



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Uso de extractos naturales de *Simira ecuadorensis* como antioxidantes para
la industria alimentaria**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Castillo Ochoa, Daniela Alejandra.

DIRECTOR: Reyes Bueno, Jorge Felipe, Mgtr.

LOJA-ECUADOR

2019



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>

2019



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>

2019

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister

Jorge Felipe Reyes Bueno.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Uso de extractos naturales de *Simira ecuadorensis* como antioxidantes para la industria alimentaria” realizado por: Daniela Alejandra Castillo Ochoa, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Diciembre de 2019

f)

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Daniela Alejandra Castillo Ochoa** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Uso de extractos naturales de *Simira ecuadorensis* como antioxidantes para la industria alimentaria, de la Titulación de Ingeniero en Alimentos, siendo el Mgtr. Jorge Felipe Reyes Bueno, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio 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”

Firma:

Autora: Daniela Alejandra Castillo Ochoa

Cédula: 1104491244

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico especialmente a mis padres, Paola y Hernán, que gracias a ellos he podido llegar hasta esta etapa tan importante en mi vida, por su esfuerzo, apoyo incondicional, por inculcarme responsabilidad y dedicación; y sobre todo por sus sabios consejos.

A mis abuelitas y hermano por estar siempre presentes y brindarme su ayuda.

A mis amigas y amigos que me han acompañado y que me han dado ánimos durante este proceso.

Todo fue posible gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y por haberme guiado en todo este camino hasta poder cumplir una meta más en mi vida.

A toda mi familia por su gran amor y por creer siempre en mí.

Agradezco a mi tutor Mgtr. Felipe Reyes por la ayuda y orientación que me brindó, por su paciencia y exigencia para la realización de este trabajo de fin de titulación, y por todas sus enseñanzas a lo largo de mi etapa universitaria.

A mis amigas Camila, Cecibel, Lilian y Meritxell por estar a mi lado apoyándome y hacer de este camino uno de los mejores recuerdos y que a pesar de la distancia nunca me sentí sola, gracias por ser las mejores.

A mis amigas de carrera: Jessy y Nico, por haber compartido y disfrutado muchas risas y malas noches, que sin su apoyo, compañía y amistad no hubiéramos llegado hasta culminar esta etapa en nuestras vidas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| Aprobación del director del trabajo de fin de titulación | ii |
| Declaratoria de autoría y cesión de derechos | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimiento | v |
| Índice de contenidos | vi |
| Índice de tablas | viii |
| Índice de figuras | viii |
| Índice de ecuaciones | viii |
| Lista de abreviaturas | ix |
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| Introducción | 3 |
| CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 1.1 Descripción y usos de <i>Simira ecuadorensis</i> | 6 |
| 1.2 Compuestos fenólicos | 7 |
| 1.3 Extracción de compuestos fenólicos | 8 |
| 1.4 Radicales libres y antioxidantes | 9 |
| 1.4.1 Mecanismos de acción | 9 |
| 1.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante | 10 |
| 1.5.1 Fenoles totales | 11 |
| 1.5.2 ABTS | 11 |
| 1.5.3 DPPH | 12 |
| 1.5.4 FRAP | 13 |
| 1.6 Antioxidantes más usados en alimentos | 13 |
| CAPÍTULO II OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivo General | 15 |
| 2.2 Objetivo Específico | 15 |
| CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Materia prima | 17 |
| 3.2 Proceso de obtención de extractos | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante | 18 |
| 3.3.1 Fenoles totales | 18 |
| 3.3.2 ABTS | 18 |
| 3.3.3 DPPH | 19 |
| 3.3.4 FRAP | 20 |
| 3.4 Análisis estadístico | 22 |
| CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 4.1 Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante | 24 |
| 4.1.1 Fenoles Totales | 24 |
| 4.1.2 DPPH (AAI) | 25 |
| 4.1.3 FRAP | 26 |
| 4.1.4 ABTS | 27 |
| Conclusiones | 29 |
| Recomendaciones | 30 |
| Bibliografía | 31 |
| Anexos | 39 |
| Anexo 1.- Rendimientos de extracción | 40 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|---|
| Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos en plantas..... | 7 |
|--|---|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Árbol y hojas de <i>Simira ecuadorensis</i> (Standl) Steyerem..... | 6 |
| Figura 2. Reacción del método fenoles totales..... | 11 |
| Figura 3. Reacción del método ABTS | 12 |
| Figura 4. Reacción del método DPPH | 13 |
| Figura 5. Reacción del ensayo FRAP | 13 |
| Figura 6. Esquema de la investigación..... | 17 |
| Figura 7. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales. a) Procedimiento para lectura de las muestras. b) Procedimiento para preparación de estándares. | 18 |
| Figura 8. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método ABTS. a) Procedimiento para preparar solución madre y de trabajo b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras | 19 |
| Figura 9. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método DPPH. a) Procedimiento para preparar solución patrón y de trabajo. b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras. | 20 |
| Figura 10. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método FRAP. a) Procedimiento para preparar solución de trabajo. b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras. | 21 |
| Figura 11. Fenoles totales extraíbles en extractos de algunas plantas. a) María et al. (2018). b) Roby et al. (2013). c) Lu et al. (2011)..... | 24 |
| Figura 12. IC ₅₀ en extractos de <i>moringa</i> , <i>BHT</i> y <i>ácido ascórbico</i> . a) Rababah et al. (2010). b) Sohaimy et al. (2015)..... | 26 |
| Figura 13. Capacidad antioxidante por el método FRAP en algunas especias. a) Lu et al. (2011). | 27 |
| Figura 14. Capacidad antioxidante por el método ABTS en algunas especias. a) Lu et al. (2011). b) Przygodzka et al. (2014)..... | 28 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

| | |
|--|----|
| Ecuación 1. Índice de actividad antioxidante | 20 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| AAI | Índice de actividad antioxidante. |
| b | Intersección. |
| BHA | Butil-hidroxianisol. |
| BHT | Butil-hidroxitolueno. |
| BS | Base seca. |
| CA | Capacidad antioxidante. |
| cm | Centímetro. |
| C_{SE} | Concentración del estándar (µg/ml) |
| C_{SM} | Concentración de la solución madre (ug/ml) |
| g | Gramos. |
| HAT | Transferencia de átomo de hidrógeno |
| m | Pendiente |
| M | Molar. |
| mg | Miligramo. |
| mL | Mililitro. |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar. |
| nm | Nanómetro. |
| ppm | Partes por millón. |
| SET | Transferencia de electrones individuales. |
| µg | Microgramo. |
| µL | Microlitro. |
| µmol | Micromol. |
| V_{SE} | Volumen que se preparará de solución estándar (ml) |
| V_{SM} | Volumen de las alícuotas que se tomará de la solución madre (ml) |
| x | Concentración |
| y | Absorbancia (nm) |

RESUMEN

En el presente trabajo se buscó determinar la capacidad antioxidante de extractos de *Simira ecuadorensis*; para ello se procedió a recolectar las hojas y se sometió a un pretratamiento que abarcó limpieza, secado empleando secador de bandejas a 40°C por 10 horas y posteriormente se almacenó en refrigeración. Se obtuvieron cuatro tipos de extractos con distintos solventes: etanol-agua, etanol y acuosos (liofilizado y atomizado). A estos se evaluó el contenido de fenoles totales (método Folin-Ciocalteu) y su capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP). Se determinó que el extracto etanol-agua poseía la capacidad antioxidante más alta en la mayoría de los métodos; y por el método DPPH una actividad antioxidante moderada. Así también, un valor IC₅₀ con alto potencial antioxidante. Además, presentó mayor contenido fenólico. Se observó también que los extractos obtenidos con solvente acuoso el de mejor resultado fue el liofilizado. Los datos anteriores sugieren que el extracto hidroalcohólico de la guápala podría ser una potencial fuente rica en antioxidantes naturales.

PALABRAS CLAVES: Actividad antioxidante, guápala, liofilización, atomización, contenido fenólico.

ABSTRACT

In the present work we sought to determine the antioxidant capacity of *Simira ecuadorensis* extracts; to do this, the leaves were collected and underwent a pretreatment that included cleaning, drying using a tray dryer at 40 °C for 10 hours and subsequently stored in refrigeration. Four types of extracts with different solvents were obtained: ethanol-water, ethanol and aqueous (lyophilized and atomized). To these, the total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) and its antioxidant capacity (DPPH, ABTS and FRAP) were evaluated. It was determined that the ethanol-water extract had the highest antioxidant capacity in most of the methods; and by the DPPH method a moderate antioxidant activity. Also, an IC₅₀ value with high antioxidant potencial. In addition, it had a higher phenolic content. It was also observed that in the extracts obtained with aqueous solvent the best result was lyophilisate. The previous data suggest that the hydroalcoholic extract of the guapala could be a potential source rich in natural antioxidants.

KEYWORDS: Antioxidant activity, gupapala, lyophilization, atomization, phenolic content.

INTRODUCCIÓN

Todos los alimentos que consumimos los seres humanos se derivan de plantas o animales, por tanto representan un sistema fisicoquímico y biológico activo; y su calidad comprende un estado dinámico que va hacia niveles más bajos respecto al tiempo. Por lo tanto, existe un periodo de tiempo en el que el alimento mantiene los niveles requeridos en sus propiedades organolépticas, nutritivas y sanitarias, denominándose vida útil o de anaquel (Baldizón y Córdoba, 2008; Casp y Abril, 2003). Dentro de los factores que disminuyen la vida útil de un alimento se encuentra la oxidación de los lípidos que es la segunda causa de deterioro después de la acción de microorganismo, lo que resulta de gran interés económico para la industria alimenticia ya que presenta alteraciones en el color, sabor, aroma y pérdida de nutrientes, además de producir sustancias potencialmente nocivas (Medina, Melica, Lorenzati, y Pérez, 2017).

Una de las principales formas de retrasar la oxidación es la adición de antioxidantes. En la industria son utilizados muy ampliamente y se dividen en dos categorías principalmente: naturales y sintéticos. Dentro de estos últimos tenemos el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil - hidroxitolueno) que han sido utilizados desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad (Muñoz Juárez y Gutiérrez, 2010; Rojano, Gaviria, y Sáez, 2008). Es por esto que existe un interés creciente en los antioxidantes naturales, potenciando la búsqueda de moléculas alternativas con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos ni genotóxicos (Raudoniūtė et al., 2011).

Simira ecuadorensis (Guápala) es una de las plantas que crece en los bosques secos de la provincia de Loja, cantón Zapotillo. Dentro de sus usos se encuentran que su madera es utilizada para construcciones rurales, sus ramas y tallos en cercas de huertos y leña. Sus hojas sirven como forraje para animales y para envolver quesos de cabra, lo que según los moradores los conserva y otorga un sabor característico (Aguirre, Kvist, y Sánchez, 2006).

En el primer capítulo, se habla sobre la Guápala y sus usos, sobre antioxidantes y sus mecanismos de acción, así como también, el fundamento de los cuatro métodos para evaluar compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. En los siguientes capítulos encontramos los objetivos planteados, la metodología, se presentan los resultados y su discusión; y finalmente las conclusiones y recomendaciones.

En la actualidad para la industria alimenticia ha crecido en importancia el empleo de extractos naturales como aditivos en los alimentos; por lo que se ha creído conveniente realizar la extracción y cuantificación de la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de *Simira*

ecuadorensis, con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre esta especie debido a que casi no existe literatura relacionada a los compuestos que brinda ésta planta.

CAPÍTULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Descripción y usos de *Simira ecuadorensis*

El Ecuador es considerado como un país mega diverso, por la presencia de una variedad de especies vegetales y animales de gran importancia biológica, una de las regiones con mayor representatividad son los bosques secos (Vázquez, Freile, y Suárez, 2005).

Simira ecuadorensis (Standl.) Steyerm es un arbusto o árbol pequeño que crece hasta 10 m de altura con tejidos que oxidan a rojo purpúreo cuando son cortados, ramificados y a veces con muchos tallos. Pertenece a la familia de Rubiaceae (García y Correa, 2005). Tiene hojas simples, grandes de hasta 15 cm de longitud por 8 cm de ancho; tiene flores pequeñas, fruto cápsula, con dos cavidades y semillas numerosas aladas en un extremo (figura 1). Crece en laderas, orillas de cultivos, ríos y quebradas de bosques secos. Está presente en las provincias de Loja, El Oro y Guayas, entre 200-800 msnm (Aguirre, 2012), se lo suele encontrar con el nombre común de:

- Guápala (Loja),
- colorado, chuzo, guápala roja (Guayas),
- colorado sabanero (Manabí)

Según Caray y Rivas (2005) la guápala brota a partir de la primera semana de diciembre, alcanzando su mayor expresión en el mes de abril, después de las precipitaciones máximas de los meses de febrero y marzo.



Figura 1. Árbol y hojas de *Simira ecuadorensis* (Standl) Steyerm
Fuente: Aguirre (2012)
Elaboración: Aguirre (2012)

Existe muy poca bibliografía y literatura relacionada a los compuestos que brinda ésta planta, Rondón et al. (2018), cuantificaron el contenido fenólico total y se evaluó capacidad antibacteriana de trece plantas medicinales recolectadas de la provincia de Guayas; obteniendo que los extractos etanólicos de *Simira ecuadorensis* fueron unos de los más activos contra los ensayos bacterianos con valores de concentración inhibitoria mínima que oscilaron entre 20 y 100 ppm. Siendo el primer informe que reporta la actividad antibacteriana de estas especies.

1.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas (Muñoz Jáuregui et al., 2007), con diferentes actividades como el apoyo mecánico, la atracción de animales polinizadores y la protección contra la radiación ultravioleta, patógenos y depredadores (Walter y Marchesan, 2011), siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés (Muñoz Jáuregui et al., 2007). Debido a su papel como antioxidantes, protegen los constituyentes celulares contra el daño oxidativo y, por lo tanto, limitan el riesgo de diversas enfermedades degenerativas como cierto tipo de cáncer, las enfermedades cardiovasculares, diabetes y osteoporosis (Scalbert et al., 2005).

Esta actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades redox, las mismas que desempeñan un papel muy importante en la absorción y neutralización de radicales libre en la descomposición de peróxidos (Porrás y López, 2009).

Químicamente se pueden definir a los compuestos fenólicos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales y van desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos (ver tabla 1) (Balasundram, Sundram, y Samman, 2006; Porrás y López, 2009).

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos en plantas.

| Estructura química | Tipo | Ejemplo |
|--------------------|-----------------------|----------------|
| C_6 | Fenol simple | Eugenol |
| $C_6 - C_1$ | Ácido fenólico | Ácido gálico |
| | Ácido benzoico | Ácido elágico |
| $(C_6 - C_1)_n$ | Taninos hidrolizables | |
| $C_6 - C_2$ | Ácido fenil acético | |
| $C_6 - C_3$ | Ácido hidroxicinámico | Ácido cafeico |
| | Cumarinas | Ácido ferúlico |
| $(C_6 - C_3)_2$ | Lignanos | |
| $C_6 - C_1 - C_6$ | Benzofenonas | |
| | Xantanos | |

| | | |
|---------------------|---|---|
| $C_6 - C_2 - C_6$ | Estilbenos | Resveratrol |
| $C_6 - C_3 - C_6$ | Flavonoides | Antocianinas Flavonoles Flavonas Flavanonas Isoflavonas Flavanoles |
| | Chalconas | |
| $C_6 - C_3 - C_6)n$ | Proantocianinas (taninos condensados) | |

Fuente: García, Fernández, y Fuentes (2012)

Elaboración: García, Fernández, y Fuentes (2012)

1.3 Extracción de compuestos fenólicos

Las técnicas de extracción se han investigado ampliamente para obtener compuestos naturales valiosos de las plantas para su comercialización (Wang y Weller, 2006). Comprende el primer paso crucial en el análisis de plantas, porque es necesario extraer sus componentes químicos deseados, para así obtener una mayor separación y caracterización. La operación básica incluía etapas, como el prelavado, secado, molienda para obtener una muestra homogénea y, a menudo, mejorar la cinética de la extracción analítica y también aumentar el contacto de la superficie de la muestra con el sistema de solvente (Sasidharan et al., 2011). Existen diferentes métodos para la extracción de este tipo de compuestos, desde técnicas tradicionales como la extracción Soxhlet y la maceración, hasta técnicas más desarrolladas como la extracción con fluido supercrítico, extracción por ultrasonido, extracción mediante líquidos presurizados, extracción por microondas, etc (Soto-García y Rosales-Castro, 2016) .

El rendimiento cuantitativo y cualitativo de la extracción depende en gran medida de la polaridad del disolvente utilizado (Capriotti et al., 2014); el etanol en sus mezclas con agua en diferentes proporciones como solventes de extracción no es tóxico y puede reutilizarse después de su recuperación lo que genera prácticamente cero residuos, por lo tanto, el etanol se puede considerar como un solvente ambientalmente seguro (Amyrgialaki, Makris, Mauromoustakos, y Kefalas, 2014).

La maceración consiste en remojar los materiales vegetales -gruesos o en polvo- en un recipiente tapado con un disolvente y se deja reposar durante un período mínimo de 3 días con agitación frecuente. El objetivo del procesado es de suavizar y romper la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles (Descalzo y Sancho, 2008).

Existen estudios donde se ha aplicado la extracción por maceración, por ejemplo Narender y Vikrant (2014), realizaron una extracción en hojas de *Psidium guajava* L. utilizando solventes etanólicos e hidroalcohólicos (4:1v/v), los mismos que produjeron el mayor rendimiento de extracción con la máxima presencia de fitoconstituyentes -alcaloides, saponinas, carbohidratos, taninos y flavonoides- en comparación con otros solventes como el éter de petróleo, cloroformo y agua. Este último demostró tener una eficacia similar a la del etanol, excepto que no había rastro de alcaloides en los extractos de agua (Vongsak et al., 2013).

1.4 Radicales libres y antioxidantes

Los radicales libres se caracterizan como partículas moleculares que contienen electrones impares, en su orbital más externo lo que ocasiona que el electrón de dicho orbital necesite de otro para poseer una configuración más estable (Ali, Ahmed, Sakandar, y Khan, 2017); debido a esto es que los radiales libres reaccionan ávidamente con una molécula cercana con el fin de eliminar su orbital incompleto, produciendo una desestabilidad de esta molécula, a su vez volviéndola reactiva y así producir reacciones en cadena (Fernández y Bellón, 2000).

Antioxidante es cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la oxidación del mismo (Mataix y Battino, 2002), una molécula antioxidante puede reaccionar con radicales libres únicos y es capaz de neutralizarlos mediante la donación de uno de sus propios electrones, lo que termina con la reacción de robo de carbonos (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, y De, 2010).

El papel de los antioxidantes es el de disminuir o retardar reacciones de autooxidación que ocurren sobre diferentes sustratos (Raudoniūtė et al., 2011) y éstos pueden actuar mediante diversos mecanismos, por ejemplo: inhibiendo la oxidación en su fase de inicio, interrumpiendo la fase de propagación, reduciendo la disponibilidad de catalizadores metálicos, apagando los radicales libres y terminando las reacciones de la cadena radical (Ramalho y Jorge, 2006).

Éstos se clasifican en antioxidantes endógenos, que normalmente son bio-sintetizados por el organismo y antioxidantes exógenos, que se los obtiene mediante la dieta (Sánchez, 2013).

1.4.1 Mecanismos de acción

Los antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción pueden ser clasificados en primario, sinergista, removedores de oxígeno, biológicos y antioxidantes mixtos.

- Los antioxidantes primarios son compuestos fenólicos que inactivan los radicales libres formados en la fase de iniciación o propagación de la reacción, por medio de la donación de átomos de hidrógeno a estas moléculas, interrumpiendo la reacción en

cadena (Ramalho y Jorge, 2006). Los principales y más conocidos de este grupo son: los polifenoles, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), ter-butil-hidroquinona (TBHQ) y propil galato (PG), que son sintéticos, y tocoferoles, que son naturales (Singh, 2011).

- Los sinergistas son sustancias con poca o ninguna actividad antioxidante, que pueden aumentar la actividad de los antioxidantes primarios cuando se utilizan en combinación adecuada con ellos (Avello y Suwalsky, 2006)
- Los removedores de oxígeno son compuestos que actúan capturando el oxígeno presente en el medio, a través de reacciones químicas estables, volviéndolas no disponibles para actuar como propagadores de la autoxidación. El ácido ascórbico, sus isómeros y sus derivados son los mejores ejemplos de este grupo (Ramalho y Jorge, 2006)
- Los antioxidantes biológicos incluyen varias enzimas, estas sustancias pueden remover oxígeno o compuestos altamente reactivos de un sistema alimenticio (Ramalho y Jorge, 2006).
- Los antioxidantes mixtos incluyen compuestos de plantas y animales que han sido ampliamente estudiados como antioxidantes en los alimentos. Entre ellos están varias proteínas hidrolizadas, flavonoides y derivados de ácido cinámico -ácido cafeico- (Parra y Navarrete, 2009) (Mataix y Battino, 2002).

1.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante

Generalmente están involucradas múltiples características químicas y físicas tanto de los oxidantes como antioxidantes y sus mecanismos de reacción, así como diferentes localizaciones de fase, por tanto ningún ensayo individual reflejará con precisión todas las fuentes de radicales o todos los antioxidantes en un sistema; por lo que estos factores son fundamentales en la selección de los métodos de ensayo apropiados. (Prior, Wu, y Schaich, 2005).

En varios ensayos para estimar capacidades antioxidantes en plantas y sus extractos se han utilizado con frecuencia los siguientes métodos: ABTS (2,2-azinobis ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrililhidracilo), FRAP (poder antioxidante reductor férrico), junto con el ensayo de fenoles totales. (Thaipong et al., 2006).

En cuanto a la base de estos métodos, FRAP mide la capacidad de una muestra para reducir metales, mientras que ABTS y DPPH miden la capacidad de eliminación de radicales libres de una muestra. Desde un punto de vista mecánico, en FRAP y ABTS hay una reacción SET (transferencia de electrones individuales), mientras que DPPH combina SET y HAT (transferencia de átomo de hidrógeno). Otro aspecto es la aplicabilidad de cada uno de estos

ensayos, FRAP y ABTS se usan generalmente para medir la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos, aunque se han sugerido algunas modificaciones para ABTS con el fin de determinar la capacidad antioxidante de una muestra asociada con sus compuestos lipofílicos (Pérez-Jiménez et al., 2008).

1.5.1 Fenoles totales

Este método es empleado para analizar compuestos fenólicos en distintos tipos de extractos vegetales, el reactivo principal del ensayo es Folin-Ciocalteu (FC) que consiste de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo y es a partir de la mezcla de ambos ácidos que se producen iones de molibdato y tungsteno (Muñoz-Bernal et al., 2017), la reacción se lleva a cabo en un pH alcalino, en donde ocurre una disociación de un protón del compuesto fenólico generando un ion fenolato que reduce al FC (García Martínez et al., 2015), mediante una reacción de tipo óxido/reducción dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (Chen et al., 2015). (Ver figura 2)

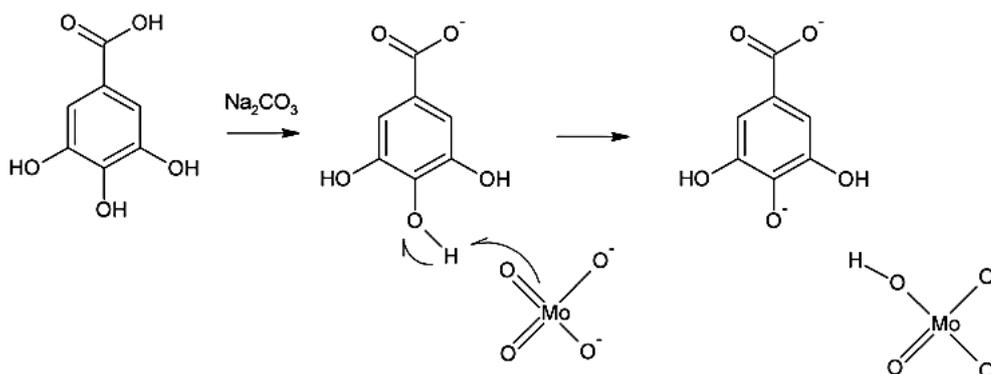


Figura 2. Reacción del método fenoles totales

Fuente: Muñoz-Bernal et al. (2017)

Elaboración: Muñoz-Bernal et al. (2017)

1.5.2 ABTS

El método se fundamenta en que existe una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio el mismo que genera un radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que al interactuar con el antioxidante presente en la muestra, provoca una reducción de la coloración verde-azulado de éste radical (ver figura 3) y es medida a una longitud de onda de 734 nm (Mesa-Vanegas et al., 2015). El radical ABTS se puede disolver tanto en medio orgánico como acuoso; por lo tanto, la actividad antioxidante se puede medir considerando la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Alvarez-Gomez, 2016).

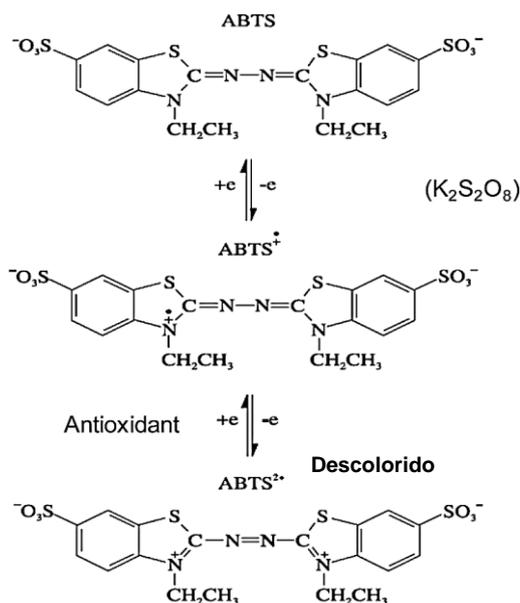


Figura 3. Reacción del método ABTS
Fuente: Konan, Tien, y Mateescu (2016)
Elaboración: Konan, Tien, y Mateescu (2016)

1.5.3 DPPH

El radical libre DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables, que tiene un color púrpura intenso. Está disponible comercialmente y no tiene que generarse antes del análisis como ABTS (Prior et al., 2005); el ensayo utiliza el radical, el mismo que es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija, Inocente, Ponce, y Zarzosa, 2015), lo que provoca una decoloración a amarillo pálido y por ende una disminución en la absorbancia (figura 4), éste proceso se evalúa a una longitud de onda de 515 nm.

Un parámetro utilizado para evaluar la actividad antioxidante es AAI (índice de capacidad antioxidante), y Scherer y Godoy (2009) consideraron en su investigación que los extractos de plantas muestran una actividad antioxidante pobre cuando AAI <0.5, actividad antioxidante moderada cuando AAI entre 0.5 y 1.0, actividad antioxidante fuerte cuando AAI entre 1.0 y 2.0, y muy fuerte cuando AAI > 2.0. Otro parámetro ampliamente utilizado para medir la actividad antioxidante es el IC₅₀, que es la cantidad de extracto de plantas necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH • en un 50%. Cuanto menor es el IC₅₀ mayor es el poder antioxidante (Roby, Sarhan, Selim, y Khalel, 2013). Según Troya-Santos et al. (2017) reportaron criterios de selección para extractos vegetales con base en el IC₅₀ evaluado frente a DPPH; considerando de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 µg/mL, con moderado potencial ubicados en un rango entre 30 µg/mL y 100 µg/mL y de bajo potencial antioxidante aquellos con un IC₅₀ por encima de 100 µg/ml.

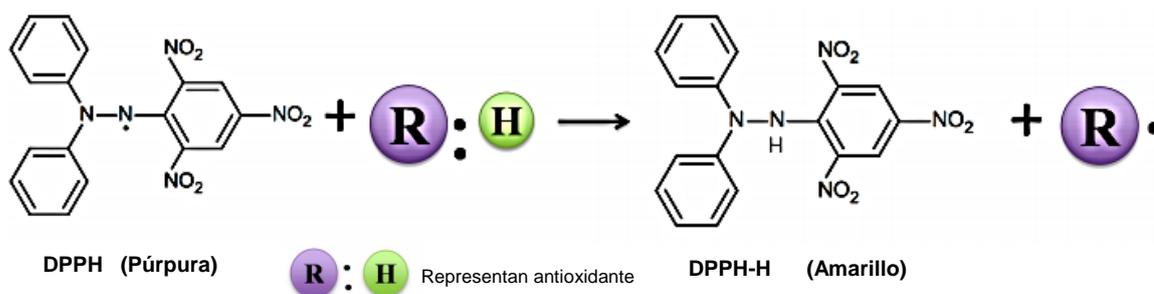


Figura 4. Reacción del método DPPH

Fuente: Liang y Kitts (2014)

Elaboración: Liang y Kitts (2014)

1.5.4 FRAP

El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se utiliza para medir la capacidad antioxidante en extractos, alimentos y bebidas, también para el estudio de la eficiencia antioxidante de sustancias puras de frutas. En este método, el complejo férrico-tripiridiltriazina (Fe III-TPTZ) se reduce al complejo ferroso (Fe II-TPTZ) en presencia de un antioxidante y en condiciones ácidas. El complejo formado por esta reacción tiene una coloración azul intensa, con una absorción máxima a 593 nm (Moura et al., 2006; Sucupira et al., 2015). (Ver figura 5)

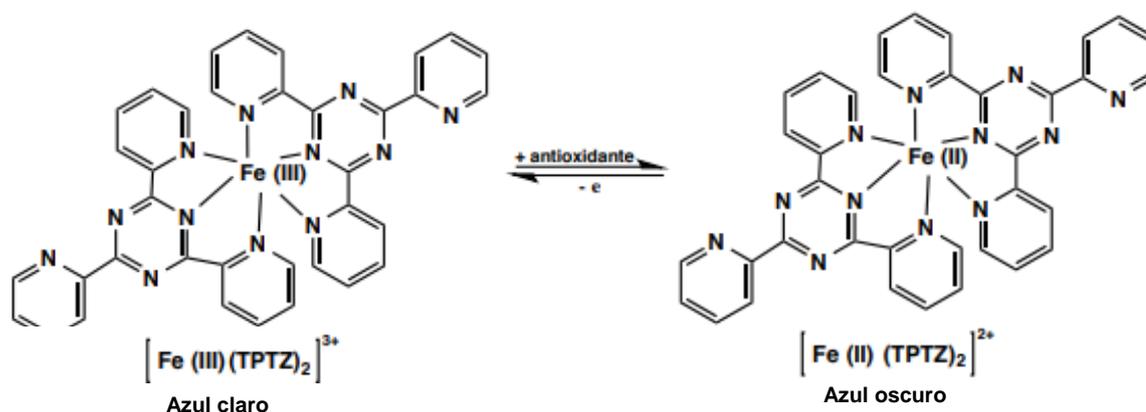


Figura 5. Reacción del ensayo FRAP

Fuente: Moura et al. (2006)

Elaboración: Moura et al. (2006)

1.6 Antioxidantes más usados en alimentos

En la industria de los alimentos los antioxidantes más usados son los sintéticos y naturales. Dentro de los primeros, los más utilizados son BHA, BHT, PG y TBHQ, éstos estabilizan los radicales libres ocasionando una interrupción en su fase de iniciación o propagación (Badui, 2010). El uso de éste tipo de antioxidantes está restringido en varios países, debido a los posibles efectos negativos que pueden generar en la salud humana (Parra y Navarrete, 2009). Es por esto que existe un interés creciente en los antioxidantes naturales, principalmente preparaciones derivadas de plantas, potenciando la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos ni genotóxicos (Raudoniūtė et al., 2011).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General: Contribuir al estudio de la biodiversidad ecuatoriana y sus usos posteriores para la industria alimentaria.

2.2 Objetivo Específico:

- Obtener cuatro tipos de extractos a partir de *Simira ecuadorensis*.
- Evaluar la capacidad antioxidante de cuatro extractos de *Simira ecuadorensis* mediante cuatro métodos.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

Simira ecuadorensis (Standl.) Steyerm, Guápala, recolectada del cantón Zapotillo, barrio Chamarango, de fincas junto al canal de riego (581871.03Me-9517838.43mS; elevación 254m). Se sometió a un pretratamiento que abarcó limpieza, secado empleando secador de bandejas (DY-110 H) a 40°C por 10 horas y posteriormente se almacenó en refrigeración.

3.2 Proceso de obtención de extractos

Para la obtención de los cuatro extractos primeramente se llevó a cabo la maceración de las hojas utilizando como solvente agua, etanol (97%), y etanol-agua (50:50%) en relación -por cada kilogramo de hojas 5 litros del solvente-. Se dejó reposar en refrigeración en un recipiente ambar por tres días, y se filtró al vacío. Para los dos extractos con solvente etanólico se procedió a evaporar el solvente utilizando un rotaevaporador a 40°C y 150 rpm y finalmente se secó por liofilización. Para los dos extractos acuosos, uno de ellos se procedió a atomizar utilizando BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 a 120 °C, flujo 70% y se empleó maltodextrina hasta concentración del 3% para aumentar la concentración de sólidos totales y para el segundo extracto se utilizó el liofilizador LABCONCO modelo 7754047, para lo cual la muestra tenía que estar previamente congelada (Jumbo, 2019). En la figura 6, se indica el procedimiento que se siguió.

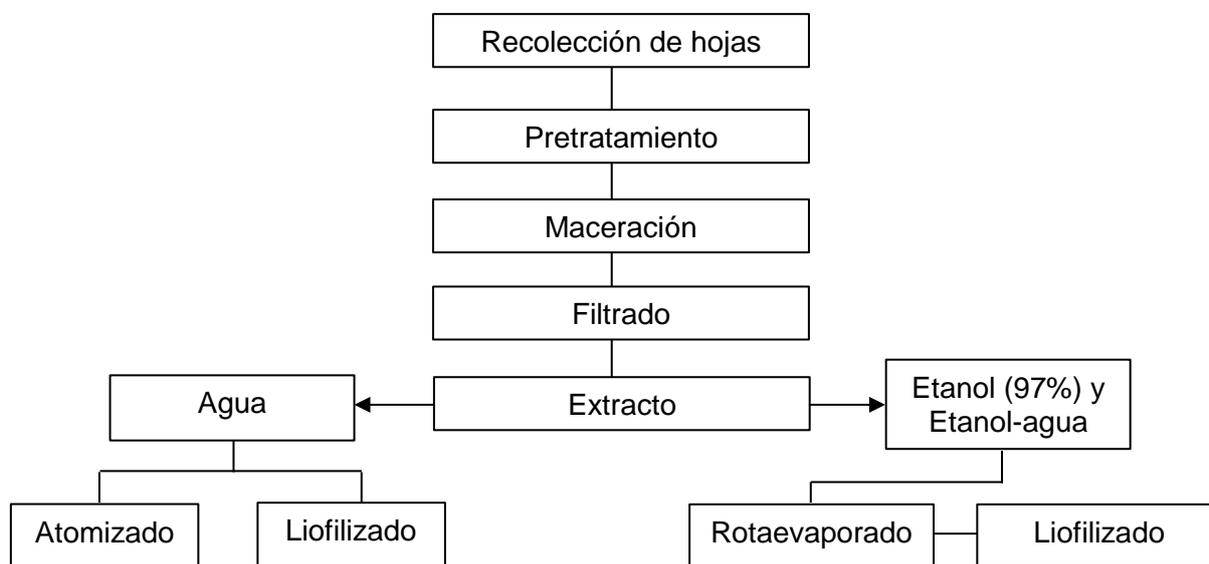


Figura 6. Esquema de la investigación
Fuente: La experimentación
Elaboración: La autora

3.3 Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante

3.3.1 Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales se realizó empleando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Thaipong et al. (2006) con modificaciones de Figueroa et al. (2018). Los extractos liofilizado y atomizado se analizaron en una concentración de 5000 ppm diluidos en agua, mientras que etanol y etanol-agua en concentraciones de 2000 y 2500 ppm respectivamente diluidas en el mismo solvente de extracción. Las lecturas se realizaron por triplicado en una microplaca de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de microplacas Biotek. Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes (anexo 2). Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g BS). En la figura 7 se indica el procedimiento que se aplicó.

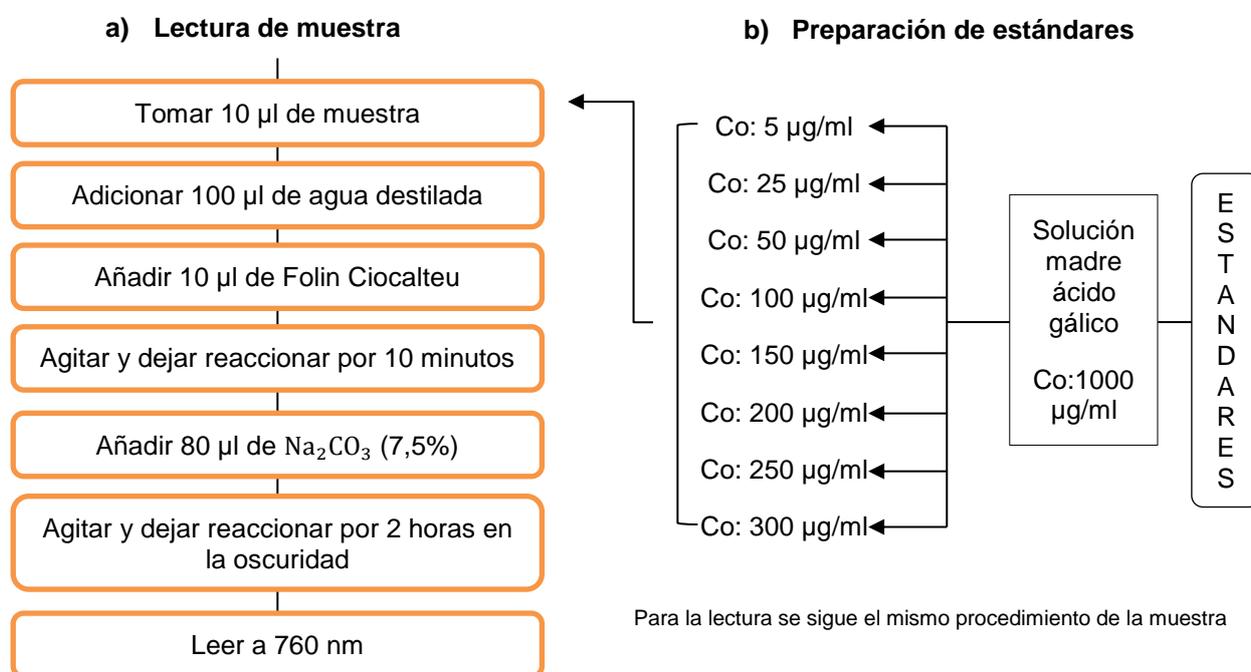


Figura 7. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales. a) Procedimiento para lectura de las muestras. b) Procedimiento para preparación de estándares.

Fuente: La experimentación

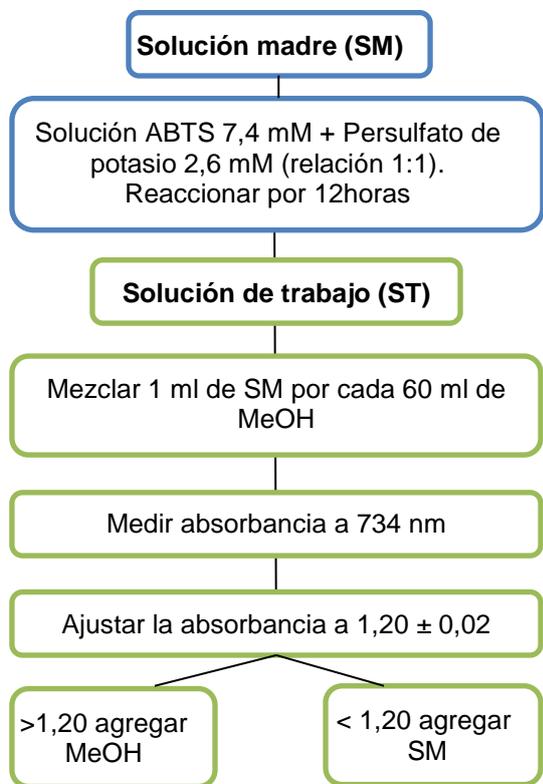
Elaboración: La autora

3.3.2 ABTS

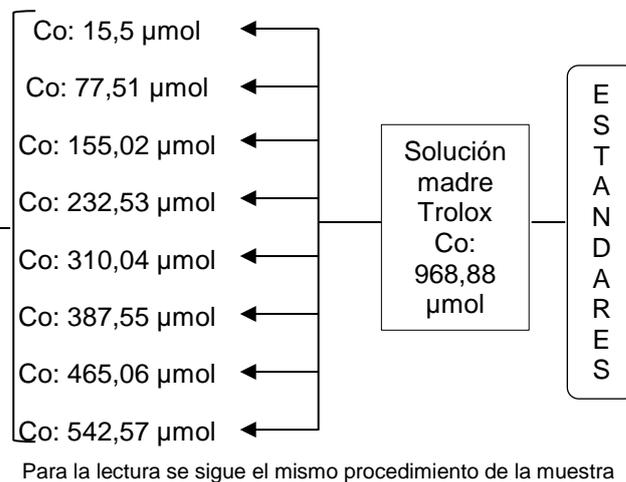
La decoloración del radical ABTS•+ se midió según el procedimiento basado en el método descrito por Thaipong et al. (2006) con algunas modificaciones. Los cuatro extractos se analizaron en una concentración de 833 ppm diluidos en el mismo solvente con el que se realizó la extracción. Las lecturas se realizaron por triplicado y se midió la absorbancia a 734 nm usando un espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific. La curva estándar es lineal entre Trolox 25 y 600 µM. Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes

(anexo 4). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol ET/g BS}$). En la figura 8 se indica el procedimiento que se aplicó.

a) Preparación de solución madre y trabajo



b) Preparación de estándares



c) Lectura de muestra

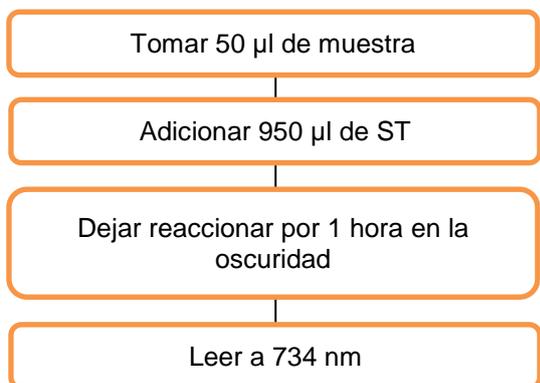


Figura 8. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método ABTS. a) Procedimiento para preparar solución madre y de trabajo b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras.

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

3.3.3 DPPH

La actividad antioxidante de las muestras y los estándares se determinó mediante el método de la actividad de captación de radicales utilizando el radical DPPH utilizando el método descrito por Scherer y Godoy (2009) con algunas modificaciones. Se añadieron en una

microplaca de 96 pocillos 8 μl de cada extracto a diferentes concentraciones y se agregó 292 μl de una solución metanólica DPPH. Las absorbancias de las muestras se midieron a 516 nm. El IC_{50} (concentración que proporciona una inhibición del 50%) se calculó gráficamente mediante la ecuación de regresión lineal entre la concentración del extracto frente al efecto de eliminación correspondiente (anexo 5). Y la actividad antioxidante se expresó como el índice de actividad antioxidante (AAI), calculado de la siguiente manera:

$$AAI = \frac{\text{Concentración final de DPPH } (\mu\text{g. ml}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g. ml}^{-1})}$$

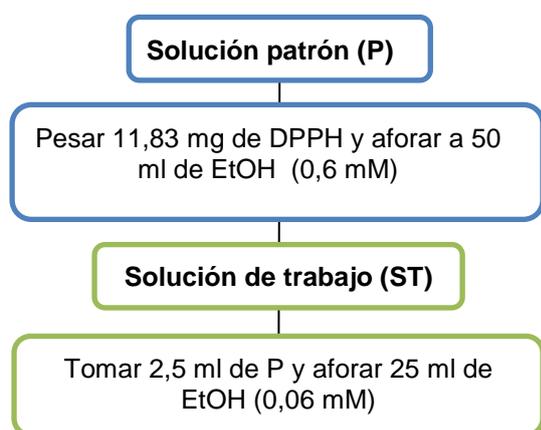
Ecuación 1. Índice de actividad antioxidante

Fuente: Scherer y Godoy (2009)

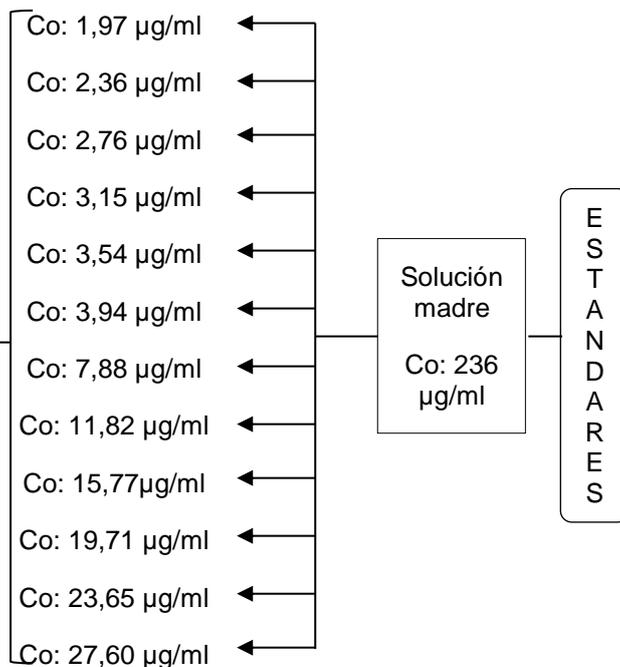
Elaboración: Scherer y Godoy (2009)

En la figura 9 se indica el procedimiento que se aplicó.

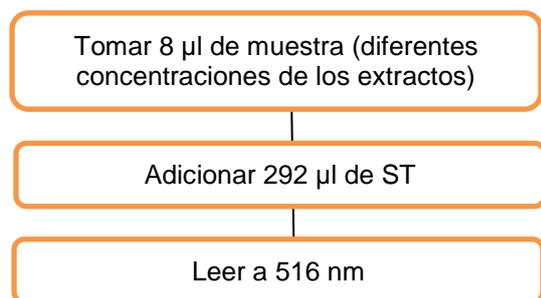
a) Preparación de solución patrón y trabajo



c) Preparación de estándares



c) Lectura de muestra



Para la lectura se sigue el mismo procedimiento de la muestra

Figura 9. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método DPPH. a) Procedimiento para preparar solución patrón y de trabajo. b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras.

Fuente: La experimentación

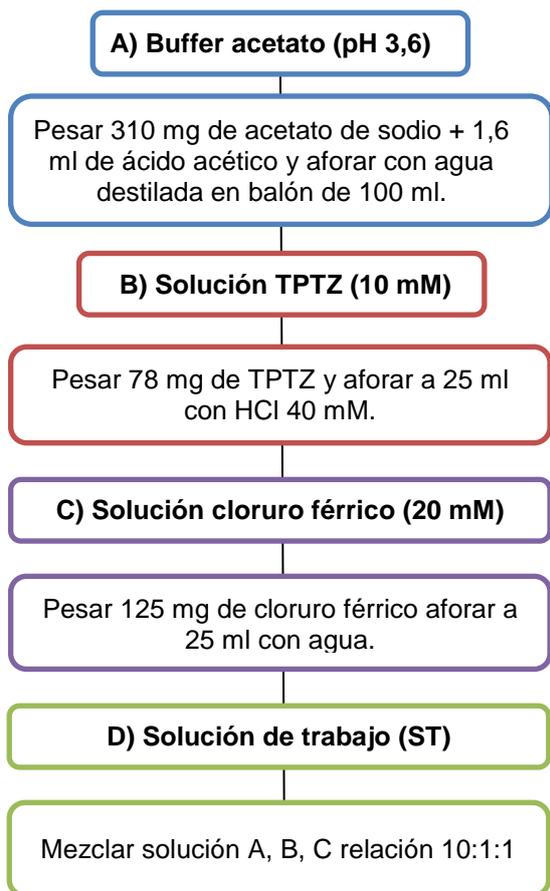
Elaboración: La autora

3.3.4 FRAP

Para medir la capacidad antioxidante se midió según el procedimiento basado en el método descrito por Thaipong et al. (2006) con algunas modificaciones. Los cuatro extractos se

analizaron en una concentración de 833 ppm diluidas en el mismo solvente de extracción. Las lecturas se realizaron por triplicado y se midió la absorbancia a 593 nm usando un espectrofotómetro UV visible. La curva estándar es lineal entre Trolox 25 y 800 μM . Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes (anexo 3). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol ET/g BS}$). En la figura 10 se indica el procedimiento que se aplicó.

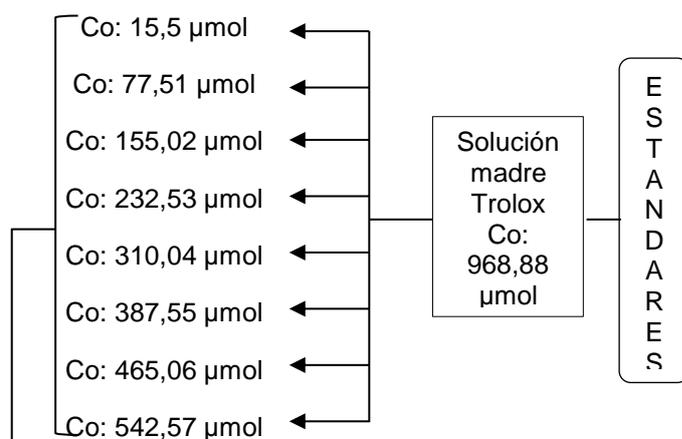
b) Preparación de solución de trabajo



c) Lectura de muestra



d) Preparación de estándares



Para la lectura se sigue el mismo procedimiento de la muestra

Figura 10. Procedimiento para la cuantificación de capacidad antioxidante por el método FRAP. a) Procedimiento para preparar solución de trabajo. b) Procedimiento para preparación de estándares. c) Procedimiento para lectura de las muestras.

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por triplicado se expresaron como la media \pm la desviación estándar y se analizaron estadísticamente utilizando el programa Minitab 16, mediante un análisis de varianza, ANOVA, y un test de rango múltiple, Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de Fenoles Totales y actividad antioxidante

En la presente investigación se analizaron cuatro extractos obtenidos a partir de *Simira ecuadorensis* evaluando su capacidad antioxidante mediante cuatro métodos: ABTS, FRAP, DPPH y fenoles totales.

4.1.1 Fenoles Totales

En la figura 11, se indican los resultados obtenidos referentes a la concentración de fenoles totales evaluados por el método Folin-Ciocalteu, donde se puede observar que hubo una diferencia estadística entre los cuatro extractos; mientras que el extracto que presentó una cantidad significativamente mayor fue en el que se empleó etanol-agua como solvente para su extracción seguido por los acuosos –liofilizado y atomizado- y finalmente etanol. Este comportamiento también fue reportado por Alothman et al. (2009) y Jakopič et al. (2009), que encontraron que las soluciones acuosas con etanol se usan comúnmente para la extracción de materiales vegetales y que son mejores que un sistema compuesto por un único solvente, con lo que se consigue una extracción más eficiente disolviendo una amplia gama de fenoles obteniendo mezclas más complejas de este tipo de compuestos que con los solventes puros. Por otro lado, referente a los extractos acuosos, se obtuvo mayor contenido fenólico con el extracto liofilizado que en el atomizado. Sogi et al. (2013) en su investigación concluye que existe una disminución en las propiedades antioxidantes al usar técnicas que implican altas temperaturas de secado. Esta disminución podría deberse al efecto del calor sobre los compuestos responsables de las propiedades antioxidantes como los compuestos fenólicos, por lo que el extracto liofilizado podría ser un mejor proceso para retener propiedades antioxidantes.

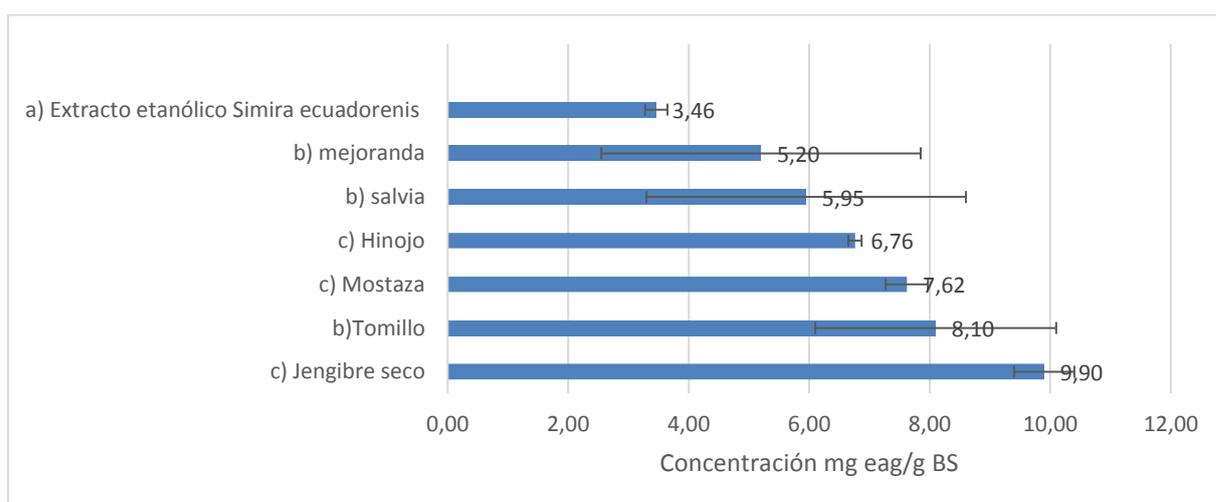


Figura 11. Fenoles totales extraíbles en extractos de algunas plantas.

Fuente: a) Rondón et al. (2018). b) Roby et al. (2013). c) Lu et al. (2011)

Elaboración: La autora

Así también, en la figura 11 se muestra una comparación de los resultados obtenidos frente a un estudio previo realizado por Rondón et al. (2018) que es el primer informe sobre la composición química del extracto alcohólico de *Simira ecuadorensis* que muestra una abundante presencia de alcaloides, que está de acuerdo con las especies de Rubiaceae, mientras que se observó taninos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, terpenos y saponinas en menor proporción. Así como también se evaluó fenoles totales obteniendo un valor de $3,46 \pm 0,18$ mg eag/g BS que es mayor al de la experimentación con el mismo solvente, esto puede deberse a que la planta de esta investigación se la recolectó en la provincia del Guayas y que como metodología aplicaron una extracción con soxhlet que difiere de la utilizada en el presente trabajo; sin embargo en los extractos atomizado, liofilizado y etanol-agua presentó valores superiores.

Por otro lado, Roby et al. (2013), en su investigación evaluaron la concentración de compuestos fenólicos en extracto metanólico de 3 muestras en donde el tomillo exhibió la mayor capacidad antioxidante seguida de salvia y luego de mejorana. Por otro lado según Lu et al., 2011, evaluaron fenoles totales a varias especias como jengibre seco, mostaza e hinojo que se encuentran en niveles moderados de fenoles. En el presente trabajo, el extracto que se podría considerar con un nivel moderado de contenido fenólico es el extracto etanol-agua.

4.1.2 DPPH (AAI)

Según la clasificación considerada en la investigación de Scherer y Godoy (2009) los extractos etanol-agua y etanol muestran una actividad antioxidante moderada; por otro lado los extractos liofilizado y atomizado son significativamente iguales y se consideran que poseen actividad antioxidante pobre.

En la figura 12 se puede observar que no existe diferencia estadística entre los valores de IC_{50} de los extractos etanol-agua y etanol, mientras que el extracto que presentó una cantidad significativamente menor fue el extracto etanol-agua y según el criterio reportado por Troya-Santos et al. (2017) se considera con alto potencial antioxidante, seguido por etanol con moderado potencial y con bajo potencial antioxidante los extractos acuosos. Además por lo general, un mayor contenido de fenoles conduce a una mejor actividad captadora de DPPH (Ebrahimzadeh et al., 2010).

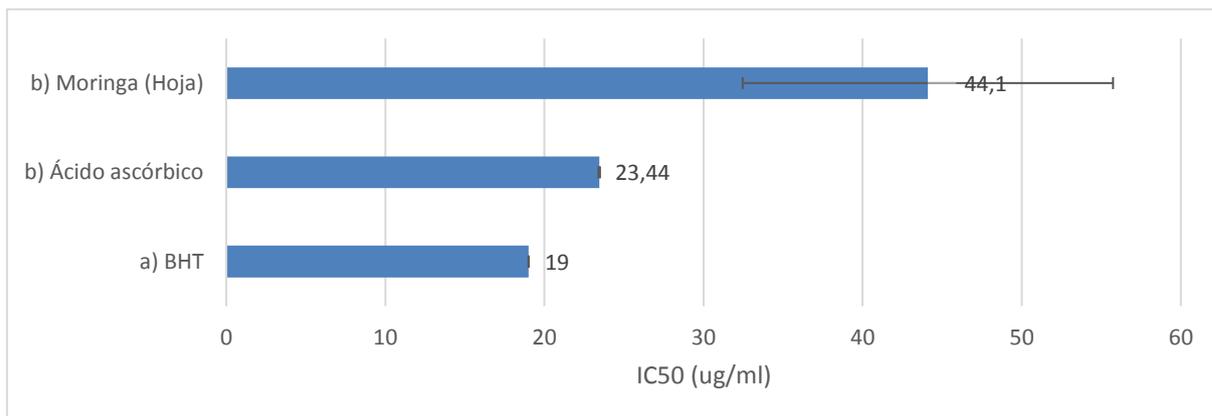


Figura 12. IC₅₀ en extractos de *moringa*, BHT y ácido ascórbico.

Fuente: a) Rababah et al. (2010). b) Sohaimy et al. (2015)

Elaboración: La autora

De igual manera, en la figura 12, se presenta una comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo frente a resultados de las hojas de moringa, de un antioxidante sintético (BHT) y ácido ascórbico como antioxidante natural. Sohaimy et al. (2015), en su investigación utilizaron el BHT como control, con un valor que es similar al ácido ascórbico y al extracto etanol-agua, considerándose con un alto potencial antioxidante. Por otro lado, Rababah et al. (2010), reportaron que el extracto etanólico de las hojas de moringa mostraron una actividad antioxidante moderada, cuyo valor se encuentra por encima al obtenido en el extracto etanólico de *Simira ecuadorensis* en la experimentación.

4.1.3 FRAP

En la figura 13 se puede observar que el extracto etanol-agua presentó un valor significativamente mayor que el resto de extractos, además se observa que no hubo diferencia estadística entre los resultados de los extractos etanol y liofilizado, liofilizado y atomizado.

Observando la figura 13 y considerando la clasificación expuesta anteriormente por Lu et al. (2011), se puede indicar que los cuatro extractos obtenidos en este trabajo demuestran tener una baja capacidad antioxidante (CA) por este método si se lo compara con el laurel (alta CA), el jengibre seco (moderada CA), el hinojo y comino (baja CA).

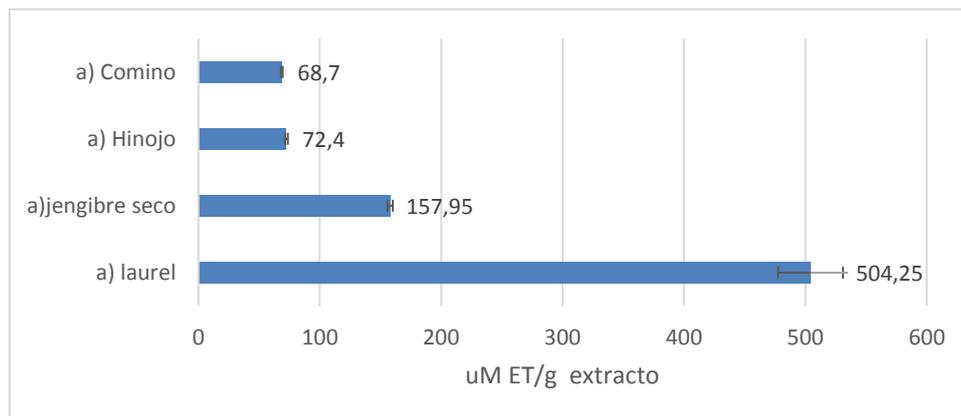


Figura 13. Capacidad antioxidante por el método FRAP de algunas especias.

Fuente: a) Lu et al. (2011).

Elaboración: La autora

4.1.4 ABTS

En la figura 14, se indica que el extracto que presentó una cantidad significativamente mayor fue el liofilizado, seguido por los extractos etanol-agua, atomizado y etanol; además se observa que hubo diferencia estadística entre los cuatro extractos obtenidos en la experimentación. La actividad antioxidante se correlaciona positivamente con el contenido total de polifenoles (Vamanu, 2012). Además existen estudios que afirman que la aplicación de procesos de liofilización tienen la capacidad de aumentar y preservar la CA de los extractos considerándolo como un valor agregado para la conservación de muestras y que permite obtener extractos en polvo que se pueden usar como ingrediente (Bravo et al., 2013; Souza, Marques, Gomes, y Narai, 2015).

Estos valores se compararon con especias reportadas en los trabajos de investigación realizados por Lu, Yuan, Zeng, y Chen, (2011) y Przygodzka et al. (2014), cuyos resultados fueron útiles para clasificar las especias en grupos con alta CA (anís estrellado), moderada (jengibre seco) y baja capacidad (culantro). Estos valores se indican en la figura 14, por lo que se puede decir, que los extractos liofilizado, etanol-agua y atomizado se encuentran con una actividad antioxidante moderada y con actividad baja el extracto etanólico.

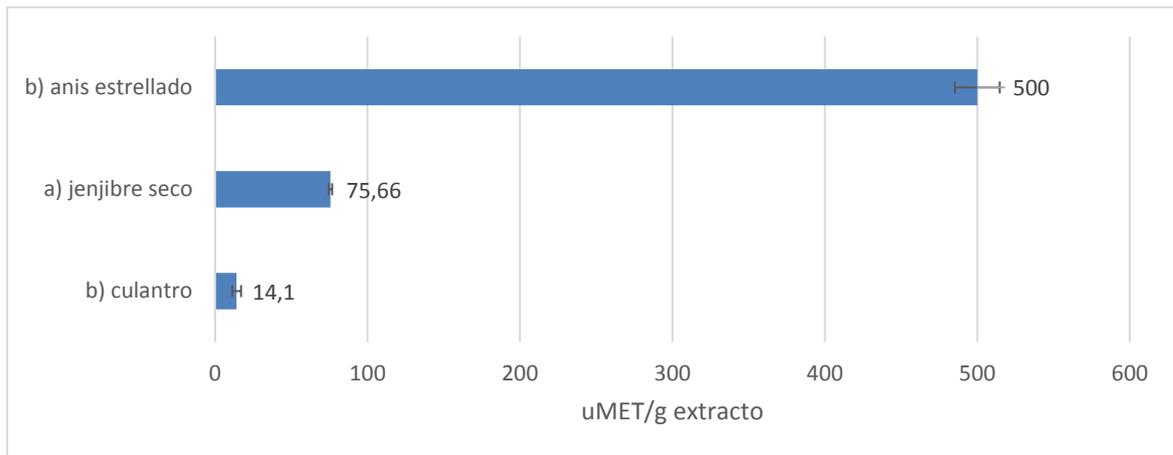


Figura 14. Capacidad antioxidante por el método ABTS en extractos de algunas especias.

Fuente: a) Lu et al. (2011). b) Przygodzka et al. (2014)

Elaboración: La autora

CONCLUSIONES

- Se determinó que el extracto etanol-agua obtuvo los mejores resultados en los cuatro métodos evaluados en cuanto a su actividad antioxidante y fenoles totales, lo que sugiere que este extracto hidroalcohólico podría ser una potencial fuente rica en antioxidantes naturales para su uso posterior en la industria alimentaria.
- Se observó que en los solventes acuosos los mejores resultados se obtuvieron por el método de liofilización que por atomización debido al efecto del calor sobre la disminución de los compuestos responsables de las propiedades antioxidantes, por lo que el método de liofilizado es un mejor proceso para retener mayores propiedades antioxidantes.

RECOMENDACIONES

- Aplicar los extractos obtenidos de *Simira ecuadorensis* en una matriz alimentaria y evaluar la efectividad como antioxidante natural para su aplicación en la industria alimentaria.
- Como complemento, evaluar el poder antibacterial y realizar un análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de *Simira ecuadorensis*, con el fin de conocer el potencial biológico y los metabolitos secundarios responsables de su actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Kvist, L. P., y Sánchez, O. (2006). Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica económica de los Andes Centrales*, 2006, 162–187. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Monica_Moraes_R/publication/312313242_Botanica_Economica_de_los_Andes_Centrales/links/587988a408ae9a860fe2f2ad/Botanica-Economica-de-los-Andes-Centrales.pdf
- Ali, S., Ahmed, M., Sakandar, S., y Khan, S. (2017). *Antioxidants and free radicals in human diseases: current status and future prospectives*. 10. Recuperado de https://www.ejpmr.com/admin/assets/article_issue/1496229486.pdf
- Alothman, M., Bhat, R., y Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- Alvarez-Gomez, F. (2016). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4), 271-288. <https://doi.org/10.7773/cm.v42i4.2677>
- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., y Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.011>
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494). Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Badui, S. (2010). *Química de los alimentos*. Pearson Educación.
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

- Bravo, J., Monente, C., Juárez, I., De Peña, M. P., y Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.026>
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., y Laganà, A. (2014). Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chemistry*, 158, 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.130>
- Chen, L.-Y., Cheng, C.-W., y Liang, J.-Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Descalzo, A. M., y Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 423-436. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.006>
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bahramian, F., y Bekhradnia, A. R. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *Angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*, 23(1), 29–34.
- Figuroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Quirantes-Piné, R., y Segura-Carretero, A. (2018). Optimization of drying process and pressurized liquid extraction for recovery of bioactive compounds from avocado peel by-product. *Electrophoresis*, 39(15), 1908-1916. <https://doi.org/10.1002/elps.201700379>
- García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2012). *Determinación de polifenoles totales por el método de FolinCiocalteu*. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>

- Guija, E., Inocente, Á., Ponce, J., y Zarzosa, E. (2015). *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>
- Jakopič, J., Veberič, R., y štampar, F. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93(1). <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0002-4>
- Jumbo, M. (2019). *Uso de extracto de Simira ecuadorensis (Standl) como conservante de queso fresco*. Recuperado de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/24161>
- Konan, K. V., Tien, C. L., y Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 8(28), 5638-5644. <https://doi.org/10.1039/C6AY01088A>
- Liang, N., y Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., y Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44(2), 530-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.055>
- Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=85632845001>
- Moura, M., Elesbão, R., Sousa, E., Morais, S., Sampaio, C., Pérez, J., y Saura, F. (2006). *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)*. Recuperado de <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/664098/1/cot125.pdf>
- Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., y Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de

- compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 142-149. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1810-634X2007000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., y Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=72564>
- Narender, T., y Vikrant, A. (2014). Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of Psidium Leaves. Recuperado 30 de mayo de 2019, de <http://www.phytojournal.com/vol1Issue1/1.1.html>
- Nikolic, J. S., Mitic, V. D., Stankov Jovanovic, V. P., Dimitrijevic, M. V., y Stojanovic, G. S. (2019). Chemometric characterization of twenty three culinary herbs and spices according to antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00137-0>
- Parra, M. Á. L., y Navarrete, J. A. Z. (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(0), 13-22. Recuperado de <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/895>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., y Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Porras, A. P., y López, A. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Recuperado de <https://tsia.udlap.mx/importancia-de-los-grupos-fenolicos-en-los-alimentos/>

- Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., y Zieliński, H. (2014). Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.019>
- Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., y Yang, W. (2010). Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. *Journal of Food Science*, 75(7), C626-C632. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01756.x>
- Ramalho, V. C., y Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Raudoniūtė, I., Rovira, J., Venskutonis, P. R., Damašius, J., Rivero-Pérez, M. D., y González-SanJosé, M. L. (2011). Antioxidant properties of garden strawberry leaf extract and its effect on fish oil oxidation: Antioxidant properties of garden strawberry leaf extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 935-943. Recuperado de <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2011.02582.x>
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., y Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris L.*), sage (*Salvia officinalis L.*), and marjoram (*Origanum majorana L.*) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
- Rondón, M., Moncayo, S., Cornejo, X., Santos, J., Villalta, D., Siguencia, R., y Duche, J. (2018). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science*, 30(4), 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>

- Sánchez, M. E. (2013). *Antioxidantes: Consumo de Antioxidantes Naturales en Adultos Mayores de entre 65 y 75 años con Dislipidemia* (Universidad Abierta Interamericana). Recuperado de <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC112550.pdf>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., y Latha, L. Y. (2011). Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1). Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Scherer, R., y Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., y De, B. (2010). *Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect*. 3(1), 10. Recuperado de <http://global-research-online.net/journalcontents/volume3issue1/article%20021.pdf>
- Singh, P. (2011). *Antioxidant activity of food proteins and food protein hydrolysates*. 89. Recuperado de http://digitool.library.mcgill.ca/webclient/StreamGate?folder_id=0&dvs=15506065037 66-980
- Sogi, D. S., Siddiq, M., Greiby, I., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>
- Sohaimy, S. A. E., Hamad, G. M., Mohamed, S. E., Amar, M. H., y Al-Hindi, R. R. (2015). *Biochemical and functional properties of Moringa oleifera leaves and their potential as a functional food*. 12.

- Soto-García, M., y Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Souza, D. S., Marques, L. G., Gomes, E. de B., y Narain, N. (2015). Lyophilization of Avocado (*Persea americana* Mill.): Effect of Freezing and Lyophilization Pressure on Antioxidant Activity, Texture, and Browning of Pulp. *Drying Technology*, 33(2), 194-204. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.943766>
- Sucupira, N. R., Silva, A. B. da, Pereira, G., y Costa, J. N. da. (2015). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *Journal of Health Sciences*, 14(4). <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2012v14n4p%p>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Troya-Santos, J., Ale-Borja, N., y Suárez-Cunza, S. (2017). Capacidad antioxidante in vitro y efecto hipoglucemiante de la maca negra (*Lepidium meyenii*) preparada tradicionalmente. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(1), 40-51. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1810-634X2017000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Vamanu, E. (2012). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Ethanolic Extract of Lyophilized Mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules*, 17(4), 3653-3671. <https://doi.org/10.3390/molecules17043653>
- Vázquez, M. A., Freile, J. F., y Suárez, L. (2005). *Biodiversidad en los bosques secos de la zona de Cerro Negro-Cazaderos, occidente de la provincia de Loja: Un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas*. Recuperado de <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/catalog/resGet.php?resId=45640>

- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., y Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
- Walter, M., y Marchesan, E. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 371-377.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000200020>
- Wang, L., y Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

ANEXOS

Anexo 1.- Rendimientos de extracción

En la tabla 3 se indican los rendimientos de extracción de cada extracto tomando como referencia el peso de hojas frescas.

| Métodos de extracción de <i>Simira</i> <i>ecuadorensis</i> | Cantidad de extracto obtenido (g) | Rendimiento (%) |
|---|--|------------------------|
| Atomizado (H ₂ O) | 87,06 | 17,41 |
| Liofilizado (H ₂ O) | 75,87 | 15,17 |
| Etanol-agua | 58,06 | 11,61 |
| Etanol | 24,5 | 4,9 |