



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

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Determinación de la calidad fenólica del cacao**

*(Theobroma cacao L.)*

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Guamán González, Karina Elizabeth

**DIRECTORA:** Castillo Carrión, Maritza Janneth, Mgs.

**LOJA – ECUADOR**

**2017**



*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, 2017*

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgs.

Maritza Janneth Castillo Carrión

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Determinación de la calidad fenólica del cacao (*Theobroma cacao* L.) realizado por Karina Elizabeth Guamán González ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Abril del 2017

f).....

Mgs. Maritza Janneth Castillo Carrión

C.I: .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Karina Elizabeth Guamán González declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “**Determinación de la calidad fenólica del cacao (*Theobroma cacao* L.)**”, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgs. Maritza Janneth Castillo Carrión directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.....  
Karina Elizabeth Guamán González  
CI. 0705647675

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por haberme dado la fortaleza y cubrirme de bendiciones día a día en este largo camino emprendido.

### **A mí amada madre**

Por su apoyo y cariño incondicional, convirtiéndose en mi mayor motivo de impulso para alcanzar esta meta propuesta; y sobre todo por su esfuerzo constante, que me ha permitido crecer moral e intelectualmente.

### **A mis hermanos y familia**

Por sus sabios consejos y enseñanzas en el momento oportuno.

## AGRADECIMIENTO

A mi Dios por ser mi guía y cubrirme con sus bendiciones.

A mi madre, Chela por su apoyo incondicional durante toda mi vida, a mis hermanos, abuelitos y demás familiares por darme su cariño y consejos durante esta etapa.

A mi directora de tesis Mgs. Maritza Janneth Castillo Carrión, que supo impartir sus sabios conocimientos y experiencia, para de esta manera lograr poder culminar este trabajo de la mejor manera.

De igual manera a la Mgs. Ruth Martínez por su colaboración como miembros del jurado de tesis, que supieron guiar esta investigación con sus observaciones y sugerencias, por su tiempo y dedicación.

A mis amigas Dolores y Johanna por su amistad verdadera en esta larga etapa universitaria.

Por último a la Universidad Técnica Particular de Loja en especial a la Titulación de Bioquímica y Farmacia y sus docentes que lo conforman por aportar sus conocimientos durante mi formación estudiantil.

A todos los que hicieron posible esto ¡Gracias!

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Cacao.....	6
1.2. Antioxidantes.....	6
1.3. Compuestos fenólicos o polifenoles.....	7
1.3.1. Compuestos fenólicos del cacao.....	8
1.4 Extracción de antioxidantes.....	8
1.4.1. Tipo de solvente.....	9
1.4.2. Temperatura .....	9
1.4.3. Relación muestra-solvente.....	9
1.5. Determinación de fenoles.....	10
1.6. Determinación de actividad antioxidante.....	10
1.6.1. Método FRAP. ....	10
1.6.2. Método DPPH.....	10
1.7. Concentración media inhibitoria.....	11

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Muestra y preparación.....	13
2.2. Determinación de humedad.....	13
2.3. Obtención de extractos.....	13
2.3.1. Determinación de la concentración inicial de los extractos.....	14
2.4. Cuantificación de fenoles totales.....	15
2.5. Cuantificación de la actividad antioxidante.....	16
2.5.1. Método FRAP .....	16
2.5.2. Método DPPH.....	19
2.6. Determinación de IC <sub>50</sub> y AAI.....	21
2.7. Análisis estadístico.....	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1. Concentración inicial de los extractos.....	27
3.2. Fenoles totales.....	27
3.3. Capacidad antioxidante.....	30
3.4. IC <sub>50</sub> y AAI.....	33
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	42



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales grupos de polifenoles de alimentos.....	7
<b>Figura 2.</b> Cuantificación de fenoles totales.....	15
<b>Figura 3.</b> Determinación del método FRAP.....	17
<b>Figura 4.</b> Determinación del método DPPH.....	19
<b>Figura 5.</b> Determinación de IC <sub>50</sub> .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos para la obtención de extractos .....	14
<b>Tabla 2.</b> Concentración de los extractos utilizados para IC <sub>50</sub> .....	24
<b>Tabla 3.</b> Concentración inicial de los extractos de cacao.....	27
<b>Tabla 4.</b> Contenido de fenoles totales en extractos de cacao .....	28
<b>Tabla 5.</b> Capacidad antioxidante del cacao por el método FRAP .....	30
<b>Tabla 6.</b> Capacidad antioxidante del cacao por el método DPPH.....	32
<b>Tabla 7.</b> IC <sub>50</sub> y AAI del cacao .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo1.</b> Determinación de la concentración inicial de los extractos.....	42
<b>Anexo2.</b> Cuantificación de fenoles totales.....	44
<b>Anexo 3.</b> Cuantificación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.....	51
<b>Anexo4.</b> Cuantificación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	59
<b>Anexo5.</b> Determinación del parámetro IC <sub>50</sub> y AAI.....	65
<b>Anexo6.</b> Determinación de la concentración inicial de los extractos.....	81
<b>Anexo7.</b> Análisis estadístico.....	83

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Contenido fenólico en cacao extraído con varios solventes.....	29
<b>Gráfica 2.</b> Comparación de la capacidad antioxidante con diferentes solventes-método FRAP.....	31
<b>Gráfica 3.</b> Capacidad antioxidante de cacao y subproducto de mango con extracción etanol-agua 40°C.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAI:** Índice de actividad antioxidante

**BS:** Base seca

**Co:** Concentración

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

**EAG:** Equivalente de ácido gálico

**EOH:** Etanol

**ET:** Equivalente de Trolox

**FD:** Factor de dilución

**FRAP:** Poder de reducción férrica

**g:** Gramo

**HCl:** Àcido clorhídrico

**IC<sub>50</sub>:** Capacidad media inhibitoria

**MeOH:** Metanol

**mg:** Miligramo

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**N:** normal

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

**nm:** Nanómetro

**P<sub>inicial</sub>:** Peso inicial

**P<sub>final</sub>:** Peso final

**R<sup>2</sup>:** Factor de correlación

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SM:** Solución madre

**ST:** Solución de trabajo

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

**$\mu\text{L}$** : Microlitro

**$\mu\text{m}$** : Micrómetro

**$\mu\text{M}$** : Micromolar

**v/v**: Volumen/volumen

## RESUMEN

El creciente interés por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, ha incentivado el estudio de componentes naturales presentes en plantas y frutos como el cacao. El presente trabajo tuvo como objetivo extraer y evaluar los compuestos fenólicos presentes en el polvo cacao (*Theobroma cacao* L.) para lo cual se elaboraron extractos mediante maceración dinámica, usando etanol, etanol-agua (50:50 v/v) y agua como solventes y a temperaturas de 20, 40 y 60°C. El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico Folin Ciocalteu, la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y FRAP, además de valorar el parámetro IC<sub>50</sub> al mejor tratamiento por el método DPPH. Los mejores resultados presentaron los extractos de etanol-agua (50:50 v/v) con valores de fenoles totales entre 3614,02 y 4784,50mg EAG/100 g y en capacidad antioxidante de 446,15 a 454,96 µM ET/g con DPPH y 317,02 a 357,11µM ET/g con FRAP; demostrando el potencial que posee el cacao para ser usado en la elaboración de ingredientes o formulación de alimentos por parte de la industria alimentaria.

**PALABRAS CLAVE:** Fenoles totales, capacidad antioxidante, etanol, agua, cacao.

## ABSTRACT

The greater interest in the consumption of foods that besides nourishing with a favorable impact on health, has encouraged the study of natural components in plants and fruits such as cacao. The objective of the present work was to extract and evaluate the phenolic compounds present in cocoa powder (*Theobroma cacao* L.) for which extracts were prepared by dynamic maceration using ethanol, ethanol-water (50:50 v/v) and water as solvents and temperatures of 20, 40 and 60 °C. The total phenol content was determined by the method Folin Ciocalteu, the antioxidant capacity by the DPPH and FRAP methods, as well as by evaluating the IC<sub>50</sub> parameter to the best treatment by the DPPH method. The best results presented the ethanol-water extracts (50:50v/v) with total phenol values between 3614,02 and 4784,50 mg EAG /100g and in antioxidant capacity of 446,15 to 454,96 µM ET/g with DPPH and 317,02 to 357,11 µM ET/g with FRAP; demonstrating the potential of cocoa to be used in the manufacture of food ingredients or formulation by the food industry.

**KEY WORDS:** Total phenols, antioxidant capacity, ethanol, water, cocoa.

## INTRODUCCIÓN

La planta *Theobroma cacao* L. es un árbol originario de las selvas de América Central y del Sur. Ecuador posee un 70% de la producción mundial de cacao fino convirtiéndolo en el mayor productor de cacao del mundo, lo que ha generado el reconocimiento del país en este ámbito (ProEcuador, 2013).

En las dos últimas décadas, se ha incrementado el interés por el cacao debido al potencial que presenta por el contenido de compuestos bioactivos. De hecho, un gran número de estudios resaltan los beneficios del cacao en la salud entre ellos el efecto beneficioso para el mantenimiento de la vasodilatación (Cádiz et al.2014). Estudios realizados por Zapata et al. (2014) indican la presencia de compuestos fenólicos en granos de cacao con valores que varían entre 35,36 a 37,32 mg de GAE/100; mientras que en polvo de cacao Nazaruddin et al. (2011) reporta valores desde 43,01 a 58,87 mg de GAE/100.

Los compuestos fenólicos de las plantas se destacan por su potencial antioxidante, anticancerígeno, antifúngico o por modular rutas importantes *in vivo* en mamíferos (Gálvez, Sánchez, Ruiz, Molina, & De la Torre, 2013). Los grupos de polifenoles más abundantes en el cacao son metabolitos tipo flavonoide, especialmente tres grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es la epicatequina que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles del grano (Sotelo C., Alvis B., & Arrázola P., 2015).

Se ha demostrado que son varios los factores que influyen en la extracción de antioxidantes como: el pretratamiento de la muestra (desengrasado, tamaño), relación disolvente / muestra, tipo de disolvente, tiempo y temperatura de extracción (Spigno, Tramelli, & Faveri, 2007). En cuanto a los solventes más comúnmente utilizados están el metanol, acetona, etanol, éter etílico, etc.; ningún solvente por sí solo puede extraer antioxidantes de ambas polaridades, por lo que se usan mezclas entre ellos y también se emplean mezclas acuosas de los mismos (Sun & Tang, 2004). El problema de la mayoría de los solventes orgánicos está asociado a la toxicidad y residualidad que presentan, lo que limita su uso en matrices alimentarias. El etanol al poseer baja toxicidad representa una buena alternativa para solventar este inconveniente (Brossard-González, Ferrari, Pighinelli, & Park, 2010).

Por otro lado se ha demostrado que un aumento en la temperatura favorece la extracción potenciando tanto la solubilidad del soluto como el coeficiente de difusión, encontrando mejores rendimientos de fenoles a 60°C que a 28°C (Spigno, Tramelli, & Faveri, 2007) .Dado lo anterior el objetivo de esta investigación fue extraer y evaluar los compuestos fenólicos en cacao y con ello contribuir al desarrollo de ingredientes alimentarios a partir de alimentos utilizando procesos de extracción verdes. Se estudió el efecto del solvente (etanol, agua y mezcla de los dos) y de la temperatura de extracción (20 40 y 60°C), manteniendo constante la relación muestra-solvente y el tamaño de partícula de la muestra de cacao.

Los resultados evidenciaron que la mezcla de solventes agua-etanol (50:50 v/v) y que las temperaturas más altas de 40 y 60°C, potenciaron la extracción de fenoles en cacao con alta capacidad antioxidante; obteniéndose valores superiores a frutas como mango y tamarindo.

El trabajo se presenta en 3 capítulos, en el primero se hace una revisión bibliográfica sobre el cacao, compuestos fenólicos, actividad antioxidante y los fundamentos de los métodos analíticos para su cuantificación. En el segundo capítulo se describe la metodología empleada, detallando el procedimiento de obtención de los extractos, el método colorimétrico Folin Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales, los métodos DPPH y FRAP para medir la capacidad antioxidante, y el método usado para medir el IC<sub>50</sub>. Finalmente en el tercer capítulo se expone los resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones.



## **1. MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Cacao

El cacao es un árbol procedente de la región comprendida entre América central y América del sur, es también conocido por su nombre científico de origen griego *Theobroma cacao L.*, el cual significa “alimentos de los dioses” (Proecuador, 2013).

Desde hace más de dos siglos, el cacao en grano se ha destacado como un rubro de gran importancia comercial en el ámbito mundial, ya que éste es utilizado como materia prima para la obtención de diversos productos de la industria de alimentos (confitería, bebidas), la industria cosmetológica y la farmacéutica (Chávez & Ordoñez, 2013).

Cerca del 70% de la producción mundial de cacao fino de aroma se encuentra en nuestro país convirtiéndonos en el mayor productor de cacao fino de aroma del mundo (Anecacao, 2014). Según Martínez et al. (2012) en su estudio realizado en la cáscara y testa del cacao con dos tipos de solvente (etanol y la mezcla de metanol-acetona), evidenciaron la presencia de compuestos fenólicos; obteniendo para el método FRAP valores entre 0,67 a 1,78  $\mu\text{mol ET/g}$  y en el caso de DPPH de 18,40 a 21,37  $\mu\text{mol ET/g}$ .

Mientras que Sotelo et al. (2015) al evaluar la cáscara de cacao utilizando como solvente etanol-agua, obtuvieron entre 16,40 a 23,01 EAG/g para polifenoles y en capacidad antioxidante de 13660,13 a 16904,25  $\mu\text{mol TE/100 g}$  medidos con el método FRAP.

## 1.2. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que encontrándose en bajas concentraciones con relación a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato (Othman et al. 2009).

Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Los antioxidantes protegen a la célula contra el daño causado por las moléculas inestables conocidas como radicales libres (Llacuna & Mach, 2012).

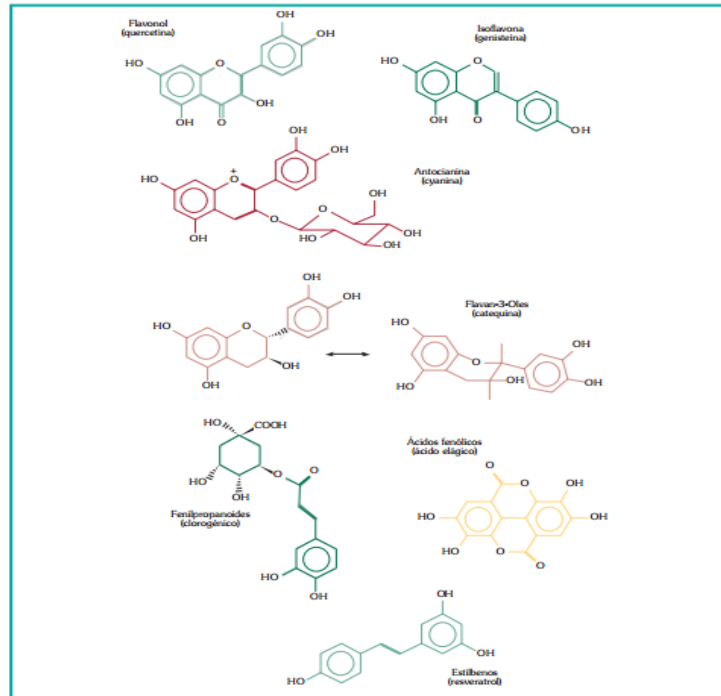
Los antioxidantes incluyen la vitamina A, E, C, betacaroteno, bioflavonoides, polifenoles entre otros, siendo interesante saber que estas sustancias se toman actualmente como

suplementos nutricionales o productos farmacéuticos (Giaquinta Aranda, Fernández Araque, Curbelo Rodríguez, & Rojo Aragues, 2016).

### 1.3. Compuestos fenólicos o polifenoles

En el reino vegetal se logra distinguir cuatro grandes grupos de compuestos fitoquímicos: sustancias fenólicas, sustancias terpénicas, sustancias azufradas y sustancias nitrogenadas (alcaloides). De estos cuatro grupos, son los tres primeros los que tienen mayor importancia como constituyentes de las frutas y hortalizas y los alimentos derivados con relevancia en la alimentación humana y, los polifenoles son los que se encuentran de forma general en todos los alimentos de origen vegetal (Tomás-Barberán, 2003).

Las sustancias fenólicas o polifenoles constituyen un grupo numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas (Figura 1), desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados (Tomás-Barberán, 2003).



**Figura 1.** Principales grupos de polifenoles de alimentos  
**Fuente:** Tomás- Barberán (2003).

Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno. Ellos se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color, la palatabilidad y el valor nutricional (Padilla, Rincón, & Bou-Rached, 2008).

Así mismo los polifenoles poseen propiedades captadoras de radicales libres dándoles así una actividad antioxidante, la misma que está relacionada con la ayuda y prevención de múltiples tipos de cáncer (Tomás-Barberán, 2003).

### **1.3.1. Compuestos fenólicos del cacao.**

Dentro de los polifenoles más abundantes presentes en el cacao se encuentran los metabolitos tipo flavonoide, contando con tres grupos básicos los que poseen un núcleo tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es la epicatequina que abarca el 30% del contenido de polifenoles del grano (Sotelo C. et al., 2015).

Los compuestos fitoquímicos polifenólicos podrían inhibir los procesos vasculares e inflamatorios involucrados en la patogenia de varias enfermedades, posiblemente debido a alteraciones en la síntesis de eicosanoides celulares. Ensayos *in vivo* e *in vitro* en humanos utilizando células endoteliales aórticas sugieren que las procianidinas del chocolate pueden alterar favorablemente la síntesis de eicosanoides (incrementando prostaciclina y reduciendo leucotrienos), lo que fundamentaría un posible mecanismo para explicar el motivo por el que los productos del cacao disminuyen la actividad plaquetaria en humanos (Gutierrez, 2002).

## **1.4 Extracción de antioxidantes**

La eficiencia de la extracción de antioxidantes está influenciada por múltiples parámetros como: el pretratamiento de la muestra (desengrasado y tamaño), relación entre el disolvente y la muestra, el tipo de solvente, tiempo y temperatura de la extracción (Spigno, Tramelli, & Faveri, 2007). Las condiciones apropiadas para la extracción de antioxidantes dependerán de la naturaleza de los antioxidantes presentes en la matriz de estudio, para lograr así la máxima recuperación de compuestos fenólicos (Liyana & Shahidi, 2005).

#### **1.4.1. Tipo de solvente**

El rendimiento cuantitativo y cualitativo de la extracción depende principalmente de la elección de disolventes debido a la afinidad molecular existente entre el disolvente y el soluto para la extracción de compuestos bioactivos (Azmir et al., 2013).

El uso de disolventes orgánicos para la obtención de ingredientes alimenticios es eficiente, sencilla, pero costosa, debido a las grandes cantidades de solvente que se requiere (Soto & Rosales, 2016). Desde la perspectiva de la seguridad alimentaria es conveniente utilizar disolventes tales como: mezclas de acetona:agua o de etanol:agua, ya que cumplen con las buenas prácticas de fabricación (Meneses et al., 2013); evitando que trazas del solvente orgánico queden en el extracto. Do et al. (2014), mencionan que el rendimiento de fenoles se incrementa con el aumento del contenido del agua en la extracción, debido a la solubilidad que presentan los compuestos. El metanol es usualmente un buen solvente de extracción y a pesar de su alta polaridad y altos rendimientos de extracción, la característica tóxica de este disolvente plantea serios problemas cuando el propósito de su aplicación es en productos alimenticios (Mussatto et al., 2011). Hoffmann (1996) y Sosa (1997), indican que las plantas deberían macerarse en soluciones hidroetanólicas en concentraciones del 30% o 70% de etanol, dada su baja toxicidad para consumo humano y considerándose como un procedimiento de extracción seguro y eficaz.

#### **1.4.2. Temperatura**

La temperatura tiene una gran influencia durante la extracción, ya que afecta el equilibrio (solubilidad), la velocidad de transferencia de masa (coeficiente de difusión) y la estabilidad de compuestos fenólicos (Luthria, 2008). Según Gimeno (2014) al ir incrementado la temperatura se facilita la difusión de compuestos desde la matriz hacia el solvente, sin embargo la estabilidad de los compuestos fenólicos y la desnaturalización de las membranas pueden ocurrir a temperaturas muy altas, generalmente sobre los 60 °C (Pinelo et al., 2005).

#### **1.4.3. Relación muestra-solvente**

La relación muestra-solvente tiene un efecto positivo durante la extracción, Pinelo et al. (2005) mencionan que cuanto mayor es la relación disolvente-muestra, mayor es la cantidad

total de antioxidantes obtenidos, de acuerdo a los principios de transferencia de masa. Se han estudiado varias relaciones muestra-solvente entre las más comunes se encuentran 1:1 y 1:10, sin embargo se ha demostrado que proporciones más altas desde 1:20 a 1:100 han dado mejores resultados (Dorta et al.2013); debiendo considerar en estos casos también los costos implicados al mayor uso de los solventes.

### **1.5. Determinación de fenoles**

Para esta determinación se utiliza el método colorimétrico Folin Ciocalteu que se basa en la reducción de fenoles con este reactivo y posterior neutralización con bicarbonato de sodio. Se construye una curva patrón usando como estándar ácido gálico a una absorbancia de 725nm (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006). El método es sensible y permite el análisis de compuestos orgánicos que se han hidroxilado a anillos aromáticos que al encontrar contenido fenólico presentan una coloración azul (Velázquez et al., 2014).

### **1.6. Determinación de actividad antioxidante**

#### **1.6.1. Método FRAP.**

Este método describe la capacidad de reducción basada en el ion férrico mediante una reacción de reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica que presenta un color amarillo al complejo ferroso color azul por un antioxidante en un medio ácido (Benzie & Strain, 1996). A medida que exista mayor cantidad de capacidad antioxidante en la muestra, mayor será la señal de absorbancia dada este método se mide a una longitud de onda de 593nm (Prior, 2005).

#### **1.6.2. Método DPPH.**

El método DPPH es uno de los métodos más representativos que emplean radicales, se ganó gran popularidad en la última década debido a su rapidez y sensibilidad (Koleva, Beek, Linssen, Groot, & Evstatieva, 2002). Cuando se mezcla una solución de DPPH con otra sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno reduce al radical DPPH<sup>•</sup>, perdiendo el color violeta y tomando un color amarillo pálido (Molyneux, 2004).

En su forma de radical el DPPH se absorbe a una longitud de onda de 515 nm, pero tras la reducción por un antioxidante, la absorción desaparece (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995).

### **1.7. Concentración media inhibitoria**

El índice de concentración media o denominado  $IC_{50}$  permite medir la inhibición del 50% del radical libre en solución de sustancias antioxidantes contenidas en diferentes tipos de matrices y extractos vegetales (Rodríguez, Salager, Forgiarini, 2013). Se considera que el valor  $IC_{50}$  es dependiente de la concentración del DPPH, así como de la naturaleza del compuesto antioxidante (Guija, E., Inocente, M., Ponce, J. Zarsosa, 2015). La técnica involucra una serie de ensayos dirigidos al estudio de la cinética de reacción entre los agentes antioxidantes y el DPPH a diferentes concentraciones, donde el medio de reacción debe garantizar la solubilización total del reactivo y las muestras, debido a que éste puede afectar de manera significativa los resultados (Rodríguez, 2013).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2.1. Muestra y preparación

La materia prima empleada en el presente estudio fue cacao (*Theobroma cacao* L.) en polvo desengrasado con un remante de 10 a 12% de manteca de cacao con un tamaño de partícula de  $\leq 355 \mu\text{m}$ ; proporcionado por la empresa TULICORP S.A.

## 2.2. Determinación de humedad

Se siguió el procedimiento descrito en la norma AOAC 934.06 de humedad en frutas deshidratadas. Se utilizó una estufa de vacío modelo OV-12, Vacuum Oven a  $70 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y  $-0,05 \text{ MPa}$ , hasta que la muestra presente un peso constante.

El contenido de la humedad se obtuvo por pérdida de peso, utilizando la siguiente fórmula y los cálculos correspondientes se encuentran en el **Anexo 1**.

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{\text{P. inicial} - \text{P. final}}{\text{P. inicial}} \times 100$$

## 2.3. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos se utilizó como solvente: etanol, agua y la mezcla de agua-etanol (50:50 v/v); a las temperatura de 20, 40 y 60  $^\circ\text{C}$ . Se elaboraron tres extractos por cada tratamiento, los cuales se definieron mediante un diseño estadístico factorial utilizando el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tratamientos para la obtención de extractos

<b>Solvente de extracción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Etanol	20
Agua	20
Etanol-agua (50:50 v/v)	60
Etanol	40
Agua	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	40
Etanol	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	20
Agua	40

**Elaboración:** La autora

Cada extracto se preparó usando una relación muestra-solvente de 1:20 (Rojas Jiménez, 2014; Sogi et al., 2013), para lo cual se pesó 1 g de muestra y se adicionó 20 mL del solvente; la mezcla se trabajó con maceración dinámica manteniendo la muestra en baño maría a la temperatura correspondiente y con agitación constante de 2500 rpm durante 1 hora y 30 minutos. Terminada la maceración, la muestra se centrifugó a 2790 rpm por 30 minutos en una centrifuga marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC® (Becton, Dickinson, MD, USA). El sobrenadante que fue de interés, se separó del residuo y fue almacenado en tubos plásticos protegidos con papel aluminio y colocados en congelación hasta su posterior uso.

### **2.3.1. Determinación de la concentración inicial de los extractos**

En viales previamente limpios, secos (70° C por 6 horas) y pesados, se colocó una alícuota de 2 mL de cada uno de los extractos. La concentración se realizó mediante evaporación en una estufa de convección forzada, con incremento paulatino de temperatura desde 40°C hasta 100°C para evitar pérdidas; a esta última temperatura se mantuvo el extracto hasta conseguir un peso constante por aproximadamente 10 horas.

La concentración se la obtuvo por pérdida de peso aplicando la siguiente fórmula:

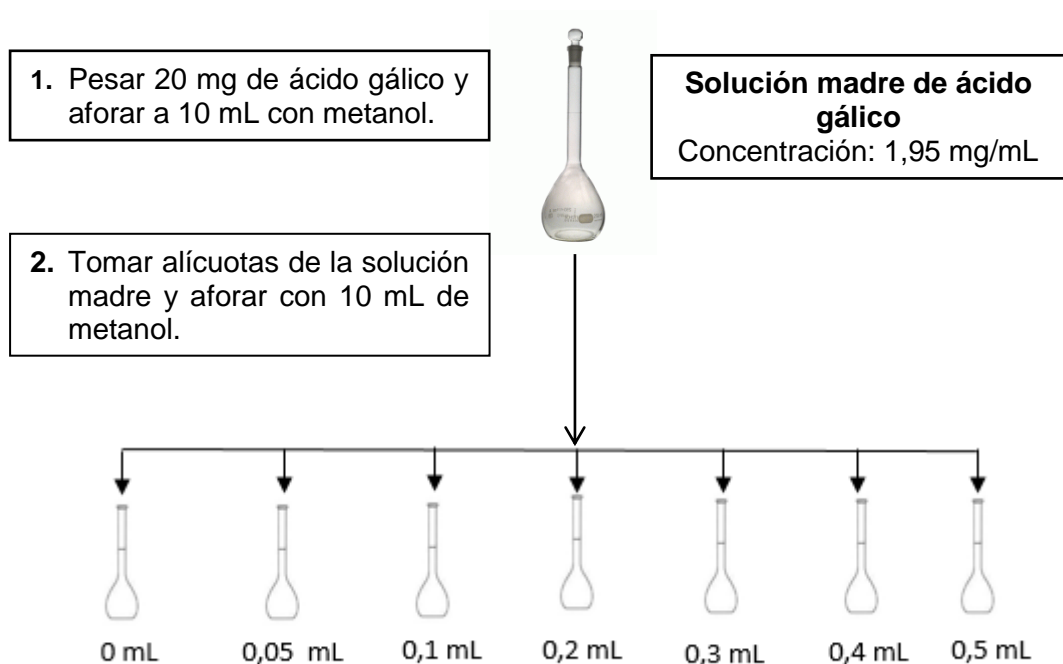
$$\text{Concentración del extracto: } \frac{P. \text{ final} - P. \text{ vial}}{\text{alícuota}}$$

#### 2.4. Cuantificación de fenoles totales

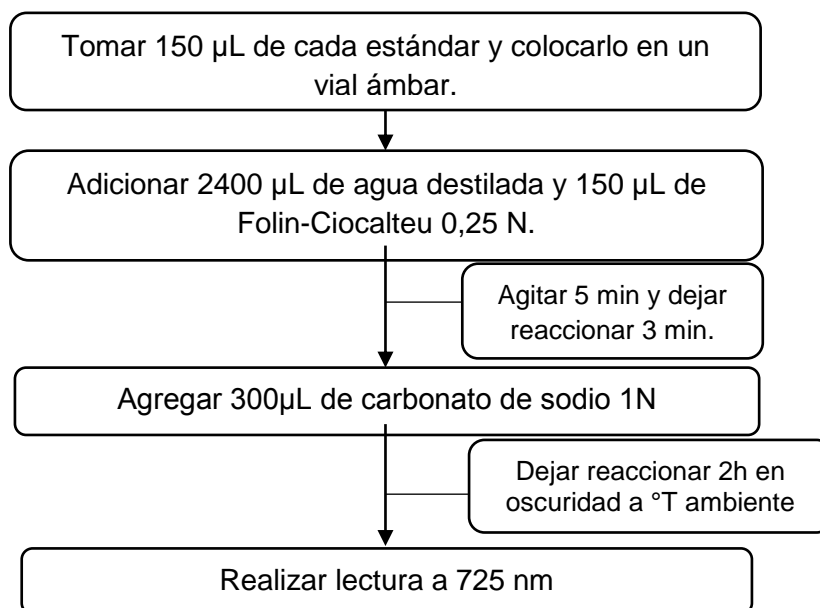
Para la cuantificación de fenoles totales se siguió el método Folin-Ciocalteu adaptado por Swain and Hillis (1959) y citado por Thaipong et al. (2006). Se utilizó ácido gálico como estándar y se procedió a leer las absorbancias en un espectrofotómetro Visible 6400 JENWAY®, encerado previamente con agua destilada.

Los resultados se expresaron en mg EAG/100g de muestra BS, reportando el valor promedio de tres repeticiones y la desviación estándar. El procedimiento se detalla en la **Figura 2** y los cálculos en el **Anexo 2**.

##### a) Preparación de la solución madre y estándares.



## b) Lectura de absorbancias



**Figura 2.** Cuantificación de fenoles totales  
**Elaboración:** La autora

Para leer las absorbancias de los extractos de cacao, se siguió el mismo procedimiento indicado en la figura 2 (b), cambiando los 150 µL del estándar por los 150 µL de cada extracto a analizar.

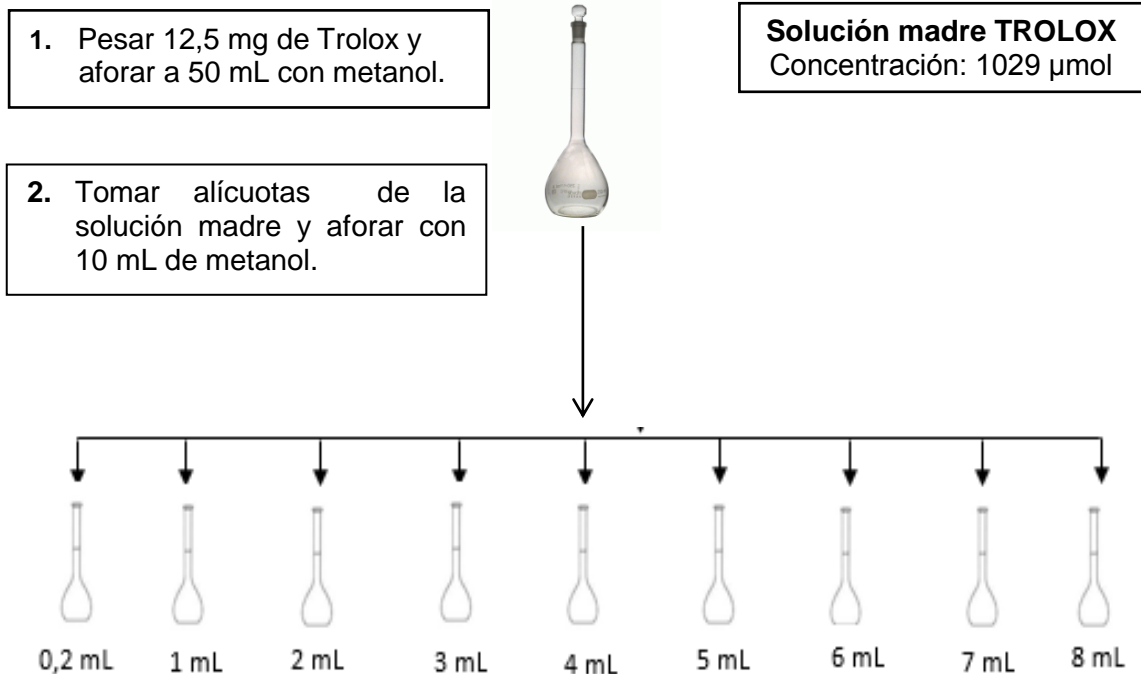
## 2.5. Cuantificación de la actividad antioxidante.

### 2.5.1. Método FRAP

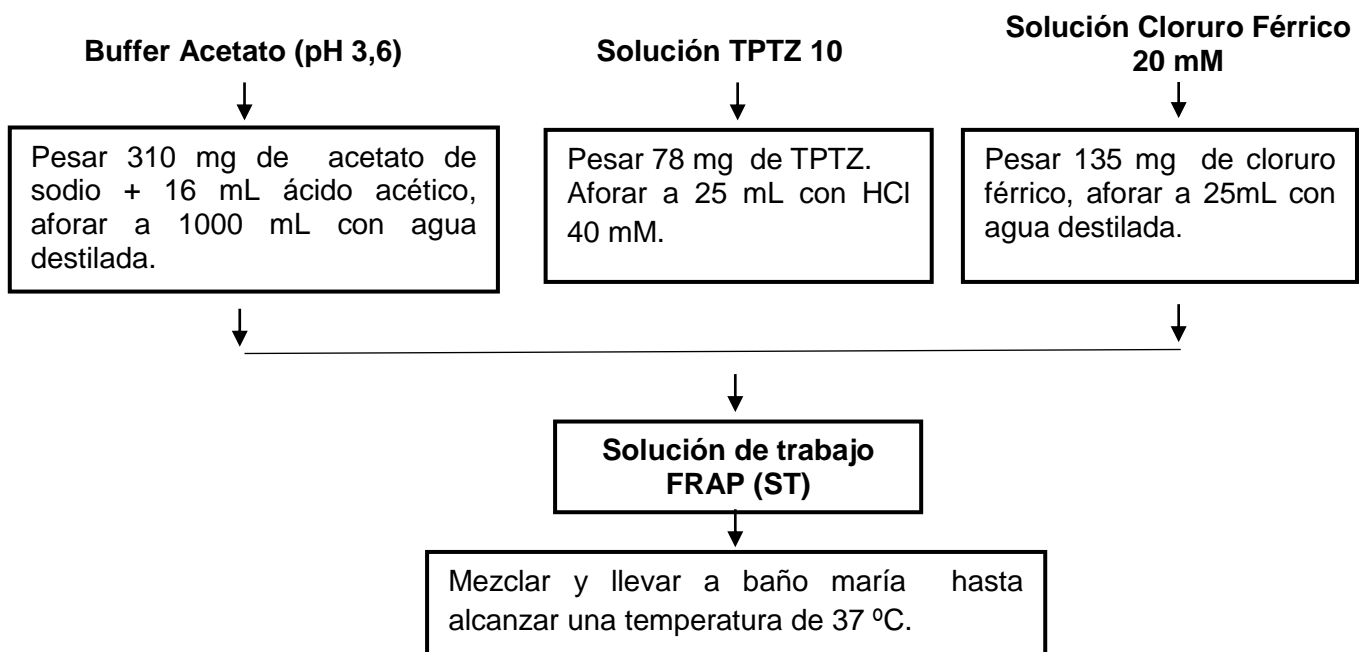
Se siguió la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) citado y modificado por Thaipong et al. (2006). Se utilizó como patrón de referencia el reactivo Trolox (Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) y la lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro Visible 6400 JENWAY®, a una longitud de onda de 593 nm.

Los resultados se expresaron en µmol TE/g BS, reportando el valor promedio de tres repeticiones y la desviación estándar. En la **Figura 3** se detalla el procedimiento y los cálculos correspondientes se especifican en el **Anexo 3**.

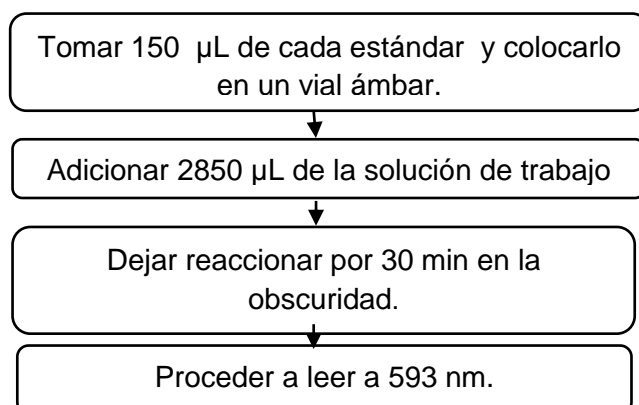
**a) Preparación de la solución madre y estándares.**



**b) Preparación de la solución de trabajo**



### c) Lectura de absorbancias



**Figura 3.** Determinación del método FRAP.  
**Elaboración:** La autora

Para leer las absorbancias de los extractos de cacao, se siguió el mismo procedimiento indicado en la figura 3 (c), cambiando los 150 µL del estándar por los 150 µL de cada extracto a analizar.

Se construyó una curva de calibración, graficando la concentración calculada de cada estándar (Anexo 4) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, la misma que debe presentar un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) mayor a 0,99.

En el caso de los extractos (muestras) los valores de las absorbancias deben ubicarse dentro del rango de los valores de la curva de calibración, recomendando siempre que los valores obtenidos no estén en los extremos de ésta. Los resultados fueron calculados con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

$$y = mx + b$$

**Donde:**

y = absorbancia(nm)

m = pendiente

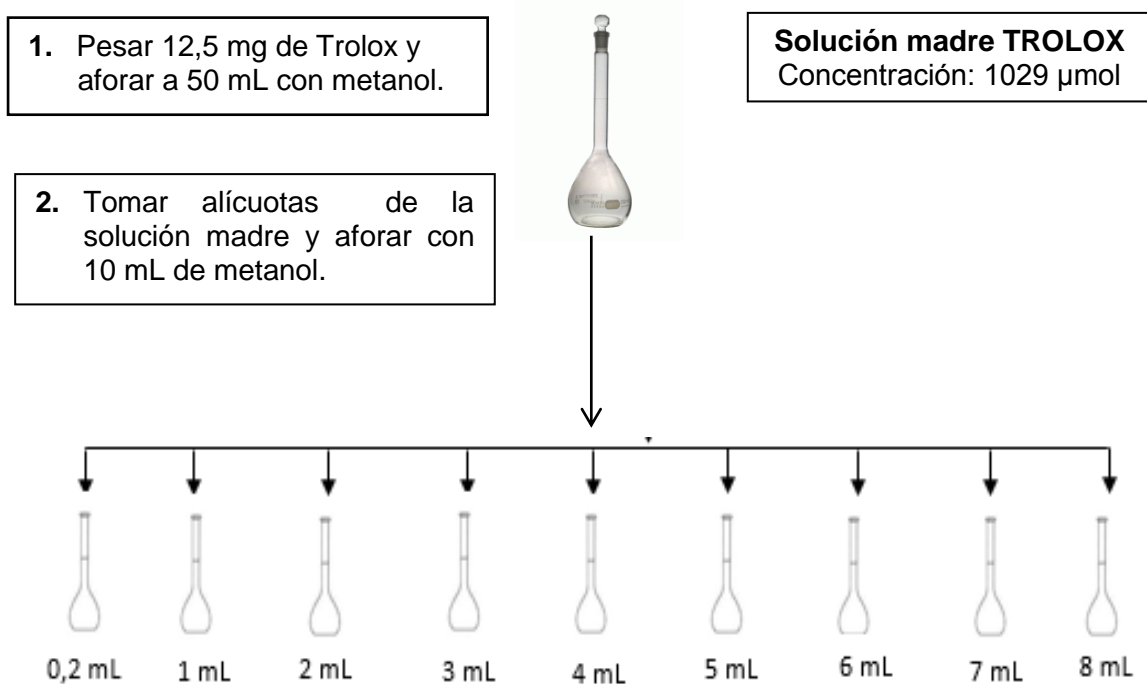
x = concentración

b = intersección

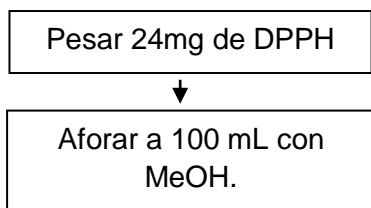
### 2.5.2. Método DPPH

Se empleó la metodología descrita por Brand-Williams et al. (1995) citada y modificada por Thaipong et al. (2006), este método permite medir la capacidad para capturar el radical 2,2-difenil-1-picrihidracil (DPPH) por parte de los antioxidantes. El reactivo Trolox se usó como estándar, las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro Visible 6400 JENWAY® previamente calibrado con metanol y a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol TE} / \text{g BS}$ , reportando el valor promedio de tres repeticiones con su desviación estándar. En la **Figura 4** se detalla el procedimiento y los cálculos correspondientes se especifican en el **Anexo 4**.

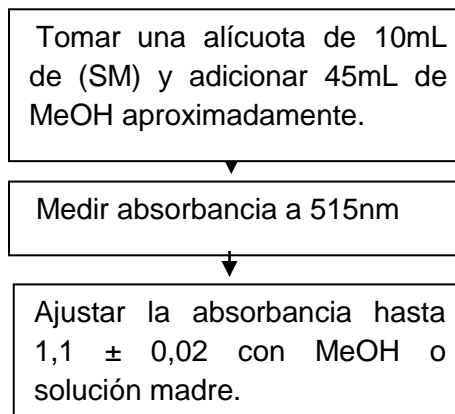
#### a) Preparación de la solución madre y los estándares.



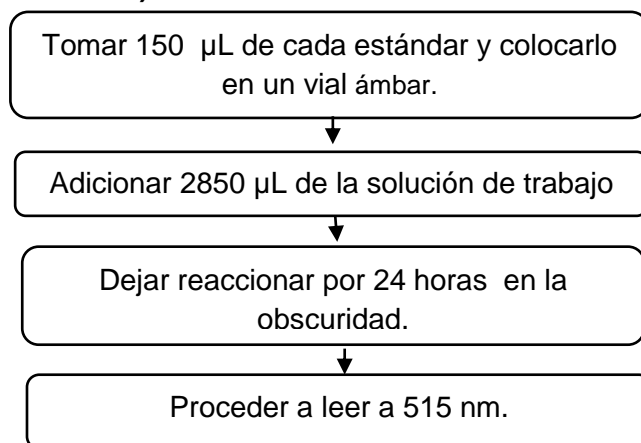
**b) Preparación de la solución madre**



**c) Preparación de la solución trabajo.**



**d) Lectura de absorbancias.**



**Figura 4.** Determinación del método DPPH.

**Elaboración:** La autora

Para leer las absorbancias de los extractos de cacao, se siguió el mismo procedimiento indicado en la figura 4 (d), cambiando los 150 µL del estándar por los 150 µL de cada extracto a analizar.

Se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (Anexo 2) en el eje X vs. la absorbancia en el eje Y, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe ser mayor a 0,99.

Los valores de las absorbancias de los extractos deben ubicarse dentro del rango de los valores de la curva de calibración, siendo lo óptimo que no esté en los extremos de ésta. Los resultados fueron calculados con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.



$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia(nm)

m = pendiente

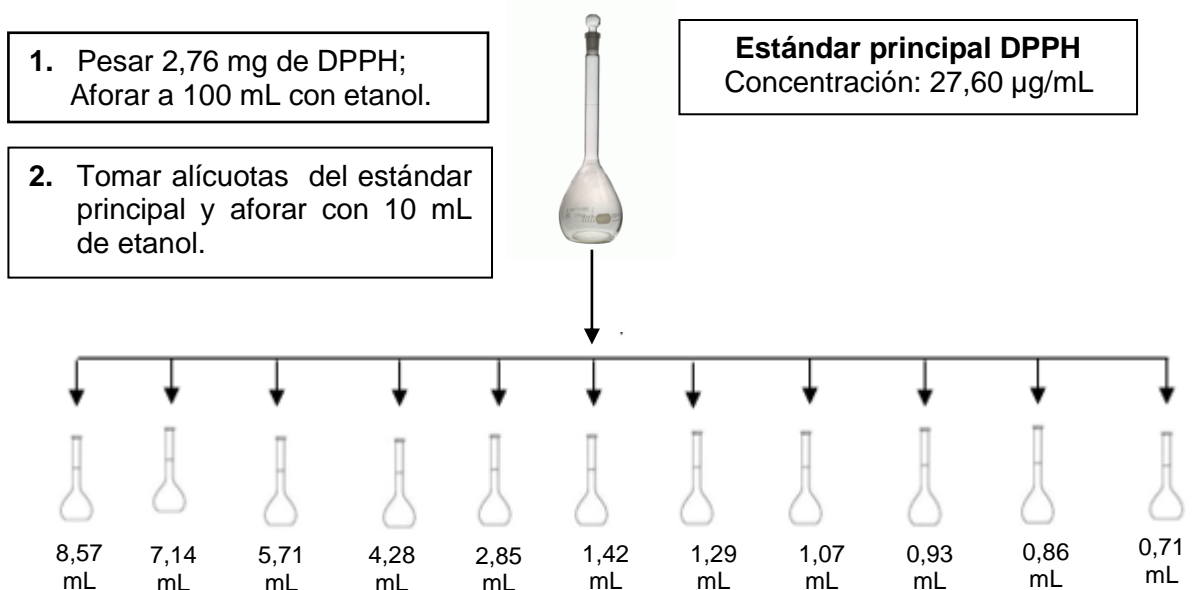
x = concentración

b = intersección

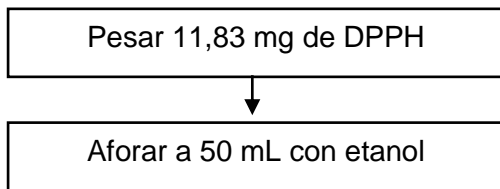
## 2.6. Determinación de IC<sub>50</sub> y AAI.

Para la determinación de este método se utilizó el procedimiento descrito por Scherer & Godoy (2009). Únicamente se utilizaron los extractos obtenidos con etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C los cuales fueron elegidos por presentar mayor índice de inhibición de radicales libres DPPH al igual que mayor capacidad de reducción basada en el ion férrico. El reactivo DPPH se usó como estándar, se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro Visible 6400, JENWAY®, previamente calibrado con etanol a una longitud de onda de 517 nm. En la **Figura 5** se detalla el procedimiento y los cálculos correspondientes se especifican en el **Anexo 5**.

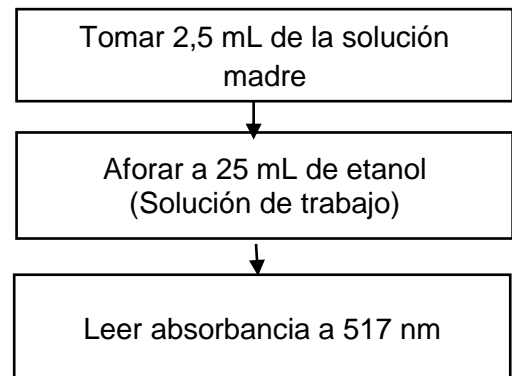
### a) Preparación del estándar principal y estándares secundarios.



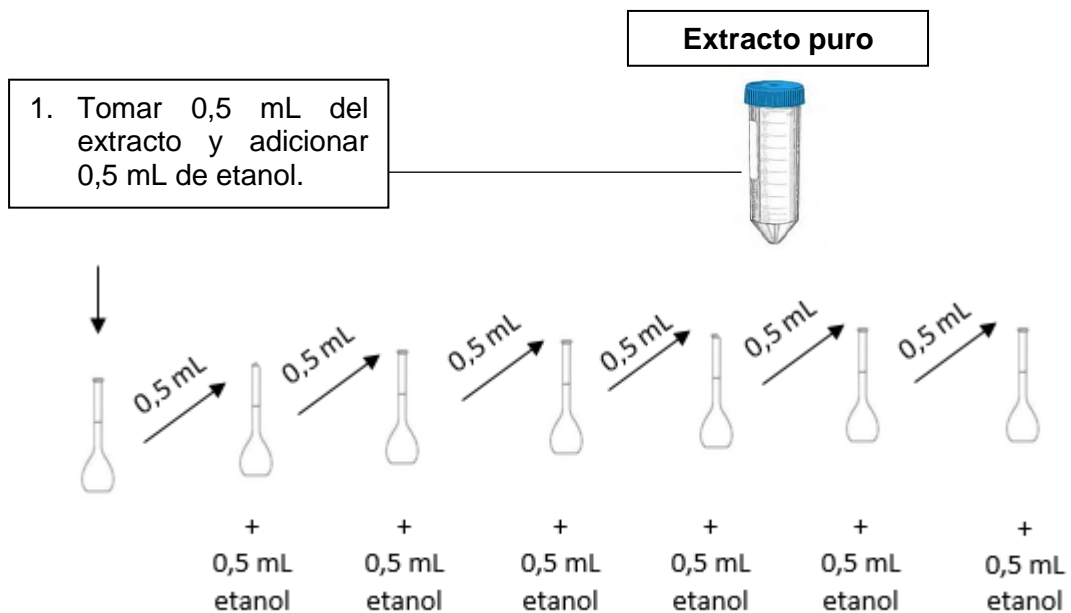
**b) Preparación de la solución madre DPPH**



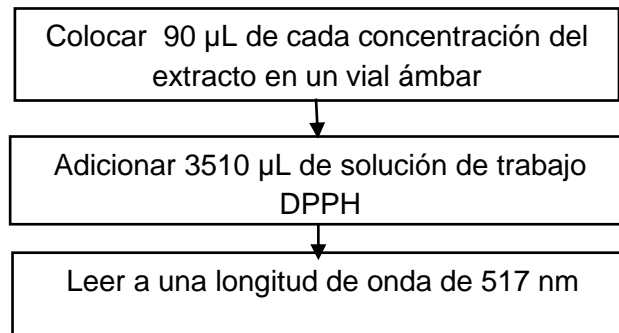
**c) Preparación de la solución de**



**d) Preparación de concentraciones del extracto puro**



**e) Lectura de absorbancias de las concentraciones de los extractos.**



**Figura 5.** Determinación de IC<sub>50</sub>.  
**Elaboración:** La autora.

Con los valores de las absorbancias de los estándares (Figura 5 literal a.) se construyó la curva de calibración, graficando la concentración del estándar (**Anexo 5**) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe ser mayor a 0,99.

En la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

**Donde:**

y = absorbancia(nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

Se trabajó con las absorbancias medidas a los 90 minutos las mismas que deben ubicarse dentro del rango de la curva de calibración.

El IC<sub>50</sub> se determinó gráficamente, construyendo una curva con la concentración calculada del extracto antioxidante en el eje X, obtenida a partir de la concentración inicial de los extractos analizados, vs. el % residual de DPPH en el eje Y, calculado con la fórmula:

$$\% \text{ Residual de DPPH} = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo (t)(mol/L)}}{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 (mol/L)}} \times 100$$

Obteniendo una ecuación polinómica:

$$y = ax^2 + bx + c$$

Para la obtención de la concentración del extracto se determinó a partir de la concentración inicial de los extractos indicada en el apartado 2.3.1. Los valores obtenidos de cada uno de ellos se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Concentración de los extractos utilizados para IC<sub>50</sub>.

Tratamiento analizado	Temperatura de extracción (°C)	Concentración del extracto (µg/mL)
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	9895
		10290
		10235

**Elaboración:** La autora

El índice de actividad antioxidante (AAI) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentración de DPPH en tiempo 0}(\mu\text{g/mL})}{IC_{50}(\mu\text{g/mL})}$$

## **2.7. Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa Minitab 16, y para determinar diferencias significativas se aplicó el test de rango múltiple (Tukey) con 95% de intervalo de confianza.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Concentración inicial de los extractos

La concentración inicial de cada uno de los extractos estudiados se indica en la tabla 3. Los cálculos correspondientes se encuentran en el **Anexo 6**.

**Tabla 3.** Concentración inicial de los extractos de cacao

<b>Solvente de extracción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentración del extracto (µg/mL)</b>
Etanol	20	4433,33 ± 370,7
	40	8671,67 ± 177,8
	60	7491,67 ± 267,6
Etanol- agua (50-50 v/v)	20	6183,33 ± 111,4
	40	10140,00 ± 213,9
	60	9210,00 ± 378,1
Agua	20	6722,00 ± 541,8
	40	10060,00 ± 689,0
	60	8845,00 ± 326,9

n = 3

**Elaboración:** La autora

### 3.2. Fenoles totales

Los resultados de la cuantificación de fenoles totales se muestran en la tabla 4. El menor contenido de fenoles presentaron los extractos obtenidos solamente con etanol, seguidos de los extractos con 100% agua; no existiendo diferencia significativa por la temperatura empleada en la extracción en ninguno de ellos.

Los valores de fenoles en los extractos acuosos de este estudio (1556,59 a 2208,47 mg EAG/100g) son superiores a los obtenidos por Won et al. (2003) para cacao en polvo (611 mg EAG/ 100g), té negro (124 mg EAG/ 100g) y té verde (165 mg EAG/ 100g); así como en subproductos de tamarindo (735,60 mg EAG/100 g) (Paute, 2016).

**Tabla 4.** Contenido de fenoles totales en extractos de cacao

<b>Solvente de extracción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Fenoles Totales (mg EAG/100 g muestra BS)</b>
Etanol	20	221,72 ± 11,14 <sup>a</sup>
	40	301,75 ± 5,48 <sup>a</sup>
	60	389,63 ± 54,33 <sup>a</sup>
Etanol- agua (50-50 v/v)	20	3614,02 ± 557,38 <sup>b</sup>
	40	4645,44 ± 390,02 <sup>c</sup>
	60	4784,50 ± 149,05 <sup>c</sup>
Agua	20	1556,59 ± 29,40 <sup>d</sup>
	40	2008,56 ± 60,84 <sup>d</sup>
	60	2208,47 ± 201,06 <sup>d</sup>

n = 3

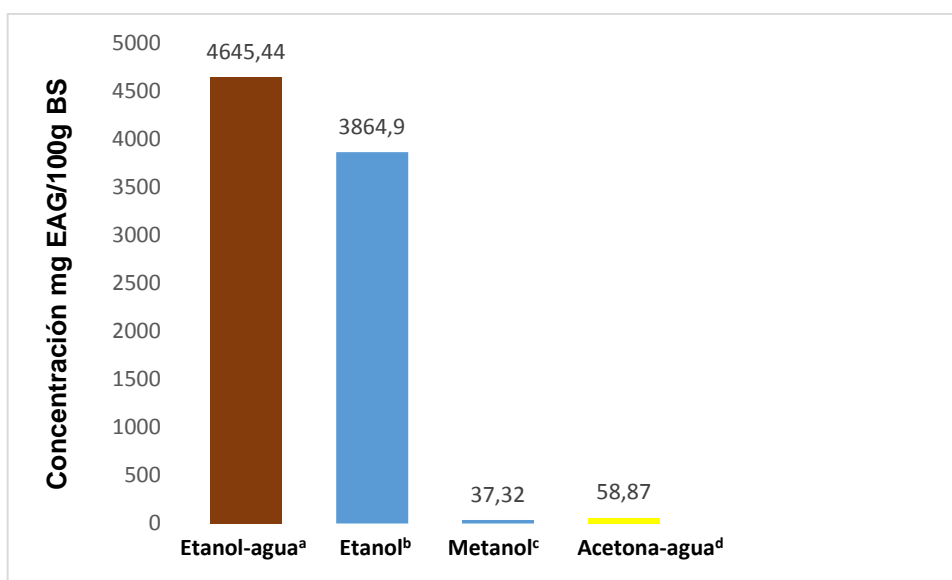
**EAG:** Equivalentes de ácido gálico **BS:** Base seca.Valores con la misma letra en la misma columna, no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )**Elaboración:** La autora

Los extractos con la mezcla de etanol-agua (50:50 v/v) presentaron el mayor contenido de fenoles totales, siendo estadísticamente mejor la extracción a 40 y 60°C. Las temperaturas de 40 y 60°C influyeron positivamente en el contenido de fenoles totales, ya que la temperatura favorece la extracción aumentando la solubilidad y el coeficiente de difusión de compuestos (Spigno & Faveri, 2007). En el estudio realizado por Restrepo, Narváez y Restrepo (2009) donde evaluaron la extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba, demostraron que el contenido de fenoles aumentó a medida que se incrementaba la temperatura obteniendo valores de 286 mg AG/ 100 g a 20°C y de 418 mg AG/ 100 g a 50°C. En este mismo estudio se evidenció que a temperaturas altas de 72°C existió disminución en la cantidad de fenoles totales, lo cual puede ser indicativo de un efecto de degradación que tiene la temperatura muy alta sobre el contenido de estos compuestos; lo anterior sustenta la mayor temperatura (60°C) usada en este estudio en las extracciones para evitar posibles pérdidas por volatilización o degradación de los compuestos fitoquímicos (Dorta et al. 2012).



En la **Gráfica 1** se muestra el contenido de fenoles presentes en cacao, reportado por varias investigaciones usando distintos solventes. Tanto los valores obtenidos en este estudio como los reportados por Ovaco & Pineda (2011) son los más altos, considerando que en los dos casos se empleó al etanol como solvente; mientras que los valores reportados por Zapata et al. (2014) corresponde a granos de cacao sin tostar y extraídos con metanol a 30 °C y los de Nazaruddin et al. (2001) fueron extraídos con una mezcla de acetona-agua para cacao en polvo comercial. Lo anterior demuestra que la mezcla de solventes etanol-agua permitió extraer compuestos fitoquímicos de ambas polaridades, ya que como lo mencionan Azmir et al. (2013) y Dorta et al. (2012) el etanol es un disolvente de baja polaridad que extrae compuestos menos polares (flavonoles, taninos) mientras que el agua que es un fuerte disolvente polar extrae compuestos más polares (antocianinas, terpenoides), por lo que al mezclar estos dos solventes aumenta la polaridad facilitando la extracción de sustancias fenólicas de ambos extremos de polaridad, ya que las mezclas de alcoholes y agua han revelado ser más eficientes en la extracción de constituyentes fenólicos en comparación con un sistema de disolventes donde se utiliza un solo disolvente (Spigno, Tramelli, & Favari, 2007).

**Gráfica 1.** Contenido fenólico en cacao extraído con varios solventes.



**EAG:** Equivalentes de ácido gálico. **BS:** Base seca

**Fuente:** La experimentación<sup>a</sup>. Ovaco & Pineda (2011)<sup>b</sup>. Zapata et al. (2014)<sup>c</sup>. Nazaruddin et al. (2001)<sup>d</sup>.

**Elaboración:** La autora

### 3.3. Capacidad antioxidante.

En la tabla 5 se indican los resultados de la capacidad de reducción férrica FRAP en las muestras de cacao estudiadas, al igual que en el contenido de fenoles es mayor en los extractos donde se usó la mezcla de etanol-agua (50:50 v/v), siendo estadísticamente diferente el tratamiento de 20°C con los de 40 y 60°C. Como lo manifiestan González y González (2010) el aumento de temperatura mejora la eficiencia de extracción debido a que se facilita la velocidad de propagación de los compuestos fitoquímicos en los disolventes. Este comportamiento se repite en los extractos de etanol y agua, donde también se observa que a medida que se incrementa la temperatura, la capacidad antioxidante es mayor.

**Tabla 5.** Capacidad antioxidante del cacao por el método FRAP

<b>Solvente de extracción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>FRAP (µM ET/ g muestra BS)</b>
Etanol	20	34,98 ± 4,21 <sup>a</sup>
	40	48,32 ± 7,04 <sup>a</sup>
	60	69,14 ± 4,89 <sup>b</sup>
Etanol- agua (50-50 v/v)	20	317,02 ± 7,48 <sup>c</sup>
	40	357,11 ± 6,09 <sup>d</sup>
	60	356,37 ± 1,64 <sup>d</sup>
Agua	20	138,64 ± 5,27 <sup>e</sup>
	40	164,46 ± 2,68 <sup>f</sup>
	60	186,72 ± 0,56 <sup>g</sup>

n = 3

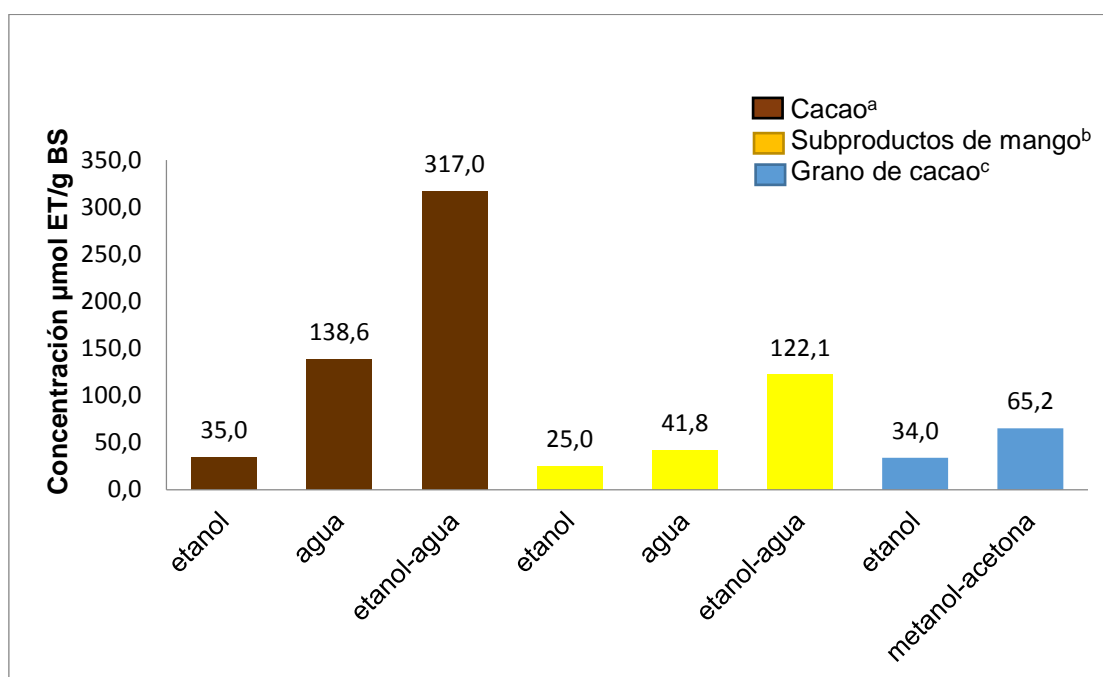
**ET:** Equivalentes de Trolox. **BS:** Base seca

Valores con la misma letra en la misma columna, no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Elaboración:** La autora.

El cacao en polvo estudiado presenta un gran potencial antioxidante (317,02 a 357,11  $\mu\text{M}$  ET/ g muestra BS), superior a otras frutas como la guayaba (147,00  $\mu\text{M}$  ET/ g muestra BS) y açai (128,44  $\mu\text{M}$  ET/ g muestra BS ) en el que se ha utilizado una mezcla de solventes, incluido el agua (Restrepo et al. 2009; Rufino et al., 2011); corroborándose de esta forma lo mencionado por Meneses et al. (2013) que indica que al adicionar agua a disolventes orgánicos tales como acetona, metanol y etanol se crea un medio más polar mejorando así su extracción. En la **Gráfica 2** se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de varios alimentos al emplear un solo solvente y mezclas de los mismos; demostrándose que existe mejor extracción en el segundo caso debido al aumento de la polaridad.

**Gráfica 2.** Comparación de la capacidad antioxidante con diferentes solventes - método FRAP



**ET:** Equivalentes de Trolox. **BS:** Base seca

**Fuente:** La experimentación<sup>a</sup>. Martínez (2016)<sup>b</sup>. Ovaco & Pineda (2011)<sup>c</sup>.

**Elaboración:** La autora.

Comparando las diferentes partes del fruto de cacao, se corrobora que en cuanto al contenido de antioxidantes medido por el método FRAP y en extractos 100% etanol a temperatura ambiente, los valores reportados por Ovaco & Pineda (2001) son de 5,9 ; 3,4 ; 5,0 y 34  $\mu\text{M}$  TE/g para cáscara, testa, pulpa y grano; respectivamente. Este último valor es similar al obtenido en la muestra en estudio (34,98 $\mu\text{M}$  TE/g).

En la tabla 6 se puede apreciar que, en general, los extractos etanol-agua (50:50 v/v) obtuvieron mayores valores de actividad antioxidante medida por DPPH, coincidiendo de esta forma con lo expresado por Pérez et al. (2013), que manifiesta que los extractos con mayor contenido fenólico resultan ser los de mayor actividad inhibidora del radical DPPH, lo que demuestra que dicha actividad biológica se atribuye a los compuestos fenólicos obtenidos en la fracción en etanol-agua.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante del cacao por el método DPPH

Tratamiento	Temperatura (°C)	DPPH (µM ET/ g muestra BS)
Etanol	20	25,16 ± 1,84 <sup>a</sup>
	40	38,49 ± 2,37 <sup>a</sup>
	60	43,02 ± 9,06 <sup>a</sup>
Etanol- agua (50-50 v/v)	20	454,96 ± 3,76 <sup>b</sup>
	40	446,15 ± 1,36 <sup>b</sup>
	60	454,50 ± 1,84 <sup>b</sup>
Agua	20	185,51 ± 11,10 <sup>c</sup>
	40	213,99 ± 60,79 <sup>c</sup>
	60	181,11 ± 6,18 <sup>c</sup>

n = 3

**ET:** Equivalentes de Trolox. **BS:** Base seca

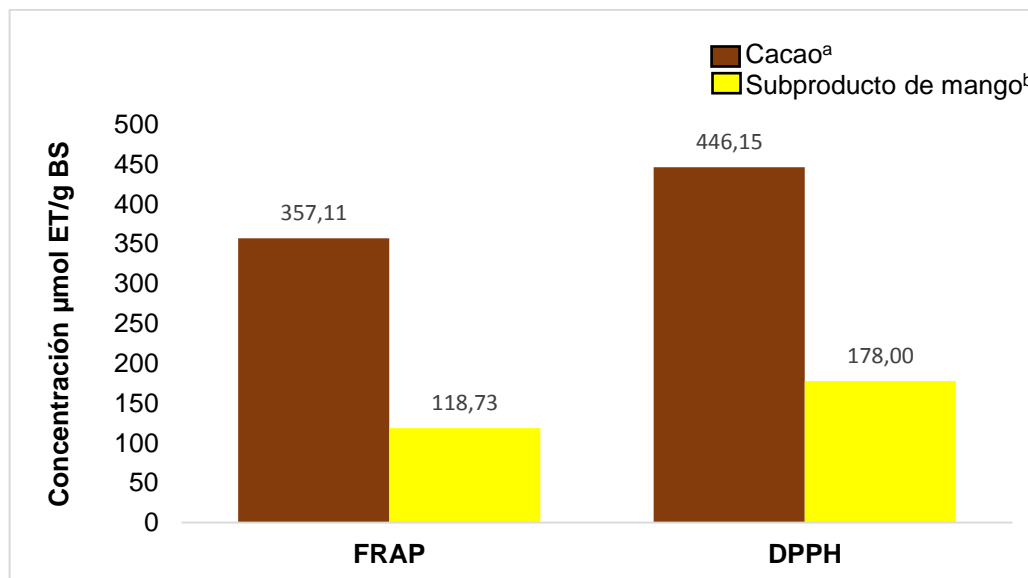
Valores con la misma letra en la misma columna, no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Elaboración:** La autora.

Mediante el análisis de decoloración por secuestro del radical DPPH por parte de los antioxidantes, se observa que el grano de cacao reportado por Ovaco & Pineda (2011) exhibe aproximadamente cinco veces más actividad antioxidante (113,8 µmol ET/g BS) que la muestra de cacao de este estudio en los extractos etanólicos a temperatura ambiente; sin embargo y como se observa en la tabla 6, al utilizar agua y etanol en la extracción y a la misma temperatura, la capacidad antioxidante de nuestra muestra incrementa en un 95%. Lo anterior corrobora nuevamente el beneficio de mezclar agua y etanol en la extracción, y de usar temperaturas de 40 y/o 60 °C. Este mismo comportamiento lo reporta Martínez

(2016) para los subproductos de mango; siendo superiores los valores obtenidos en cacao (Gráfica 3).

**Gráfica 3.** Capacidad antioxidante de cacao y subproductos de mango con extracción etanol-agua a 40°C



ET: Equivalentes de Trolox. BS: Base seca  
Fuente: La experimentación<sup>a</sup> Martínez (2016)<sup>b</sup>.  
Elaboración: La autora.

### 3.4. IC<sub>50</sub> y AAI

La concentración inhibitoria IC<sub>50</sub> se la determinó a partir de una concentración de DPPH de 24,14 μg/mL únicamente al extracto de la mezcla etanol-agua a 40°C. Los resultados se encuentran reflejados en la tabla 7, mostrando una capacidad inhibitoria menor a la descrita por Scherer & Godoy (2009) para compuestos puros como el ácido gálico (1,11 μg/mL) y quercitina (1,90 μg/mL) a una concentración de DPPH de 30,75 μg/mL.

Con los resultados de IC<sub>50</sub> obtenidos, la muestra de cacao analizada presentaría un moderado potencial antioxidante, según la clasificación de Tovar (2013) que consideran con alto potencial antioxidante los valores menores a 30 μg/mL, con moderado potencial a los ubicados en un rango de 30 a 100 μg/mL y bajo potencial antioxidante los valores superiores

a 100 µg/mL. Por otro lado, de acuerdo a lo propuesto por Scherer & Godoy (2009), el índice de actividad antioxidante (AAI) del cacao es bajo, por ser inferior a 0,5.

**Tabla 7.** IC<sub>50</sub> y AAI del cacao

<b>Tratamiento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>AAI</b>
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	81,69 ± 1,44	0,29 ± 0,005

**Elaboración:** La autora.

Se han reportado valores similares a los de este estudio para el índice de capacidad media inhibitoria, así Nazario et al. (2014) indican que la mayor eficiencia para inhibir el radical DPPH de un clon de cacao “Criollo” denominado ICS-95 fue de 73,293 µg/mL y para el clon SCA-6 de 80,473 µg/mL; por otro lado Chávez & Ordoñez (2013) reportan para polvo de cacao, un IC<sub>50</sub> mayor 52,743 µg/mL similar al del licor de cacao con 52,930 9 µg/mL. Se debe indicar que estos dos autores utilizaron una forma distinta de medir este índice, usaron otros solventes y diferente concentración de DPPH.

## CONCLUSIONES

- La mezcla de solventes etanol-agua (50:50 v/v) logró extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos y obtener la mejor capacidad antioxidante en cacao.
- El incremento de temperatura influyó positivamente en la extracción de fenoles y en su actividad antioxidante.
- Los extractos obtenidos de la mezcla etanol-agua (50:50) v/v a la temperatura de 40°C y 60°C, presentan alta capacidad antioxidante y media capacidad inhibitoria corroborando el potencial funcional que posee el cacao.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar celdas nuevas y en óptimas condiciones para una correcta lectura espectrofotométrica.
- Las muestras deben ser leídas en el tiempo de reacción establecido por la técnica descrita, con la finalidad de evitar falsos resultados o que sean erróneos al momento de reportar, debido a la sensibilidad que presenta dichos antioxidantes.
- En vista de los excelentes resultados obtenidos en este trabajo, sería necesario realizar un perfil polifenólico de los mejores extractos para identificar los compuestos individuales presentes en el cacao y con ello tener mayor información sobre los beneficios y potencialidades de este alimento.



## BIBLIOGRAFÍA

- Anecacao. (2014). Actualidad y perspectivas del sector cacaotero en Ecuador. Recuperado de (<http://www.anecacao.com/uploads/2014/09/1-EI-Ecuador-Actualidad-y-Perspectivas-del-Sector-Cacaotero-ANECACAO-cumbre-mundial-del-cacao-2014.pdf>).
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436
- 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.
- Brand-Williams, W , Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food science and Technology* 30, 25–30.
- Brossard-González, C. O., Ferrari, R. A., Pighinelli, A. L., & Park, K. J. (2010). Evaluación preliminar del etanol anhidro como solvente en la extracción de aceite de semillas de jatrofa (*Jatropha curcas* L.). *Grasas Y Aceites*, 61(3), 295–302. <http://doi.org/10.3989/gya.087209>
- Cádiz -Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gomez, M., Legeai-Mallet, L., Fernandez-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485–498. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
- Cevallos Caillagua, Lizett del Cisne. (2016). Optimización de extracción de antioxidantes de zarandaja (*Labrad purpureus* L.) Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Chávez, R., & Ordoñez, E. (2013). Polifenoles totales, Antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento de licor y polvo de cacao. *Revista ECI Perú*, 10, 42–49.
- Días Curay, Alejandra Tatiana. (2011). “Pulpa de café: *Coffea Arabica* L.: como fuente alternativa de antioxidantes. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Do, Q. D.; Angkawijaya, A. E.; Tran-Nguyen, P. L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F. E.; Ismadji, S.; Ju, Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila* aromatic. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3):296-302.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & Gonzalez, M. (2012). Reutilization of Mango Byproducts : Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties, *Journal of Food Science*, 77(1), C80-C88.
- Dorta, E., Lobo, M., Gonzalez, M. (2013). Optimization of Factors Affecting Extraction of Antioxidants from Mango Seed. *Food Bioprocess Technol* 6:1067–1081.
- Gálvez, J. Q., Sánchez, C. R. T., Ruiz, Y. C., Molina, Y. Q., & De la Torre, C. M. H. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 201–215.
- Giaquinta Aranda, A., Fernández Araque, A., Curbelo Rodriguez, R., & Rojo Aragues, A. (2016). Glaucoma y antioxidantes: revisión sistemática. *Revista Mexicana de*

*Oftalmología*, (xx). <http://doi.org/10.1016/j.mexoft.2016.03.007>

- Gimeno David .(2015). Optimización de la extracción de compuestos de interés en subproductos de frutas tropicales para su aplicación en matrices alimentarias.Universidad de Zaragoza.
- González,M., González ,V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals.*Analytical Methods* , 1842–1866. <http://doi.org/10.1039/c0ay00361a>
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J.Zarsosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2 , 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo ( DPPH ) para determinar capacidad antioxidante, 2(1), 0–3.
- Gutierrez, B. (2002). Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2), 149–152. Retrieved from [http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP\\_21\\_2\\_3\\_1\\_S2133VGV50.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_3_1_S2133VGV50.pdf)
- Hoffmann, D. 1996. Guía familiar de Plantas Medicinales. Fitoterapia práctica para un bienestar integral. Madrid. TIKAL, 256
- Koleva, I. I., Beek, T. A. Van, Linssen, J. P. H., Groot, A. De, & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 8–17.
- Lecumberri,E.,Mateos, R.,Izquierdo,M., Rupèrez,P.,Goya, L.,Bravo,L. (2006). Dietary fibre composition , antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa ( *Theobroma cacao* L. ), *Food Chemistry* 104, 948–954.
- Liyana,C.,Shahidi,F.(2005).Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93 (2005) 47–56.
- Luthria,D.(2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry* 107 ,745–752
- Llacuna, L., & Mach, N. (2012). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana Y Dietética*, 16(1), 16–24. [http://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70067-4](http://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70067-4)
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Martínez Morales, Enith Salomé. (2016). Calidad fenólica de los subproductos de mango. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer ' s spent grains. *Separation and purification technology*, 108, 152–158. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Molyneux, P. (2003). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl ( DPPH ) for estimating antioxidant activity.*Songklanakarín J.Sci.Technol.*26(2):211-219.

- Mussato, S., Ballesteros, L., Martins, S., Teixeira, J. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology* 83 173–179.
- Nazaruddin R., Ayub, Y., Mamot, S., Heng, H. (2001). HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, Vol. 7, No. 2.
- Nazario, O., Ordoñez, E., Mandujano, Y., Arévalo, J. (2014). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y analisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonía*. 3 (1): 51-59
- Othman, A., Maleyki, A., King, K., Ismail, A., Ghani, N., Adenan, I. (2009). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(7), pp. 1052-1059,
- Ovaco Vaca, Deycy Cecilia. Pineda LLanes, Ivanova Cecibel (2011). Los residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(3), 303–308.
- Paute Torres, Ana Belen. (2016). Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Pérez, V., Lugo, E., Gutiérrez M., Toro, C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cascara de lima (*Citrus limetta* Risso), *Biotechnia*, 18-22.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Seneiro, J., Núñez. (2005). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assesment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry* 94(3):406-414.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4290–4302.
- Restrepo, D., Narváez, C., Restrepo, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de Guayaba cultivada en Vélez- Santander, Colombia. *Quim. Nova*. 6, 1517-1522.
- Rodríguez, J., Salager, J., Forgiarini, A. (2013). Evaluación del poder antioxidante de una microemulsión conteniendo quercetina y aceites esenciales mediante un método optimizado de análisis. *Ciencia e Ingeniería*, 34(1), 45–50.
- Rojas Jiménez, Ximena Alexandra. (2014). Valoración de los subproductos de mango (*Mangifera Indica* L.) y guayaba (*Psidium Guajava* L.) como fuente de fibra dietaria y antioxidante. (Bioquímico Farmacéutico), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Rufino, M., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S., & Saura-Calixto, F. (2011). Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, 44(7), 2100-2106.

- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index ( AAI ) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food chemistry* 112, 654–658. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Sogi, D. S., Siddiq, M., Greiby, I., & Dolan, K. D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food chemistry*, 141(3), 2649-2655.
- Sosa R. 1997. El poder medicinal de las plantas. APIA. 24
- Sotelo C., L., Alvis B., A., & Arrázola P., G. (2015). Evaluación de epicatequina , teobromina y cafeína en cáscaras de cacao ( *Theobroma cacao* L .), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124–134.
- Soto,M.,Rosales,M.(2016). Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from pinus durangensis and quercus sideroxylla bark. *Maderas. Ciencia y tecnología* 18(4): 701 - 714
- Spigno, G., & Faveri, D. M. De. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc : Influence of extraction procedure on yield , purity and antioxidant power of the extracts, 78, 793–801. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.020>
- Spigno, G., Tramelli, L., & Faveri, D. M. De. (2007). Effects of extraction time , temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, 81, 200–208. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRA6P, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tovar del Rio, Jennifer.(2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. Universidad tecnológica de Pereira.Pereira.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición Y Salud*, 10, 41–53.
- Velázquez, C., Villa, M., Alvarez, C.,Chávez, J., L., García, T., Ferriz, R., Garcia, O., Rosado, J., López, C.,Castellote,A.,Andrade, H., De la Torre, K. (2014). Total phenolic compounds in milk from different species . Design of an extraction technique for quantification using the Folin – Ciocalteu method. *Food Chemistry*. 176, 480–486. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>
- Won,K.,Jun, Y., Joo,H., Yong, C. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine, 7292–7295.
- Zapata,S.,Tamayo,A.,Alberto,B.(2014).Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao Colombiano. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 68(1): 7497-7507
- Zhang, Z., Li, D., Wang, L., Ozkan, N., Dong, X., Mao, Z., & Yang, H. (2007). Optimization of ethanol – water extraction of lignans from flaxseed, 57, 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.03.006>

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Condiciones iniciales de la muestra de cacao.

**A). Determinación de humedad.**

<b>Muestra</b>	<b>Peso de la cápsula (g)</b>	<b>Peso inicial muestra (g)</b>	<b>Peso cápsula + muestra (g)</b>	<b>Peso final muestra (g)</b>	<b>Contenido de humedad (g/100 g)</b>	<b>Media</b>
1	86,9632	5,0145	91,9777	4,8978	2,3273	<b>2,3558</b>
2	111,8983	5,0963	116,9946	4,9736	2,4076	
3	111,0200	5,1020	116,122	4,9830	2,3324	

**Fórmula:**

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{\text{Peso inicial muestra} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} \times 100$$

**Ejemplo:**

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{5,0145 \text{ g} - 4,8978 \text{ g}}{5,0145 \text{ g}} \times 100$$

$$\text{Contenido de humedad} = 2,3273\text{g}/100\text{g}$$

**b) Determinación del contenido de sólidos totales**

<b>Muestra</b>	<b>% de sólidos totales(ST)</b>	<b>Media</b>
1	97,6727	<b>97,64</b>
2	97,5924	
3	97,6676	

**Fórmula:**

$$\% \text{ ST} = 100\% \text{ ST} - \text{contenido de humedad}$$

**Ejemplo:**

$$\% \text{ ST} = 100 - 2,3273$$

$$\% \text{ ST} = 97,6727$$

## Anexo 2. Cuantificación de fenoles totales.

### 1. Preparación de reactivos

#### ➤ Preparación de Folin-Ciocalteu 0,25 N

$$\text{Fórmula: } C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

$C_1$ = Concentración inicial del reactivo

$V_1$ = Alícuota a tomar para la obtención de la concentración deseada

$C_2$ = Concentración deseada

$V_2$ = Volumen preparado del reactivo a la concentración deseada

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$
$$V_1 = \frac{0,25 \text{ N} \times 10 \text{ mL}}{2 \text{ N}}$$

**$V_1 = 1,25 \text{ mL}$  de Folin aforados a 10 mL con agua destilada.**

#### ➤ Preparación de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 N

**Peso molecular:** 106 g/mol

**Equivalente químico:** 53 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 53 \text{ g} & \times & 1000 \text{ mL} \text{ -----} & 1 \text{ N} \\ X & & 25 \text{ mL} \text{ -----} & 1 \text{ N} \end{array}$$

$$X = \frac{53 \text{ g} \times 25 \text{ mL} \times 1 \text{ N}}{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ N}} = 1,325 \text{ g aforados a 25 mL con agua destilada.}$$



## 2. Preparación de la solución madre.

Cantidad pesada de Ac. Gálico (mg)	Peso molecular del Ac. Gálico (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	C. Solución patrón (mg/mL)
20	170	97	10	1,95

$$C_{SM} = \frac{\text{Peso del ácido gálico} \times \text{pureza del ácido gálico}}{\text{volumen a preparar de solución madre}}$$

$$C_{SM} = \frac{20\text{mg} \times 0,975}{10 \text{ mL}} = 1,95\text{mg/mL}$$

Al transformar las unidades de mg/mL a mg/L, tenemos:

$$C_{SM} = 1,95 \text{ mg/ mL} \times 1000 \text{ mL} = \mathbf{1950 \text{ mg/L}}$$

A partir de este valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

$C_{SM}$ : Concentración de la solución madre (ácido gálico)

$V_{SM}$ : Volumen de la solución madre

$C_E$ : Concentración del estándar (ácido gálico)

$V_E$ : Volumen preparado del estándar (ácido gálico)

$$C_E = \frac{C_{SM} \times V_{SM}}{V_E}$$

$$C_E = \frac{1,95 \text{ mg/mL} \times 0,05 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = \mathbf{0,00975 \text{ mg/mL}}$$

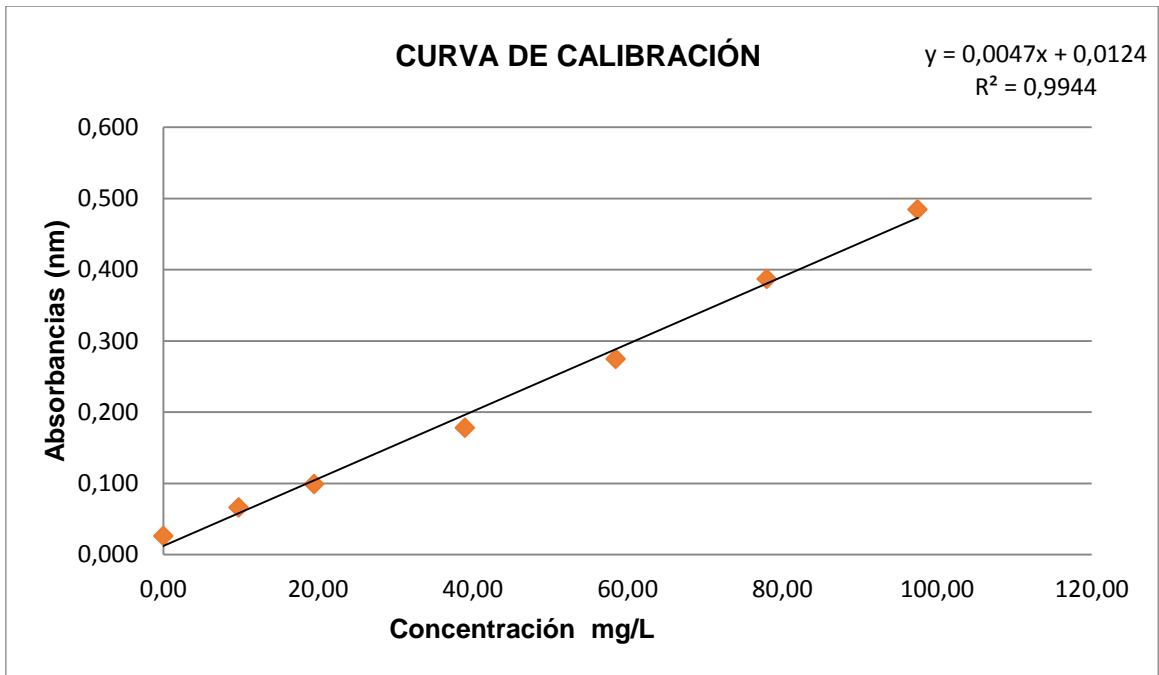
Por consiguiente obtenemos las siguientes concentraciones:

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	
			(mg/mL)	(mg/L)
1	0,00	10	0,00000	0,00
2	0,05	10	0,00975	9,75
3	0,10	10	0,01950	19,50
4	0,20	10	0,03900	39,00
5	0,30	10	0,05850	58,50
6	0,40	10	0,07800	78,00
7	0,50	10	0,09750	97,50

### C3. Curva de calibración.

Estándar	Alícuota* (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg/L)	Absorbancias
1	0,00	10	0,00	0,026
2	0,05	10	9,75	0,066
3	0,10	10	19,50	0,099
4	0,20	10	39,00	0,178
5	0,30	10	58,50	0,274
6	0,40	10	78,00	0,387
7	0,50	10	97,50	0,484

\* Volumen que se toma de la solución madre.



<b>Pendiente</b>	0,0047
<b>Intersección</b>	0,0124
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9944

C5. Resultados de la cuantificación de fenoles totales

Solvente de extracción	Temperatura	Peso de la muestra (g)	FD <sup>1</sup>	Absorbancia	Fenoles totales		Promedio
					(mg EAG/100 g BH)	(mg EAG/100 g BS)	
Etanol	20°C	1,00	1:5	0,115	220,141	225,452	221,724
		1,00	1:5	0,118	225,092	230,522	
		1,05	1:5	0,113	204,269	209,198	
	40°C	1,00	1:5	0,149	292,280	299,332	301,746
		1,00	1:5	0,149	290,866	297,883	
		1,00	1:5	0,153	300,767	308,024	
	60°C	1,00	1:5	0,216	433,023	443,470	389,629
		1,00	1:5	0,191	381,393	390,595	
		1,00	1:5	0,166	326,935	334,823	

Etanol-agua (50-50 v/v)	20°C	1,00	1:30	0,333	4091,846	4190,568	<b>3614,015</b>
		1,00	1:30	0,286	3489,270	3573,454	
		1,00	1:30	0,248	3005,511	3078,024	
	40°C	1,00	1:30	0,399	4932,058	5051,051	<b>4645,436</b>
		1,00	1:30	0,339	4172,473	4273,139	
		1,00	1:30	0,365	4503,465	4612,117	
	60°C	1,00	1:30	0,371	4571,361	4681,651	<b>4784,504</b>
		1,00	1:30	0,373	4605,309	4716,418	
		1,00	1:30	0,392	4838,701	4955,441	
Agua	20°C	1,00	1:20	0,190	1514,258	1550,792	<b>1556,586</b>
		1,00	1:20	0,188	1494,456	1530,511	
		1,00	1:20	0,195	1551,035	1588,035	
	40°C	1,00	1:20	0,243	1961,239	2008,557	<b>2008,557</b>
		1,00	1:20	0,236	1901,831	1947,715	
		1,00	1:20	0,250	2020,649	2069,399	

	<b>60°C</b>	1,00	1:20	0,254	2054,596	2104,167	<b>2208,467</b>
		1,00	1:20	0,292	2382,760	2440,247	
		1,00	1:20	0,251	2031,964	2080,989	

<sup>1</sup> Corresponde al factor de dilución el mismo que se encuentra en función de la concentración inicial del extracto; en caso de estar muy concentrado se procede a diluir.

**Nota:** El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

**Anexo 3.** Cuantificación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

**1. Preparación de reactivos**

➤ **S1 :Buffer acetato y ácido acético**

$$\begin{array}{rcl} 16 \text{ mL} & - & 1000 \text{ mL} \\ X & - & 100 \text{ mL} \\ \hline & & \mathbf{X=1,6 \text{ mL de ácido acético}} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 3,1 \text{ g} & - & 1000 \text{ mL} \\ X & - & 100 \text{ mL} \\ \hline & & \mathbf{X= 0,31 \text{ g de Buffer acetato.}} \end{array}$$

➤ **S2 (TPTZ 10 mM)**

**Peso molecular :** 312,33 g/mol

$$\begin{array}{rcl} 312,33 \text{ g} & \diagdown & 1000 \text{ mL} - 1000\text{mM} \\ X & \diagup & 25 \text{ mL} - 10 \text{ mM} \\ \hline X = \frac{312,33 \text{ g} \times 25\text{mL} \times 10\text{mM}}{1000\text{mL} \times 1000\text{mM}} = \mathbf{0,078 \text{ g} = 78 \text{ mg}} \end{array}$$

➤ **S3 HCl 40 mM**

**Peso molecular:** 36,46 g/ mol

$$\begin{array}{rcl} 36,46 \text{ g} & \diagdown & 1000 \text{ mL} \text{ ———— } 1000 \text{ mM} \\ X & \diagup & 500 \text{ mL} \text{ ———— } 40 \text{ mM} \\ \hline X = \frac{36,46 \text{ g} \times 500\text{mL} \times 40\text{mM}}{1000\text{mL} \times 1000\text{mM}} = \mathbf{0,7292 \text{ g}} \end{array}$$

$$0,7292 \text{ g} \text{ ----- } 100\%$$

$$X \text{ ----- } 37\%$$

$$X = \frac{0,7292 \text{ g} \times 100\%}{37\%} = \mathbf{1,97 \text{ g}}$$





Al transformar las unidades de M a  $\mu\text{M}$  tenemos:

$$X = 0,000998 * 10^{-4} \text{ M} * \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}}$$

$$X = 998,84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no es 100% puro, se realiza la corrección con el porcentaje de pureza.

$$\begin{array}{r} 998,84 \mu\text{M} \\ X \end{array} \quad \begin{array}{r} 100 \% \\ 97 \% \end{array}$$

$$x = 1029,73 \mu\text{M}$$

A partir de este valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

**C<sub>SM</sub>**: Concentración de la solución madre (Trolox)

**V<sub>SM</sub>**: Volumen de la solución madre

**C<sub>E</sub>**: Concentración del estándar (Trolox)

**V<sub>E</sub>**: Volumen preparado del estándar (Trolox)

$$C_E = \frac{C_{SM} \times V_{SM}}{V_E}$$

$$C_E = \frac{1029,73 \mu\text{M} \times 0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = 20,59 \mu\text{M}$$

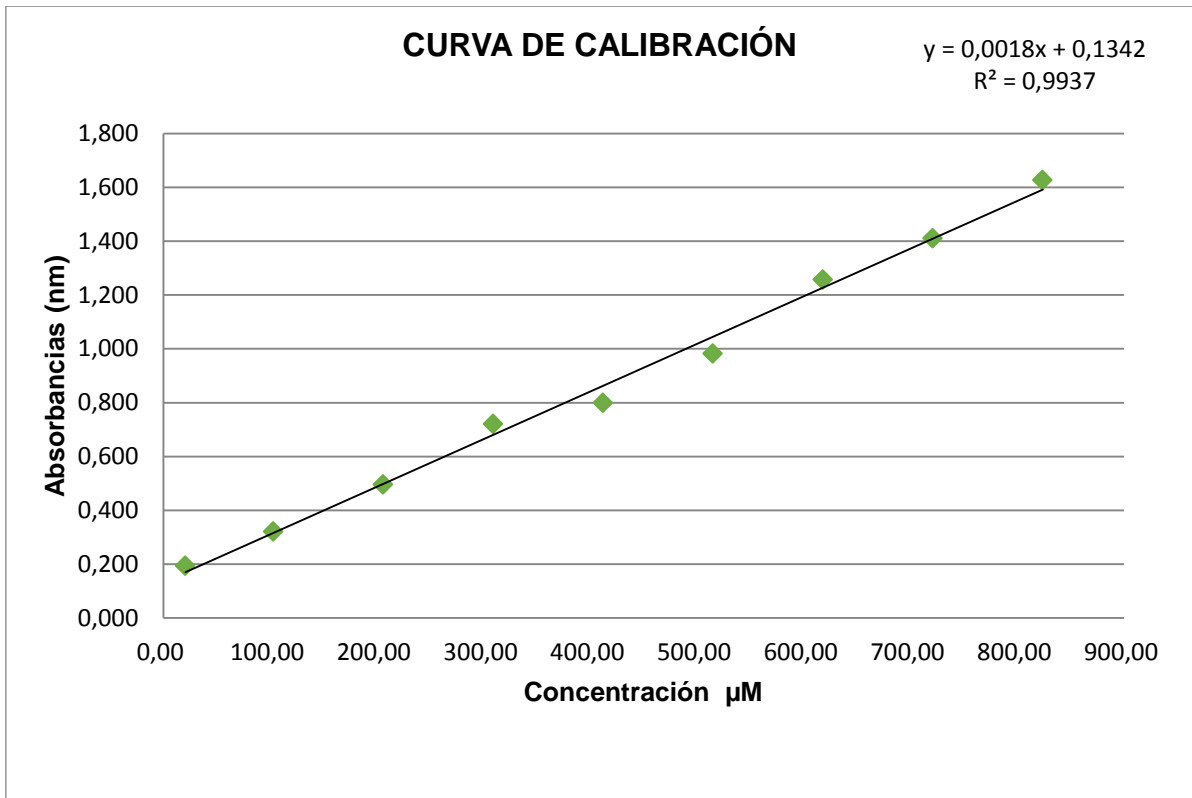
Por consiguiente obtenemos las siguientes concentraciones:

<b>Estándar</b>	<b>Alícuota* (mL)</b>	<b>Aforo (mL)</b>	<b>Concentración (<math>\mu</math>M)</b>
1	0,2	10	20,59
2	1,0	10	102,97
3	2,0	10	205,95
4	3,0	10	308,92
5	4,0	10	411,89
6	5,0	10	514,87
7	6,0	10	617,84
8	7,0	10	720,81
9	8,0	10	823,79

\*Volumen que se toma de la solución madre.

### 3. Curva de calibración.

<b>Estándar</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Aforo (mL)</b>	<b>Concentración (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Absorbancias</b>
1	0,2	10	20,59	0,194
2	1,0	10	102,97	0,321
3	2,0	10	205,95	0,495
4	3,0	10	308,92	0,720
5	4,0	10	411,89	0,799
6	5,0	10	514,87	0,982
7	6,0	10	617,84	1,257
8	7,0	10	720,81	1,411
9	8,0	10	823,79	1,626



<b>Pendiente</b>	0,0018
<b>Intersección</b>	0,1342
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9937

4. Resultados de la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

Solvente de extracción	Temperatura	Peso de la muestra (g)	FD <sup>1</sup>	Absorbancia	Capacidad antioxidante		Promedio
					μM ET/g BH	μM ET / g BS	
Etanol	20°C	1,00	1:5	0,815	38,470	39,399	34,9782
		1,00	1:5	0,731	33,705	34,518	
		1,05	1:5	0,696	30,288	31,018	
	40°C	1,00	1:5	0,149	40,015	40,981	48,3242
		1,00	1:5	0,149	47,814	48,967	
		1,00	1:5	0,153	53,729	55,025	
	60°C	1,00	1:5	0,216	72,208	73,950	69,1399
		1,00	1:5	0,191	67,668	69,300	
		1,00	1:5	0,166	62,657	64,169	

<b>Etanol-agua (50.50v/v)</b>	<b>20°C</b>	1,00	1:25	0,1208	303,398	310,717	<b>317,019</b>
		1,00	1:25	0,1258	317,619	325,282	
		1,00	1:25	0,1223	307,636	315,058	
	<b>40°C</b>	1,00	1:25	0,1353	344,369	352,677	<b>357,114</b>
		1,00	1:25	0,1360	346,252	354,606	
		1,00	1:25	0,1392	355,483	364,059	
	<b>60°C</b>	1,00	1:25	0,1360	346,346	354,703	<b>356,375</b>
		1,00	1:25	0,1366	348,042	356,439	
		1,00	1:25	0,1371	349,549	357,982	
<b>Agua</b>	<b>20°C</b>	1,00	1:15	0,932	135,190	138,452	<b>138,641</b>
		1,00	1:15	0,964	140,616	144,008	
		1,00	1:15	0,903	130,330	133,475	
	<b>40°C</b>	1,00	1:15	0,243	163,446	167,389	<b>164,457</b>
		1,00	1:15	0,236	158,304	162,123	
		1,00	1:15	0,250	159,999	163,859	

	<b>60°C</b>	1,00	1:15	0,254	182,942	187,356	<b>186,720</b>
		1,00	1:15	0,292	181,926	186,315	
		1,00	1:15	0,251	182,095	186,488	

<sup>1</sup> Corresponde al factor de dilución el mismo que se encuentra en función de la concentración inicial del extracto; en caso de estar muy concentrado se procede a diluir.

**Nota:** El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

**Anexo 4.** Cuantificación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.

**1. Preparación de la solución madre.**

Cantidad pesada de Trolox (g)	Peso molecular del Trolox (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Concentración solución madre (μM)
0,0125	250,29	97	50 mL	1029,73

$$\begin{array}{rcl}
 250,29 \text{ g} & \times & 1000\text{mL} \text{ — } 1\text{M} \\
 0,0125 \text{ g} & \times & 50 \text{ mL} \text{ — } X
 \end{array}$$

$$X = \frac{0,0125 \cancel{\text{g}}^* \cdot 1000 \cancel{\text{mL}}^* \cdot 1 \text{ M}}{250,29 \cancel{\text{g}}^* \cdot 50 \cancel{\text{mL}}^*}$$

$$X = 0,000998 \text{ M}$$

Al transformar las unidades de M a μM tenemos:

$$X = 0,000998 \cdot 10^{-4} \cancel{\text{M}}^* \cdot \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \cancel{\text{M}}^*}$$

$$X = 998,84 \mu\text{M}$$

$$X = 998,84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no es 100% puro, se realiza la corrección con el porcentaje de pureza.

$$998,84 \mu\text{M} \quad 100 \%$$

$$X \quad 97 \%$$

$$x = 1029,73 \mu\text{M}$$

A partir de este valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

Donde:

**C<sub>SM</sub>**: Concentración de la solución madre (Trolox)

**V<sub>SM</sub>**: Volumen de la solución madre

**C<sub>E</sub>**: Concentración del estándar (Trolox)

**V<sub>E</sub>**: Volumen preparado del estándar (Trolox)

$$C_E = \frac{C_{SM} \times V_{SM}}{V_E}$$

$$C_E = \frac{1029,73 \mu\text{M} \times 0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = 20,59 \mu\text{M}$$

Por consiguiente obtenemos las siguientes concentraciones:

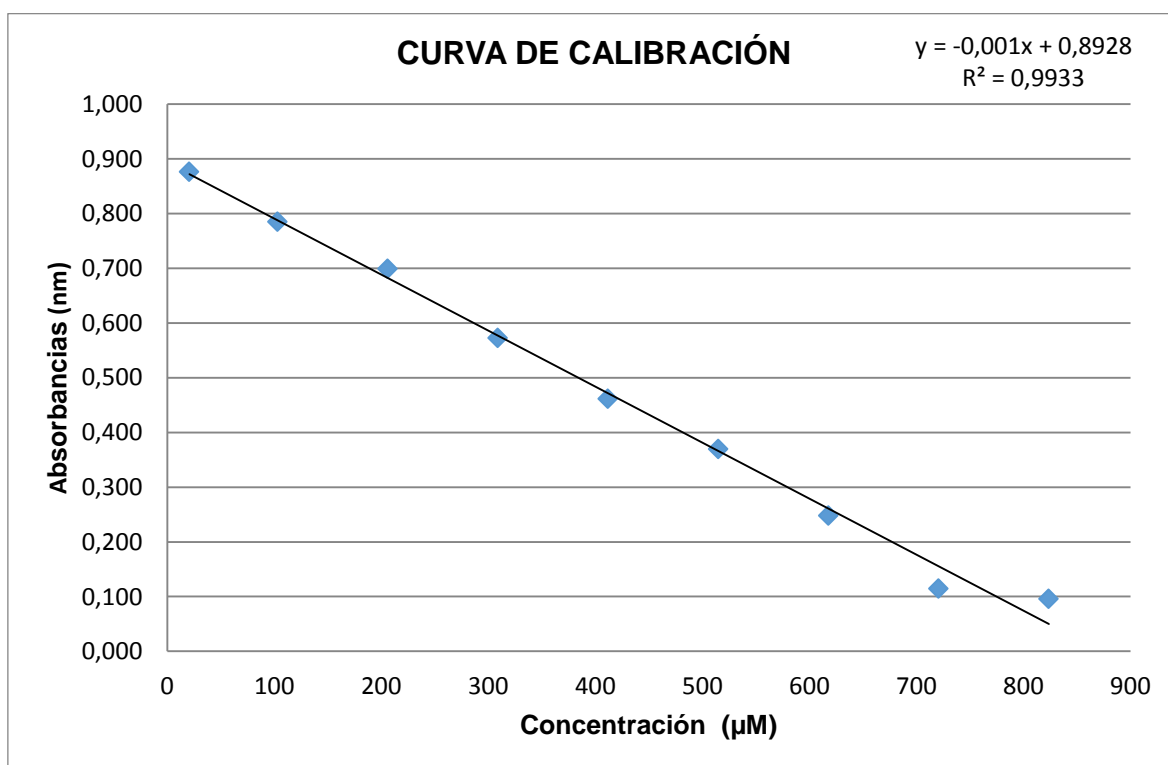
Estándar	Alícuota* (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μM)
1	0,2	10	20,59
2	1,0	10	102,97
3	2,0	10	205,95
4	3,0	10	308,92
5	4,0	10	411,89
6	5,0	10	514,87
7	6,0	10	617,84
8	7,0	10	720,81
9	8,0	10	823,79

\*Volumen que se toma de la solución madre.



### 3. Curva de calibración

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (µM)	Absorbancias
1	0,2	10	20,59	0,876
2	1,0	10	102,97	0,785
3	2,0	10	205,95	0,699
4	3,0	10	308,92	0,573
5	4,0	10	411,89	0,462
6	5,0	10	514,87	0,370
7	6,0	10	617,84	0,248
8	7,0	10	720,81	0,115
9	8,0	10	823,79	0,096



<b>Pendiente</b>	-0,001
<b>Intersección</b>	0,8928
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9933

4. Resultados de la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.

Solvente de extracción	Temperatura	Peso de la muestra (g)	FD <sup>1</sup>	Absorbancia	Capacidad antioxidante		Promedio
					μM ET/g BH	μM ET / g BS	
Etanol	20°C	1,00	1:5	0,620	26,644	27,287	25,163
		1,00	1:5	0,651	23,6457	24,216	
		1,05	1:5	0,641	23,419	23,985	
	40°C	1,00	1:5	0,527	35,802	36,666	38,490
		1,00	1:5	0,517	36,747	37,633	
		1,00	1:5	0,482	40,201	41,171	
	60°C	1,00	1:5	0,392	48,968	50,149	43,018
		1,00	1:5	0,565	32,054	32,827	
		1,00	1:5	0,433	44,992	46,078	

<b>Etanol-agua (50.50v/v)</b>	<b>20°C</b>	1,00	1:30	0,128	448,481	459,301	<b>454,962</b>
		1,00	1:30	0,139	442,224	452,893	
		1,00	1:30	0,139	442,028	452,693	
	<b>40°C</b>	1,00	1:30	0,151	435,184	445,684	<b>446,150</b>
		1,00	1:30	0,148	437,139	447,686	
		1,00	1:30	0,152	434,598	445,083	
	<b>60°C</b>	1,00	1:30	0,133	445,743	456,498	<b>454,503</b>
		1,00	1:30	0,139	442,224	452,893	
		1,00	1:30	0,137	443,397	454,095	
<b>Agua</b>	<b>20°C</b>	1,00	1:15	0,400	192,874	197,527	<b>185,512</b>
		1,00	1:15	0,454	171,495	175,633	
		1,00	1:15	0,435	179,056	183,376	
	<b>40°C</b>	1,00	1:15	0,521	145,423	148,932	<b>213,993</b>
		1,00	1:15	0,335	218,425	223,695	
		1,00	1:15	0,221	263,008	269,353	

	<b>60°C</b>	1,00	1:15	0,439	177,622	181,907	<b>181,110</b>
		1,00	1:15	0,426	182,445	186,847	
		1,00	1:15	0,457	170,452	174,565	

<sup>1</sup> Corresponde al factor de dilución el mismo que se encuentra en función de la concentración inicial del extracto; en caso de estar muy concentrado se procede a diluir.

**Nota:** El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

## Anexo 5. Determinación del parámetro IC<sub>50</sub> y AAI.

### 1. Preparación de estándares para la curva de calibración

Para saber la cantidad de DPPH necesaria para preparar el estándar 1 se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{E1} = \frac{m}{V}$$

Donde:

**C<sub>E1</sub>** = Concentración del estándar 1

**m** = cantidad pesada de DPPH

**v** = volumen preparado

<b>PM<sub>DPPH</sub> (g/mL)</b>	<b>Aforo (mL)</b>	<b>Concentración estándar 1 (mol/L)</b>
394,32	100	0,00007

$$m = C_{E1} * V$$

$$m = 0,00007 \text{ mol/L} * 0,1 \text{ L}$$

$$m = 0,000007 \text{ mol}$$

Al transformar las unidades de mol a g

$$0,000007 \text{ mol} * 394,32 \text{ g/mol} = 2,76024 * 10^{-3} \text{ g de DPPH}$$

$$= 2,76 \text{ mg de DDPH}$$

Se deben pesar 2,76 mg de DPPH y afora a 100 mL con etanol para obtener el primer estándar.

Para preparar los siguientes estándares se procede a utilizar la siguiente fórmula:

$$C_{E1} V_{E1} = C_{E2} V_{E2}$$

Donde:

$C_{E1}$  = Concentración Estándar 1

$V_{E1}$  = Volumen tomado de Estándar 1

$C_{E2}$  = Concentración Estándar 2

$V_{E2}$  = Volumen preparado de Estándar 2

$$V_{E1} = \frac{C_{E2} \times V_{E2}}{C_{E1}}$$

$$V_{E1} = \frac{0,00006 \text{ mol/L} * 0,1 \text{ L}}{0,0007 \text{ mol/L}}$$

$$V_{E1} = 8,5 \times 10^{-3} \text{ L} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \mathbf{8,57 \text{ mL}}$$

Se aplica de misma forma para preparar los demás estándares:

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración	
			(mol/L)	(ug/mL)
1	-----	100	0,00007	27,60
2	8,57	10	0,00006	23,66
3	7,14	10	0,00005	19,72
4	5,71	10	0,00004	15,77
5	4,29	10	0,00003	11,83
6	2,86	10	0,00002	7,89
7	1,43	10	0,00001	3,94
8	1,29	10	0,000009	3,55
9	1,07	10	0,000008	3,15
10	0,93	10	0,000007	2,76
11	0,86	10	0,000006	2,37
12	0,71	10	0,000005	1,97

Para determinar las concentraciones se procede a transformar las unidades de la concentración del estándar de mol/L a µg/mL, se utiliza el peso molecular del DPPH.

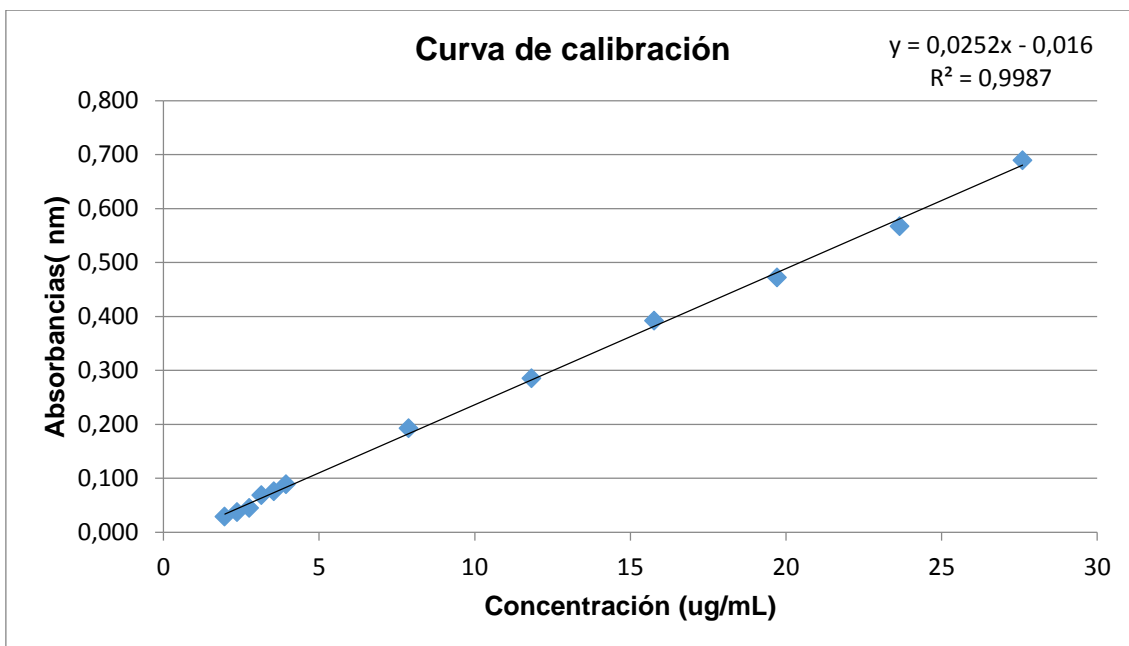
$$0,00007 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 394,32 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \frac{1000000 \mu\text{g}}{1\text{g}} \times \frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} = 27,602 \mu\text{g/mL}$$

## 2. Curva de calibración

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración		Absorbancias
			(mol/L)	(ug/mL)	
1	-----	100	0,00007	27,60	0,689
2	8,57	10	0,00006	23,66	0,567
3	7,14	10	0,00005	19,72	0,472
4	5,71	10	0,00004	15,77	0,392
5	4,29	10	0,00003	11,83	0,285
6	2,86	10	0,00002	7,89	0,192
7	1,43	10	0,00001	3,94	0,089
8	1,29	10	0,000009	3,55	0,076
9	1,07	10	0,000008	3,15	0,069
10	0,93	10	0,000007	2,76	0,045
11	0,86	10	0,000006	2,37	0,037
12	0,71	10	0,000005	1,97	0,029

<b>Pendiente</b>	0,0252
<b>Intersección</b>	-0,016
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9987





### 3. Cálculo de concentraciones para el extracto.

Las concentraciones preparadas de los extractos se calcularon a partir de las concentraciones iniciales de éstos; los cuales se muestran en el **anexo 2** y a continuación se detallan:

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Concentración inicial del extracto (µg /mL)
Etanol-agua (50-50 v/v)	40	9900
		10290
		10240

Fueron calculadas con la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

De donde:

**C<sub>i</sub>**: Concentración inicial del extracto

**V<sub>i</sub>**: Volumen tomado del extracto

**C<sub>1</sub>**: Concentración 1 a calcular

**V<sub>1</sub>**: Volumen preparado concentración 1

Para éste ejemplo se tomará el valor de la primera muestra de etanol-agua (50:50v/v):

$$C_1 = \frac{C_i V_i}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{9900 \mu\text{g/mL} * 0,5}{1 \text{ mL}}$$

$$C_1 = \mathbf{4947,50 \mu\text{g/mL}}$$

Se realiza una corrección de volumen a cada concentración, multiplicándola por la alícuota que se tomó de la concentración para la lectura de absorbancias y dividiendo para el volumen final:

$$\mathbf{\text{Concentración 1} = 4947,50 \mu\text{g/mL} \times (0,09\text{mL}/3,6\text{mL})}$$

$$\mathbf{\text{Concentración 1} = 123,69 \mu\text{g/mL}}$$

La concentración 2, se determina de la siguiente manera:

$$\mathbf{C_1 V_1 = C_2 V_2}$$

Donde:

**C<sub>1</sub>**: Concentración 1

**V<sub>1</sub>**: Volumen tomado de la concentración 1

**C<sub>2</sub>**: Concentración 2 a calcular

**V<sub>2</sub>**: Volumen preparado de la concentración 2

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$
$$C_2 = \frac{123,69 \mu\text{g/mL} * 0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$
$$C_2 = \mathbf{61,84 \mu\text{g/mL}}$$

Se aplica el mismo procedimiento para calcular las demás concentraciones del extracto:

<b>Concentración</b>	<b>Concentración calculada del extracto ( <math>\mu\text{g/mL}</math> )</b>
<b>1</b>	123,69
<b>2</b>	61,84
<b>3</b>	30,92
<b>4</b>	15,46
<b>5</b>	7,73
<b>6</b>	3,87
<b>7</b>	1,93

#### **4. Cálculos y resultados**

##### **Concentración de DPPH en el tiempo 0**

<b>Solución de trabajo</b>	<b>Absorbancia (nm)</b>	<b>Concentración de DPPH en el tiempo 0 ( <math>\mu\text{g/mL}</math> )</b>
1	0,608	24,14286

Fue calculada mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

En este caso la ecuación de la recta es:

$$y = 0,0252x - 0,016$$

De donde se despeja la concentración (x):

$$X = \frac{y + 0,0095}{0,0252}$$

Se reemplaza en (y) el valor de la absorbancia de la solución de trabajo DPPH, para este ejemplo se utiliza la absorbancia de la solución de trabajo 1.

$$X = \frac{0,68 + 0,0095}{0,0252}$$

$$X=24,7619$$

Se realiza una corrección de volumen, multiplicando (x) por la alícuota de solución de trabajo tomada para la lectura de absorbancias y dividiendo para el volumen total:

$$\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0} = 24,7619 \times (3,51 \text{ mL} / 3,6 \text{ mL})$$

$$\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0} = 24,14286$$

Se siguió el mismo procedimiento para determinar la concentración de DPPH en el tiempo 0 de las dos soluciones de trabajo utilizada.

Concentración de DPPH en el tiempo t y % residual de DPPH

Solvente de extracción	Temperatura (°C)	Concentración calculada del extracto (µg/mL)	Absorbancia	Concentración de DPPH en el tiempo 0 (µg/mL)	Concentración de DPPH en el tiempo t (mol/L)	% Residual de DPPH
Etanol-agua (50-50v/v)	40	123,69	0,169	24,14286	-----	-----
		61,84	0,319		13,294	55,062
		30,92	0,399		16,468	68,211
		15,46	0,479		19,643	81,361
		7,73	0,509		20,833	86,292
		3,87	0,512		20,952	86,785
		1,93	0,539		22,023	91,223
Etanol-agua (50-50v/v)	40	128,62	0,170	24,14286	-----	-----
		64,31	0,309		12,897	53,419
		32,15	0,389		16,071	66,568
		16,07	0,468		19,206	79,553
		8,03	0,507		20,754	85,963

		4,02	0,511		20,913	86,620
		2,00	0,537		21,944	90,894
<b>Etanol-agua (50-50v/v)</b>	<b>40</b>	127,938	0,167	<b>24,14286</b>	-----	-----
		63,969	0,311		12,976	53,748
		31,984	0,397		16,389	67,883
		15,992	0,466		19,127	79,224
		7,996	0,507		20,754	85,963
		3,998	0,524		21,429	88,757
		1,999	0,538		21,984	91,059

La concentración de DPPH en el tiempo t fue calculada mediante la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

En este caso la ecuación de la recta es:

$$y = 0,0252x - 0,016$$

Se reemplaza en (y) los valores de las absorbancias de las concentraciones preparadas del extracto, para este ejemplo se utiliza los datos de la primera muestra de etanol-agua (50:50 v/v):

$$X = \frac{0,319+0,016}{0,0252} = \mathbf{13,29365079 \mu\text{g/mL}}$$

Para calcular el % residual de DPPH se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Residual de DPPH} = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo (t) (mol/L)}}{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 (mol/L)}} * 100$$

$$\% \text{ Residual de DPPH} = \frac{13,29365079 \mu\text{g/mL}}{24,14286 \mu\text{g/mL}}$$

$$\% \text{ Residual de DPPH} = \mathbf{55,062459 \mu\text{g/mL}}$$

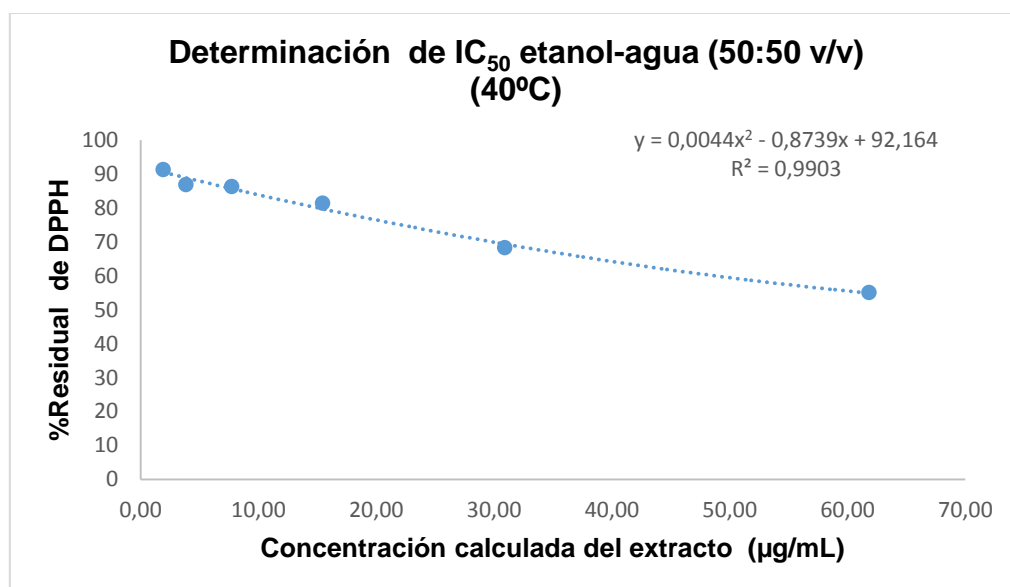
Se procedió de igual forma en el resto de concentraciones



### Determinación del parámetro IC<sub>50</sub> y AAI

Para determinar el IC<sub>50</sub> se trabaja con un mínimo de seis concentraciones, cuyas absorbancias deben estar dentro del rango de la curva de calibración. En este caso únicamente se trabajó con el tratamiento etanol-agua (50:50 v/v) a 40 °C.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Residual de DPPH
61,84	55,062459
30,92	68,211703
15,46	81,360947
7,73	86,291913
3,87	86,78501
1,93	91,22288



De la curva graficada se obtiene una ecuación polinómica:

$$y = ax^2 + bx + c$$

En este caso es:

$$y = 0,0044 x^2 - 0,8739 x + 92,164$$

Por definición  $IC_{50}$  es la concentración necesaria de extracto para disminuir en 50% la concentración de DPPH, entonces (y) toma el valor de 50. A partir de la ecuación dada se despeja x:

$$X (IC_{50}) = \mathbf{82,600027 \mu g/mL}$$

Para calcular el AAI se utiliza la siguiente fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 } (\mu g/mL)}{IC_{50} (\mu g/mL)}$$

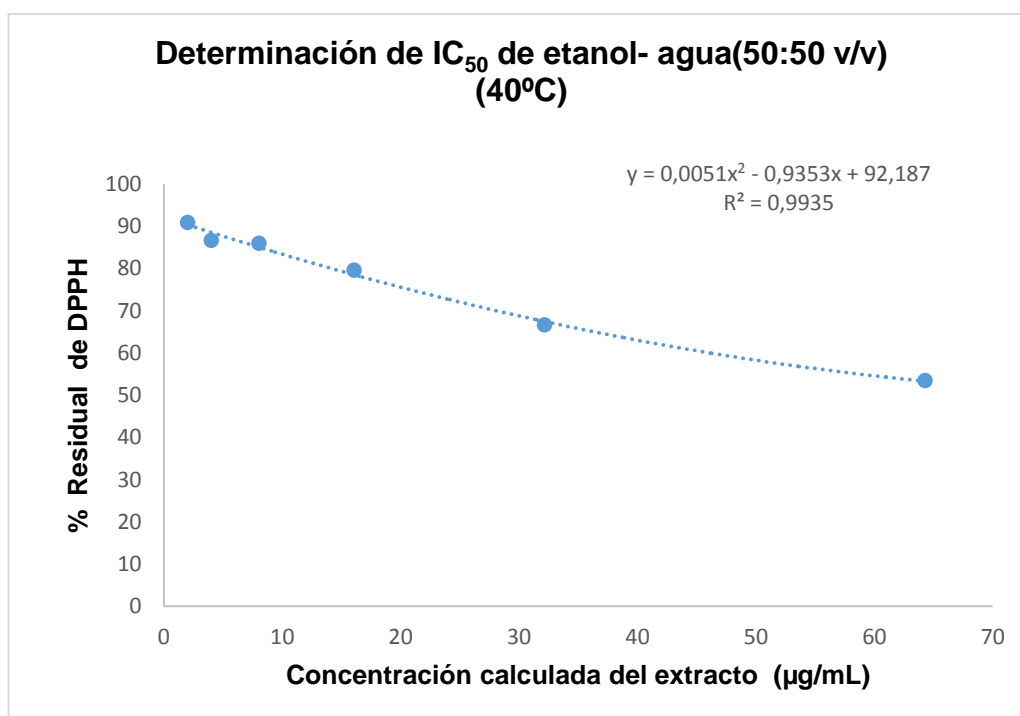
$$AAI = \frac{24,14286 \mu g/mL}{82,600027 \mu g/mL}$$

$$AAI = \mathbf{0,2922863}$$

## IC<sub>50</sub> y AAI de extractos obtenidos por etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C

1.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Residual de DPPH
64,312	53,419
32,156	66,568
16,078	79,553
8,039	85,963
4,019	86,621
2,009	90,894

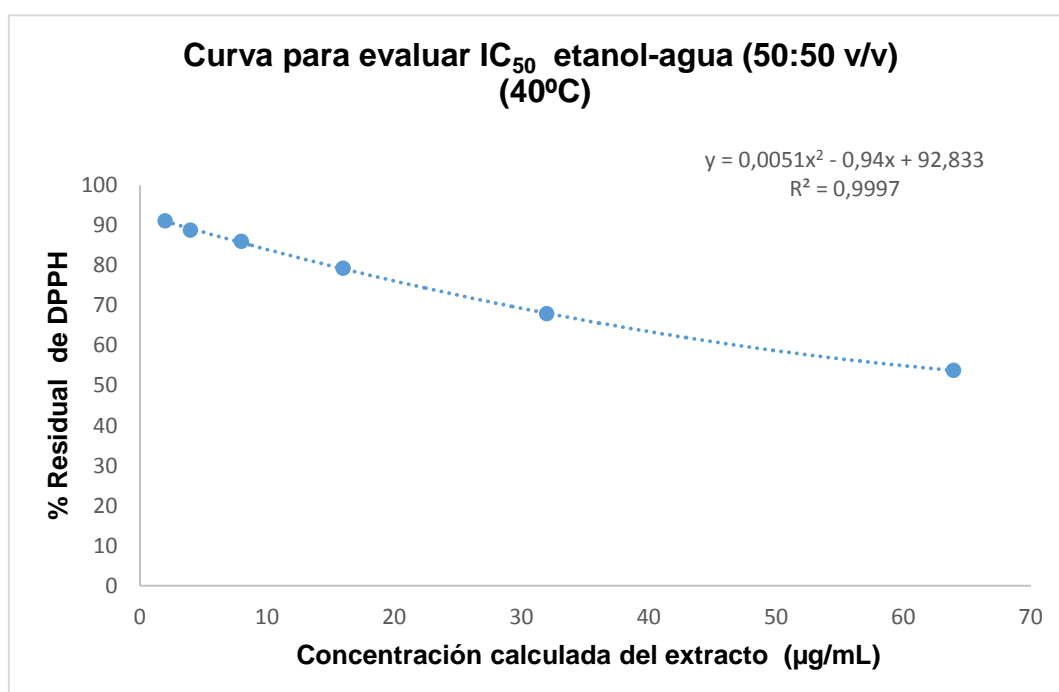


2.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)

% Residual de DPPH

63,969	53,748
31,984	67,883
15,992	79,224
7,996	85,963
3,998	88,757
1,999	91,059



de extractos analizados:

Solvente de extracción	Temperatura (°C)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	AAI
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	82,600	0,292
		80,025	0,302
		82,448	0,293

**Anexo 6.**Determinación de la concentración inicial de los extractos.

Solvente de extracción	Temperatura	Peso del vial seco (g)	Peso del vial + extracto (g)	Concentración del extracto	
				(g/mL)	( $\mu$ g/mL)
	20 °C	9,98560	9,99410	0,00425	4250
		10,02429	10,03401	0,00486	4860
		9,90200	9,91038	0,00419	4190

<b>Etanol</b>	<b>40 °C</b>	10,14354	10,15601	0,00624	6240
		9,88751	9,90002	0,00625	6250
		10,04225	10,05434	0,00606	6060
	<b>60 °C</b>	10,01136	10,02357	0,00610	6100
		10,00553	10,01971	0,00709	7090
		10,02799	10,04194	0,00697	6970
<b>Etanol-agua (50:50v/v)</b>	<b>20 °C</b>	9,88662	9,90394	0,00866	8660
		9,93229	9,95000	0,00885	8850
		10,00628	10,02328	0,00850	8500
	<b>40 °C</b>	10,13361	10,15339	0,00990	9900
		10,12981	10,15039	0,01029	10290
		9,90350	9,92397	0,01024	10240
	<b>60°C</b>	10,22268	10,24430	0,01081	10810
		10,01426	10,3317	0,00945	9450
		9,91931	9,93914	0,00992	9920
<b>Agua</b>	<b>20 °C</b>	10,01688	10,03127	0,00719	7190
		9,96263	9,97806	0,00771	7710
		10,01289	10,02802	0,00756	7560
	<b>40 °C</b>	9,88431	9,90230	0,00903	9030
		10,016457	10,18380	0,00964	9640
		9,84756	9,86548	0,00896	8960
	<b>60°C</b>	10,04346	10,06189	0,00922	9220
		9,84919	9,86664	0,00873	8730
		9,90279	9,91998	0,00860	8600

**Nota:** Para todos los tratamientos se tomó una alícuota de 2 mL.

Para la determinación de la concentración inicial de los extractos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del extracto} = \frac{\text{P. final} - \text{P. vial}}{\text{alícuota}}$$

**Ejemplo:**

Al reemplazar los valores obtenidos del tratamiento a 20 °C etanol tenemos:

$$\text{Concentración del extracto} = \frac{\text{P. final} - \text{P. vial}}{\text{alícuota}}$$

$$\text{Concentración del extracto} = \frac{9,99410 \text{ g} - 9,98560 \text{ g}}{2 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración del extracto} = 0,00425 \text{ g/mL}$$

## Anexo 7. Análisis estadístico

### ANOVA unidireccional: FENOLES vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Código	8	77711421	9713928	163,99	0,000
Error	18	1066213	59234		
Total	26	78777634			

S = 243,4    R-cuad. = 98,65%    R-cuad. (ajustado) = 98,05%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Código	N	Media	Agrupación
EA60	3	4784,5	A
EA40	3	4645,4	A
EA20	3	3614,0	B
A60	3	2208,5	C
A40	3	2008,6	C
A20	3	1556,6	C
E60	3	389,6	D
E40	3	301,7	D
E20	3	221,7	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.  
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
Nivel de confianza individual = 99,75%

### ANOVA unidireccional: FRAP vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Código	8	400796,9	50099,6	2028,59	0,000
Error	18	444,5	24,7		
Total	26	401241,5			

S = 4,970 R-cuad. = 99,89% R-cuad. (ajustado) = 99,84%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Código	N	Media	Agrupación
EA40	3	357,11	A
EA60	3	356,37	A
EA20	3	317,02	B
A60	3	186,72	C
A40	3	164,46	D
A20	3	138,64	E
E60	3	69,14	F
E40	3	48,32	G
E20	3	34,98	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.  
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
Nivel de confianza individual = 99,75%

### ANOVA unidireccional: DPPH vs. Código

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Código	8	797605	99701	226,15	0,000
Error	18	7936	441		
Total	26	805541			

S = 21,00 R-cuad. = 99,01% R-cuad. (ajustado) = 98,58%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Código	N	Media	Agrupación
EA20	3	454,96	A



EA60	3	454,50	A
EA40	3	446,15	A
A40	3	213,99	B
A20	3	185,51	B
A60	3	181,11	B
E60	3	43,02	C
E40	3	38,49	C
E20	3	25,16	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.  
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
Nivel de confianza individual = 99,75%