolichos lablab*)**

La zarandaja, también llamada Chaucha japonesa (Fotografía 2), es una leguminosa cultivada en zonas tropicales y subtropicales, y sus vainas maduras son ricas en proteínas, vitaminas, carbohidratos, fibra y otros nutrientes, y es una fuente alimenticia barata si comparamos con fuentes de origen animal en los países en desarrollo (Castillo, 2012; Das & Fakir, 2014).

La zarandaja es uno de los granos más consumidos en América Latina y por su contenido de glucósidos cianogénicos hace que deba haber una adecuada cocción antes de su consumo (Castillo, 2012). Constituye uno de los cultivos considerados de mayor importancia para el agricultor de la provincia de Loja, debido a sus características morfológicas, hábito de crecimiento, variedad genética y rendimiento; aunque actualmente solo se dispone de estudios básicos de esta leguminosa tanto como alimento y su importancia industrial (Ojeda, 1991).

Se ha comprobado que los granos de esta leguminosa contienen enzimas y otros compuestos capaces de transformar especies reactivas de oxígeno en compuestos mucho menos dañinos, entre las enzimas que forman el componente enzimático antioxidante se encuentran: peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y polifenol oxidasa, mientras que los componentes antioxidantes no enzimáticos incluyen ascorbato, el glutatión, fenoles, entre otros (D'Souza & Devaraj, 2011; Yancey, Clark, Hand, Bowlus, & Somero, 1982).

La zarandaja es una buena fuente de antioxidantes, según el estudio realizado por Marathe et al. (2011) el contenido de fenoles totales entre ciertos tipos de zarandaja van desde  $32,5 \pm 0,2$  mg EAG/100 g muestra hasta  $101,7 \pm 3,8$  mg EAG/100 g de muestra.

El potencial compuesto químico Kievitona, el cual es un isoflavonoide, que combate contra el cáncer de mama, también fue encontrado en la zarandaja, además de otros compuestos beneficiosos (Oboh, 2006; Soong & Barlow, 2004). Además, estudios diversos reportan que la inclusión de esta leguminosa en la dieta genera en los consumidores beneficios óptimos de salud, junto con la asimilación de nutrientes sin consecuencias negativas, por ejemplo, beneficios debido al potencial efecto hipocolesterolémico de la misma (Maheshu, Priyadarsini, & Sasikumar, 2013).



**Fotografía 2.** Zarandaja  
**Fuente:** El autor

### **1.3. Amaranto (*Amaranthus spp.*)**

El amaranto es un pseudocereal y un grano antiguo (Fotografía 3), perteneciente a la familia *Amaranthaceae* (Chauhan, Saxena, & Singh, 2015; Coombes, 2012). Esta familia tiene una amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales e incluyen cerca de 170 géneros y 2300 especies, pero en nuestro país se han registrado 20 géneros y 84 especies, de las cuales 21 son endémicas (Montufar & Tye, 2000).

El cultivo del amaranto en América se remonta a más de siete mil años, siendo básico en la alimentación de algunos pueblos indígenas y actualmente es parte de la agricultura tradicional, además algunos escritos procedentes de China, India y Egipto atestiguan el uso del amaranto tanto nutricional como medicinal (Box, 2005). Además se conoce que tiene un potencial económico, debido a que la familia *Amaranthaceae* tiene varios usos, especialmente en la alimentación y medicina, y las especies centroamericanas se usaban en diversos rituales religiosos en diversas culturas (Freire-Fierro, 2004).

En la actualidad, se han realizado algunos estudios sobre la actividad antioxidante de amaranto y se muestra que este pseudocereal exhibe una actividad antioxidante

principalmente por su contenido de polifenoles, antocianinas, flavonoides, y tocoferoles (Escudero et al., 2011). Además se ha revelado que es una fuente importante de hierro, calcio, magnesio y zinc, así como también de riboflavina, vitamina C, niacina, y tiamina (Becker et al., 1981). Un estudio llevado a cabo por Li et al. (2015) para determinar el contenido de fenoles totales en semillas de amaranto, encontró un contenido total fenólico desde 129 hasta 155 mg EAG/ 100g BS.

El alto valor nutritivo del amaranto es beneficioso en el tratamiento de anemias y desnutrición por lo que se recomienda que sea parte de la dieta, especialmente en mujeres embarazadas y niños; así también en el caso osteoporosis, y además el grano de amaranto ha sido probado y reconocido como un alimento libre de gluten por lo que se considera apto para incorporarse en la dieta de los pacientes con enfermedad celíaca (Becker et al., 1981; Chauhan et al., 2015; Yawadio Nsimba, Kikuzaki, & Konishi, 2008).



**Fotografía 3.** Amaranto  
**Fuente:** El autor

#### **1.4. Radicales libres, estrés oxidativo y antioxidantes**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, y debido a esto son muy reactivos y tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su propia estabilidad electroquímica (Youngson, 2003). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula que se lo cedió pierde su estabilidad y se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose de esa manera una verdadera reacción en cadena que provoca daños significantes en nuestras células (Uwalsky, 2006).

Según Olivares et al. (2010), los radicales libres, producidos normalmente durante el metabolismo aerobio se utilizan en diversos procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos. Cuando existen condiciones metabólicas normales también debe existir un balance entre los procesos oxidantes, donde hay producción de

radicales libres, y los sistemas de defensa antioxidante y reparación del daño oxidante, sin embargo cuando no se mantiene un balance entre estos, ya sea por la pérdida o disminución del sistema protector, por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno o por ambos factores simultáneamente, se dice que existe un estado de estrés oxidante, que ocasiona graves disfunciones metabólicas y posterior daño celular (Laguna, Piña, Martínez, Pardo, & Riveros, 2013). Estos radicales libres tienen una función fisiológica en el organismo, participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis, sin embargo, como ya se mencionó, estas moléculas son altamente reactivas, capaces de dañar a las diversas biomoléculas de nuestras células y provocar problemas importantes en las mismas (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ )
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ )
- Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

Nuestro cuerpo sufre diariamente el ataque de los radicales libres con los consiguientes problemas de salud, entre otras enfermedades, promueven la arteriosclerosis, el cáncer y envejecimiento prematuro de la piel (Ortemberg, 2004). Además diversos estudios relacionan a los radicales libres con el envejecimiento y se propone que la pérdida de funciones celulares que acarrea el envejecimiento es el resultado de la acumulación del daño oxidante ocasionado por los radicales libres sobre los distintos componentes celulares (Laguna et al., 2013).

Por otro lado, los antioxidantes son compuestos químicos que interactúan con los radicales libres uniéndose a los mismos, para neutralizarlos y favorecer a su eliminación (Ortemberg, 2004). Son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres (López et al., 2012), y de esta manera detienen o inhiben significativamente el estrés oxidativo (Laguna et al., 2013).

Para que una sustancia sea considerada antioxidante, tendría que ser capaz, en cantidades bajas, de competir con otros sustratos oxidables y por tanto, retrasar o inhibir la oxidación de

dichos sustratos, además, deben tener alta efectividad y versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de especies de radicales libres (González & Cavia, 2011).

Debido a que el cuerpo no puede formar antioxidantes de forma espontánea, sino que se los debe consumir en la dieta, estos compuestos presentan un alto interés nutricional, por su contribución al mantenimiento de la salud debido a las propiedades benéficas de su actividad antioxidante (Torres et al., 2008). Entre los nutrientes que parecen poseer propiedades antioxidantes se incluyen las vitaminas E, C y A, el  $\beta$ -caroteno, el selenio, entre otros (Thompson, Manore, & Vaughan, 2008).

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, se añaden a aceites y grasas, así como a alimentos, para prevenir la formación de colores y sabores no deseables y de otros compuestos que se originan en la oxidación de los lípidos (Maestro & Borja, 1993). Los antioxidantes sintéticos más usados son el terbutil-hidroxi-tolueno, el terbutil-hidroxi-anisol y la terbutil-hidroxi-quinona (Derache, 1990).

Los antioxidantes sintéticos mencionados han presentado muchos inconvenientes, lo que ha provocado que se compruebe su seguridad en los alimentos, y de igual manera ha provocado que las investigaciones se enfoquen en encontrar productos naturales con actividad antioxidante (Maestro & Borja, 1993). Entre los antioxidantes naturales podemos encontrar el ácido ascórbico (Vitamina C) y todos sus derivados, el palmitato de ascorbilo, y los tocoferoles (Kuklinski, 2003)

También cabe recalcar la importancia de los compuesto polifenólicos, los cuales son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta, y son producto del metabolismo secundario de las plantas, a las cuales también protegen del ataque de patógenos y herbívoros; y estructuralmente poseen anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante (Arranz-Martínez, 2010; Gimeno-Creus, 2004)

Durante los últimos años el interés en los compuestos fenólicos ha ido en aumento, debido a su efecto benéfico contra algunas enfermedades, como por ejemplo, ciertos cánceres y desordenes cardíacos, esto gracias a su poderosa actividad antioxidante (Gracia-Nava, 2000). Entre estos compuestos se destacan: alcoholes y ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, sus derivados y glucósidos, cumarinas, flavonoides y sus glucósidos, catequinas, taninos, entre otros (Maestro & Borja, 1993). Muchos científicos han comprobado el potencial antioxidante de los polifenoles en frutas y verduras y su relación en la disminución del riesgo de enfermedades degenerativas (Kaur & Kapoor, 2001), además de la existencia de la relación entre el consumo de alimentos de origen vegetal y los beneficios para la salud, por ejemplo,

la reducción en las tasas de enfermedades isquémicas del corazón, diabetes, ciertos tipos de cáncer, y la disminución del riesgo de obesidad, dislipemia e hipertensión (Sabaté, 2005).

Los sistemas enzimáticos y endógenos de defensa del organismo pueden ser insuficientes para neutralizar la acción oxidativa que provocan los radicales libres asociados al estrés oxidativo, y por tal motivo es sumamente importante el consumo de alimentos que sean considerados fuente de antioxidantes, y de esta manera evitamos o disminuimos los daños importantes en proteínas, lípidos y ADN provocados por los radicales libres (López & Medina, 2009).

Los alimentos de origen vegetal son una fuente importante de vitaminas antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno y vitamina C, aparte de otras sustancias fitoquímicas con potente efecto antioxidante como los compuestos fenólicos, por ejemplo, los flavonoides, los cuales son otras sustancias con propiedades antioxidantes contenidas en los productos vegetales, y según estudios epidemiológicos, una dieta de alimentos ricos en flavonoides protege contra enfermedades humanas asociadas con el estrés oxidativo (Nassourou et al., 2016). Las hierbas aromáticas y especias típicas de recetas mediterráneas como el perejil, laurel, tomillo, pimentón y orégano, también contienen abundantes compuestos fitoquímicos con potentes efectos antioxidantes (Rodés, Piqué, & Trilla, 2007).

### **1.5. Extracción de antioxidantes**

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos. Esta extracción va a depender de múltiples factores, por ejemplo, la naturaleza química, el grado de polimerización de los compuestos, del método de extracción, polaridad de los solventes, del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden interferir (Arranz-Martínez, 2010). Algo igualmente importante es el tiempo de contacto que deben tener las muestras con los disolventes, por ejemplo, según Krygier, Sosulski y Hogge (1982) el tiempo óptimo para la extracción de polifenoles libres y esterificados es de 50-60 minutos, con una mezcla de metanol/acetona/agua.

Existe una gran cantidad de disolventes utilizados para la extracción de antioxidantes en alimentos de origen vegetal, entre los más usados podemos destacar al metanol, etanol, acetona, y mezclas de los mismos con agua en diferentes proporciones. Uno de los más usados es la extracción de antioxidantes mediante dos tratamientos sucesivos con mezclas de distintos disolventes (metanol/agua 50:50 v/v pH 2 y acetona/agua 70:30 v/v) debido a su eficacia en alimentos de origen vegetal (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007). Según un estudio llevado a cabo por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2005), en una extracción de antioxidantes en salvado de trigo, los valores de la capacidad antioxidante que se obtuvieron

mediante la mezcla de disolventes antes mencionados fueron mayores a las que se obtuvieron solo con uno de estos dos disolventes o con acetona, metanol y etanol combinados con agua. Es habitual la utilización de disolventes acidificados (metanol/HCl) para una mejor extracción y estabilidad de antocianidinas y proantocianidinas (Krygier et al., 1982).

#### **1.6. Determinación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante ha sido generalmente reconocida como una herramienta para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto puro o de un extracto en los alimentos, así como también ser un índice útil para predecir la estabilidad oxidativa, pero también puede ser considerada como un índice de potenciales benéficos para la salud (Isaza, Restrepo, López, Ochoa, & Gil, 2010; Pellegrini et al., 2003)

La capacidad antioxidante total de una muestra está determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos, así como el modo de acción de cada uno de ellos, es por eso que es necesario combinar más de un método para que la evaluación de la capacidad antioxidante de una muestra sea más eficaz, y por tanto, se han desarrollado una gran cantidad de métodos para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos, basados en distintos aspectos, como la reducción de metales (FRAP), la capacidad de captación de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la desoxirribosa), de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH); por lo que muchos autores sugieren que al momento de evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, siempre se deben combinar al menos dos métodos, y que además estén basados en distintos fundamentos (Frankel & Meyer, 2000; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007)

Las técnicas que se han utilizado con mayor frecuencia para estimar las capacidades antioxidantes en los productos y alimentos de origen vegetal para estudios clínicos incluyen DPPH, ABTS y FRAP (Thaipong et al., 2006)

##### **1.6.1. DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil).**

El método fue descrito por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995). Este método se basa en la capacidad captadora de radicales libres de un extracto, reduciendo el catión DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) frente a los antioxidantes presentes en el compuesto estudiado, lo que provoca una decoloración del mismo, que puede ser medido a 515 nm (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007; Thaipong et al., 2006).

El radical DPPH es una especie de radical orgánico estable. El ensayo de DPPH se utiliza en todo el mundo en la cuantificación de la capacidad de captación de radicales. La capacidad de los reactivos biológicos para captar el radical DPPH, se puede expresar como su magnitud

de la capacidad antioxidante (Deng, Cheng, & Yang, 2011) . La solución de alcohol DPPH es de color morado oscuro, el cual desaparece en presencia de antioxidantes, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm. DPPH es hidrófoba por lo que sus reacciones deben ejecutarse en disolventes orgánicos, por ejemplo metanol (Schaich, Tian, & Xie, 2015).

### **1.6.2. ABTS.**

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzoatiazolín-6-sulfónico) (ABTS). Es un método descrito por Arnao, Cano y Acosta (1999) el cual mide la capacidad captadora de radicales libres a través de la decoloración del radical ABTS. Éste método es capaz de determinar propiedades antioxidantes tanto hidrofílicas y lipofílicas.

En este método, el color azul/verde radical  $ABTS^+$ , generado por la oxidación de ABTS con persulfato potásico, se reduce en presencia de antioxidantes, y el grado de decoloración se determina en un punto de tiempo fijo, por tanto, entre mayor es la capacidad antioxidante del polifenol, mayor es la decoloración generado sobre el ABTS (Re et al., 1999)

### **1.6.3. FRAP.**

El método FRAP fue desarrollado por Benzie y Strain (1996), el cual mide la capacidad que tiene un compuesto para reducir el Hierro férrico ( $Fe^{3+}$ ) del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso ( $Fe^{2+}$ ) por un antioxidante en medio ácido. Esta reacción produce un cambio de color que se puede determinar midiendo la absorbancia a 593 nm en 30 minutos (Thaipong et al., 2006), según el método original el cambio de color se da en 4 minutos, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos, debido a que a los 4 minutos el compuesto aún no ha reaccionado totalmente. Es uno de los métodos más populares debido a su simplicidad y consistencia, además de no requerir equipos sofisticados. Este método no se recomienda para compuestos lipofílicos debido a la incapacidad de los carotenoides para reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000; Benzie & Strain, 1996).

Cuanto mayor sea la cantidad de antioxidantes presentes en el compuesto estudiado, mayor es la reducción y mayor es la concentración de TPTZ- $Fe^{2+}$ , con lo cual también será más alta la absorbancia obtenida (Sulbarán et al., 2011). Básicamente los ensayos FRAP y  $ABTS^+$  son los mismos, debido a que ambos tienen como ventaja la transferencia de electrones usando una sal férrica con un potencial redox similar al usado en el ensayo  $ABTS^+$  (Preed & Watson, 2008).

### **1.7. Contenido de Fenoles Totales**

El contenido de fenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu, que fue adaptado por Swain y Hillis (1959). Este método consiste en la reacción entre el reactivo de Folin Ciocalteu de color amarillo y los grupos fenólicos presentes en la muestra, lo cual produce un complejo de color azul con máxima absorción a 725 nm (Isaza et al., 2010). Los compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, presentan una amplia ubicuidad en la naturaleza. Son responsables del buen funcionamiento de las plantas y, en su relación con el hombre, son utilizados para tratar desordenes cardiovasculares y prevenir algunos cánceres (Gracia-Nava, 2000). Es un método que se fundamenta en su carácter reductor y posterior neutralización con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , mientras que los resultados son expresados en equivalentes de ácido gálico (Thaipong et al., 2006).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Muestras

Se trabajó con tres tipos de especies vegetales: amaranto, zarandaja y firigüelo. A su vez, dos muestras de cada especie vegetal, provenientes de lugares distintos una de la otra: dos muestras de amaranto, una proveniente de la parroquia Perucho en Pichincha y la otra del cantón Celica perteneciente a Loja; dos muestras de zarandaja, una proveniente de la parroquia Malacatos en el cantón Loja y la otra del cantón Zapotillo; y dos muestras de firigüelo, provenientes de los cantones Macará y Celica en la provincia de Loja. Las muestras mencionadas fueron obtenidas tanto en el mercado mayorista y en el mercado central, ubicados en la ciudad de Loja.

## 2.2. Reactivos

Los reactivos utilizados para la extracción de antioxidantes, determinación de la capacidad antioxidante y fenoles totales, se detallan a continuación, así como la marca y concentración de cada uno de ellos:

- **Extracción de antioxidantes:** Metanol (99,9% PAI-ACS), acetona (99,8%) , ácido clorhídrico (37% PQ).
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Sigma), (ácido 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) (97%) (Trolox) (Aldrich Chemistry).
- **ABTS:** 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (>98%) (Sigma), persulfato de potasio (99% USP) (Sigma- Aldrich), (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) (97%) (Trolox) (Aldrich Chemistry).
- **FRAP:** 2, 4, 6 - tripiridil-s-triazina (<98%) (TPTZ) (Sigma), acetato de sodio trihidratado (USP) (Merck), ácido clorhídrico (37% PQ) (Sigma-Aldrich), cloruro férrico hexahidratado (USP) (Merck).
- **Determinación de Fenoles totales:** Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), carbonato de sodio (ISO) (Merck), ácido gálico (97.5-102.5%) (Sigma), metanol (99,9% PAI-ACS).

## 2.3. Método Experimental

### 2.3.1. Preparación de las muestras.

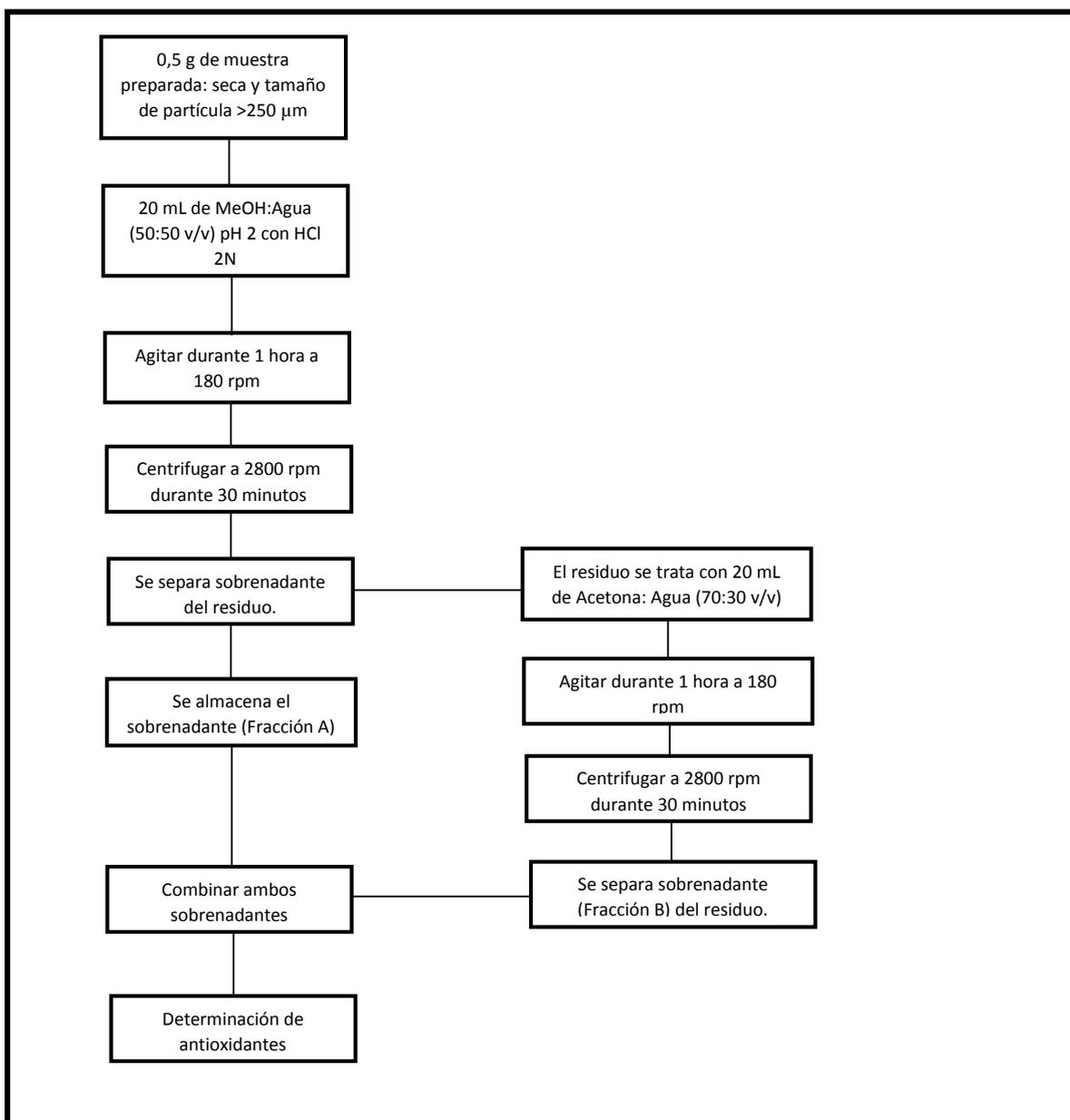
Los análisis se realizaron sobre muestras de polvo seco del material vegetal. Por lo que se procedió a triturar las muestras. Al tratarse de una materia prima con una textura dura, no hubo problema en la trituration y el tamizaje. Las muestras se trituraron a 1400 rpm usando un molino vibratorio de discos marca RETSCH y posteriormente se tamizó en un tamizador automático marca J. ENGELSMANN hasta un tamaño de partícula de menor a 250 µm. Las muestras que no se usaron inmediatamente fueron empacadas al vacío (Saura-calixto & Pérez Jiménez, 2007).

### **2.3.2. Determinación de humedad.**

Para la determinación de la humedad se utilizó el método descrito por la norma NTE INEN 712 (2013). Una vez que las muestras fueron trituradas y tamizadas, se procedió a determinar la humedad de cada muestras; cabe recalcar que este proceso se llevo a cabo por duplicado. Se usó una estufa de marca Memmert, a temperaturas de 130°C. Previamente se secó durante 24 horas las cápsulas a usar. Se registró el peso de las cápsulas secas. Se colocó la cantidad de 2 g de muestra en cada cápsula, y se procedió al anotar el peso que registraba la balanza analítica. Luego las cápsulas con la muestra aún sin pérdida de humedad se llevaron a la estufa a una temperatura de 130°C, pasada 1 hora se sacaron las cápsulas y se dejó enfriar por 45 minutos en un desecador, para que de esa manera las muestras no ganen humedad del ambiente. Pasado ese tiempo se volvió a pesar y a registrar los pesos resultantes. Se realizó este procedimiento continuamente hasta que la diferencia entre los dos últimos pesos registrados no sobrepasen los 0,01g. Los cálculos para determinar la humedad se detallan en el anexo A.

### **2.3.3. Extracción de antioxidantes.**

Para extraer los antioxidantes de las muestras, se empleó el método descrito por Saura-Calixto y Pérez Jiménez (2007). Cabe recalcar que todo el proceso se realizó por triplicado. Se pesó 0,5 g de muestra seca, y se colocó dentro de tubos de centrifuga. La muestra se puso en contacto con 20 mL de metanol/agua (50:50 v/v, pH 2, acidificado con HCl 2N), y se mezcló en el agitador horizontal marca GFL durante 1 hora a 180 rpm. Luego se procedió a centrifugar en una centrifuga marca DINAC a 2800 rpm durante 30 minutos. Una vez centrifugado se separó el sobrenadante del residuo, obteniéndose la fracción A. El residuo se puso en contacto con 20 mL de acetona/agua (70:30 v/v), y se agitó nuevamente durante 1 hora a 180 rpm, para luego centrifugarlo por otros 30 minutos a 2800 rpm. Tras la centrifugación se separó nuevamente el sobrenadante del residuo, obteniéndose la fracción B. Ambos sobrenadantes (fracciones A y B) se mezclaron y se obtuvo el extracto en el cual se llevará a cabo la determinación de la capacidad antioxidante y de fenoles totales, efectuándose directamente tomando alícuotas del mismo (Jiménez-Escrig, Jiménez-Jiménez, Pulido, & Saura-Calixto, 2001). El proceso descrito se detalla en la Figura 1.



**Figura 1.** Preparación de extractos para la determinación de la capacidad antioxidante.

**Fuente:** Saura-calixto y Pérez Jiménez, (2007)

**Elaborado por:** El autor

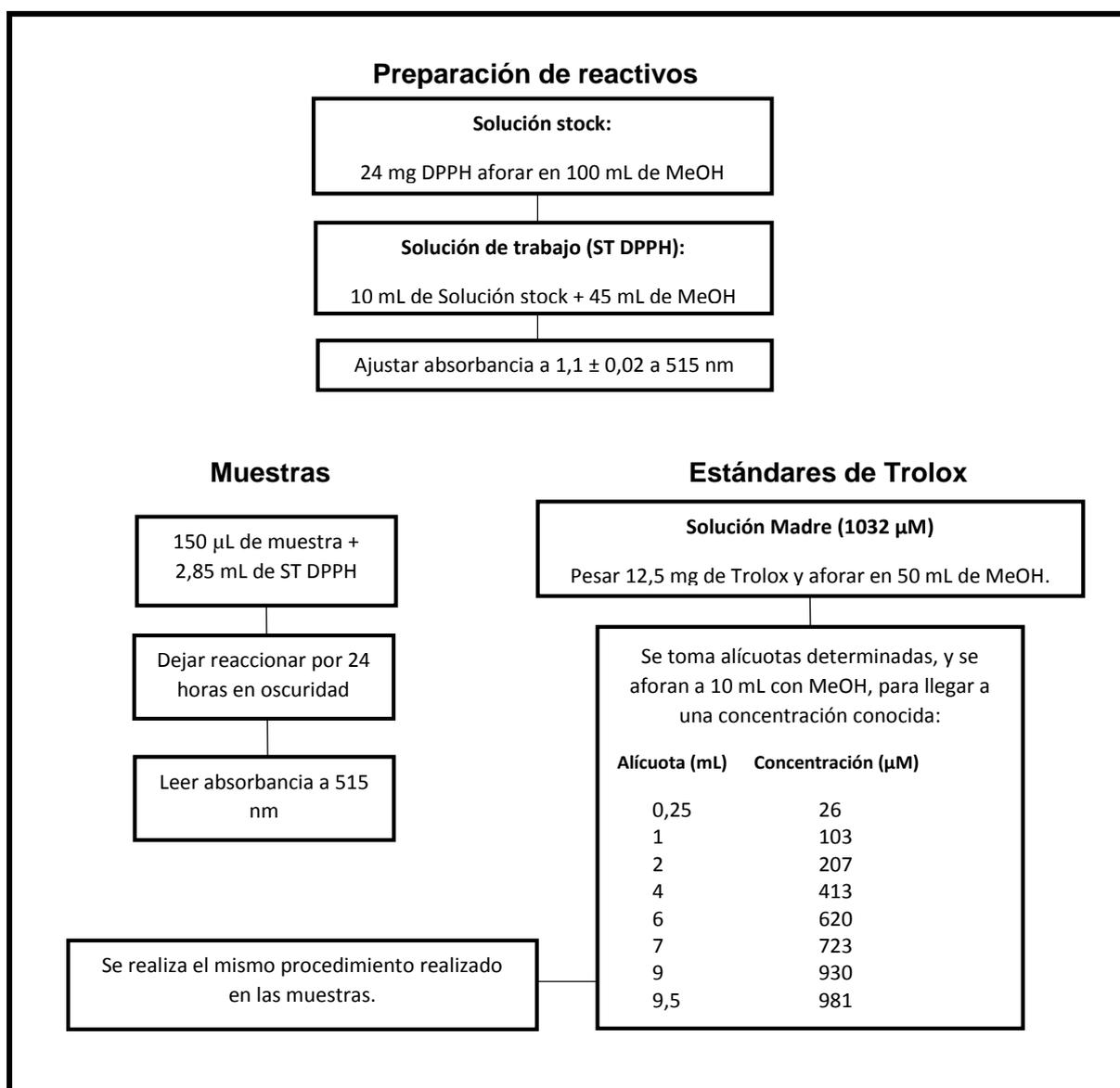
### 2.3.4. Cuantificación de la capacidad antioxidante.

Los métodos usados en este estudio se han utilizado con frecuencia para estimar la capacidad antioxidante en alimentos e incluyen: ABTS, DPPH y FRAP (Thaipong et al., 2006).

#### 2.3.4.1. DPPH.

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH, se usó el método empleado por Brand-Williams et al. (1995), con modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). En la figura 2 se describe la preparación de los reactivos, así

como el procedimiento del mismo. La curva estándar fue lineal entre 25 y 800  $\mu\text{M}$  de Trolox. Los resultados se expresaron como micromoles equivalente de trolox por gramo de muestra en base seca ( $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra BS). Los cálculos y datos se detallan en el Anexo B.



**Figura 2.** Diagrama del método DPPH.

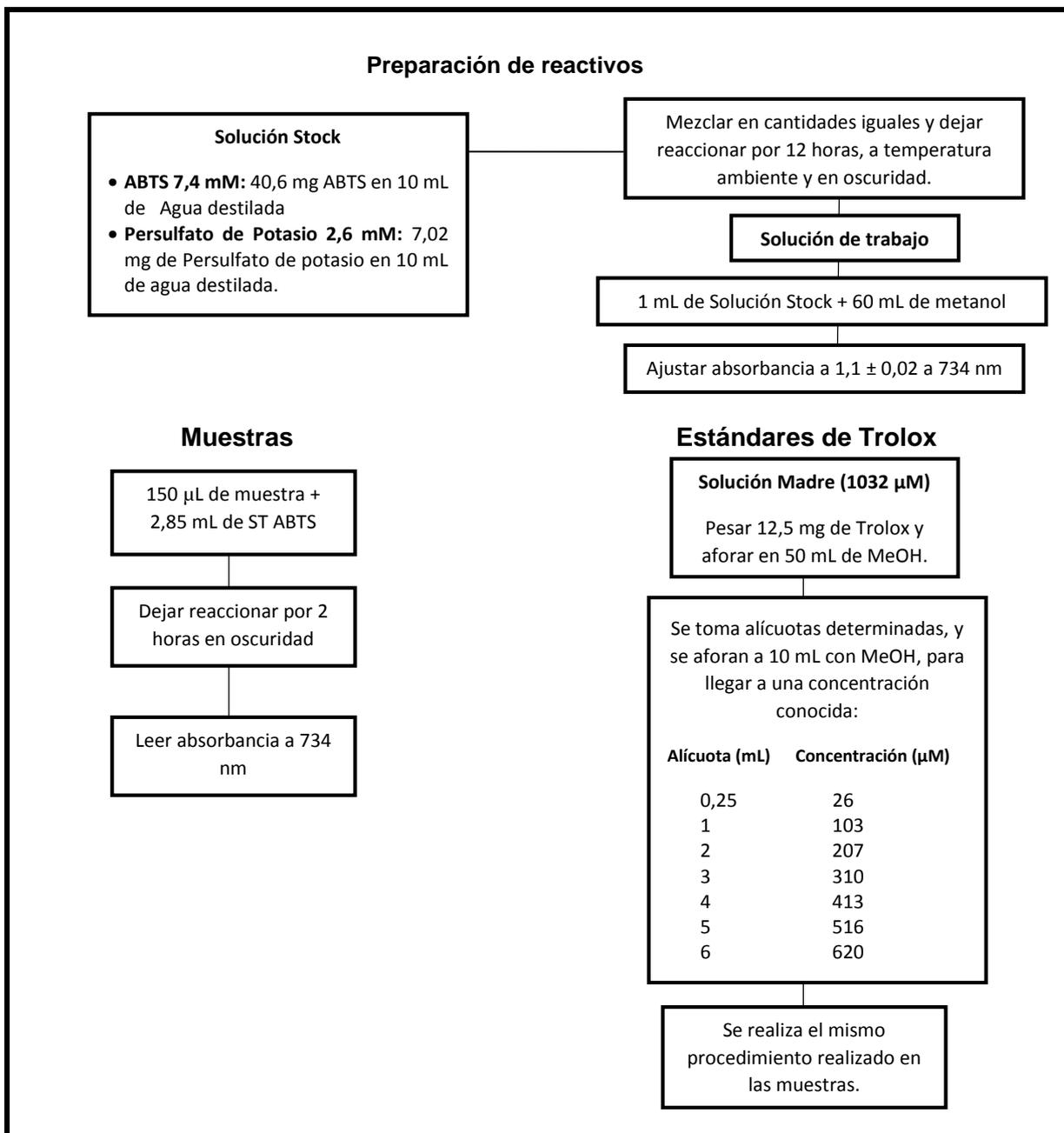
**Fuente:** Brand-Williams et al. (1995); Thaipong et al. (2006)

**Elaborado por:** El autor

#### 2.3.4.2. ABTS.

El método usado fue el descrito por Arnao et al. (1999) con algunas modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). En la figura 3 se describe la preparación de los reactivos para este método, así como el procedimiento del mismo. Se usó un blanco con metanol para calibrar el espectrofotómetro a cero. La curva estándar fue lineal entre 25

y 600 mM de Trolox. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra BS. Los cálculos y datos se detallan en el Anexo C.

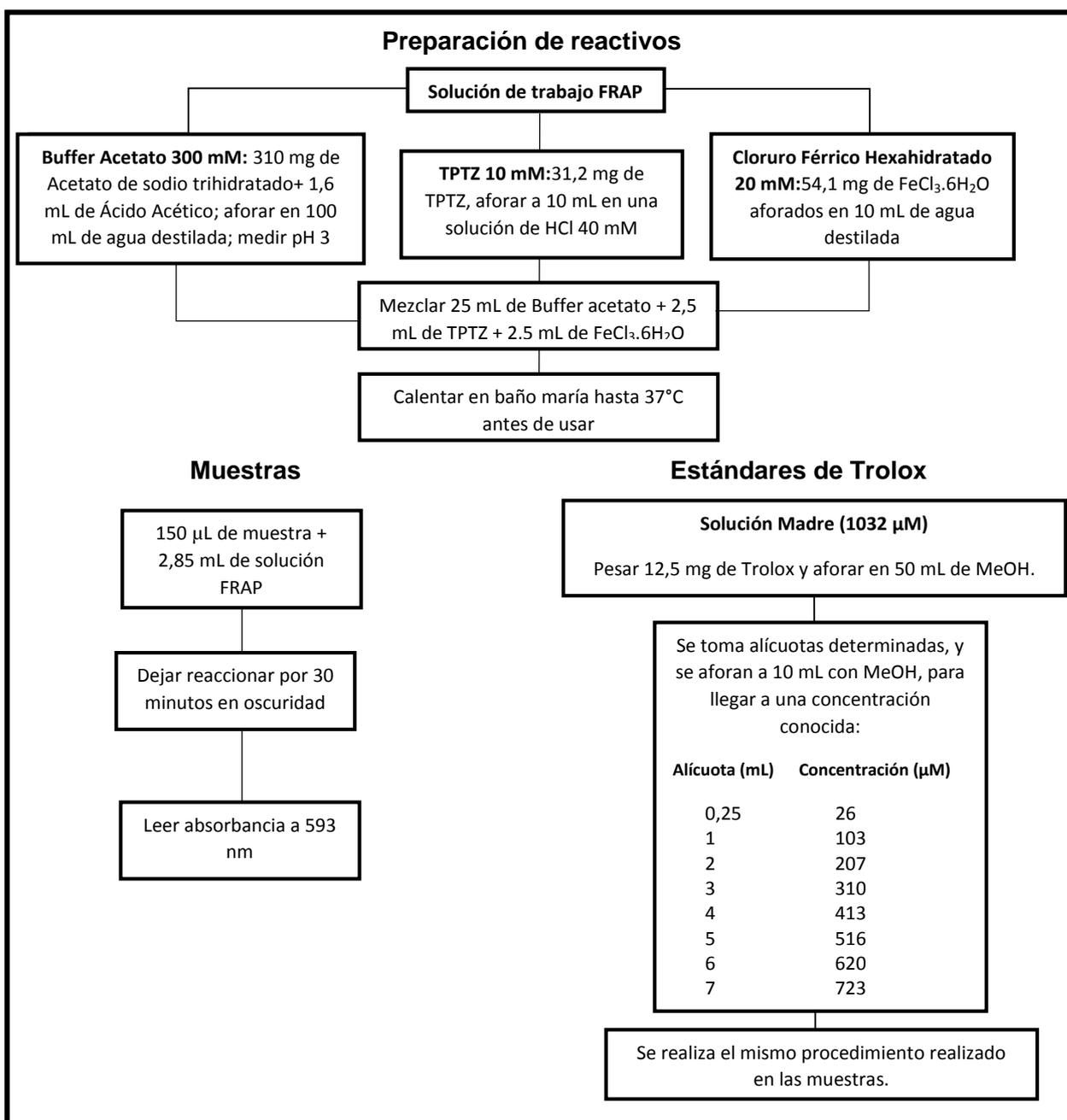


**Figura 3.** Diagrama del método ABTS.  
**Fuente:** Arnao et al. (1999); Thaipong et al. (2006)  
**Elaborado por:** El autor

#### 2.3.4.3. Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).

La determinación de la capacidad antioxidante mediante FRAP fue realizada mediante el método descrito por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). En la Figura 4 se describe la preparación de los reactivos y también el procedimiento del mismo. La curva estándar fue lineal entre 25 y 800 mM de

Trolox. Los resultados se expresan en  $\mu\text{mol TE/g}$  de muestra BS. Los cálculos y datos se detallan en el Anexo D.



**Figura 4.** Diagrama del método FRAP.

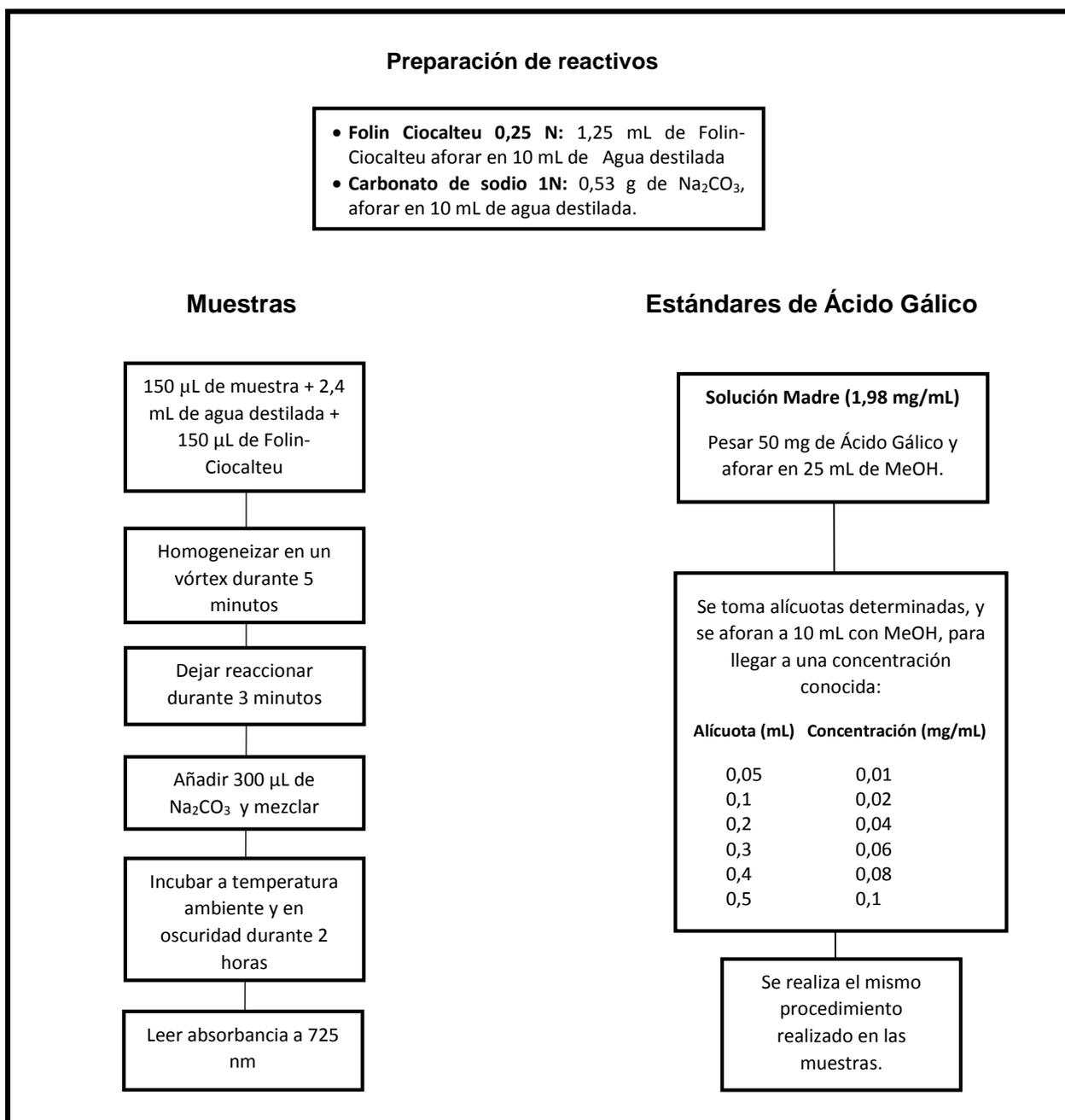
**Fuente:** Benzie y Strain (1996); Thaipong et al. (2006)

**Elaborado por:** El autor

### 2.3.5. Determinación de fenoles totales.

La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método Folin- Ciocalteu, que fue descrito por Swain y Hillis (1959). La preparación de los reactivos y el procedimiento del método se describe en la Figura 5. La absorbancia se midió a 725 nm, y los

resultados se expresan en equivalente de Ácido Gálico (EAG mg/100 g de muestra BS). Para la curva de calibración se usó una solución madre de ácido gálico en concentraciones de 0- 0,1 mg/mL. Los cálculos y datos se detallan en el Anexo E.



**Figura 5.** Diagrama del proceso de determinación de Fenoles Totales.

**Fuente:** Swain y Hillis (1959)

**Elaborado por:** El autor.

#### 2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante y fenoles totales se expresaron como media ± desviación típica y fueron analizados estadísticamente a través del programa Minitab 16, mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test de

rango múltiple (Tukey), con nivel de confianza del 95%, para determinar si existió diferencia significativa de la cantidad de compuestos antioxidantes entre cada tipo de muestra y entre las mismas muestras de distintos lugares de procedencia (Anexo F).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación se detallan los resultados de cada uno de los análisis para la determinación de la capacidad antioxidante y fenoles totales, y se comparó los mismos con estudios previos realizados en las mismas especies vegetales estudiadas. Es muy importante mencionar que al no encontrarse estudios realizados bajo las mismas condiciones de extracción usadas en la presente investigación, se procedió a comparar los resultados obtenidos con estudios previos que más se asemejaban. Como se mencionó anteriormente, el proceso de extracción de antioxidantes es sumamente importante y se ve afectada por múltiples factores, por ejemplo, polaridad de los solventes seleccionados, tamaño de partícula de la muestra y sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia (Arranz-Martínez, 2010).

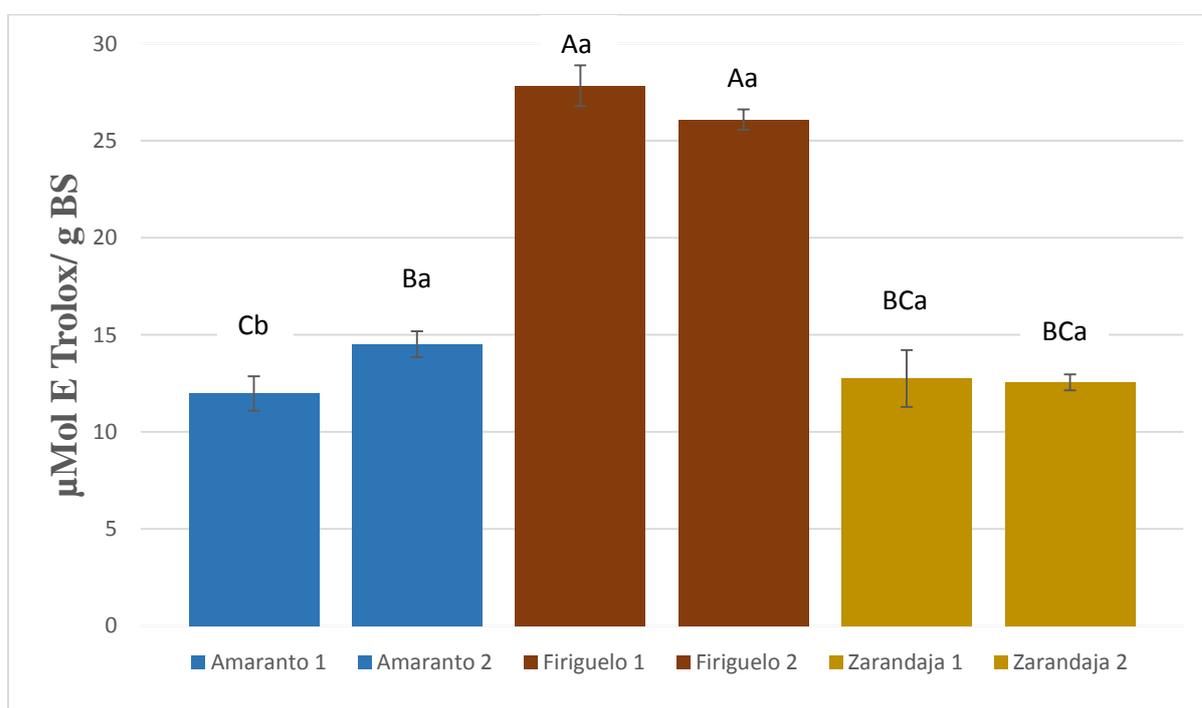
### **3.1. Análisis DPPH**

En la gráfica 1 se muestra la capacidad antioxidante medida por la captación de radicales (DPPH) en muestras de firigüelo, zarandaja y amaranto. Los resultados mostraron una mayor ( $p < 0,05$ ) capacidad antioxidante en las muestras de firigüelo, superando a las muestras de zarandaja y amaranto. El firigüelo obtuvo  $27,8 \pm 1,05$  y  $26,1 \pm 0,53$   $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, las cuales fueron estadísticamente iguales entre sí ( $p > 0,05$ ). A pesar de que no se encontró estudios previos con condiciones iguales a las de esta investigación en cuanto al proceso de extracción de antioxidantes, los resultados obtenidos en este caso pueden compararse a los encontrados por Zia-Ul-Haq, Ahmad, Amarowicz y De Feo (2013), en donde determinaron que los valores de la capacidad antioxidante del firigüelo oscilan en un rango de 25,1 hasta 32,5  $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$ . Y aunque las muestras analizadas en el presente estudio, y las analizadas en los estudios de referencia pertenecen a sitios muy alejados geográficamente, los resultados son muy similares entre sí, habiendo cierta diferencia que puede atribuirse a las condiciones de extracción mencionadas, como la selección de solventes, tamaño de partícula de la muestra, entre otros (Arranz-Martínez, 2010).

Por otro lado, las muestras de zarandaja mostraron resultados de  $12,8 \pm 1,46$  y  $12,6 \pm 0,41$   $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, las mismas que fueron iguales estadísticamente ( $p > 0,05$ ). Si comparamos con un estudio llevado a cabo en China por Wang et al. (2016), nuestros resultados van ser mayores, ya que en dicho estudio determinaron que la capacidad antioxidante de la zarandaja fue de  $4,8 \pm 0,05$   $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$ ; mientras que en otro estudio, realizado en el mismo país por Yao, Cheng, Wang, Wang y Ren (2011), se obtuvieron resultados de  $28,01 \pm 1,17$   $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$ . Nuevamente, esta diferencia entre los resultados puede ser explicada por las condiciones de la extracción, por ejemplo, en el último ensayo mencionado, hicieron, al igual que en el presente estudio una doble extracción, con la diferencia de que se usaron una mezcla de metanol/agua y dos horas

de maceración en cada extracción, además de un menor tamaño de partícula. Todos estos factores pueden ser la razón de que la eficacia de la extracción varíe y con esto, los resultados del mismo (Arranz-Martínez, 2010).

Finalmente, las muestras de amaranto mostraron una capacidad antioxidante de  $12 \pm 0,89$  y  $14,5 \pm 0,66$   $\mu\text{Mol Trolox/ g BS}$  la primera y segunda muestra respectivamente, siendo superior la muestra proveniente de Celica ( $p < 0,05$ ). Estos resultados muestran gran similitud con los obtenidos por Kraujalis et al. (2013), en donde determinaron la capacidad antioxidante en dos tipos de extractos de grano de amaranto. En el primer extracto se usó solamente acetona como solvente, y mostró un resultado de  $14.6 \pm 0.65$   $\mu\text{Mol Trolox/ g BS}$ ; mientras que en el segundo extracto, el cual fue realizado con una mezcla de metanol/agua (70:30), se obtuvo  $9.5 \pm 0.73$   $\mu\text{Mol Trolox/ g BS}$ . El segundo extracto realizado en el estudio mencionado muestra resultados menores a los obtenidos en el presente estudio, lo que se atribuye nuevamente a la selección de solventes en el proceso de extracción, ya que según Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2007), es recomendable que, en productos vegetales, se utilice al menos dos mezclas de solventes de distinta polaridad para que exista una extracción de antioxidantes más completa y eficaz.



Las medias entre columnas del mismo color que no comparten una misma letra minúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), en función del lugar de procedencia de la muestra. Las medias entre columnas que no comparten una misma letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en función de todos los tipos de muestras.

**Gráfica 1. Análisis DPPH en amaranto, firigüelo y zarandaja.**

Elaborado por: El autor

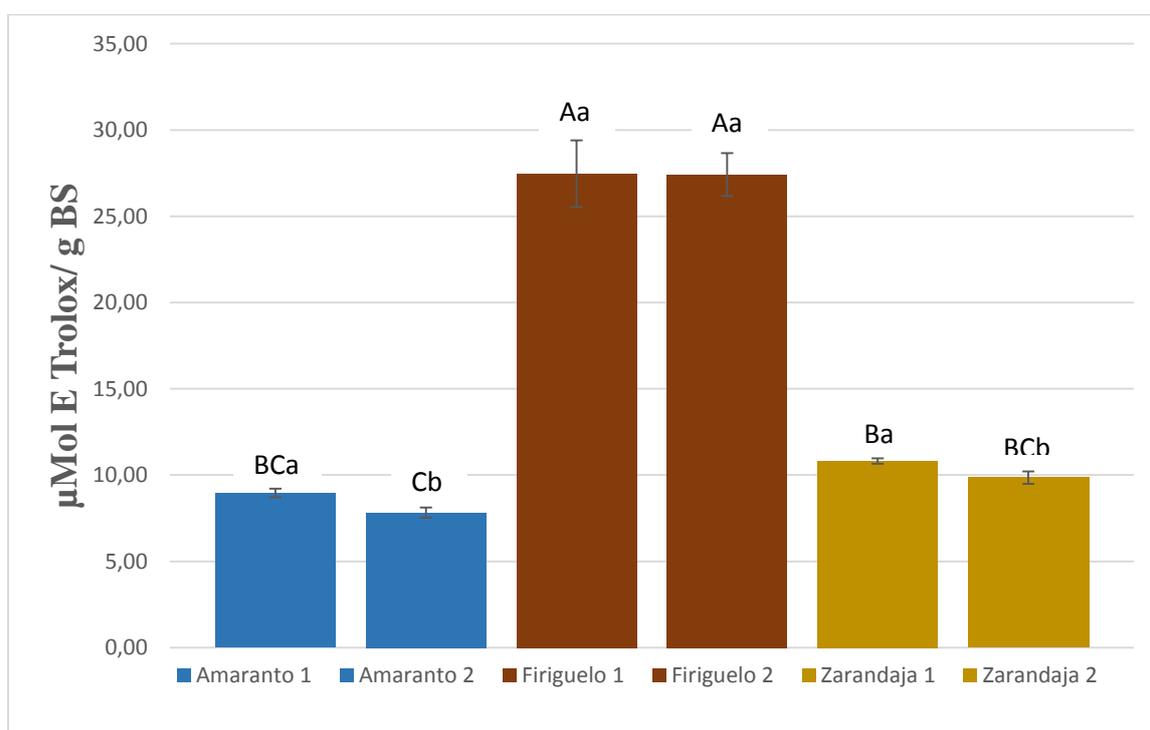
### 3.2. Análisis ABTS

En la gráfica 2 se muestra la capacidad antioxidante de firigüelo, zarandaja y amaranto. Los resultados entre las tres especies vegetales estudiadas nuevamente determinaron una mayor ( $p < 0,05$ ) capacidad antioxidante en las muestras de firigüelo, obteniéndose:  $24,31 \pm 1,71$  y  $25 \pm 1,12$   $\mu\text{mol Trolox/ g BF}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, las mismas que estadísticamente fueron similares ( $p > 0,05$ ). Estos resultados superan muy levemente a los obtenidos por Deng et al. (2013), los cuales determinaron la capacidad antioxidante en distintas legumbres, entre éstas el firigüelo y obtuvieron un resultado de  $21,01 \pm 1,11$   $\mu\text{mol Trolox/ g muestra BF}$ . Por otro lado, un estudio llevado a cabo en legumbres de la India, clasificó a las legumbres en función de sus valores de equivalentes de Trolox para la capacidad antioxidante: bajo ( $< 6,0$   $\mu\text{mol ETrolox/g}$ ), moderado ( $6,0$  a  $12,0$   $\mu\text{mol ETrolox/g}$ ) y alto ( $> 12,0$   $\mu\text{mol ETrolox/g}$ ); y clasificó al firigüelo como una legumbre con moderado potencial antioxidante (Marathe et al., 2011); según esta clasificación los resultados encontrados para el firigüelo en esta investigación serían altos. La diferencia entre los resultados obtenidos y los encontrados en ambos estudios previos se puede atribuir nuevamente a las condiciones de extracción, que se ve determinada por diversos factores, por ejemplo, en este caso se presume fue la selección de solventes la que produjo esta diferencia (Arranz-Martínez, 2010). En el presente estudio se realizaron dos extracciones sucesivas con mezcla de disolventes de distinta polaridad, además de una doble maceración dinámica; mientras que en el primer estudio mencionado, se realizó simplemente una extracción con una mezcla de tetrahidrofurano/agua, además cabe destacar que el tetrahidrofurano tiene menor polaridad que los solventes usados en el presente estudio (Deng et al., 2013); mientras que en el segundo estudio la extracción se realizó con una mezcla de metanol/agua (Marathe et al., 2011). Según bibliografía lo más recomendable, en productos vegetales, es que en el momento de la extracción de antioxidantes se use al menos dos mezclas de solventes de distinta polaridad y de esa forma la extracción será más eficaz (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007); a esto se atribuye que los resultados obtenidos en el presente estudio excedan a los encontrados en los dos estudios anteriormente mencionados.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las muestras de zarandaja fueron:  $9,57 \pm 0,13$  y  $8,82 \pm 0,3$   $\mu\text{mol Trolox/ g BF}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, siendo mayor ( $p < 0,05$ ) la primera muestra proveniente de la parroquia Malacatos. Estos resultados sobrepasan a los obtenidos en el estudio anteriormente mencionado, en legumbres de la India, en el que se analizaron 2 variedades de zarandaja: blanca y crema, clasificando a este alimento como bajo en capacidad antioxidante, con resultados de  $3.4 \pm 0.05$  y  $4.6 \pm 0.24$   $\mu\text{mol Trolox/ g BF}$ , respectivamente (Marathe et al., 2011). Según esta clasificación, los resultados

obtenidos en el presente estudio se considerarían moderados. La diferencia entre los valores obtenidos, puede atribuirse nuevamente al tipo de solventes usados en el proceso de extracción, ya que las mezclas de solventes usadas en el presente estudio han proporcionado los mejores resultados en la extracción de antioxidantes en diversos productos vegetales (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007),

En los que respecta a las muestras de amaranto, se obtuvieron los siguientes resultados:  $8,96 \pm 0,25 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$  y  $7,83 \pm 0,29 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$ , la primera y la segunda muestra respectivamente, en este caso siendo superior ( $p < 0,05$ ) la primera muestra proveniente de Pichincha. Estos resultados superan a los obtenidos en un estudio llevado a cabo en plantas de la región andina peruana, en el que se encontró un resultado de  $3,7 \pm 0,1 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$ . Cabe recalcar que en el estudio anteriormente mencionado, se utilizó solamente una mezcla de metanol/agua en la extracción de los compuestos antioxidantes, lo que explica que el resultado sea menor que el revelado en el presente estudio, además de la fuente del origen de las muestras usadas, al igual que en el resto de productos analizados (Chirinos, Pedreschi, Rogez, Larondelle, & Campos, 2013).



Las medias entre columnas del mismo color que no comparten una misma letra minúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), en función del lugar de procedencia de la muestra. Las medias entre columnas que no comparten una misma letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en función de todos los tipos de muestras.

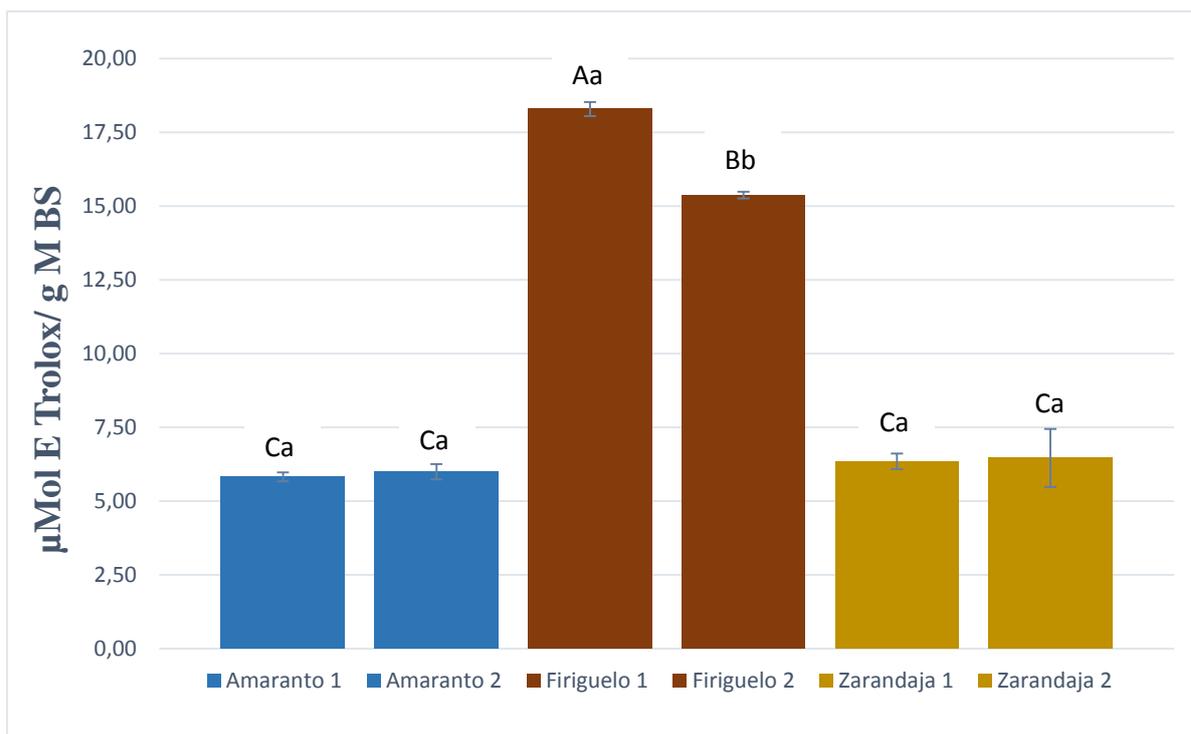
**Gráfica 2. Análisis ABTS en amaranto, firigüelo y zarandaja.**  
Elaborado por: El autor

### 3.3. Análisis del Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP)

En la gráfica 3 se observa la capacidad antioxidante cuantificada mediante el método FRAP, en muestras de firigüelo, zarandaja y amaranto. Los resultados una vez más muestran una mayor ( $p < 0,05$ ) capacidad antioxidante encontrada en el firigüelo, los resultados obtenidos en el mismo fueron:  $16,20 \pm 0,21$  y  $14,03 \pm 0,1$   $\mu\text{mol Trolox/ g BF}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, siendo significativamente distintos ( $p < 0,05$ ), y siendo superior la muestra proveniente de Macará. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en un estudio realizado en vegetales en Africa, en el que obtuvieron resultados de  $5,80 \mu\text{mol Trolox/ g BF}$  (Katerere, Graziani, Thembo, & Nyazema, 2012). El estudio mencionado muestra una capacidad antioxidante menor al encontrado en el presente estudio, lo que puede ser atribuido, nuevamente, a la selección de los solventes, y otros factores en el proceso de extracción, por ejemplo, en el estudio mencionado se llevó a cabo una sola extracción con una mezcla de metanol/agua, además de no existir maceración en el proceso; mientras que en el presente estudio las condiciones para la extracción fueron más eficientes (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007).

Por otro lado, los resultados encontrados en zarandaja fueron de  $6,35 \pm 0,27 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$  y  $6,47 \pm 0,98 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$ , la primera y segunda muestra respectivamente, siendo estadísticamente similares entre sí ( $p > 0,05$ ). Estos resultados son muy similares a los encontrados por Wang et al. (2016) en el cual se encontró  $5.187 \pm 0.11 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$  en un extraco etanólico de granos de zarandaja.

Mientras que las muestras de amaranto fueron iguales estadísticamente ( $p > 0,05$ ) mostrando una capacidad antioxidante de  $5,83 \pm 0,15$  y  $6,0 \pm 0,26 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$ , la primera y segunda muestra respectivamente; estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Birosová (2012), el cual determinó la capacidad antioxidante en extractos de varios pseudocereales, entre ellos el amaranto, en donde obtuvo  $3,31 \pm 0,15 \mu\text{mol Trolox/ g BS}$ . Los resultados de este estudio son menores a los de nuestra investigación, lo que puede deberse, nuevamente, a la selección de solventes, ya que en el estudio mencionado, los solventes usados en la extracción fueron etil-acetato y DMSO, además de no existir maceración dinámica en el proceso, ni un adecuado tamaño de partícula; factores que influyen en la extracción y posteriormente en los resultados obtenidos (Arranz-Martínez, 2010; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007).



Las medias entre columnas del mismo color que no comparten una misma letra minúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), en función del lugar de procedencia de la muestra. Las medias entre columnas que no comparten una misma letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en función de todos los tipos de muestras

### Gráfica 3. Análisis FRAP en amaranto, firigüelo y zarandaja.

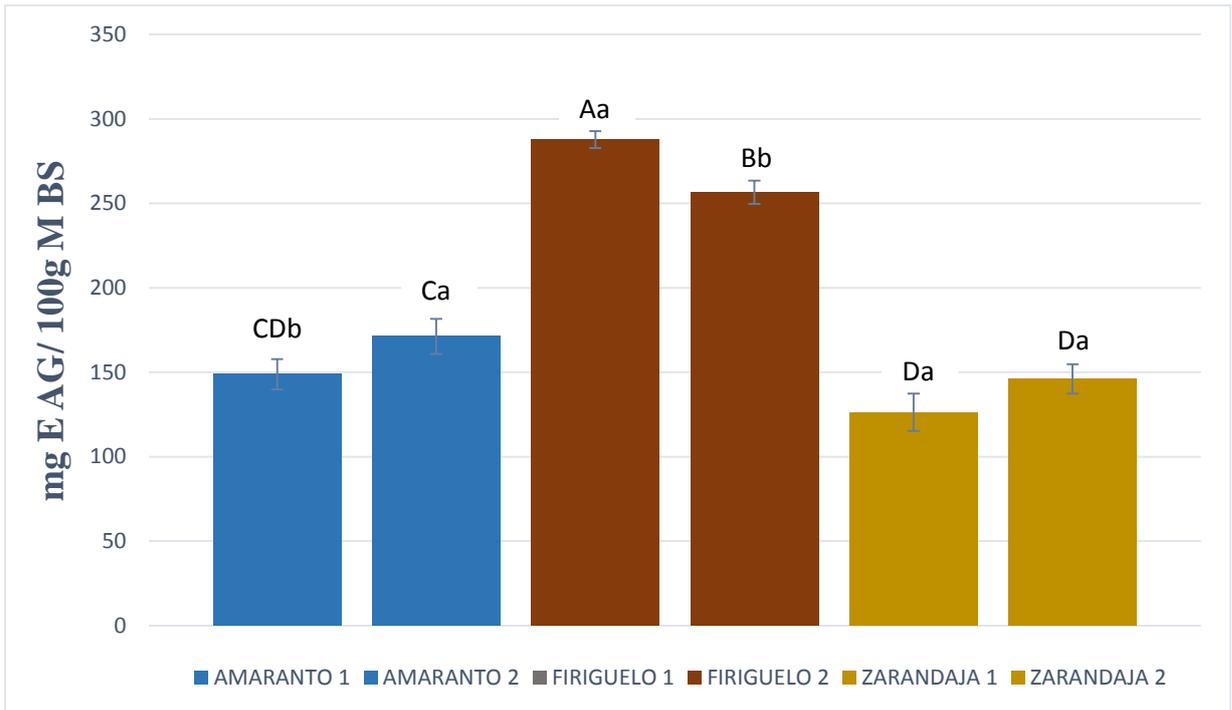
Elaborado por: El autor

### 3.4. Análisis de Fenoles Totales

En la gráfica 4 se observa el contenido total de compuestos fenólicos presentes en las muestras de firigüelo, zarandaja y amaranto. La muestra que mostró mayor ( $p < 0,05$ ) cantidad de compuestos fenólicos fue el firigüelo, con:  $287,7 \pm 5$  y  $256,6 \pm 6,8$  mg EAG/ 100g BS, la primera y segunda, respectivamente, siendo la muestra de Macará la que exhibe mayor ( $p < 0,05$ ) potencial antioxidante. Estos resultados son muy similares a los encontrados por Xu y Chang (2012), en donde la cantidad de fenoles totales va en un rango de  $214 \pm 2$  mg EAG/ 100 g muestra. La extracción de compuestos fenólicos en el estudio mencionado fue hecho con una mezcla de acetona y agua, lo que explica que en nuestro estudio los resultados son mayores, esto debido a que, los compuestos fenólicos, como flavonoides, pueden ser extraídos con solventes polares (Gracia-Nava, 2000), y en nuestro caso se usó la mezcla de metanol/agua como primera extracción, seguido de una segunda extracción con acetona/agua, para asegurar una extracción más eficaz (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007), ya que la acetona es considerado un solvente intermedio entre los muy polares y los no polares por lo que puede extraer conjuntamente sustancias polares y no polares (Nuñez, 2008).

Por otro lado, la zarandaja, mostró una cantidad menor ( $p < 0,05$ ) de compuestos fenólicos respecto al firigüelo, como en todos los demás casos, esta vez la zarandaja obtuvo una cantidad de fenoles totales de  $112 \pm 9,7$  y  $131 \pm 7,8$  mg EAG/ 100g BF, respectivamente la primera y segunda muestra, siendo ambos estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ). En un estudio anteriormente mencionado, en relación al contenido de fenoles totales, clasifica a ciertas legumbres en función de la cantidad de equivalentes de ácido gálico que presenten: bajo contenido fenólico ( $< 100$  mg EAG/100 g BF), moderado contenido fenólico (100-200 mg EAG/100 g BF) y alto contenido fenólico ( $> 200$  mg EAG/100 g BF) (Marathe et al., 2011). Según el mismo artículo, la zarandaja se categoriza como un alimento de bajo contenido fenólico, con un rango de 32,5-69,3 mg EAG/100 g BF, por debajo del firigüelo, el cual muestra un contenido fenólico moderado. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, se observa diferencia entre estos, ya que si clasificamos nuestros resultados de acuerdo al estudio anteriormente mencionado, la zarandaja mostraría un contenido fenólico moderado y el firigüelo un contenido fenólico alto. Esta diferencia puede atribuirse una vez más a las condiciones de extracción, ya que en el estudio mencionado se usó solamente metanol/agua para la extracción, además que el tamaño de partícula fue de casi 3 veces superior al usado en el presente estudio, y debido a estos factores la extracción fue menos eficiente que la nuestra (Arranz-Martínez, 2010; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007).

Finalmente, el amaranto, mostró un contenido fenólico total de  $148,9 \pm 9$  y  $171,3 \pm 10,4$  mg EAG/ 100g BS, la primera y segunda muestra respectivamente, siendo la muestra de Celica superior a la de Pichincha ( $p < 0,05$ ). Estos resultados son muy similares a los resultados obtenidos por Li et al. (2015) en tres variedades de semillas de amaranto, en el cual muestran un contenido fenólico en un rango de 129- 155 mg EAG/ 100g. Hay que recalcar nuevamente la importancia de la elección de los solventes dentro del proceso de extracción, por ejemplo, en el ensayo mencionado se realizó la extracción con metanol al 80%, esto podría explicar que nuestros resultados son superiores a los del ensayo mencionado.



Las medias entre columnas del mismo color que no comparten una misma letra minúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), en función del lugar de procedencia de la muestra. Las medias entre columnas que no comparten una misma letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en función de todos los tipos de muestras

**Gráfica 4. Análisis de Fenoles Totales en amaranto, firigüelo y zarandaja.**

Elaborado por: El autor

## CONCLUSIONES

- Todas las legumbres analizadas demostraron ser una fuente importante de antioxidantes, especialmente el firigüelo, el cual mostró el mayor ( $p < 0,05$ ) potencial antioxidante entre las especies estudiadas.
- De las muestras de firigüelo, el que mostró mayor capacidad antioxidante fue el proveniente de Macará, el cual superó ( $p < 0,05$ ) a los resultados obtenidos en la muestra proveniente de Celica, en dos de los cuatro métodos (FRAP y Fenoles totales), mientras que en los otros dos métodos (DPPH y ABTS) fueron estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ).
- De las muestras de amaranto, se obtuvo mejores resultados en la muestra proveniente del cantón Celica, la cual sobrepasó ( $p < 0,05$ ) a los resultados obtenidos de la muestra proveniente de Pichincha en dos de los cuatro métodos usados (DPPH y Fenoles totales), mientras que en el método FRAP fueron iguales estadísticamente ( $p > 0,05$ ).
- En cuanto a las muestras de zarandaja, ambas muestras no presentaron diferencia significativa en tres de los cuatro métodos (DPPH, FRAP y Fenoles totales).

## RECOMENDACIONES

- Para investigaciones posteriores se recomienda expresar la actividad antioxidante medida por la captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) como los gramos de muestra necesarios para inhibir en 50% de un gramo de DPPH (IC50) para facilitar la comparación estudios previos.
- Realizar optimización en el método de extracción de antioxidantes para conocer las variables más eficaces que se pueden utilizar.
- Realizar estudios cromatográficos en extractos de las tres muestras estudiadas para conocer los compuestos presentes en cada una de ellas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araméndiz-Tatis, H., & Combatt-caballero, C. E. C. E. M. (2016). Contenido Nutricional de Líneas de Fríjol Caupí ( *Vigna unguiculata* L . Walp .) Seleccionadas de una Población Criolla Nutritional Content of Cowpea Bean Lines ( *Vigna unguiculata* L . Walp .) Selected from a Creole Population, 27(2), 53–60.
2. Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (1999). Methods to measure the Antioxidant Activity in plant material.
3. Arranz-Martínez, S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Universidad Complutense de Madrid.
4. Ayedemi, K. D., & Olorunsanya, A. O. (2012). Comparative analysis of phenolic composition and antioxidant effect of four Cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties on broiler meat. *Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, University of Ilorin, Ilorin, Nigeria*, 2, 343–349.
5. Becker, R., Wheeler, E. L., Lorentz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Beschart, A. A., & Saunders, R. M. (1981). A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*, 46(4), 1175–1180.
6. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 76, 70–76.
7. Birosová, L. (2012). The impact of pseudocereal extracts with antioxidant and antimutagenic activity on development of antibiotic resistance. *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 51, 2(January).
8. Box, M. (2005). *Prontuario de agricultura*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica.
9. Brand-Williams, Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.*, 28, 25–30.
10. Cardador, A., Loarca, G., & Piña, D. (2002). Antioxidant Activity in Common Beans ( *Phaseolus vulgaris* L .). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 6975–6980 6975), 0–5.
11. Cardona-Ayala, C., & Jarma-Orozco, A. (2013). Mecanismos de adaptación a sequía en caupí (*Vigna unguiculata* L Walp)., 7(2), 277–288.
12. Castillo, C. (2012). Valoración de raciones balanceadas elaboradas con

- productos nativos, para el crecimiento y engorde del cuy en la parroquia Sabiango. Universidad Nacional de Loja.
13. Chauhan, A., Saxena, D. C., & Singh, S. (2015). Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus spp.*) flour. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 939–945.
  14. Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152.
  15. Coba, P., & Tivi, L. M. (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus* Importance of antioxidant activity and evaluation in ethanol extracts of *Oryctanthus* type La Granja, 11(1), 22–30.
  16. Coombes, A. J. (2012). *The A to Z of Plant Names: A Quick Reference Guide to 4000 Garden Plants*. book, Timber Press.
  17. D'Souza, M. R., & Devaraj, V. R. (2011). Specific and non-specific responses of Hyacinth bean (*Dolichos lablab*) to drought stress. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(1), 130–139.
  18. Das, S. S., & Fakir, M. S. A. (2014). Genotypes of Lablab purpureus, 37(3), 306–310.
  19. De la Pava S, N., & Sepúlveda-cano, P. A. (2015). Artículo de investigación original. Biología del áfido negro (*Aphis craccivora : aphididae*), sobre frijol caupi (*Vigna unguiculata, fabaceae*), 2(3), 93–97.
  20. De La Torre, L., Balslev, H., Navarrete, H., & Macía, M. J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Herbario QCA& Herbario AAU. Quito & Aarhus. 2008: 1–3, 1–3.*
  21. Deng, G. F., Lin, X., Xu, X. R., Gao, L. L., Xie, J. F., & Li, H. Bin. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 260–266.
  22. Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index ( AAU ) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430–1435.
  23. Derache, R. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Omega.
  24. Escudero, N. L., Albarracín, G. J., Lucero López, R. V., & Giménez, M. S. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of flour and protein concentrate of *amaranthus cruentus* seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 35(4), 1327–1341.

25. Figuerola, F., María, A., & Avendaño, O. (2008). Desarrollo de un alimento de humedad intermedia de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*), 58.
26. Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.
27. Freire-Fierro, A. (2004). *Botánica sistemática Ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden.
28. Gimeno-Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud, 23, 80–84.
29. González, M., & Cavia, M. (2011). Antioxidantes Naturales y Quimioterapia Antitumoral. *Revista Electrónica de Biomedicina*, (2), 42–47. Retrieved from <https://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=56c0d45f-2e41-435a-a027-64e3755d19b3@sessionmgr4003&vid=20&hid=4104>
30. Gracia-Nava, M. (2000). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales de *Malva sylvestris*. *Ámbito Farmacéutico: Nutrición*.
31. Isaza, Y., Restrepo, D., López, J., Ochoa, O., & Gil, J. (2010). Capacidad antioxidante a los 10 días de almacenamiento de sistemas modelo de salchicha tipo Frankfurt adicionadas con extracto de cereza (*prunusavium*). 21–29., 21–29.
32. Jacobsen, S., Mujica, A., & Ortiz, R. (2003). La Importancia de los Cultivos Andinos. *Journal of Agricultural ...*, 36, 14–24.
33. Jacobsen, S., & Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en ecuador*. Quito-Ecuador: Centro Internacional de la Papa (CIP).
34. Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 530–534.
35. Katerere, D. R., Graziani, G., Thembo, K. M., & Nyazema, N. Z. (2012). Antioxidant activity of some African medicinal and dietary leafy African vegetables. *African Journal of Biotechnology Vol . 11(17)*, Pp. 4103-4108, 28 February, 2012 Available Online at <Http://www.academicjournals.org/AJB>, 1.
36. Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), 703–725.
37. Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Kraujaliene, V., & Pukalskas, A. (2013). Antioxidant Properties and Preliminary Evaluation of Phytochemical Composition of Different Anatomical Parts of Amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 322–328.

38. Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., & Kazernavičiute, R. (2013). Accelerated solvent extraction of lipids from *Amaranthus* spp. seeds and characterization of their composition. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(2), 528–534.
39. Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *30*(2), 330–334.
40. Kuklinski, C. (2003). *Nutrición y bromatología*. Omega.
41. Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J., & Riveros, H. (2013). *Bioquímica de Laguna* (Vol. 7).
42. Li, H., Deng, Z., Liu, R., Zhu, H., Draves, J., Marcone, M., ... Tsao, R. (2015). Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, *37*, 75–81.
43. López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R., & Sánchez, S. (2012). Antioxidantes , un paradigma en el tratamiento de enfermedades Antioxidants , a paradigm for diseases treatment, *5*(1).
44. López, R., & Medina, I. (2009). *La alimentación en el siglo XXI*. book, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=gMRxYillcEcC>
45. Maestro, R., & Borja, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, *44*, 101–106.
46. Maheshu, V., Priyadarsini, D. T., & Sasikumar, J. M. (2013). Effects of processing conditions on the stability of polyphenolic contents and antioxidant capacity of *Dolichos lablab* L. *Journal of Food Science and Technology*, *50*(4), 731–738.
47. 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.
48. Melorose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, *1*.
49. Nassourou, M. A., Njintang, Y. N., Noubissié, T. J.-B., Nguimbou, R. M., & Bell, J. M. (2016). Genetics of seed flavonoid content and antioxidant activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *The Crop Journal*.
50. Nuñez, C. (2008). *Comentarios sobre solventes y solubilidades de sustancias orgánicas*.
51. Oboh, G. (2006). Antioxidant properties of some commonly consumed and underutilized tropical legumes. *European Food Research and Technology*,

- 224(1), 61–65.
52. Ojeda, C. (1991). *Alimentación de Broilers con Dietas que Contienen Sarandaja ( Dolichos Lablab L .).*
  53. Olivares, L., Betanzos, G., & Sumaya, T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación Y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 50, 3–8.
  54. Ortemberg, A. (2004). *Antioxidantes para rejuvenecer: Los alimentos más efectivos para combatir de manera natural los radicales libres.* Océano Ambar.
  55. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Rio, D. Del, Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods , Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays 1, (April), 2812–2819.
  56. Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040.
  57. Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2007). Methodology for the evaluation of antioxidant. V congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones, 2007.
  58. Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
  59. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved {ABTS} radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
  60. Rodés, J., Piqué, J., & Trilla, A. (2007). *Libro de la salud del Hospital Clínic de Barcelona y la Fundación BBVA.* Barcelona: Fundación BBVA.
  61. Sabaté, J. (2005). *Nutrición vegetariana.* Safeliz.
  62. Saura-calixto, F., & Pérez Jiménez, J. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha Y Agroexportaciones, 2007*, 1150–1160.
  63. Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy : A critical evaluation of ABTS , DPPH , and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125.
  64. Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411–417.
  65. Sulbarán, B., Sierra, E., Ojeda, G., Berradre, M., Fernández, V., & Peña, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante del tomate crudo y procesado

- Evaluation of the antioxidant activity of the raw and processed tomato  
Introducción, 273–291.
66. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zeballos, 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(6–7), 669–675.
  67. Thompson, J. L., Manore, M. M., & Vaughan, L. A. (2008). *Nutrición*. book, Pearson Educación. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=UQrnPgAACAAJ>
  68. Torres, R., Norma, A., Sánchez, R., López, H., Víctor, M., Cárdenas, F., ... Piña, L. (2008). Sistema de Información Científica antioxidante en granos de maíz (*Zea mays* L.).
  69. Urarte, E., Asensio, A. C., Tellechea, E., Pires, L., & Moran, J. F. (2014). Evaluation of the anti-nitrative effect of plant antioxidants using a cowpea Fe-superoxide dismutase as a target. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 356–364.
  70. Uwalsky, M. A. S. (2006). adicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección \*, 161–172.
  71. Vargas, Y., & Villamil, O. (2012). *Caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol caupí*. Facultad de Ingeniería Agronómica: Programa de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Tolima.
  72. Venereo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
  73. Wang, Y.-K., Zhang, X., Chen, G.-L., Yu, J., Yang, L.-Q., & Gao, Y.-Q. (2016). Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. *Journal of Functional Foods*, 24, 359–372.
  74. Xu, B., & Chang, S. K. C. (2012). Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*, 134(3), 1287–1296.
  75. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214–1222.
  76. Yao, Y., Cheng, X., Wang, L., Wang, S., & Ren, G. (2011). Biological potential of sixteen legumes in China. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 7048–7058.
  77. Yawadio Nsimba, R., Kikuzaki, H., & Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of

various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chemistry*, 106(2), 760–766.

78. Youngson, R. (2003). *Antioxidantes y radicales libres*. book, EDAF. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=SNthxQBeHkUC>
79. Zia-UI-Haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., & De Feo, V. (2013). Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. *Molecules*, 18(2), 2005–2017.

## **ANEXOS**

## Anexo A. Determinación de humedad

Muestra	#	W Cap Seca (g)	W Cap+M Húmeda (g)	W1 (g)	W2 (g)	W C+ Muestra seca (g)	W Muestra Húmeda (g)	W. Muestra seca (g)	Humedad (%)	Prom (%)	Sólidos Totales (%)
<b>Amaranto 1</b>	1	122,9515	124,9626	124,9123	124,8401	124,804	2,0111	1,8525	7,89	7,53	92,47
	2	85,5103	87,5322	87,4566	87,4022	87,3851	2,0219	1,8748	7,28		
	3	91,3086	93,3923	93,3423	93,2798	93,2373	2,0837	1,9287	7,44		
<b>Amaranto 2</b>	1	115,3414	117,3514	117,3045	117,2334	117,2115	2,0100	1,8701	6,96	6,79	93,21
	2	111,7686	113,7939	113,6996	113,6614	113,658	2,0253	1,8894	6,71		
	3	125,3889	127,4195	127,3562	127,3098	127,2834	2,0306	1,8945	6,70		
<b>Firigüelo 1</b>	1	31,0103	33,0112	32,809	32,7847	32,7844	2,0009	1,7741	11,33	11,46	88,54
	2	23,3746	25,3784	25,1613	25,1445	25,1428	2,0038	1,7682	11,76		
	3	63,6429	65,6428	65,4483	65,4201	65,4172	1,9999	1,7743	11,28		
<b>Firigüelo 2</b>	1	127,0163	129,0358	128,9833	128,8711	128,8525	2,0195	1,8362	9,08	8,79	91,21
	2	89,5691	91,6477	91,6012	91,5288	91,4652	2,0786	1,8961	8,78		
	3	110,9581	112,9613	112,9102	112,8267	112,791	2,0032	1,8329	8,50		
<b>Zarandaja 1</b>	1	31,0113	33,0125	32,787	32,7828	32,7824	2,0012	1,7711	11,5	11,5	88,46
	2	23,3846	25,3684	25,1713	15,1575	25,1418	1,9838	1,7572	11,42		
	3	63,6329	65,6291	65,4183	65,4075	65,3975	1,9962	1,7646	11,6		
<b>Zarandaja 2</b>	1	51,7884	53,7853	53,5764	53,576	53,5758	1,9969	1,7874	10,49	10,47	89,53
	2	51,7944	53,7757	53,5694	53,5691	53,5683	1,9813	1,7739	10,47		
	3	50,153	52,1304	51,9275	51,9245	51,924	1,9774	1,771	10,44		

**W=** Peso

**W Cap Seca=** Peso de la cápsula seca

**W Cap+M húmeda=** Peso de la cápsula con la muestra húmeda

**W Cap+ M seca=** Peso de la cápsula con la muestra seca

**W1=** Peso de la cápsula con la muestra tras 1 hora de deshidratación

**W2=** Peso de la cápsula con la muestra tras 2 hora de deshidratación

**W Cap+ M seca=** Peso de la cápsula con la muestra tras 3 hora de deshidratación

**W. Muestra seca=** Peso de la muestra seca

- La fórmula que se aplicó a cada una de las muestras fue la siguiente:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(W \text{ muestra húmeda} - W \text{ muestra seca})}{W \text{ muestra húmeda}} \times 100$$

- Ejemplo (Amaranto 1)

$$\% \text{ humedad} = \frac{(W \text{ muestra húmeda} - W \text{ muestra seca})}{W \text{ muestra húmeda}} \times 100 = \frac{2,0111 - 1,8525}{2,0111} \times 100 = 7,89\%$$

Este porcentaje fue sumado a los obtenidos en las otras repeticiones, se sacó la media y la respuesta fue: 7,53%

- Al 100% de la masa total de la muestra le restamos el porcentaje de humedad y obtenemos el % de sólidos totales:

$$100\% - 7,89\% = 92,11\%$$

**Anexo B. Cuantificación de la capacidad antioxidante (DPPH)**

Muestra	#	ABS	Co ( $\mu\text{Mol/ml}$ ) ( $y\pm b$ )/m	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/40mL extracto (0,5g)	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/1 g muestra	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox /1 g muestra BS	Promedio	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
<b>Amaranto 1</b>	1	0,882	130,33	5,21	10,27	11,10	12,0	0,89	7,4
	2	0,872	140,40	5,62	11,0	11,94			
	3	0,863	149,45	5,98	11,9	12,88			
<b>Amaranto 2</b>	1	0,837	175,62	7,02	14,05	15,07	14,5	0,66	4,6
	2	0,841	171,59	6,86	13,7	14,70			
	3	0,851	161,53	6,46	12,8	13,78			
<b>Firiguelo 1</b>	1	0,718	295,38	11,82	23,6	26,67	27,8	1,05	3,8
	2	0,701	312,49	12,50	24,9	28,11			
	3	0,695	318,53	12,74	25,4	28,72			
<b>Firiguelo 2</b>	1	0,714	299,41	11,98	23,3	25,53	26,1	0,53	2,0
	2	0,703	310,48	12,42	24,2	26,58			
	3	0,708	305,45	12,22	23,9	26,15			
<b>Zarandaja 1</b>	1	0,879	133,35	5,33	10,6	12,02	12,8	1,46	11,5
	2	0,879	133,35	5,33	10,4	11,80			
	3	0,849	163,54	6,54	12,8	14,43			
<b>Zarandaja 2</b>	1	0,867	145,43	5,82	11,4	12,73	12,6	0,41	3,3
	2	0,877	135,36	5,41	10,8	12,08			
	3	0,866	146,43	5,86	11,5	12,84			

## Curva de calibración y elaboración de estándares de Trolox (DPPH)

Para calcular la concentración de la solución madre de Trolox ( $C_{O_{SMT}}$ ), se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{W * p}{v}$$

**Donde:**

**W**= cantidad de trolox pesado (mg)

**p**= pureza del trolox (%)

**v**= volumen del aforo del trolox (mL)

- Reemplazando datos:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{25,1 * 0,97}{100} * 1000 = 243,47 \text{ mg/L}$$

- Para conocer la concentración de la solución madre en  $\mu\text{M}$ , utilizamos el peso molecular del trolox, cantidad de reactivo pesado y volumen de aforo:

$$\begin{array}{l} 250,29 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 1000 \text{ mL} \quad \longrightarrow \quad 1\text{M} \\ 0,0251 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 100 \text{ mL} \quad \longrightarrow \quad X \end{array}$$

$$X = 1,0028 \times 10^{-3} \text{ M}$$

- Convertimos M a  $\mu\text{M}$  (1M es igual a 1000000  $\mu\text{M}$ ), entonces:

$$1,0028 \times 10^{-3} \text{ M} = 1002 \mu\text{M}$$

- El reactivo no es 100% puro, por lo que hay que compensar el 3% de pureza faltante:

$$\begin{array}{l} 1002 \mu\text{M} \quad \text{---} \quad 97\% \\ X \quad \text{---} \quad 100\% \end{array}$$

$$X = 1032,9 \mu\text{M}$$

- La concentración obtenida permitió a su vez calcular la concentración de los estándares, con la siguiente fórmula:

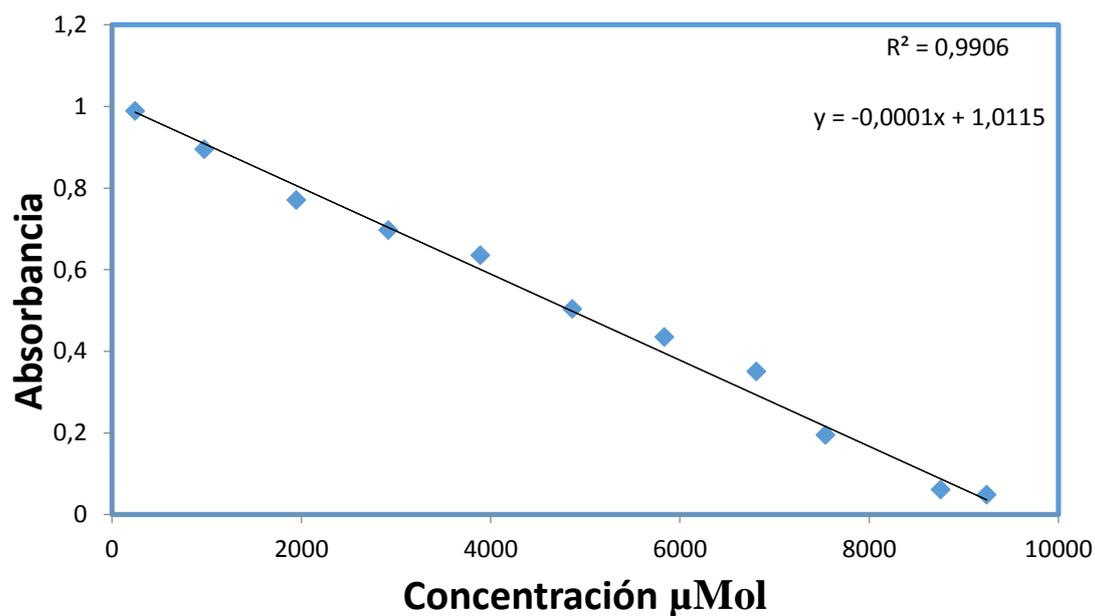
$$C_{O_{Et}} = \frac{C_{O_{SMT}} * V_{ET}}{V_a}$$

**Donde:**

**$C_{O_{SMT}}$** = Concentración de la solución madre de trolox

**$V_{ET}$** = Volumen de la alicuota de la SMT

**$V_a$** = Volumen de aforo del estándar



W (g) Trolox	PM (g/mol)	Pureza (%)	Aforo (mL)	Concentración (mg/L)	Concentración ( $\mu\text{Mol}$ )
0,0251	250,29	97	100	243,47	1032,9

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo	Concentración	
			( $\mu\text{Mol}$ )	Absorbancia
ET1	0,25	9,75	25,82	0,989
ET2	1	9	103,29	0,895
ET3	2	8	206,58	0,771
ET4	4	6	413,17	0,635
ET5	6	4	619,75	0,435
ET6	7	3	723,06	0,351
ET7	9	1	929,63	0,061
ET8	9,5	0,5	981,28	0,049

**Pendiente**

-0,0009936

**Intersección**

1,01150388

**R<sup>2</sup>**

0,9906

Ejemplo del cálculo de la actividad antioxidante (DPPH) en las muestras.

### Amaranto 1 (Repetición #1)

**Pendiente**

-0,0009936

**Intersección**

1,01150388

$Abs = Pendiente (Concentración) + Intersección$

$$Concentración = \frac{Abs - Intersección}{Pendiente}$$

$$Concentración = \frac{0,882 - 1,01150388}{-0,0009936}$$

$C_0 = 130,33 \mu\text{Mol/mL}$

$$\frac{C_0}{X_1} = \frac{1000 \text{ mL}}{40 \text{ mL}} = 5,213 \mu\text{Mol}$$

$$\frac{X_1}{X_2} = \frac{0,5078 \text{ g}}{1 \text{ g}} = 10,27 \mu\text{Mol/g BF}$$

$$\frac{X_2}{C_f} = \frac{92,47 \% ST}{100 \% ST} = 11,10 \mu\text{Mol/g BS}$$

**Anexo C. Cuantificación de la capacidad antioxidante (ABTS)**

Muestra	#	ABS	Co ( $\mu\text{Mol/ml}$ ) ( $y \pm b$ )/m	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/40mL extracto (0,5g)	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/1 g muestra	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox /1 g muestra BS	Promedio	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
Amaranto 1	1	0,834	104,84	4,19	8,26	8,93	8,96	0,25	2,8
	2	0,829	108,43	4,34	8,53	9,22			
	3	0,839	101,25	4,05	8,07	8,72			
Amaranto 2	1	0,849	94,07	3,76	7,52	8,07	7,83	0,29	3,7
	2	0,858	87,60	3,50	6,99	7,50			
	3	0,851	92,63	3,71	7,37	7,90			
Firiguelo 1	1	0,579	287,92	11,52	23,02	25,99	27,46	1,93	7,0
	2	0,566	297,26	11,89	23,68	26,74			
	3	0,522	328,85	13,15	26,25	29,65			
Firiguelo 2	1	0,523	328,13	13,13	25,52	27,97	27,42	1,23	4,5
	2	0,520	330,28	13,21	25,79	28,27			
	3	0,557	303,72	12,15	23,72	26,00			
Zarandaja 1	1	0,815	118,48	4,74	9,45	10,68	10,81	0,16	1,5
	2	0,807	124,22	4,97	9,72	10,99			
	3	0,810	122,07	4,88	9,53	10,77			
Zarandaja 2	1	0,827	109,86	4,39	8,61	9,62	9,85	0,36	3,6
	2	0,829	108,43	4,34	8,66	9,68			
	3	0,817	117,04	4,68	9,19	10,27			

## Curva de calibración y elaboración de estándares de Trolox (ABTS)

Para calcular la concentración de la solución madre de Trolox ( $C_{O_{SMT}}$ ), se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{W * p}{v}$$

**Donde:**

**W**= cantidad de trolox pesado (mg)

**p**= pureza del trolox (%)

**v**= volumen del aforo del trolox (mL)

- Reemplazando datos:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{25,1 * 0,97}{100} * 1000 = 243,47 \text{ mg/L}$$

- Para conocer la concentración de la solución madre en  $\mu\text{M}$ , utilizamos el peso molecular del trolox, cantidad de reactivo pesado y volumen de aforo:

$$\begin{array}{l} 250,29 \text{ g} \quad \xrightarrow{1000 \text{ mL}} \quad 1\text{M} \\ 0,0251 \text{ g} \quad \xrightarrow{100 \text{ mL}} \quad X \end{array}$$

$$X = 1,0028 \times 10^{-3} \text{ M}$$

- Convertimos M a  $\mu\text{M}$  (1M es igual a 1000000  $\mu\text{M}$ ), entonces:

$$1,0028 \times 10^{-3} \text{ M} = 1002 \mu\text{M}$$

- El reactivo no es 100% puro, por lo que hay que compensar el 3% de pureza faltante:

$$\begin{array}{l} 1002 \mu\text{M} \quad \text{---} \quad 97\% \\ X \quad \text{---} \quad 100\% \end{array}$$

$$X = 1032,9 \mu\text{M}$$

- La concentración obtenida permitió a su vez calcular la concentración de los estándares, con la siguiente fórmula:

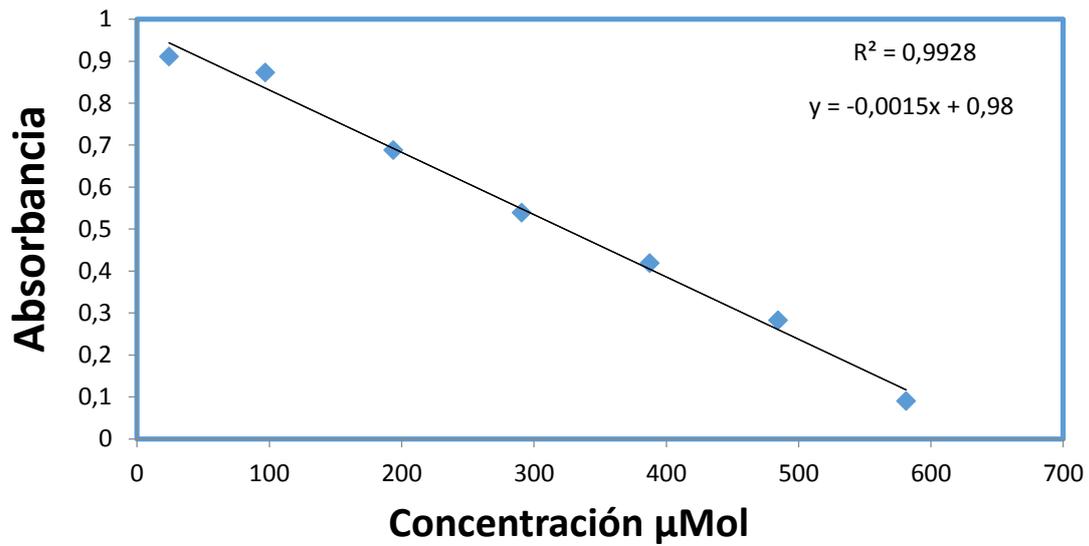
$$C_{O_{Et}} = \frac{C_{O_{SMT}} * V_{ET}}{V_a}$$

**Donde:**

**$C_{O_{SMT}}$** = Concentración de la solución madre de trolox

**$V_{ET}$** = Volumen de la alicuota de la SMT

**$V_a$** = Volumen de aforo del estándar



W (g) Trolox	PM (g/mol)	Pureza (%)	Aforo (mL)	Concentración (mg/L)	Concentración (μMol)
0,0251	250,29	97	100	243,47	1032,9

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración	
			(μMol)	Absorbancia
ET1	0,25	9,75	25,82	0,911
ET2	1	9	103,29	0,873
ET3	2	8	206,58	0,688
ET4	3	7	309,88	0,539
ET5	4	6	413,17	0,419
ET6	5	5	516,46	0,283
ET7	6	4	619,75	0,09

**Pendiente**  
-0,00139278

**Intersección**  
0,980012105

**R<sup>2</sup>**  
0,9928

Ejemplo del cálculo de la actividad antioxidante (ABTS) en las muestras.

### Amaranto 1 (Repetición #1)

**Pendiente**

-0,00139278

**Intersección**

0,980012105

*Abs = Pendiente (Concentración) + Intersección*

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Abs} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{0,834 - 0,980012105}{-0,00139278}$$

$C_0 = 104,84 \mu\text{Mol/mL}$

$$\frac{C_0}{X_1} = \frac{1000 \text{ mL}}{40 \text{ mL}} = 4,19 \mu\text{Mol}$$

$$\frac{X_1}{X_2} = \frac{0,5078 \text{ g}}{1 \text{ g}} = 8,26 \mu\text{Mol/g BF}$$

$$\frac{X_2}{C_f} = \frac{92,47 \% \text{ ST}}{100 \% \text{ ST}} = 8,93 \mu\text{Mol/g BS}$$

**Anexo D. Cuantificación de la capacidad antioxidante (FRAP)**

Muestra	#	ABS	Co ( $\mu\text{Mol/ml}$ ) ( $y \pm b$ )/m	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/40mL extracto (0,5g)	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox/1 g muestra	$\mu\text{mol Eq}$ Trolox /1 g muestra BS	Promedio	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
Amaranto 1	1	0,207	67,46	2,70	5,31	5,75	5,83	0,15	2,5
	2	0,214	70,53	2,82	5,55	6,00			
	3	0,205	66,58	2,66	5,30	5,74			
Amaranto 2	1	0,205	66,58	2,66	5,33	5,71	6,00	0,26	4,4
	2	0,219	72,72	2,91	5,81	6,23			
	3	0,215	70,97	2,84	5,64	6,05			
Firiguelo 1	1	0,522	205,58	8,22	16,43	18,56	18,29	0,24	1,3
	2	0,515	202,51	8,10	16,13	18,22			
	3	0,511	200,76	8,03	16,03	18,10			
Firiguelo 2	1	0,462	179,27	7,17	13,94	15,28	15,38	0,11	0,7
	2	0,466	181,03	7,24	14,13	15,50			
	3	0,462	179,27	7,17	14,00	15,35			
Zarandaja 1	1	0,218	72,28	2,89	5,77	6,52	6,35	0,27	4,2
	2	0,209	68,34	2,73	5,35	6,04			
	3	0,221	73,60	2,94	5,75	6,49			
Zarandaja 2	1	0,212	69,65	2,79	5,46	6,10	6,47	0,98	15,2
	2	0,247	85,00	3,40	6,79	7,59			
	3	0,202	65,27	2,61	5,13	5,72			

## Curva de calibración y elaboración de estándares de Trolox (FRAP)

Para calcular la concentración de la solución madre de Trolox ( $C_{O_{SMT}}$ ), se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{W * p}{v}$$

**Donde:**

**W**= cantidad de trolox pesado (mg)

**p**= pureza del trolox (%)

**v**= volumen del aforo del trolox (mL)

- Reemplazando datos:

$$C_{O_{SMT}} = \frac{25,1 * 0,97}{100} * 1000 = 243,47 \text{ mg/L}$$

- Para conocer la concentración de la solución madre en  $\mu\text{M}$ , utilizamos el peso molecular del trolox, cantidad de reactivo pesado y volumen de aforo:

$$\begin{array}{l} 250,29 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 1000 \text{ mL} \quad \longrightarrow \quad 1\text{M} \\ 0,0251 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 100 \text{ mL} \quad \longrightarrow \quad X \end{array}$$

$$X = 1,0028 \times 10^{-3} \text{ M}$$

- Convertimos M a  $\mu\text{M}$  (1M es igual a 1000000  $\mu\text{M}$ ), entonces:

$$1,0028 \times 10^{-3} \text{ M} = 1002 \mu\text{M}$$

- El reactivo no es 100% puro, por lo que hay que compensar el 3% de pureza faltante:

$$\begin{array}{l} 1002 \mu\text{M} \quad \text{---} \quad 97\% \\ X \quad \text{---} \quad 100\% \end{array}$$

$$X = 1032,9 \mu\text{M}$$

- La concentración obtenida permitió a su vez calcular la concentración de los estándares, con la siguiente fórmula:

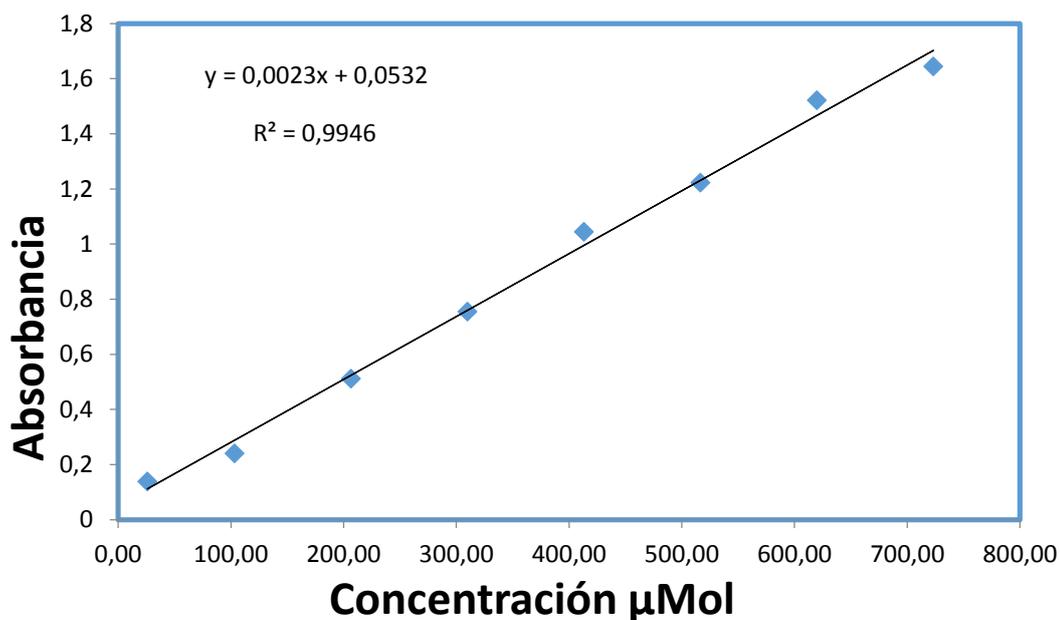
$$C_{O_{Et}} = \frac{C_{O_{SMT}} * V_{ET}}{V_a}$$

**Donde:**

**$C_{O_{SMT}}$** = Concentración de la solución madre de trolox

**$V_{ET}$** = Volumen de la alicuota de la SMT

**$V_a$** = Volumen de aforo del estándar



W (g) Trolox	PM (g/mol)	Pureza (%)	Aforo (mL)	Concentración (mg/L)	Concentración (μMol)
0,0251	250,29	97	100	243,47	1032,9

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración	
			(μMol)	Absorbancia
ET1	0,25	9,75	25,82	0,139
ET2	1	9	103,29	0,241
ET3	2	8	206,58	0,512
ET4	3	7	309,88	0,755
ET5	4	6	413,17	1,044
ET6	5	5	516,46	1,223
ET7	6	4	619,75	1,522
ET8	7	3	723,05	1,644

**Pendiente**

0,00228060

**Intersección**

0,053150029

**R<sup>2</sup>**

0,9946

Ejemplo del cálculo de la actividad antioxidante (FRAP) en las muestras.

**Amaranto 1 (Repetición #1)**

**Pendiente**

0,00228060

**Intersección**

0,053150029

*Abs = Pendiente (Concentración) + Intersección*

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Abs} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{0,207 - 0,053150029}{0,00228060}$$

$C_0 = 67,46 \mu\text{Mol/mL}$

$$\frac{C_0}{X_1} = \frac{1000 \text{ mL}}{40 \text{ mL}} = 2,7 \mu\text{Mol}$$

$$\frac{X_1}{X_2} = \frac{0,5078 \text{ g}}{1 \text{ g}} = 5,31 \mu\text{Mol/g BF}$$

$$\frac{X_2}{C_f} = \frac{92,47 \% \text{ ST}}{100 \% \text{ ST}} = 5,75 \mu\text{Mol/g BS}$$

**Anexo E. Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu**

Muestra	#	Abs	Co (mg/ml)	mg EAG/ 40 mL extrato (0,5 g muestra)	mg EAG/100 g muestra BF	mg EAG/100 g muestra BS	PROMEDIO (mg EAG/100 g muestra BS)	Desviación Estandar	% Coeficiente Variación
<b>AMARANTO 1</b>	1	0,078	0,018	0,74	145	157	148,9	9,03	6,1
	2	0,069	0,016	0,65	129	139			
	3	0,074	0,017	0,70	139	151			
<b>AMARANTO 2</b>	1	0,081	0,019	0,76	153	164	171,3	10,41	6,1
	2	0,091	0,021	0,86	171	183			
	3	0,083	0,020	0,78	156	167			
<b>FIRIGUELO 1</b>	1	0,134	0,031	1,25	250	282	287,7	5,00	1,7
	2	0,139	0,032	1,30	258	291			
	3	0,138	0,032	1,29	257	290			
<b>FIRIGUELO 2</b>	1	0,129	0,030	1,20	234	257	256,6	6,84	2,7
	2	0,132	0,031	1,23	240	263			
	3	0,125	0,029	1,17	228	250			
<b>ZARANDAJA 1</b>	1	0,053	0,013	0,51	101	114	126,3	11,06	8,8
	2	0,061	0,015	0,58	114	128			
	3	0,065	0,015	0,62	120	136			
<b>ZARANDAJA 2</b>	1	0,075	0,018	0,71	139	155	146,1	8,74	6,0
	2	0,065	0,015	0,62	123	138			
	3	0,07	0,017	0,66	130	145			

### Curva de calibración y elaboración de estándares de ácido gálico (Fenoles totales)

Para calcular la concentración de la solución madre de ácido gálico ( $C_{OSAG}$ ), se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{OSAG} = \frac{W * p}{v}$$

**Donde:**

**W**= cantidad del ácido gálico pesado (mg)

**p**= pureza del reactivo (%)

**v**= volumen del aforo (mL)

- Reemplazando datos:

$$C_{OSAG} = \frac{50 * 0,975}{25} = 1,95 \text{ mg/mL}$$

- A partir del resultado obtenido se procede a calcular los volúmenes para los estándares, para llegar a la concentración deseada, con la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_{St} V_{St}$$

**Donde:**

**C<sub>SM</sub>**= Concentración de la solución madre (mg/mL)

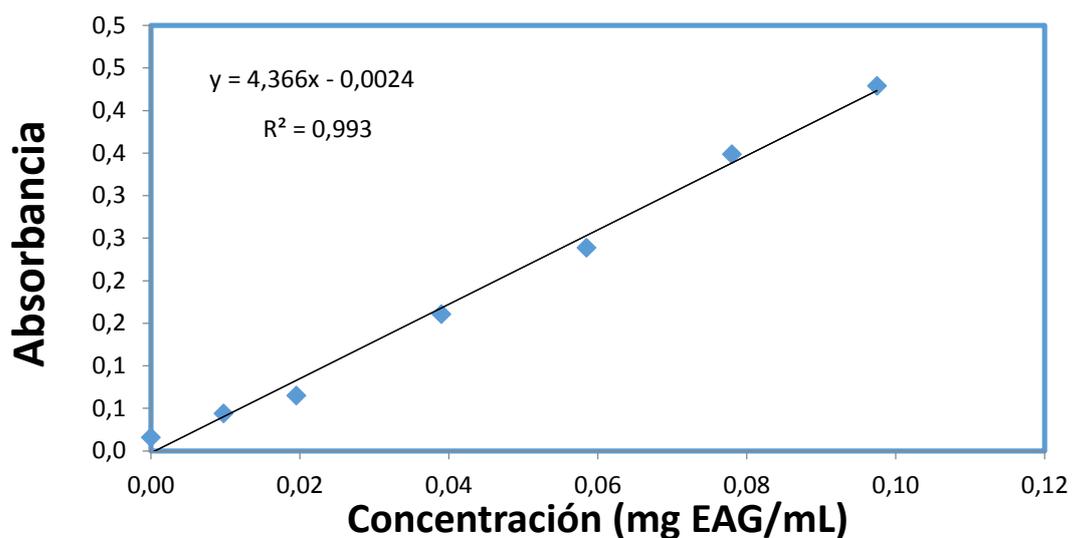
**V<sub>SM</sub>**= Volumen a tomar de la solución madre

**C<sub>St</sub>**= Concentración del estándar (mg/mL)

**V<sub>St</sub>**= Volumen a preparar del estándar

- Por ejemplo, si tomamos una alícuota de 0,1 mL de la solución madre y aforamos a un volumen de 10 mL con metanol tenemos la siguiente concentración:

$$C_{St} = \frac{C_{SM} * V_{SM}}{V_{St}} = \frac{1,95 \frac{mg}{mL} * 0,1 mL}{10 mL} = 0,0195 \text{ mg/mL}$$



W (g) Ácido gálico	Pureza	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)
<b>0,05</b>	0,975	25	1,95

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg EAG/mL)	Absorbancia
ET1	0,000	10	0,0000	0,016
ET2	0,050	9,95	0,0098	0,044
ET3	0,100	9,9	0,0195	0,065
ET4	0,200	9,8	0,0390	0,161
ET5	0,300	9,7	0,0585	0,239
ET6	0,400	9,6	0,0780	0,349
ET7	0,500	9,5	0,0975	0,429

**Pendiente**  
4,36597532

**Intersección**  
-0,00237372

**R<sup>2</sup>**  
0,993

Ejemplo del cálculo del contenido de fenoles totales en las muestras.

### Amaranto 1 (Repetición #1)

**Pendiente**

4,36597532

**Intersección**

-0,00237372

*Abs = Pendiente (Concentración) + Intersección*

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Abs} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{0,078 - (-0,00237372)}{4,36597532}$$

$C_0 = 0,018 \text{ mg EAG/mL}$

$$\frac{C_0}{X_1} = \frac{1000 \text{ mL}}{40 \text{ mL}} = 0,74 \text{ mg EAG}$$

$$\frac{X_1}{X_2} = \frac{0,5078 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 145 \text{ mg EAG/100g BF}$$

$$\frac{X_2}{C_f} = \frac{92,47 \% ST}{100 \% ST} = 157 \text{ mg EAG/100g BS}$$

## Anexo F. Análisis estadístico

- DPPH entre las mismas muestras de distintos lugares de procedencia.

### ANOVA unidireccional: DPPH ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	11,289	11,289	16,43	0,015
Error	4	2,748	0,687		
Total	5	14,037			

S = 0,8289 R-cuad. = 80,42% R-cuad. (ajustado) = 75,53%

ICs de 95% individuales para la media  
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
Amaranto1	3	11,773	0,966	(-----*-----)
Amaranto2	3	14,517	0,664	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+-----+  
10,5      12,0      13,5      15,0

Desv.Est. agrupada = 0,829

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Amaranto2	3	14,5167	A
Amaranto1	3	11,7733	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA unidireccional: DPPH ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	4,577	4,577	6,59	0,062
Error	4	2,778	0,694		
Total	5	7,354			

S = 0,8333 R-cuad. = 62,23% R-cuad. (ajustado) = 52,79%

ICs de 95% individuales para la media  
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
Firiguelo1	3	27,832	1,053	(-----*-----)
Firiguelo2	3	26,085	0,529	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+-----+  
25,2      26,4      27,6      28,8

Desv.Est. agrupada = 0,833

Agrupar información utilizando el método de Tukey

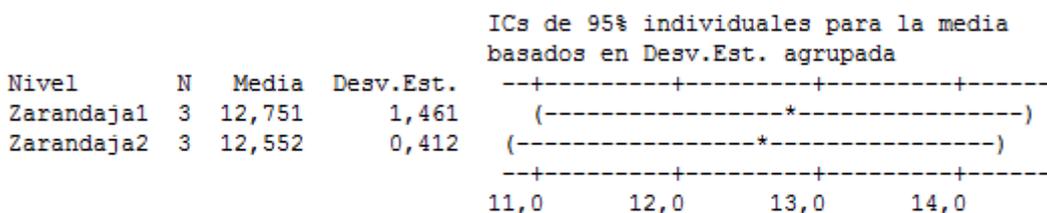
Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	27,8321	A
Firiguelo2	3	26,0854	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA unidireccional: DPPH ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	0,06	0,06	0,05	0,832
Error	4	4,61	1,15		
Total	5	4,67			

S = 1,073 R-cuad. = 1,26% R-cuad. (ajustado) = 0,00%



Desv.Est. agrupada = 1,073

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Zarandaja1	3	12,751	A
Zarandaja2	3	12,552	A

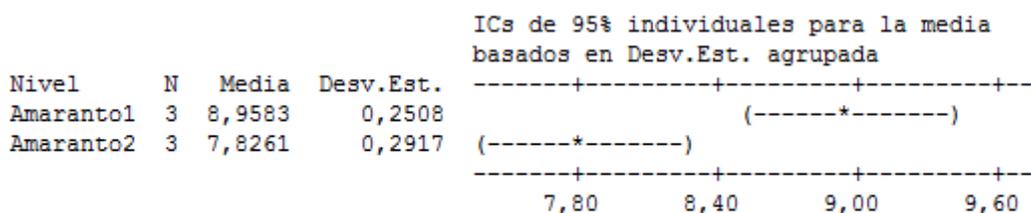
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **ABTS** entre las mismas muestras de distintos lugares de procedencia.

### ANOVA unidireccional: ABTS ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	1,9226	1,9226	25,99	0,007
Error	4	0,2959	0,0740		
Total	5	2,2185			

S = 0,2720 R-cuad. = 86,66% R-cuad. (ajustado) = 83,33%



Desv.Est. agrupada = 0,2720

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Amaranto1	3	8,9583	A
Amaranto2	3	7,8261	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANOVA unidireccional: ABTS ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	0,00	0,00	0,00	0,975
Error	4	10,49	2,62		
Total	5	10,49			

S = 1,619 R-cuad. = 0,03% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
Firiguelo1	3	27,461	1,930	(-----*-----)
Firiguelo2	3	27,418	1,233	(-----*-----)

25,5      27,0      28,5      30,0

Desv.Est. agrupada = 1,619

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	27,461	A
Firiguelo2	3	27,418	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANOVA unidireccional: ABTS ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	1,3844	1,3844	18,14	0,013
Error	4	0,3053	0,0763		
Total	5	1,6897			

S = 0,2763 R-cuad. = 81,93% R-cuad. (ajustado) = 77,42%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
Zarandaja1	3	10,814	0,157	(-----*-----)
Zarandaja2	3	9,854	0,358	(-----*-----)

9,50      10,00      10,50      11,00

Desv.Est. agrupada = 0,276

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Zarandaja1	3	10,8142	A
Zarandaja2	3	9,8535	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **FRAP** entre las mismas muestras de distintos lugares de procedencia.

### ANOVA unidireccional: FRAP ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	0,0443	0,0443	0,98	0,379
Error	4	0,1817	0,0454		
Total	5	0,2260			

S = 0,2131 R-cuad. = 19,61% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs
Amaranto1	3	5,8272	0,1486	(-----*-----)
Amaranto2	3	5,9991	0,2622	(-----*-----)

5,50      5,75      6,00      6,25

Desv.Est. agrupada = 0,2131

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Amaranto2	3	5,9991	A
Amaranto1	3	5,8272	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA unidireccional: FRAP ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Lugar procedencia

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	12,7546	12,7546	368,88	0,000
Error	4	0,1383	0,0346		
Total	5	12,8929			

S = 0,1859 R-cuad. = 98,93% R-cuad. (ajustado) = 98,66%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs
Firiguelo1	3	18,293	0,239	(---*---)
Firiguelo2	3	15,377	0,109	(---*---)

16,0      17,0      18,0      19,0

Desv.Est. agrupada = 0,186

Agrupar información utilizando el método de Tukey

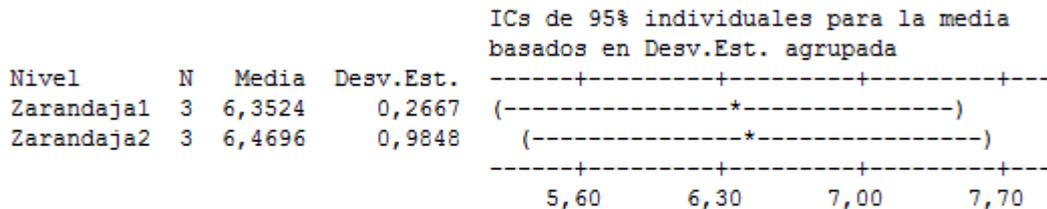
Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	18,2926	A
Firiguelo2	3	15,3766	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANOVA unidireccional: FRAP (µMol E Trolox/g) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	0,021	0,021	0,04	0,852
Error	4	2,082	0,520		
Total	5	2,103			

S = 0,7214 R-cuad. = 0,98% R-cuad. (ajustado) = 0,00%



Desv.Est. agrupada = 0,7214

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Zarandaja2	3	6,4696	A
Zarandaja1	3	6,3524	A

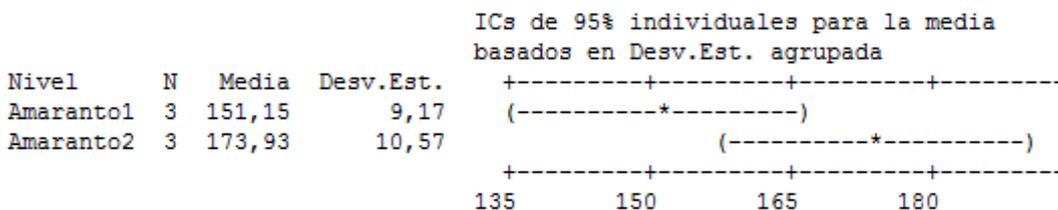
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Fenoles Totales** entre las mismas muestras de distintos sitios de procedencia.

**ANOVA unidireccional: FT (mg EAG/100g) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	778,8	778,8	7,95	0,048
Error	4	391,6	97,9		
Total	5	1170,4			

S = 9,895 R-cuad. = 66,54% R-cuad. (ajustado) = 58,17%



Desv.Est. agrupada = 9,89

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar procedencia	N	Media	Agrupación
Amaranto2	3	173,931	A
Amaranto1	3	151,145	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANOVA unidireccional: FT (mg EAG/100g) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	1498,1	1498,1	40,47	0,003
Error	4	148,1	37,0		
Total	5	1646,2			

S = 6,084 R-cuad. = 91,01% R-cuad. (ajustado) = 88,76%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Firiguelo1	3	292,15	5,08
Firiguelo2	3	260,54	6,94

-----+-----+-----+-----+-----  
 (-----\*-----)  
 (-----\*-----)  
 -----+-----+-----+-----+-----  
 255            270            285            300

Desv.Est. agrupada = 6,08

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar

procedencia	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	292,148	A
Firiguelo2	3	260,545	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANOVA unidireccional: FT (mg EAG/100g) vs. Lugar procedencia**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Lugar procedencia	1	605	605	5,91	0,072
Error	4	410	102		
Total	5	1015			

S = 10,12 R-cuad. = 59,63% R-cuad. (ajustado) = 49,53%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Zarandaja1	3	128,25	11,23
Zarandaja2	3	148,34	8,87

-----+-----+-----+-----+-----  
 (-----\*-----)  
 (-----\*-----)  
 -----+-----+-----+-----+-----  
 120            135            150            165

Desv.Est. agrupada = 10,12

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Lugar

procedencia	N	Media	Agrupación
Zarandaja2	3	148,34	A
Zarandaja1	3	128,25	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

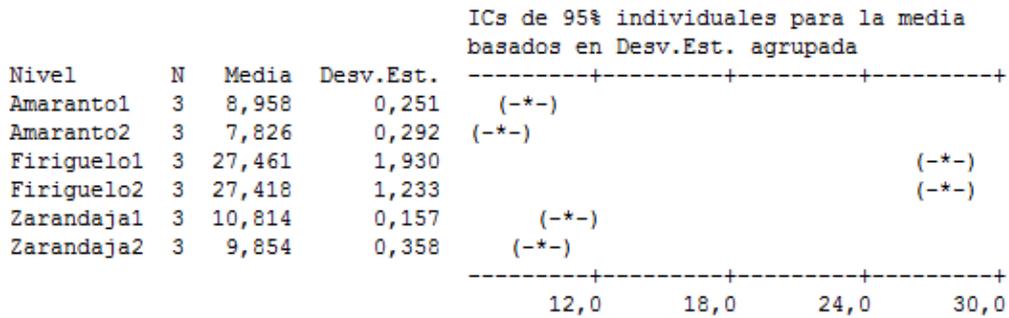


- **ABTS** en todas las muestras.

**ANOVA unidireccional: ABTS ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Muestras**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestras	5	1321,624	264,325	285,96	0,000
Error	12	11,092	0,924		
Total	17	1332,716			

S = 0,9614    R-cuad. = 99,17%    R-cuad.(ajustado) = 98,82%



Desv.Est. agrupada = 0,961

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestras	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	27,461	A
Firiguelo2	3	27,418	A
Zarandaja1	3	10,814	B
Zarandaja2	3	9,854	B C
Amaranto1	3	8,958	B C
Amaranto2	3	7,826	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **FRAP** en todas las muestras.

### ANOVA unidireccional: FRAP ( $\mu\text{Mol E Trolox/g}$ ) vs. Muestras

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestras	5	469,175	93,835	468,80	0,000
Error	12	2,402	0,200		
Total	17	471,577			

S = 0,4474    R-cuad. = 99,49%    R-cuad. (ajustado) = 99,28%

ICs de 95% individuales para la media  
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
Amaranto1	3	5,827	0,149	(-*)
Amaranto2	3	5,999	0,262	(*-)
Firiguelo1	3	18,293	0,239	(*-)
Firiguelo2	3	15,377	0,109	(-*)
Zarandaja1	3	6,352	0,267	(*-)
Zarandaja2	3	6,470	0,985	(*-)

-----+-----+-----+-----+-----  
7,0      10,5      14,0      17,5

Desv.Est. agrupada = 0,447

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestras	N	Media	Agrupación
Firiguelo1	3	18,293	A
Firiguelo2	3	15,377	B
Zarandaja2	3	6,470	C
Zarandaja1	3	6,352	C
Amaranto2	3	5,999	C
Amaranto1	3	5,827	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

