



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Uso de *Piper carpunya* como antioxidante para la industria alimentaria.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Guayllas Poma, Jessenia Maribel

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

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 *Piper carpunya* como antioxidante para la industria alimentaria” realizado por: Guayllas Poma Jessenia Maribel, 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, **Guayllas Poma Jessenia Maribel** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Uso de *Piper carpunya* como antioxidante 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: Guayllas Poma Jessenia Maribel

Cédula: 1150105417

DEDICATORIA

Con mucho cariño, dedico este trabajo a quienes han formado parte de mi vida y me han apoyado incondicionalmente para lograr mis objetivos:

A mi madre, mi amiga incondicional y mi apoyo fundamental en los momentos difíciles. Este logro sin lugar a dudas ha sido en gran parte gracias a ti, por tus sabios consejos y muestras de cariño. Te amo mamá.

A mi padre, mi ejemplo de perseverancia y trabajo, gracias por creer siempre en mí y darme la libertad para volar.

A mis hermanos Alex, Stalin, Luis Fernando y Natali, mi fuente de inspiración y motivación para ser mejor cada día.

A Patricio, el dueño de mis sueños, el que me brinda su amor, cariño y sobretodo paciencia, tu apoyo y comprensión han sido sumamente importantes a lo largo de esta etapa. Este logro también es tuyo. Gracias amor.

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento eterno a la Universidad Técnica Particular de Loja, institución que me recibió con los brazos abiertos y me formó a través de la ciencia para poder servir a la sociedad.

A la titulación de Ingeniero en Alimentos y a todos los docentes quienes conforman la misma, por la gran labor que desempeñan día a día en tan noble profesión, por su empeño y constancia de formar mentes creativas con espíritu emprendedor, pero sobretodo corazones apasionados por la industria en alimentos. Gracias por ayudarme a cristalizar un sueño más en esta vida.

A mi tutor Mgtr. Jorge Felipe Reyes, por impartir sus conocimientos desde el primer día de universidad y más aún por brindarme su amistad, orientación y confianza en todas las actividades que pude compartir a su lado, lo considero mi ejemplo a seguir. Gracias por su predisposición y ayuda para lograr culminar con éxito este trabajo.

A la Mgtr. Maritza Castillo y a la Mgtr. Natalí Solano, docentes que estimo y admiro por su gran compromiso en formar profesionales de calidad, les agradezco por impartir sus conocimientos y experiencias que serán fundamentales en la profesión.

A mis amigas: Daniela y Nicole, gracias por su apoyo en los momentos difíciles, por las risas, las lágrimas, las largas jornadas de estudio y los buenos momentos que pudimos compartir, sin lugar a duda esta experiencia no hubiese sido igual de divertida sin ustedes. Les deseo éxitos en su vida profesional. Siempre las llevaré en mi corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Aprobación del director del trabajo de titulación	ii
Declaratoria de autoría y cesión de derechos	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice de contenidos	vi
Índice de figuras	viii
Índice de ecuaciones	viii
Lista de abreviaturas	viii
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 Generalidades	5
1.2 Familia Piperaceae	5
1.2.1 El género Piper.	5
1.2.1.1 Piper carpunya (Guaviduca).	5
1.3 Antioxidantes y radicales libres	6
1.4 Extracción de antioxidantes	7
1.4.1 Extracción sólido-líquido.	7
1.4.2 Disolventes de extracción.	8
1.5 Determinación de actividad antioxidante	8
1.5.1 Fenoles totales.	8
1.5.2 DPPH.	9
1.5.2.1 IC ₅₀ .	10
1.5.3 FRAP.	10
1.5.4 ABTS.	11
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo General:	14
2.2 Objetivo Específico:	14
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Lugar de ejecución	16

3.2	Diagrama de obtención de extractos	16
3.2.1	Descripción del diagrama de flujo de obtención de extractos.	16
3.2.1.1	Deshidratado.	16
3.2.1.2	Trituración.	16
3.2.1.3	Maceración.	17
3.2.1.4	Extractos acuosos.	17
3.2.1.5	Extractos etanólicos.	17
3.3	Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante	17
3.3.1	Fenoles totales.	17
3.3.2	DPPH.	19
3.3.3	FRAP.	21
3.3.4	ABTS.	22
3.4	Análisis estadístico	24
	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1	Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante	26
4.1.1	Fenoles totales.	26
4.1.2	DPPH.	27
4.1.3	FRAP.	28
4.1.4	ABTS.	28
	CONCLUSIONES	30
	RECOMENDACIONES	31
	BIBLIOGRAFÍA	32
	ANEXOS	38
	Anexo 1.-Rendimiento obtenido en los extractos de <i>Piper carpunya</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hoja de <i>Piper carpunya</i>	6
Figura 2. Reacción del reactivo Folin-Ciocalteu	9
Figura 3. Reacción del método DPPH	10
Figura 4. Reacción del ensayo FRAP	11
Figura 5. Reacción del método ABTS	12
Figura 6. Esquema de la investigación	16
Figura 7. Preparación de curva de calibración. Método de Folin-Ciocalteu	18
Figura 8. Metodología para cuantificación de fenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu	19
Figura 9: Metodología para curva de calibración. Método DPPH	20
Figura 10. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método DPPH	20
Figura 11. Metodología para curva de calibración. Método FRAP	21
Figura 12. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método FRAP	22
Figura 13. Metodología para preparación de solución de trabajo. Método ABTS	23
Figura 14. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método ABTS	24
Figura 15. Fenoles totales extraíbles en <i>P. carpunya</i> y diversas especies vegetales.	26
Figura 16. IC ₅₀ (ug/ml) de extractos de <i>P. carpunya</i> y diversas especies vegetales.	27
Figura 17. Capacidad antioxidante de <i>P. carpunya</i> y otras especies. Método FRAP	28
Figura 18. Capacidad antioxidante de <i>P. carpunya</i> y otras especies. Método ABTS.	28

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación del índice de actividad antioxidante	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI	Índice de actividad antioxidante
ANOVA	Análisis de varianza
BS	Base seca
Co_{SM}	Concentración de la solución madre
Co_{ST}	Concentración de los estándares
CV	Coefficiente de variación
EAG	Equivalente de ácido gálico
ET	Equivalente de Trolox
g	Gramo
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno
L	Litro

mg	Miligramo
nm	Nanómetro
PM	Peso molecular
SD	Desviación estándar
SET	Reacción de transferencia de un electrón
μL	Microlitro
μmol	Micromol

RESUMEN

Este trabajo se realizó con la finalidad de conocer el contenido fenólico y capacidad antioxidante de las hojas de *Piper carpunya* (guaviduca). Las hojas se las recolectó en el barrio Celén, parroquia rural Gualiel perteneciente a la provincia de Loja, fueron secadas (40°C por 11 horas) y trituradas manualmente (5-10 mm), luego por un periodo de tres días se maceró de forma estática para la obtención de los extractos acuosos (atomizado y liofilizado), etanólico y etanol-agua. El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu y para la capacidad antioxidante se emplearon los métodos: DPPH, FRAP y ABTS; el extracto que manifestó mayor contenido fenólico y actividad antioxidante fue etanol-agua en todos los métodos realizados. A través de los resultados se pudo comprobar que *Piper carpunya* presenta un gran potencial para ser considerado como fuente de antioxidantes naturales y ser usado en la industria alimentaria.

Palabras claves: guaviduca, antioxidante, contenido fenólico, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

This work was carried out in order to know the phenolic content and antioxidant capacity of the leaves of *Piper carpunya* (guaviduca). The leaves were collected in the neighborhood Celén, Gualiel rural parish belonging to the province of Loja, were dried (40 ° C for 11 hours) and crushed manually (5-10 mm), then for a period of three days it was slaughtered static form to obtain aqueous extracts (atomized and lyophilized), ethanol and ethanol-water. The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method and for the antioxidant capacity the methods were used: DPPH, FRAP and ABTS; the extract that showed the highest phenolic content and antioxidant activity was ethanol-water in all the methods performed. Through the results it was found that *Piper carpunya* has great potential to be considered as a source of natural antioxidants and be used in the food industry.

Keywords: guaviduca, antioxidant, phenolic content, antioxidant capacity

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas han formado parte de la vida del ser humano y han desempeñado un papel fundamental para suplir las necesidades básicas de los mismos (Celis et al., 2008; Martínez y Leyva, 2014). Con el paso del tiempo se ha despertado el interés de muchos investigadores por conocer y profundizar los conocimientos sobre plantas y sus usos en las diferentes ramas de la ciencia.

A medida que el consumo de productos alimenticios ha variado, la industria de alimentos se encuentra en constante búsqueda de nuevas alternativas que satisfagan los intereses del consumidor, las cuales se enfocan no solo en cualidades organolépticas sino también que sean inocuos, nutricionalmente adecuados y principalmente presenten efectos benéficos para la salud (Rojano, Gaviria, y Sáez, 2008; Rufino et al., 2010), razón por la cual se ha fortalecido el estudio de los antioxidantes debido a su acción de protección al organismo de los radicales libres y con ello el de especies vegetales ya que es el componente principal de las plantas (Gutiérrez, Ledesma, García, y Grajales, 2007).

Con el fin de brindar un aporte al estudio de antioxidantes de origen natural, se utilizaron hojas de guaviduca (*Piper carpunya*), que son ampliamente utilizadas en el Ecuador, principalmente en comunidades del sur del país debido a sus propiedades antisépticas, antifúngicas, estimulantes y relajantes, para aliviar cólicos menstruales, estomacales, úlceras gástricas, inflamaciones y controlar la diarrea (Pozo et al., 2016).

En el primer capítulo se encuentra información sobre la guaviduca, antioxidantes, radicales libres, método de extracción y de cuantificación de fenoles y actividad antioxidante. En el segundo capítulo encontramos los objetivos planteados para la presente investigación, los mismos que se centran a la obtención de cuatro extractos y evaluar el contenido fenólico y capacidad antioxidante. Así también, en el capítulo 3, se describen los materiales y métodos utilizados para alcanzar los objetivos propuestos, mientras que en el capítulo 4, se presenta y discuten los resultados obtenidos. Finalmente las conclusiones y recomendaciones.

Este proyecto de fin de titulación, busca fomentar el conocimiento sobre la guaviduca debido a los escasos estudios que hay de esta especie y sus posibles usos como alternativa de antioxidante natural para la industria de alimentos.

CAPÍTULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades

El ser humano ha hecho siempre uso de las plantas para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda, vestido e incluso en actos rituales (Celis et al., 2008; Martínez y Leyva, 2014). Se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales (Gallegos-zurita, 2017). Ecuador es considerado uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo y la flora del sur es considerada entre las más ricas y diversas (Lozano, 2014).

1.2 Familia Piperaceae

Se desconoce el origen de esta familia y se la considera muy primitiva dentro de las Dicotiledóneas, comprende a hierbas, arbustos, árboles y aromáticos (Lázaro, 1998). Se le atribuye alrededor de 14 géneros y 1950 especies en todo el mundo, siendo los géneros más abundantes el Piper y Peperomia, con alrededor de 700 y 600 especies, respectivamente (Parra, Delgado, y Cuca, 2011; Ramirez, Cartuche, y Morocho, 2013).

La gran abundancia del material vegetal y la diversidad de uso de esta planta, motiva a investigadores a profundizar en el estudio de la familia Piperaceae (Calle, 1983).

1.2.1 El género Piper.

El género Piper es el más representativo dentro de la familia Piperaceae; es una de las familias más grandes e importantes, debido a su elevado grado de contribución económica, por sus aplicaciones a nivel alimenticio, industrial y medicinal (Parra et al., 2011). Se estima que existen 700 especies aproximadamente (Dorman y Deans, 2000).

Las especies de este género se usan ampliamente como condimento (Celis et al., 2008) y en la medicina tradicional para prevenir dolores estomacales, contra parásitos, fiebre, gripe, etc (Ramirez et al., 2013; Y. Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, y Iglesia, 2009). Según Sánchez et al. (2009), mencionan que los metabolitos secundarios encontrados en extractos de esta planta muestran actividad fungicida, insecticida, estimulante y bactericida, además sus aceites esenciales inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones en el hombre, plantas y animales.

1.2.1.1 *Piper carpunya* (Guaviduca).

Dentro del género Piper, se encuentra *Piper carpunya*, conocida comúnmente como guaviduca; es un arbusto de 2 a 6 metros de altura, se encuentra principalmente en los Andes y en la Amazonía (Mendoza, Linares-Palomino, y Peter, 2006), sus hojas son ampliamente

utilizadas en el Ecuador, principalmente en comunidades del sur del país, para contrarrestar enfermedades dérmicas, aunque es muy frecuente también utilizar el zumo y la infusión de sus hojas en desinfecciones por las propiedades antisépticas, antifúngicas, estimulantes y relajantes que posee, para aliviar cólicos menstruales, estomacales, úlceras gástricas, inflamaciones y controlar la diarrea (Pozo et al., 2016).



Figura 1. Hoja de *Piper carpunya*

Fuente: Yáñez, (2012)

Elaboración: Yáñez, (2012)

1.3 Antioxidantes y radicales libres

Los antioxidantes son compuestos que interactúan con los radicales libres, uniéndose a los mismos para neutralizarlos (Avello y Suwalsky, 2006); son capaces de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas (Valencia y Marín, 2003). Los radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado o libre, y debido a esto son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006; Saavedra et al., 2010). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula que se lo cede pierde su estabilidad y se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así una verdadera reacción en cadena (Avello y Suwalsky, 2006), Cuando se tiene un exceso de formación de radicales libres sin neutralización, es cuando comienza a producir daños (Morales Del Rio, Gutiérrez Lomelí, Guerrero Medina, y Lizette Del Toro Sánchez, 2015), favoreciendo el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, asma, acelera el envejecimiento, etc., (F. Jaramillo y Valdivia, 2016).

Los vegetales son fuente de antioxidantes naturales, también existen los elaborados por la industria que son considerados sintéticos (Castro y Parada, 2016). Los naturales son

compuestos utilizados empíricamente desde la antigüedad (Pokorny, Yanishlieva, y Gordon, 2001), pueden ser hidrosolubles y liposolubles, interrumpen la cadena de formación de radicales libres, inhiben o impiden la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos (González, 2010). Los principales compuestos son: fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides (Mesa et al., 2010; Velioglu, Mazza, Gao, y Oomah, 1998). Estos compuestos se pueden encontrar en oleaginosas, cereales, hortalizas, frutas, hojas, cortezas, raíces y hierbas (Abdalla, Darwish, Ayad, y El-Hamahmy, 2007).

Por otra parte, los antioxidantes sintéticos más utilizados son compuestos fenólicos como butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroquinona terciaria (TBHQ), ésteres de ácido gálico como el galato de propilo (PG) y el galato de dodecilo (DG) (Pokorny et al., 2001), los mismos que han sido utilizados desde principios del siglo (Velioglu et al., 1998), con el fin de extender la vida útil de los alimentos (Villanueva, Rodríguez, Aguirre, y Castro, 2017). Sin embargo, se están imponiendo restricciones sobre el uso de estos compuestos por ser tóxicos y cancerígenos (Elhassaneen, El-waseef, Fathy, y Sayed, 2016; Velioglu et al., 1998). Roncancio, Jairo, Latorre, y María (2015), mencionan que el BHT se asocia con la presencia de asma, edemas alérgicos, rinitis y urticaria.

1.4 Extracción de antioxidantes

La extracción es el paso inicial en el aislamiento de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales (Spigno, Tramelli, y Faveri, 2007). De forma general se consideran dos tipos de extracción con disolventes: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido (Spigno et al., 2007); en este caso mencionaremos el segundo tipo de extracción.

1.4.1 Extracción sólido-líquido.

Consiste en la extracción de compuestos de muestras sólidas utilizando disolventes, el líquido penetra en los poros del sólido, disolviendo los componentes a extraer (extracción física), o entrar en reacción con ellos (extracción química), la sustancia que pasa a la disolución, o el producto de la reacción se difunde hacia la superficie del cuerpo sólido y pasa a la masa fundamental del líquido (A. Dueñas, Alcívar, Sacon, Bravo, y Villanueva, n.d.). Depende de factores como: naturaleza, tamaño de partícula y contenido de humedad de la muestra, y también de la selectividad y cantidad de solvente.

1.4.2 Disolventes de extracción.

Existe una gran cantidad de disolventes utilizados para la extracción de antioxidantes, entre los más utilizados se encuentran: etanol, metanol y acetona, y sus mezclas con agua en diferentes proporciones, sin embargo no existe un disolvente definido (Soto y Rosales, 2016; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, y Hawkins, 2006).

Las propiedades químicas como polaridad y pH y otros parámetros como temperatura y tiempo de extracción de un solvente son importantes no solo para incrementar la selectividad de los componentes extraídos, sino también para mejorar el rendimiento de la extracción (Beltrán, Morris, Reynaldo de la Cruz, Quevedo, y Bermúdez, 2013; Diem et al., 2013).

Soto y Rosales (2016), mencionan que existe una tendencia de disminución de sólidos extraíbles conforme se aumenta la concentración de etanol, y a su vez las soluciones hidroalcohólicas mejoran el proceso de extracción de compuestos fenólicos (Alothman, Bhat, y Karim, 2009).

1.5 Determinación de actividad antioxidante

Existe un sinnúmero de métodos para determinar la actividad antioxidante, entre las que se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Rock y Brunswick, 2005). Debido a los múltiples mecanismos de reacción, un método de evaluación de antioxidantes no es suficiente para analizar las fuentes de radicales libres y los antioxidantes presentes (Prior, Wu, y Schaich, 2005).

Los antioxidantes inhabilitan a los radicales por dos mecanismos de reacción: Reacción de transferencia de un electrón (SET) o de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) (Prior et al., 2005). El primero mide la capacidad reductora de los antioxidantes mientras que el HAT cuantifica la capacidad de ceder átomos de hidrógeno (Huang, Ou, y Prior, 2005).

Los métodos comúnmente utilizados para determinar la capacidad antioxidante son: DPPH, FRAP, ABTS, y el ensayo de fenoles totales (Thaipong et al., 2006).

1.5.1 Fenoles totales.

El ensayo Folin-Ciocalteu (FC), se ha usado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales (Prior et al., 2005). Este método consiste en la reacción entre el reactivo de Folin Ciocalteu de color amarillo y los grupos fenólicos, lo cual produce un complejo de color azul con máxima absorción a 725 nm. La disociación de un protón fenólico da lugar a un anión fenolato, que es capaz de reducir el

FC, formando complejos azules independientes de la estructura de los compuestos fenólicos (Huang et al., 2005), este método se puede monitorear a una longitud de onda de 745-750 nm (Prior et al., 2005). Además, se ha encontrado que el método de FRAP y el método de FC muestran alta correlación (Restrepo, Narváez, y Restrepo, 2009). La figura 2, muestra la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu.

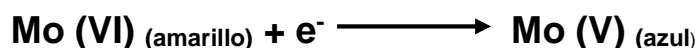


Figura 2. Reacción del reactivo Folin-Ciocalteu

Fuente: Huang et al.,(2005)

Elaboración: Huang et al.,(2005)

1.5.2 DPPH.

Este método se denomina así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Se basa en la medición de eliminación de radicales libres de los compuestos antioxidantes con DPPH (Sánchez, Larrauri, y Saura, 1998). La prueba es aplicada para determinar el potencial antioxidante de alimentos, muestras biológicas o extractos vegetales (Roginsky y Lissi, 2005; Sánchez-Moreno, 2002).

Este método es ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno y evaluar la actividad antioxidante en muestras sólidas o líquidas de compuestos naturales (Kedare y Singh, 2011; Roginsky y Lissi, 2005). Este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante (Ramos, Castañeda, y Ibáñez, 2008), la cual se puede medir espectrofotométricamente entre 515 a 528 nm (Sánchez-Moreno, 2002).

El DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares (Mercado, Carrillo, Wall, López, y Álvarez, 2013), además es un radical que puede obtenerse directamente sin una preparación previa a diferencia del ABTS, que es generado tras una reacción química, enzimática o electroquímica (Castañeda, Ramos, y Ibáñez, 2008). La figura 3, muestra la reacción que se origina por el método DPPH.

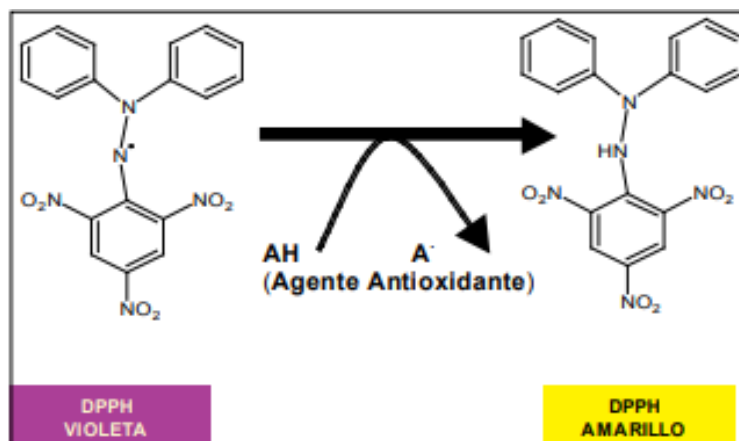


Figura 3. Reacción del método DPPH

Fuente: Castañeda et al.,(2008)

Elaboración: Castañeda et al.,(2008)

Scherer y Godoy (2009), mencionan que los extractos de plantas muestran poca actividad antioxidante cuando AAI < 0.5, actividad antioxidante moderada cuando AAI se encuentra entre 0.5 y 1.0, actividad antioxidante fuerte cuando AAI está entre 1.0 y 2.0, y muy fuerte cuando AAI > 2.0.

1.5.2.1 IC_{50} .

La concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}), es un parámetro ampliamente utilizado para medir la capacidad antioxidante, esta medida determina la cantidad de extracto de plantas necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%, mientras menor sea el IC_{50} mayor es el poder antioxidante (Hussein et al., 2013).

1.5.3 FRAP.

El ensayo FRAP mide la capacidad reductora total de los compuestos de prueba (Nantitanon, Yotsawimonwat, y Okonogi, 2010). Se basa en la capacidad de los fenólicos para reducir el complejo amarillo de un complejo férrico al complejo ferroso azul por la acción de antioxidantes donadores de electrones (Karadag, Ozcelik, y Saner, 2009), este ensayo se da en condiciones ácidas (pH 3.6) (Huang et al., 2005); es simple, rápido y automatizable (Prior et al., 2005); los extractos reaccionan rápidamente con los iones férricos en un tiempo de 30 minutos (Thaipong et al., 2006). Los valores de FRAP se obtienen a una absorbancia de 593 nm (Restrepo et al., 2009). La figura 4, muestra la reacción del ensayo FRAP, en la que se observa la reducción del complejo $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ ($TPTZ= 2,4,6$ -tripiridiltriazina), por la presencia de los antioxidantes a $Fe(II)(TPTZ)_2Cl_2$.

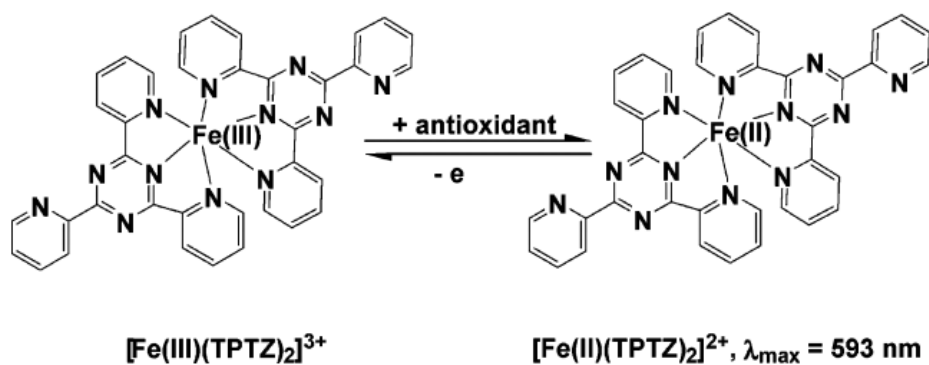


Figura 4. Reacción del ensayo FRAP

Fuente: Huang et al. (2005)

Elaboración: Huang et al. (2005)

El ensayo FRAP es el único que evalúa directamente la cantidad de antioxidantes de una muestra; los otros ensayos son indirectos debido a que miden la inhibición de especies reactivas (radicales libres) generadas en la mezcla de reacción (Nikolic, Mitic, Stankov, Dimitrijevic, y Stojanovic, 2019).

1.5.4 ABTS.

Denominado así por el reactivo 2,2-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), mide la capacidad de los antioxidantes naturales para eliminar los radicales libres (Nantitanon et al., 2010).

Este método consiste en la generación del radical ABTS⁺, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un cromóforo azul verdoso; en presencia de antioxidantes se produce una disminución de la absorbancia del radical ABTS⁺, debido a que los compuestos antioxidantes en el medio de reacción capturan el radical libre que se traduce en una pérdida de color y por tanto la reducción de absorbancia (Restrepo et al., 2009; Zulueta, Esteve, y Frígola, 2009); se puede monitorizar mediante análisis espectrofotométrico en el rango de 600 a 750 nm (Karadag et al., 2009).

Los resultados suelen ser expresados como $\mu\text{mol Trolox/g muestra}$ ($\mu\text{MET/g de muestra}$). Este método puede ser utilizado en un amplio rango de pH y se aplica para sistemas tanto acuosos como orgánicos (Restrepo et al., 2009) y tiene la ventaja de ser más versátil ya que se pueden evaluar muestras polares y no polares (Nikolic et al., 2019).

En la figura 5, se muestra la reacción del método ABTS.

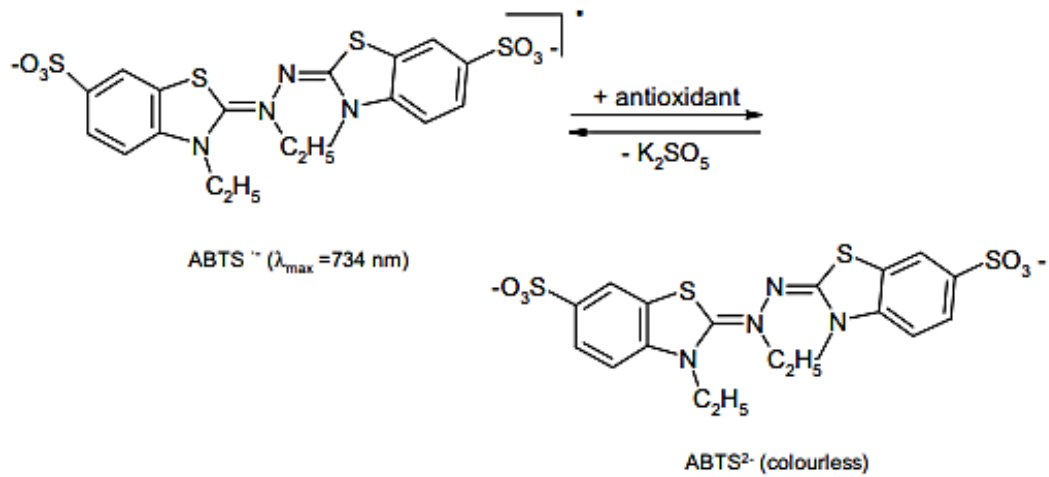


Figura 5. Reacción del método ABTS

Fuente: Zulueta et al. (2009)

Elaboración: Zulueta et al. (2009)

Mediante este método se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos (Mercado et al., 2013; Rodríguez, Andrade, y Díaz, 2015). Los valores más altos demuestran una mayor actividad antioxidante (Erkan, Ayranci, y Ayranci, 2008).

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 *Piper carpunya*.
- Evaluar la actividad antioxidante de cuatro extractos de *Piper carpunya* mediante cuatro métodos.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

Las hojas de guaviduca (*Piper carpunya*) fueron recolectadas en el barrio Celén, perteneciente a la parroquia rural Gualiel, provincia de Loja (684640.92 mE-9601714.03mS; elevación 2730m). Los extractos se obtuvieron en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

3.2 Diagrama de obtención de extractos

Las hojas fueron lavadas, se secaron y maceraron como lo indica la Figura 6.

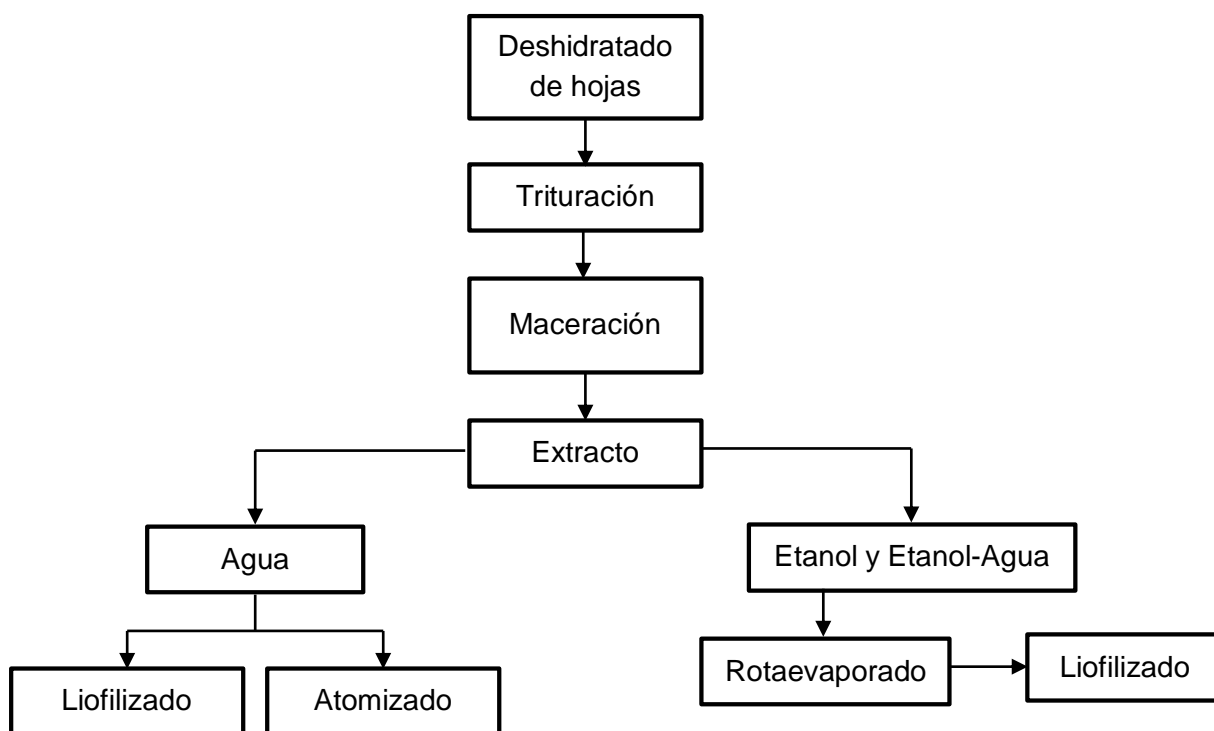


Figura 6. Esquema de la investigación

Fuente: Jumbo (2019)

Elaboración: La autora

3.2.1 Descripción del diagrama de flujo de obtención de extractos.

3.2.1.1 *Deshidratado.*

Las hojas lavadas fueron secadas por medio de aire caliente en un secador de bandejas modelo DY-110H a 40°C, durante 11 horas aproximadamente y se almacenaron en refrigeración para su posterior uso.

3.2.1.2 *Trituración.*

Las hojas fueron trituradas manualmente a un tamaño de partícula aproximado de 5-10 mm.

3.2.1.3 Maceración.

Se pesó 500g de hojas y se adicionó 2500ml de solvente, en un recipiente con tapa y protegido de la luz solar. Los solventes que se utilizaron fueron: agua destilada, etanol (97%), mezcla etanol-agua (1:1), la maceración estática se realizó durante tres días en refrigeración. Finalmente se procedió a comprimir las hojas en una prensa mecánica y filtrar al vacío para separar las partículas sólidas del extracto líquido.

3.2.1.4 Extractos acuosos.

El extracto acuoso se destinó una parte para secar por atomización y la otra para liofilizar. Se atomizó usando el Mini Spray Dryer, marca BÜCHI, modelo B-290, con las siguientes condiciones 120°C, velocidad de aspiración de 20m³/h y flujo de la muestra de 70%; se empleó maltodextrina al 3% que se incorporó al extracto para aumentar la concentración de sólidos totales.

Para el secado por liofilización, previamente se congeló el extracto líquido a -40°C (con una inclinación de 45°) y luego se colocó en el liofilizador, marca LABCONCO modelo 7754047 en condiciones de vacío de 0,180 mbar a una temperatura de -50°C por 48 horas aproximadamente hasta obtener el extracto liofilizado.

3.2.1.5 Extractos etanólicos.

El etanol presente en los extractos se eliminó mediante rotaevaporación, utilizando un equipo marca Heidolph G1, a una temperatura de 40°C y 150rpm. Para el caso de la mezcla etanol-agua, primero se rotaevaporó para eliminar el etanol en las condiciones mencionadas y posteriormente el agua por liofilización siguiendo el proceso antes descrito.

3.3 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante

Se emplearon tres métodos para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos: DPPH, FRAP y ABTS; y el ensayo de fenoles totales para evaluar el índice global de compuestos antioxidantes.

3.3.1 Fenoles totales.

Se siguió el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado por Swain y Hills (1959) y modificado por Thaipong et al. (2006) y Figueroa, Borrás, Lozano, Quirantes, y Segura, (2018) para la determinación del contenido de polifenoles totales. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo en base seca (mg EAG/ g BS).

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)) hasta tener una concentración inicial de: 5000 ppm para los extractos atomizado, liofilizado y etanol-agua, y 1250 ppm para el extracto con etanol. Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes.

A continuación la figura 7, indica el procedimiento que se siguió para la construcción de la curva de calibración y las diferentes concentraciones utilizadas de ácido gálico (5-300 µg/ml).

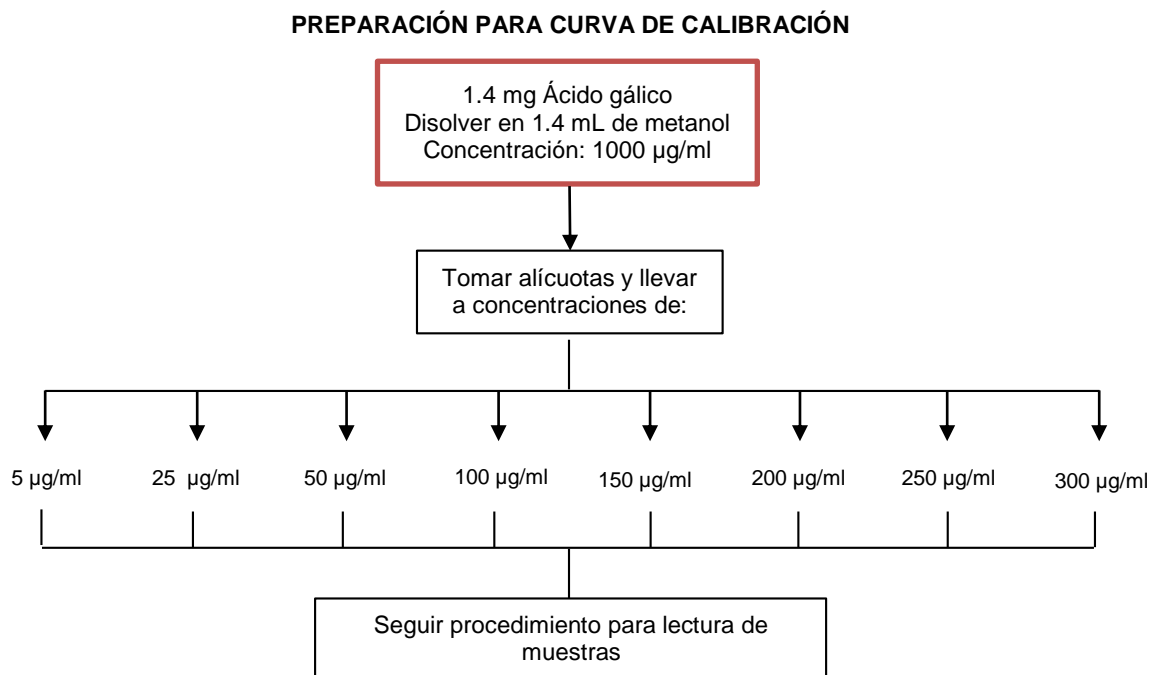


Figura 7. Preparación de curva de calibración. Método de Folin-Ciocalteu

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

Las lecturas se realizaron por triplicado en una microplaca de 96 pocillos fondo plano a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro de microplacas Epoch 2.

A continuación se indica la figura 8, en la cual se puede observar el proceso para la lectura de las muestras.

LECTURA DE MUESTRAS

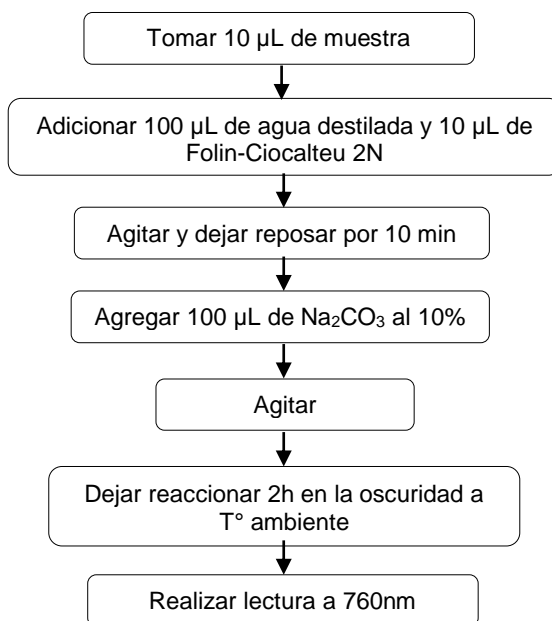


Figura 8. Metodología para cuantificación de fenoles totales. Método de Folin-Ciocalteu

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

3.3.2 DPPH.

La actividad antioxidante de las muestras se determinó mediante método descrito por Scherer y Godoy (2009). Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)) hasta tener una concentración inicial de: 60000 ppm para el extracto atomizado, 20000 ppm para el liofilizado, 2500 ppm para etanol-agua y 10000 ppm para el extracto con etanol, a partir de éstas se prepararon cinco concentraciones más con el respectivo solvente (1:1).

Se realizó un control de la solución de trabajo, para lo cual se mezclaron 292 µL de esta solución con 8 µL de etanol. El blanco del ensayo fue solamente 300 µL de etanol y 300 µL de agua para los extractos etanólicos y acuosos respectivamente. Una vez utilizada la solución patrón y de trabajo se almacenó en refrigeración y oscuridad.

A continuación la figura 9, detalla el proceso aplicado para la construcción de la curva de calibración, graficando las diferentes concentraciones de DPPH (27.60-1.97µg/ml). Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes.

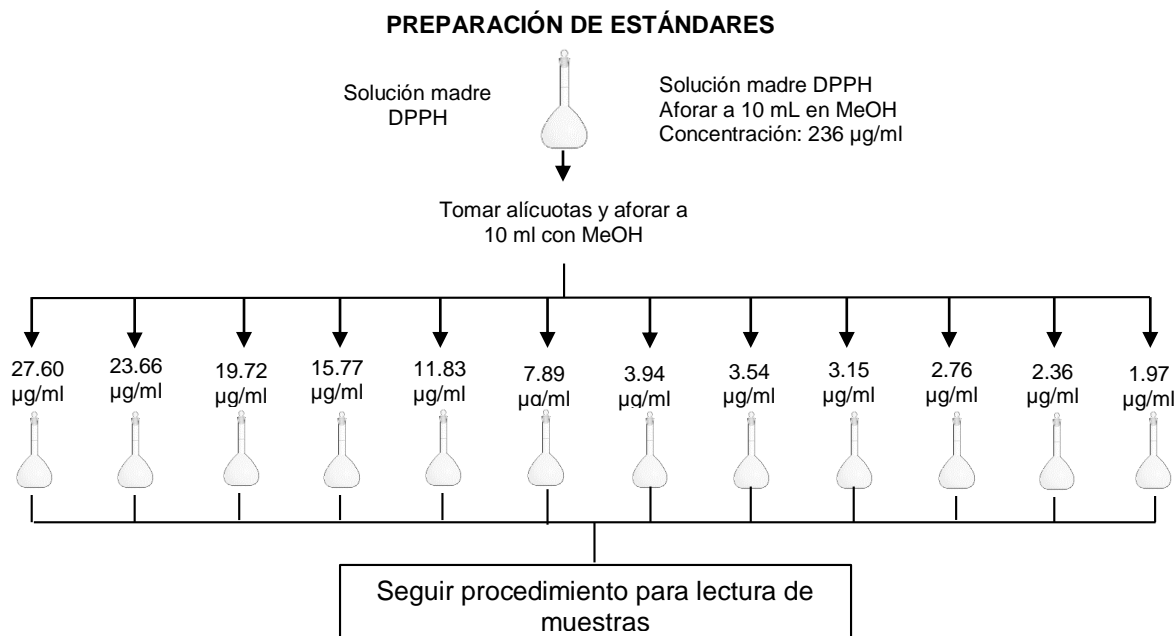


Figura 9: Metodología para curva de calibración. Método DPPH

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

Posteriormente la figura 10, detalla la metodología para cuantificación de capacidad antioxidante, en el literal **a.** el procedimiento para la preparación de soluciones patrón y de trabajo y **b.** indica el procedimiento para la lectura de las muestras. Las lecturas se realizaron por duplicado en una microplaca de 96 pocillos fondo plano a temperatura ambiente y con longitud de onda de 516 nm en un lector de microplaca.

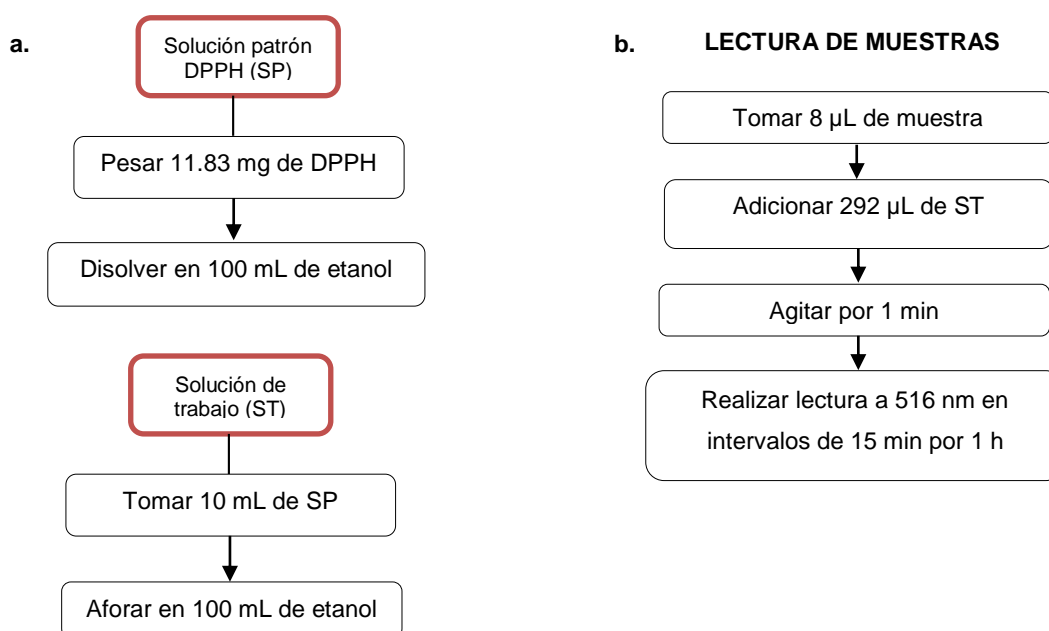


Figura 10. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método DPPH

a. Procedimiento para preparación de soluciones: patrón y de trabajo **b.** Procedimiento para la lectura de muestras.

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

Por otra parte, el IC₅₀ se calculó gráficamente, utilizando la curva de calibración en el rango lineal, trazando la concentración del extracto frente al efecto de eliminación correspondiente. Y la actividad antioxidante se expresó como el índice de actividad antioxidante (AAI), el mismo que se calculó a partir de la ecuación 1:

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

Ecuación 1. Determinación del índice de actividad antioxidante

Fuente: Scherer y Godoy (2009)

Elaboración: Scherer y Godoy (2009)

3.3.3 FRAP.

La determinación de capacidad antioxidante mediante el mecanismo de reducción de metales (FRAP), se realizó de acuerdo al método descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). El patrón de referencia utilizado fue Trolox y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo en base seca (μmol ET/g BS).

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)) hasta tener una concentración inicial de: 5000 ppm para el extracto atomizado, 2500 ppm para el liofilizado y 833 ppm para los extractos etanol-agua y etanol. Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes.

La figura 11, detalla el proceso para la determinación de la curva de calibración, graficando diferentes concentraciones de Trolox (15,50-542,57 μg/ml).

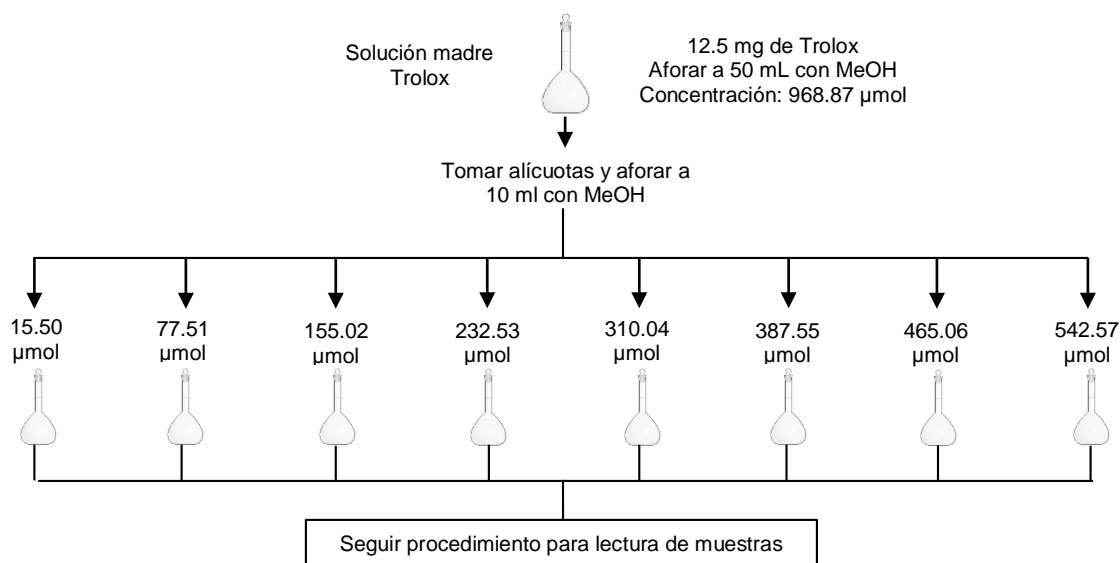


Figura 11. Metodología para curva de calibración. Método FRAP

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

Las lecturas se realizaron por duplicado en una celda de 1 mL, en un espectrofotómetro UV visible (Thermo scientific), con longitud de onda de 593 nm. A continuación se muestra la figura 12, en la que se detalla la metodología **a.** para la preparación de la solución de trabajo y **b.** para la lectura de muestras.

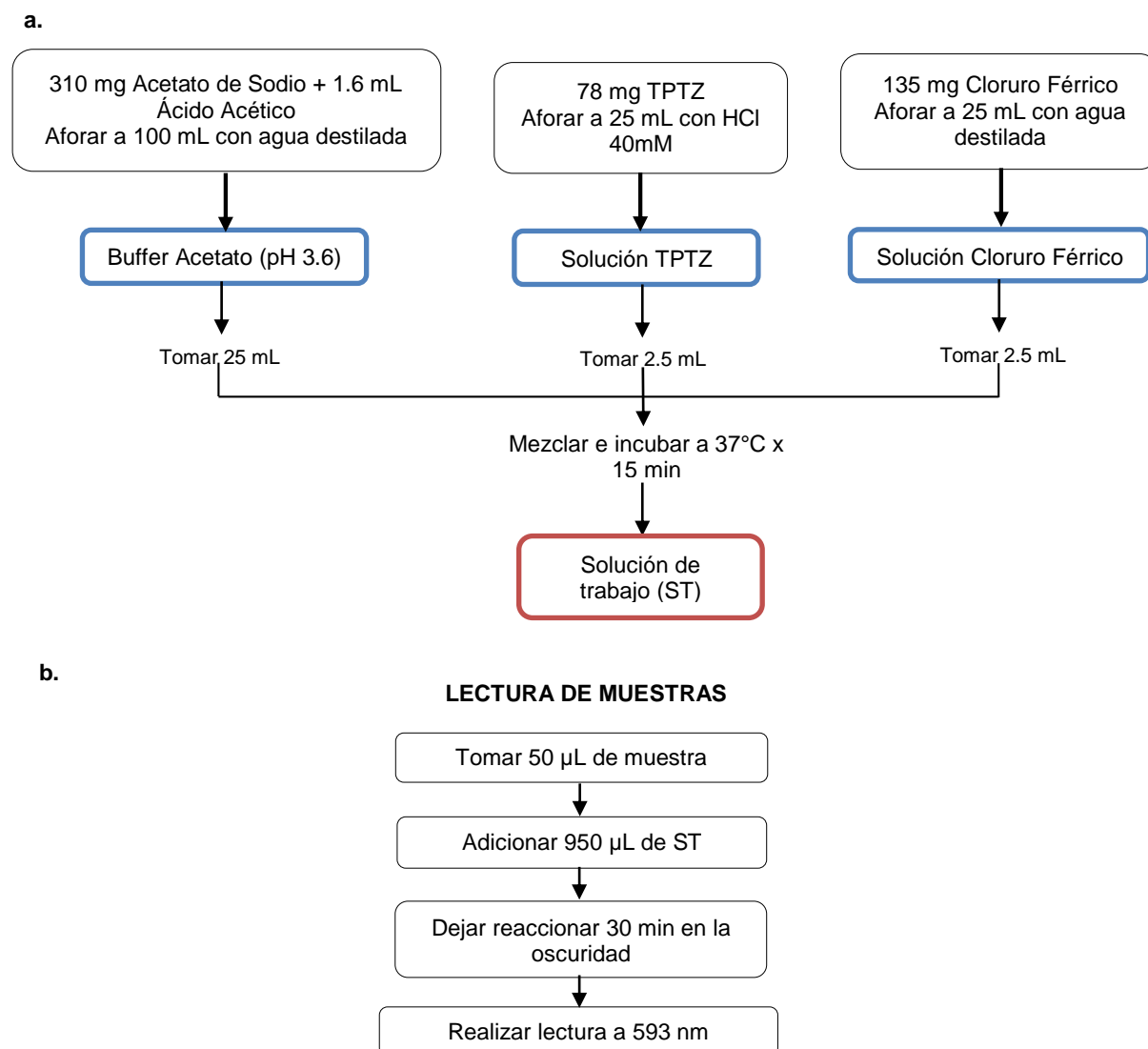


Figura 12. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método FRAP

a. Procedimiento para preparación de solución de trabajo **b.** Procedimiento para preparación de estándares **c.** Procedimiento para la lectura de muestras.

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

3.3.4 ABTS.

El método ABTS se procedió a realizar de acuerdo a lo descrito por Arnao, Cano, y Acosta (2001) con modificaciones hechas por Thaipong et al., (2006). El patrón de referencia utilizado fue Trolox y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo en base seca ($\mu\text{mol ET/g BS}$).

Cada extracto se pesó y se reconstituyó con el solvente utilizado durante la maceración (agua destilada, etanol, etanol-agua (1:1)) hasta tener una concentración inicial de: 625 ppm para el extracto liofilizado, 312,5 ppm para el extracto atomizado, 833 ppm para el extracto etanol y 208 ppm para etanol-agua. Posterior a lo cual se realizaron los cálculos correspondientes.

En la figura 13, se detalla el proceso para la preparación de la solución madre y de trabajo.

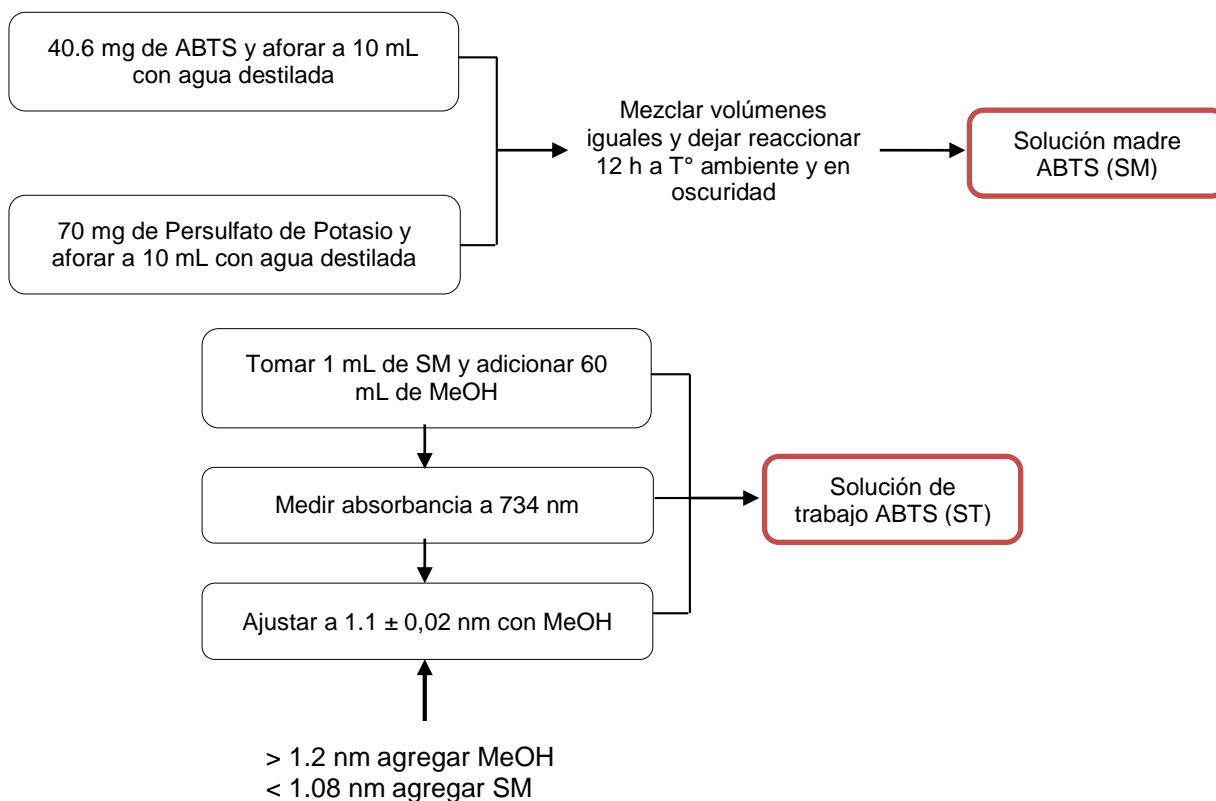


Figura 13. Metodología para preparación de solución de trabajo. Método ABTS

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

La figura 14, muestra **a.** el proceso para la determinación de la curva de calibración, graficando diferentes concentraciones de Trolox (15,50-542,57 $\mu\text{g/ml}$) y **b.** el procedimiento para la lectura de las muestras, las cuales se realizaron por duplicado en una celda de 1 ml, en un espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda de 734 nm.

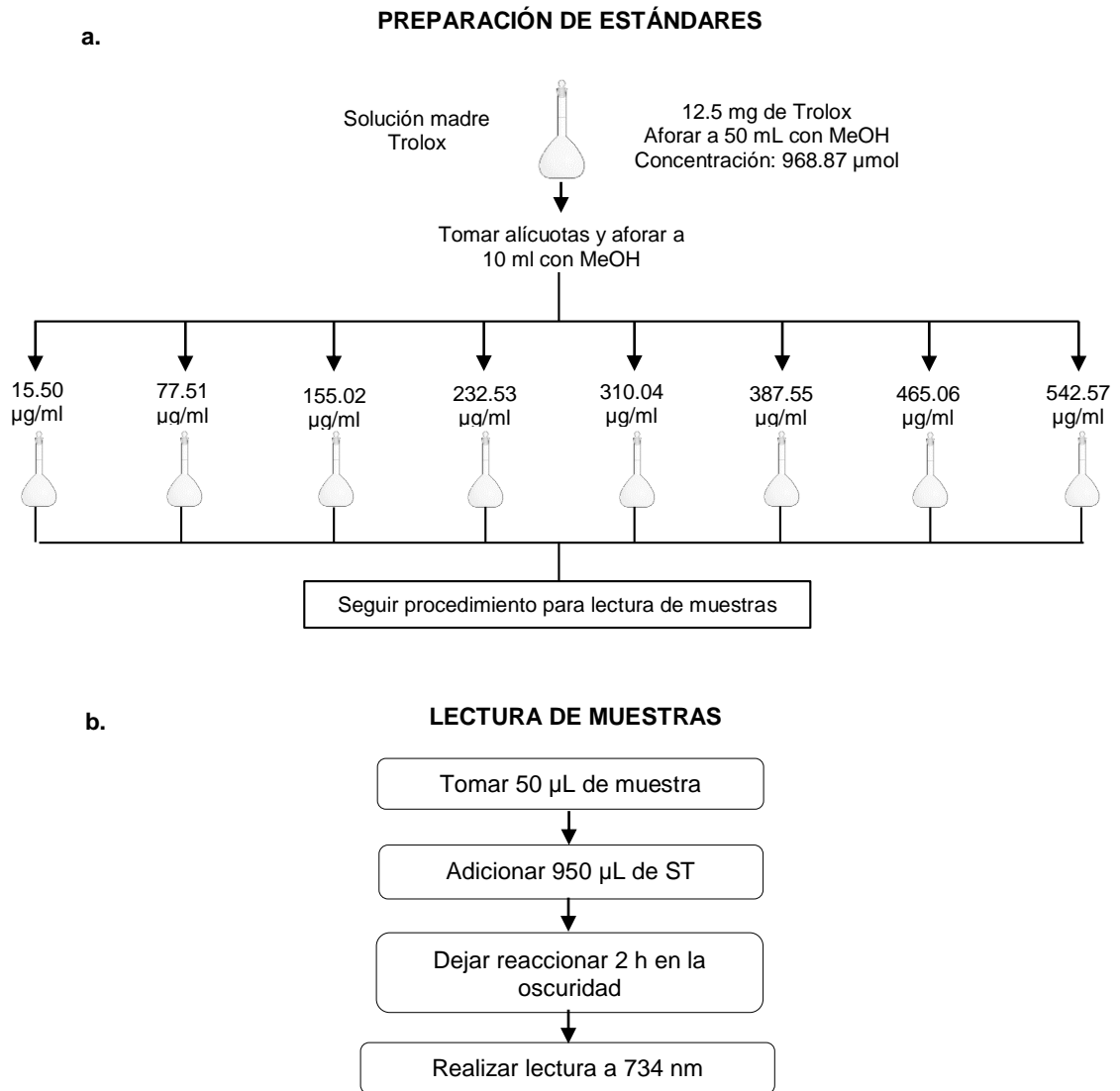


Figura 14. Metodología para cuantificación de capacidad antioxidante. Método ABTS
a. Procedimiento para preparación de estándares **b.** Procedimiento para la lectura de muestras.
Fuente: La experimentación
Elaboración: La autora

3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar ($n=3$) y fueron analizados estadísticamente en 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

El análisis de los resultados de la capacidad antioxidante de los cuatro extractos de *Piper carpunya* se muestran a continuación:

4.1.1 Fenoles totales.

El extracto etanol-agua presentó significativamente mayor contenido fenólico frente al resto de extractos estudiados; esta directriz también fue reportada en otros estudios como se observa en la figura 15, en los cuales demostraron que las soluciones hidroalcohólicas mejoran el proceso de extracción de compuestos fenólicos con respecto a la utilización de un único solvente (Alothman et al., 2009; J. Dueñas, Naranjo, y Araujo, 2009).

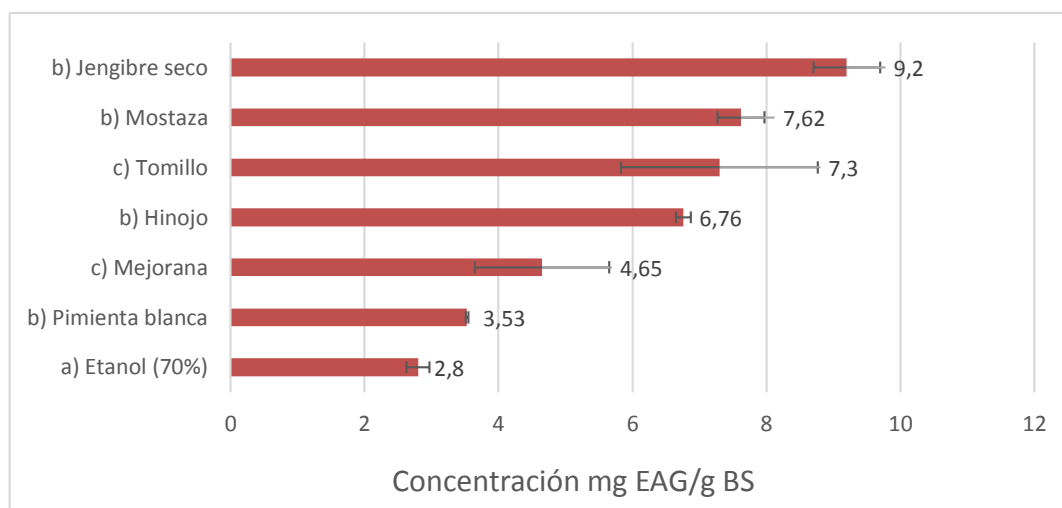


Figura 15. Fenoles totales extraíbles en *P. carpunya* y diversas especies vegetales.

Fuente: **a)** Jaramillo, Jaramillo, De Armas, Troccoli, y Rojas (2016). **b)** Lu, Yuan, Zeng, y Chen (2011) y **c)** Hussein, Atef, Selim, & Ibrahim (2013).

Elaboración: La autora

Jaramillo, Jaramillo, De Armas, Troccoli, y Rojas (2016), determinaron la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, glucósidos cianogénicos y saponinas en menor proporción en extracto de *Piper carpunya*, además reportaron el contenido de fenoles totales ($2,80 \pm 0,17$ mg EAG/g BS) con etanol al 70%, este dato es mayor al extracto etanólico (97%) obtenido mediante la presente experimentación, esto pudo deberse a la concentración del solvente y lugar de recolección de la muestra (provincia de El Oro).

Además, el extracto hidroalcohólico de guaviduca presentó mayor contenido fenólico que especies como la mejorana (*Origanum majorana*) y pimienta blanca (*Piper nigrum L.*), sin embargo menor contenido fenólico a especies como jengibre seco (*Zingiber officinale*), mostaza (*Brassica nigra*), tomillo (*Thymus vulgaris L.*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*); esto pudo deberse a que los autores utilizaron maceración dinámica para la obtención de sus

extractos, los resultados fueron obtenidos de estudios realizados por Lu, Yuan, Zeng, y Chen, (2011) y Hussein, Atef, Selim, y Ibrahim, (2013).

4.1.2 DPPH.

Los resultados obtenidos de los extractos de *P. carpunya*, indican que existió estadísticamente mayor actividad antioxidante del extracto etanol-agua frente al resto de extractos estudiados y además que los extractos liofilizado y atomizado no son significativamente diferentes. Según la clasificación dada por Scherer y Godoy (2009), el extracto etanol-agua es considerado de fuerte actividad antioxidante, mientras que los extractos: etanol, liofilizado y atomizado de poca actividad antioxidante.

Además, los extractos etanol-agua y etanol de guaviduca demostraron mejores resultados frente a otras especies como hojas de guanábana (*Annona muricata*) e ishpingo (*Amburana cearensis*) reportadas por Gomes et al. (2010) y de Hercampuri (*Amburana cearensis*) descrito por Nora, Suárez, y Arnao (2016), mientras que los extractos acuosos de guaviduca reportaron menor actividad antioxidante frente a las especies mencionadas anteriormente.

Además, el extracto etanol-agua presenta mayor capacidad antioxidante con respecto al ácido ascórbico reportado por Sohaimy, Hamad, Mohamed, Amar, y Al-hindi, (2015), lo que permite deducir que el extracto etanol-agua podría ser utilizado en reemplazo al ácido ascórbico para retrasar la oxidación de los alimentos.

Según la clasificación propuesta por Troya-Santos, Ale-Borja, y Suárez-Cunza (2017), el extracto etanol-agua es considerado con alto potencial, seguido por el extracto etanólico con moderado potencial y los extractos liofilizado y atomizado de bajo potencial.

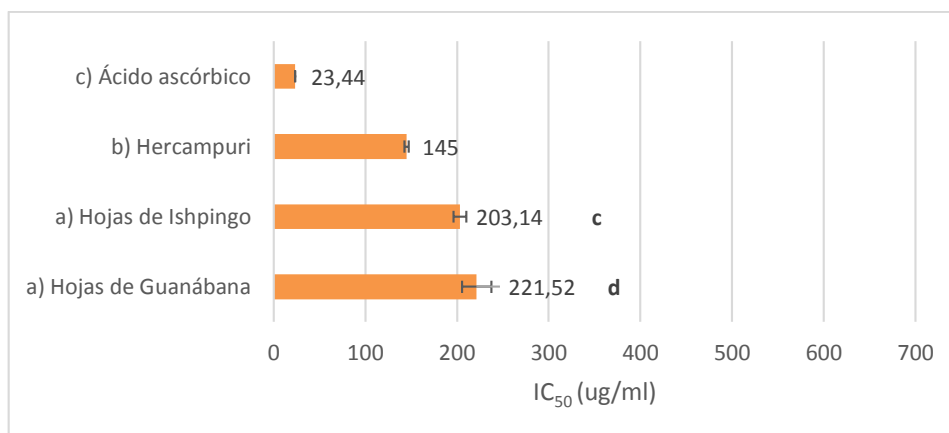


Figura 16. IC₅₀ (ug/ml) de extractos de *P. carpunya* y diversas especies vegetales. **Fuente:** a) Gomes et al. (2010). b) Nora et al. (2016). c) Sohaimy et al. (2015). **Elaboración:** La autora

4.1.3 FRAP.

Lu et al. (2011), reportan que el jengibre seco posee una capacidad antioxidante moderada, mientras que el hinojo, comino (*Cuminum cyminum*) y angelica dahurica (*Angelicae dahuricea*) tienen baja capacidad antioxidante; según estos resultados los extractos etanol-agua, atomizado, liofilizado y etanol de *P. carpunya* son considerados de baja capacidad antioxidante, por lo que se determina que los extractos de guaviduca no tienen efecto sobre la reducción de sales férricas.

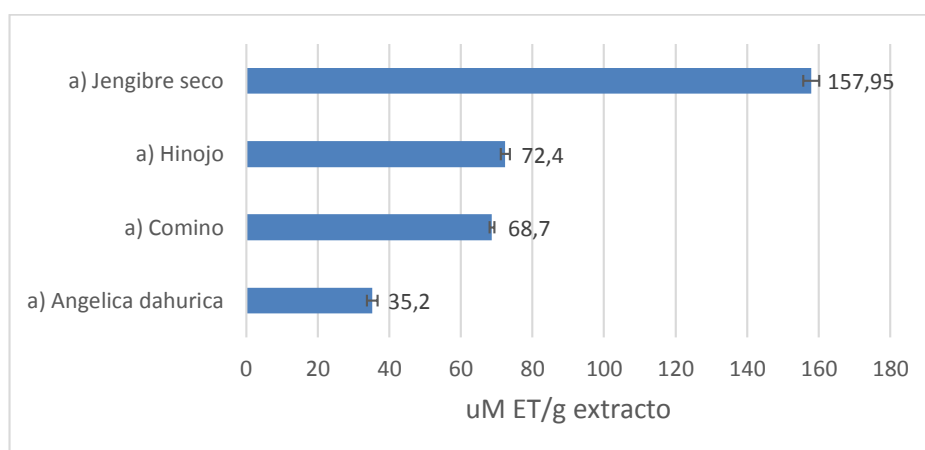


Figura 17. Capacidad antioxidante de *P. carpunya* y otras especies. Método FRAP

Fuente: a) Lu et al. (2011)

Elaboración: La autora

4.1.4 ABTS.

En la figura 18, se puede observar que el extracto etanol-agua presentó mayor actividad antioxidante ($p < 0,05$) frente al resto de extractos estudiados.

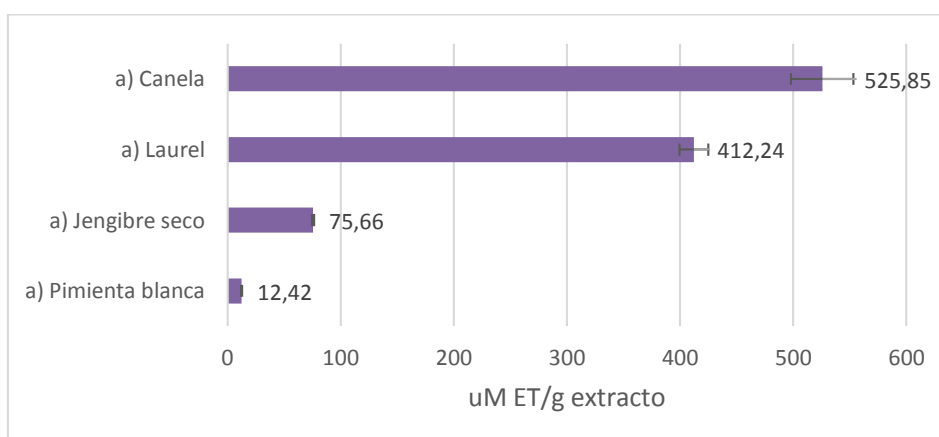


Figura 18. Capacidad antioxidante de *P. carpunya* y otras especies. Método ABTS.

Fuente: a) Lu et al. (2011)

Elaboración: La autora

Lu et al. (2011), mencionan que la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y laurel (*Laurus nobilis*) presentan alta capacidad antioxidante, mientras que el jengibre seco (*Zingiber officinale*) moderada capacidad antioxidante y la pimienta blanca (*Piper nigrum L.*) reportó la más baja capacidad antioxidante, según esta clasificación los extractos etanol-agua, atomizado y liofilizado presentan una capacidad antioxidante moderada mientras que el extracto etanólico muestran baja capacidad antioxidante.

CONCLUSIONES

- La presente investigación permitió comprobar que las hojas de *Piper carpunya* presentan un gran potencial para la industria alimentaria como fuente de antioxidante natural y a su vez aprovechar un recurso natural renovable de la provincia de Loja.
- Se pudo obtener cuatro tipos de extractos a partir de *Piper carpunya*: etanol-agua, etanol, atomizado y liofilizado, siendo los extractos atomizado y etanol-agua los que presentaron mayor rendimiento.
- Se determinó que el extracto etanol-agua manifestó mayor contenido fenólico y actividad antioxidante en los métodos aplicados: fenoles totales, DPPH, FRAP y ABTS. Y a su vez, en el método DPPH reportó mayor capacidad antioxidante que el ácido ascórbico, lo que permite potenciar su uso como antioxidante natural.

RECOMENDACIONES

- Aplicar los extractos obtenidos de *Piper carpubya* en matrices alimentarias con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante y la vida útil durante el almacenamiento.
- Analizar el perfil fenólico de los compuestos que manifiestan actividad antioxidante en los extractos de *Piper carpubya*.
- Realizar análisis microbiológicos a los extracto de guaviduca.
- Efectuar el proceso de obtención de extractos mediante maceración dinámica y comparar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A., Darwish, S., Ayad, E., y El-Hamahmy, R. (2007). Food Chemistry Egyptian mango by-product 2 : Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Journal of Food Chemistry*, 103, 1141-1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.026>
- 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>
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección, 161-172.
- Beltrán, Y., Morris, H., Reynaldo de la Cruz, E., Quevedo, Y., y Bermúdez, R. (2013). Contenido de fenoles totales en extractos de Pleurotus obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(2), 121-129.
- Benzie, I. F. F., y Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay, 76, 70-76.
- Calle, J. (1983). Contribucion al estudio de algunas especies de la familia piperaceae, 4(3), 47-57. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56650/55564>
- Castañeda, C., Ramos, L., y Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8, 56-72.
- Castro, H., y Parada, F. (2016). Evaluación del efecto protector contra la oxidación lipídica de fracciones obtenidas a partir del epicarpio de tomate de árbol (Solanum betaceum Sendtn). *Universidad Nacional de Colombia*, (81).
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., y Cuca, E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae . Una revisión Plant extracts used as biocontrol with emphasis on Piperaceae family . A review, 26(1), 97-105.
- Diem, Q., Elisa, A., Lan, P., Huong, L., Edi, F., Ismadji, S., y Ju, Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content , total flavonoids content , and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>

- Dueñas, A., Alcívar, U., Sacon, E., Bravo, L., y Villanueva, G. (s. f.). Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *C. huquiraga* Jussieu jf Gmel usando la lixiviación de muestras sólidas, 166-175.
- Dueñas, J., Naranjo, B., y Araujo, P. (2009). Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas , a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. *Escuela Politécnica del Ejército*.
- Elhassaneen, Y., El-waseef, S., Fathy, N., y Sayed, S. (2016). Bioactive Compounds and Antioxidant Potential of Food Industry By-products in Egypt. *Science & Education Publishing*, 4(1), 1-7. <https://doi.org/10.12691/ajfn-4-1-1>
- Erkan, N., Ayranci, G., y Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L .) extract , blackseed (*Nigella sativa* L .) essential oil , carnosic acid , rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, (September 2008), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058>
- Gallegos-zurita, M. (2017). Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos - Ecuador Medicinal plants used for treatment of skin diseases in rural communities in Los Ríos, 315-321.
- Gomes, J., De Sousa, T., Thijan, V., Lyra, D., Desterro, M., Carneiro, S., ... Paulino, U. (2010). Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil, 15, 8534-8542. <https://doi.org/10.3390/molecules15128534>
- González, F. (2010). *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia hispanica L .), mediante electroforesis capilar*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, Á., Ledesma, L., García, I., y Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Publica*, 33(1), 1-7. <https://doi.org/10.1590/S0864-34662007000100008>
- Huang, D., Ou, B., y Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hussein, M., Atef, M., Selim, K., y Ibrahim, K. (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 & Products*, 43, 827-831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>

- Jaramillo, C., Jaramillo, A., De Armas, H., Troccoli, L., y Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(September), 1171-1184.
- Jaramillo, F., y Valdivia, A. (2016). *Fundamentos de estrés oxidativo celular*. México: Universidad autónoma de Aguascalientes.
- Jumbo, M. (2019). *Uso de extracto de Simira ecuadorensis (Standl) como conservante de queso fresco*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities, (November 2008), 41-60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Kedare, S., y Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(August), 412-422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Lázaro, J. (1998). Flora del Valle de Lerma. *Universidad Nacional de Salta*, 5, 1-24. Recuperado a partir de <http://www.unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora/vol5/pdf/1.PIPERACEAE.pdf>
- Lozano, P. (2014). Los tipos de bosque en el sur del Ecuador, 29-49.
- 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>
- Martínez, A., y Leyva, A. (2014). La biomasa de los cultivos en el agroecosistema. Sus beneficios agroecológicos. *INCA*, 35(1), 11-20.
- Mendoza, Z., Linares-Palomino, R., y Peter, L. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa*, 13(2), 324-346.
- Mercado, G., Carrillo, L., Wall, A., López, J., y Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria*, 28(1), 36-46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Mesa, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez, J., Blair, S., y Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. Antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum* genus.

Revista Cubana de Plantas Medicinales, 15(2), 13-15.

- Morales Del Rio, J. A., Gutiérrez Lomelí, M., Guerrero Medina, P. J., y Lizette Del Toro Sánchez, C. (2015). Antioxidantes en Alimentos. En *Alimentos funcionales y compuestos bioactivos* (pp. 215-240).
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., y Okonogi, S. (2010). LWT - Food Science and Technology Factors in influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1095-1103. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.015>
- Nikolic, J., Mitic, V., Stankov, V., Dimitrijevic, M., y Stojanovic, G. (2019). Chemometric characterization of twenty three culinary herbs and spices according to antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, (123456789). <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00137-0>
- Nora, K., Suárez, S., y Arnao, A. (2016). Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante in vitro del extracto de *Gentianella nitida* extract, 77(3), 333-337.
- Parra, J., Delgado, W., y Cuca, L. (2011). Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters - PHYTOCHEM LETT*, 4, 280-282. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.015>
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food. Practical applications*. Cambriedge England: Woodhead publishing limited.
- Pozo, W., Azuola, R., Vargas Aguilar, P., Vacas, O., Vejar, R., Mosquera, T., ... Sacchetti, G. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* (canela amazónica) Y *Piper carpunya* (guaviduca , pinku). *Qualitas*, 11(3), 56-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>
- Prior, R., 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*, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ramirez, J., Cartuche, L., y Morocho, V. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanones isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador, 23(September 2007), 370-373. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000012>
- Ramos, E., Castañeda, B., y Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*,

15(1), 42-46.

- Restrepo, D., Narváez, C., y Restrepo, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia, *32*(6), 1517-1522.
- Rock, L., y Brunswick, N. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, 4290-4302.
- Rodríguez, O., Andrade, W., y Diaz, F. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (*Papaveraceae*), 21-36.
- Roginsky, V., y Lissi, E. A. (2005). Food Chemistry Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *92*, 235-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Rojano, B., Gaviria, C., y Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Revista de la facultad de química farmacéutica: Vitae*, *15*(2), 212-218.
- Roncancio, B., Jairo, J., Latorre, S., y María, L. (2015). del consumo de los alimentos de.
- Rufino, M., Alves, R., Brito, E., Pérez, J., Saura, F., y Mancini, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *121*(4), 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
- Saavedra, O. M., Nahúm, E., Vázquez, J., Roberto, M., Guapillo, B., Manuel, G., ... Bolaina, E. M. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades, (272).
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Journal of Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>
- Sánchez, C., Larrauri, J., y Saura, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *270*, 270-276.
- Scherer, R., y Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *112*, 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Sohaimy, S., Hamad, G., Mohamed, S., Amar, M., y Al-hindi, R. (2015). Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. *Journal of Agricultural Science*, *4*(4), 188-199.

- Soto, M., y Rosales, 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>
- Spigno, G., Tramelli, L., y Faveri, D. M. De. (2007). Effects of extraction time , temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, 81, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675. <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.
- Valencia, E., y Marín, A. (2003). Balance Redox (oxidantes / antioxidantes) en pacientes críticamente enfermos.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., y Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits , Vegetables , and Grain Products Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits , Vegetables , and Grain Products, (October). <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Villanueva, E., Rodríguez, G., Aguirre, E., y Castro, V. (2017). Influencia de antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de chia (*Salvia hispanica* L .) por rancimat. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 19-27. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.02>
- Yáñez, P. (2012). Consideraciones para el diseño y aplicación de Planes de Manejo de especies vegetales silvestres no maderables de interés comercial. *Researchgate*, (March).
- Zulueta, A., Esteve, M. J., y Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

ANEXOS

Anexo 1.-Rendimiento obtenido en los extractos de *Piper carpunya*

Método de extracción	Peso muestra seca (g)	Cantidad de extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
Atomizado (agua)	500	92,98	18,60
Etanol-Agua	500	57,46	11,49
Liofilizado (agua)	500	36,46	7,29
Etanol	500	3,22	0,64