

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



Evaluación de la Actividad antioxidante de extractos de polifenoles obtenidos a partir de factores de desecho de frutas comercializadas en Venezuela: uso de diferentes solventes y técnicas de extracción.

Tutores: MSc. Alicia Mariela Rincón
Dra. Rosa Amaro

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Bárbara Isabel Zamora Figueroa como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Química

Caracas, noviembre de 2017.

Yo, Profesora Rosa Amaro, investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, y yo, Profesora Alicia Mariela Rincón, investigadora de la Unidad de Análisis de Alimentos, adscrita al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Evaluación de la Actividad antioxidante de extractos de polifenoles obtenidos a partir de factores de desecho de frutas comercializadas en Venezuela: uso de diferentes solventes y técnicas de extracción.”

Que presenta la Br. Bárbara Isabel Zamora Figueroa, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016-2017, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 15 noviembre de 2017



Dra. Rosa Amaro
(Tutora)



MSc. Alicia Mariela Rincón
(Tutora)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "*Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de polifenoles obtenidos a partir de factores de desecho de frutas comercializadas en Venezuela: uso de diferentes solventes y técnicas de extracción.*" Presentado por la Br. Bárbara I. Zamora F., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Prof. Rosa Amaro
(Director)



Prof. Alicia Mariela Rincón
(Director)



Prof. Yosmery Vitta
(Jurado)



Prof. Lizet Bou Rached
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, por el don de la vida y permitirme llegar hasta aquí, por dame fuerzas a diario y acompañarme en todo momento y ser la luz y guía en mi camino.

A mi madre Carmen A. Figueroa y a mi padre Francisco Zamora, por ser cada uno un ejemplo de vida, darme el apoyo necesario en cada decisión, por estar a mi lado en todo momento, darme ánimos, por todo su esfuerzo y luchar conmigo cada día para lograr esta meta, darme todo su amor incondicional para seguir adelante y sus palabras de aliento en las buenas y malas. A mis hermanas Alejandra C y Sylvia, por ser mi apoyo, enseñarme que todo esfuerzo vale la pena, por no dejarme sola nunca, por animarme, guiarme y ser mis ejemplos y compañeras de lucha en todo momento.

A mis tutoras la profesora Alicia Mariela Rincón por introducirme en esta línea de investigación, enseñarme y orientarme en todo lo necesario para llevar a cabo este TEG y la profesora Rosa Amaro por guiarme en la realización del mismo.

A la profesora Lizet Bou Rached y la profesora María Isabel Calderón, por su hospitalidad, amabilidad y darme todo el apoyo que necesité para realizar este trabajo, así como en el día a día.

Al Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Farmacia, UCV, en cuyas instalaciones, con equipos y reactivos me permitieron llevar a cabo este trabajo de investigación. A la UCV por abrirme sus puertas y ser mi alma mater.

A mis amigos Iván, Jessica, Génesis, Guillen, Norge, Luis, Ana, Ellana, Alejandro, Luz, con quienes comencé la carrera con un sueño por delante y que hoy es una meta realizada, me han apoyado en todo momento sin dudar y con quien he contado en las buenas y malas, me han regalados grandes momentos, risas y locuras, me han visto llorar y han compartido mis tristezas y alegrías, gracias muchachos por ser los mejores amigos que la UCV me regaló. Gracias también a Itzamar, Hernaylin, Diana, Auxi, José

Alejandro, Marilyn y Kariana por ayudarme siempre que podían, por su sencillez, por animarme, hacerme sonreír y ser excelentes amigos con los que siempre puedo contar en todo momento. Y, por último, pero no menos importante a mis grandes amigos de siempre Yamery y Antony, que, aunque no estamos juntos siempre me han apoyado en todas mis decisiones y ha estado allí con una palabra de ánimo mostrándome que todo es posible y que la amistad perdura a pesar de la distancia. Gracias a todos por estar a mi lado, mostrarme cuan fuerte soy y que los sueños si se pueden hacer realidad.

A los profesores Peñuela, Golding, Gustavo, Jairo y Lourdes por guiarme en cada una de sus materias, por guiarme en esta carrera, enseñarme que puedo dar más ante cualquier dificultad y que la química es más que solo ciencia, es y está en toda mi vida.

A la UCV por abrirme sus puertas, enseñarme a vencer las sombras y hacerme sentir orgullosa de decir, SOY UCVISTA. Esta es mi Alma Mater.

RESUMEN

Los alimentos de origen vegetal y en especial las frutas y vegetales pueden ejercer un efecto protector contra enfermedades degenerativas y algunos tipos de cáncer. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como los polifenoles, que incluyen flavonoides y taninos. Asimismo, los polifenoles presentes en frutas y vegetales pueden ser útiles en sistemas para prevenir reacciones deteriorativas de oxidación. Se ha demostrado que, en algunas frutas, las semillas y cáscaras poseen mayor capacidad antioxidante que las pulpas, por lo que podría haber un aprovechamiento integral de las mismas. La extracción de compuestos antioxidantes puede verse afectada por la polaridad del solvente y por la técnica de extracción.

En ese sentido se estudió la influencia de la técnica (agitación y sonicación) y el solvente de extracción (metanol, etanol e isopropanol) en el contenido de polifenoles, flavonoides y taninos en semillas y cáscaras de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*. Los polifenoles totales evaluados por el método de Folin-Ciocalteu fueron mayores en las fracciones de *Passiflora edulis* en el extracto de alcohol isopropílico por agitación para las cáscaras ($739 \pm 3 \text{mgEAG}/100\text{g}$) y por sonicación para las semillas ($2219 \pm 7 \text{mgEAG}/100\text{g}$). En *Carica papaya* se obtuvo un mayor contenido de estos compuestos en el extracto metanólico por agitación para las cáscaras ($912 \pm 9 \text{mgEAG}/100\text{g}$) y por sonicación para las semillas ($902 \pm 1 \text{mgEAG}/100\text{g}$).

Los flavonoides en las fracciones de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* se determinaron por el método de tricloruro de aluminio obteniéndose la mayor cantidad de estos compuestos en el extracto isopropílico por agitación en cáscaras de *P. edulis* ($263 \pm 6 \text{mgERT}/100\text{g}$) y semillas de *C. papaya* ($46 \pm 4 \text{mgERT}/100\text{g}$). Asimismo, se obtuvo un mayor contenido de flavonoides en el extracto isopropílico por sonicación en semillas de *P. edulis* ($538 \pm 9 \text{mgERT}/100\text{g}$) y cáscaras de *C. papaya* ($383 \pm 4 \text{mgERT}/100\text{g}$).

La mayor concentración de taninos condensados se obtuvo en el extracto metanólico por sonicación para las cáscaras y semillas de *P. edulis* (389 ± 7 ; 614 ± 13 mgECT/100g) y *C. papaya* (648 ± 7 ; 727 ± 11 mgECT/100g).

La actividad antioxidante se determinó por los métodos de DPPH• (2,2-difenil-picryl-hidracil) y poder reductor, arrojando que para ambos ensayos las semillas de *Passiflora edulis* poseen mayor poder antioxidante, seguida de las semillas de *Carica papaya*, cáscaras de *Carica papaya* y por último las cáscaras de *Passiflora edulis*.

Palabras Claves: Polifenoles, flavonoides, taninos, actividad antioxidante, extracción, sonicación, *Passiflora edulis*, *Carica papaya*, cáscaras, semillas.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Polifenoles	21
2.1.1. Clasificación	23
2.1.2. Características químicas generales	24
2.2. Flavonoides	25
2.2.1. Estructura química.....	25
2.2.2. Clasificación	26
2.3. Taninos	27
2.4. Especies reactivas del oxígeno – ROS (Reactive Oxygen Species).....	29
2.4.1. Daño oxidativo a biomoléculas	30
2.4.2. Importancia de las especies reactivas de oxígeno	31
2.5. Radicales Libres	31
2.5.1. Formación de los radicales libres.....	32
1.5.2. Clasificación	35
2.5.3. Estrés oxidativo	36
2.6. Antioxidantes	36
2.6.1. Clasificación	37
2.7. Actividad Antioxidante.....	41
2.8. Fuentes de antioxidantes naturales	42
2.9. Determinación de compuestos fenólicos	44
2.9.1. Métodos de Extracción	44

2.9.1.1.	Extracción asistida por ultrasonido (EUA) o sonicación	44
2.9.2.	Método para la determinación de polifenoles	46
2.9.3.	Método para la determinación de taninos condensados.	47
2.9.4.	Método para la determinación de flavonoides	48
2.9.5.	Poder reductor: reducción férrica de la potencia antioxidante	49
2.9.6.	Método de barrido de radicales libres (DPPH)	49
2.10.	Antecedentes en la determinación de polifenoles y actividad antioxidante	50
3.	OBJETIVOS	57
3.1.	Objetivo General	57
3.2.	Objetivos específicos	57
4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	58
4.1.	Equipos	58
4.2.	Reactivos	58
4.3.	Muestras	59
4.4.	Grado de Madurez	60
4.5.	Humedad de las muestras	60
4.6.	Preparación de la muestra	60
4.7.	Preparación del extracto	61
4.8.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales expresados en base seca.	61
4.9.	Contenido total de flavonoides.....	62
4.10.	Taninos condensados.....	62
4.11.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	62
4.11.1.	Determinación del poder reductor	62
4.11.2.	Método de barrido de radicales libres.	63

4.12.	Análisis de resultados	65
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
5.1.	Determinación de grado de madurez	66
5.2.	Determinación de humedad	67
5.3.	Cuantificación de polifenoles totales	69
5.4.	Cuantificación de flavonoides totales (flavonas y flavonoles)	75
5.5.	Cuantificación de taninos condensados	81
5.6.	Actividad Antioxidante	85
5.6.1.	Poder Reductor Férrico	87
5.6.2.	Barrido de radicales libres (DPPH●)	90
6.	CONCLUSIONES	103
7.	RECOMENDACIONES	105
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9.	GLOSARIO DE TÉRMINOS	114
10.	ABREVIATURAS	115
11.	APÉNDICE	117

INDICE TABLAS

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS).....	27
Tabla 2. Sitios de la célula y reacciones químicas a partir de las que se generan radicales libres.....	31
Tabla 3. Antioxidantes no enzimáticos (Exógenos).....	37
Tabla 4. Polifenoles totales en las fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> determinados por el método de Folin-Ciocalteu expresados como mg EAG/100g de muestra seca utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona:agua	70
Tabla 5. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente de polifenoles totales en fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> con los reportados por otros autores ...	74
Tabla 6. Valores de polifenoles totales reportados por otros investigadores determinados en cáscaras o semillas de diferentes frutas	75
Tabla 7. Flavonoides totales (flavonas y flavonoles) en las fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> determinados por acomplejamiento con tricloruro de aluminio expresados como mg ERT/100g de muestra seca utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona:agua	77
Tabla 8. Valores obtenidos experimentalmente de flavonoides totales en fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> con los reportados por otros autores	80
Tabla 9. Valores de flavonoides totales determinados en pulpa, cáscaras y semillas de diferentes frutas reportados por otros investigadores.....	81

Tabla 10. Taninos totales en las fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> determinados por el método de la Vainillina expresados como mg ECT/100g de muestra seca utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona:agua.....	83
Tabla 11. Valores de taninos reportados en la bibliografía en cáscaras, semillas, pulpa y raíces de <i>P. edulis</i> y otras plantas.....	86
Tabla 12. Actividad antioxidante en las fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> determinado por el método de poder reductor expresado como mg EAAs/100g muestra seca y por el método de barrido de radicales libres con DPPH● expresado como %Inhibición, mM ETR/g muestra seca, EC ₅₀ , TEC ₅₀ y eficiencia antirradical (EA).....	87
Tabla 13. Comparación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de las fracciones de cáscaras y semillas de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i>	89
Tabla 14. Valores de poder reductor para las fracciones de diferente material vegetal consideradas fracciones de desecho reportado en la bibliografía	90
Tabla 15. Porcentaje inhibición (% Inhibición) en cáscaras, semillas y pulpa reportados para diversas frutas.....	96
Tabla 16. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CP por agitación.....	118
Tabla 17. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CP por sonicación.....	118
Tabla 18. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en CP independientemente del solvente.....	119
Tabla 19. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SP por agitación.....	119

Tabla 20. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SP por sonicación.....	120
Tabla 21. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en SP independientemente del solvente.....	120
Tabla 22. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CL por agitación.....	121
Tabla 23. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CL por sonicación.....	121
Tabla 24. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en CL independientemente del solvente.....	122
Tabla 25. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SL por agitación.....	122
Tabla 26. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SL por sonicación.....	123
Tabla 27. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en SL independientemente del solvente.....	123
Tabla 28. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CP por agitación.....	124
Tabla 29. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CP por sonicación.....	124
Tabla 30. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en CP independientemente del solvente.....	125

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SP por agitación.....	125
Tabla 32. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SP por sonicación.....	126
Tabla 33. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en SP independientemente del solvente.....	126
Tabla 34. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CL por agitación.....	127
Tabla 35. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CL por sonicación.....	127
Tabla 36. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en CL independientemente del solvente.....	128
Tabla 37. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SL por agitación.....	128
Tabla 38. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SL por sonicación.....	129
Tabla 39. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en SL independientemente del solvente.....	129
Tabla 40. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CP por agitación.....	130
Tabla 41. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CP por sonicación.....	130

Tabla 42. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en CP independientemente del solvente.....	131
Tabla 43. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SP por sonicación.....	131
Tabla 44. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SP por agitación.....	132
Tabla 45. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en SP independientemente del solvente.....	132
Tabla 46. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CL por agitación.....	133
Tabla 47. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CL por sonicación.....	133
Tabla 48. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en CL independientemente del solvente.....	134
Tabla 49. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SL por agitación.....	134
Tabla 50. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SL por sonicación.....	135
Tabla 51. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en SL independientemente del solvente.....	135

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles.....	20
Figura 2. Estructura básica del esqueleto flavonólico.....	23
Figura 3. Estructura química de diversos compuestos C ₆ -C ₃ -C ₆ (flavonoides) encontrados en alimentos	25
Figura 4. Reacción del radical superóxido.....	28
Figura 5. Estructura química del trolox.....	62
Figura 6. Comparación de sólidos solubles totales en pulpa de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> obtenidos experimentalmente contra los reportados por otros autores.....	67
Figura 7. Resultados de la determinación de humedad en cáscaras y semillas de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> frescas y en las harinas.....	69
Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.....	71
Figura 9. Curva de calibración de rutina para la determinación de flavonoides totales en las fracciones de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i>	78
Figura 10. Curva de calibración de catequina para la determinación de taninos condensados en cáscaras y semillas de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i>	84
Figura 11. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación del poder reductor férrico en cáscaras y semillas de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i>	88
Figura 12. Curva de calibración de trolox para la determinación de la actividad antioxidante en cáscaras y semillas de <i>P. edulis</i> y <i>C. papaya</i> por el método de barrido de radicales libres.....	92

Figura 13. Relación entre polifenoles de cáscara de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	94
Figura 14. Relación entre polifenoles de cáscara de <i>C. papaya</i> y la actividad antioxidante.....	95
Figura 15. Relación entre polifenoles de semillas de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	95
Figura 16. Relación entre polifenoles de semillas de <i>C. papaya</i> y la actividad antioxidante.....	96
Figura 17. Relación entre flavonoides de cáscara de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	98
Figura 18. Relación entre flavonoides de cáscara de <i>C. papaya</i> y la actividad antioxidante.....	99
Figura 19. Relación entre flavonoides de semillas de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	99
Figura 20. Relación entre flavonoides de semillas de <i>C. papaya</i> y la actividad antioxidante.....	100
Figura 21. Relación entre taninos de cáscara de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	101
Figura 22. Relación entre taninos de cáscara de <i>C. papaya</i> y la actividad antioxidante.....	101
Figura 23. Relación entre taninos de semillas de <i>P. edulis</i> y la actividad antioxidante.....	102

Figura 24. Relación entre taninos de semillas de *C. papaya* y la actividad antioxidante.....102

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios de las plantas, incluyen los fenoles, flavonoides, taninos y ácidos fenólicos los cuales poseen diferentes estructuras químicas y propiedades, siendo relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, frescos y procesados; es decir, están relacionados con la apariencia, aroma, textura y sabor de los alimentos^[1].

Actualmente, este grupo de fitoquímicos fenólicos son de gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana^[2] debido a sus propiedades antioxidantes relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, carotenoides y vitaminas C y E^[3]. Por esta razón, existe un gran interés en el uso de antioxidantes naturales para inhibir la peroxidación lipídica o para proteger el cuerpo humano del daño oxidativo por radicales libres.

Esto es particularmente relevante, pues la producción no controlada de oxígeno derivado de los radicales libres, está implicada en la aparición de muchas enfermedades tales como cáncer, artritis reumatoide, así como el proceso degenerativo asociado con el envejecimiento, incluyendo enfermedades como Parkinson y Alzheimer, y, en ese sentido, muchos estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales tales como frutas frescas, vegetales y té tienen un efecto protector contra las enfermedades antes mencionadas^[4].

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las frutas, tal como en la pulpa, cáscaras y semillas tiene interés desde el punto de vista tecnológico y nutricional. Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que se presume que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos permitiría una disminución en la utilización de aditivos antioxidantes de origen sintético^[5].

En la industria de alimentos las pulpas de *Carica papaya* (lechosa) y *Passiflora edulis* (parchita) son utilizadas para la elaboración néctares y jugos, mientras que el material remanente del proceso industrial que resulta en las cáscaras y semillas se convierten en productos de desecho debido a que no cuentan con la tecnología para su aprovechamiento. Sin embargo, se han incrementado los estudios en la formulación de nuevos productos comerciales bajos en grasas y calorías, a partir de fibra dietética que contengan compuestos bioactivos asociados como los flavonoides y taninos^[6].

Por otra parte, algunas frutas poseen mayor capacidad antioxidante en la cáscara y las semillas respecto a la pulpa, por ejemplo, las semillas de la uva y la cáscara de la granada poseen mayor capacidad antioxidante en sus extractos metanólicos que la pulpa^[6]. Por lo tanto, las fracciones de cáscara y semillas de frutas pueden contener potencialmente más antioxidantes cuantitativa o cualitativamente.

En este sentido, el proceso de extracción para el aislamiento de antioxidantes fenólicos del fruto es muy importante; particularmente, los parámetros de extracción tales como el tipo de disolvente, la concentración del disolvente, la temperatura de extracción, el tiempo de extracción, la relación solvente-sólido y las técnicas de extracción utilizadas para mejorar la eficiencia de extracción a fin de obtener una óptima cantidad de compuestos bioactivos presentes en el extracto. En este proyecto se propone evaluar diferentes métodos de extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en semillas y cáscaras de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los alimentos de origen vegetal y en especial las frutas y vegetales pueden ejercer un efecto protector en contra de algunas enfermedades como el cáncer. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como los polifenoles, flavonoides, taninos, entre otros. A continuación se describen algunos de estos compuestos bioactivos.

2.1. Polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de tener en su estructura diversos grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se generan como producto del metabolismo secundario de las plantas, donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos o herbívoros y a su vez poseen pigmentos que atraen a los polinizadores^[7].

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales. Son una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas, en su mayoría son derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias presentes en las plantas con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas^[1].

Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas de las plantas. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, entre otros). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides^[9] (Figura 1).

Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos fenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede ser el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas^[10].

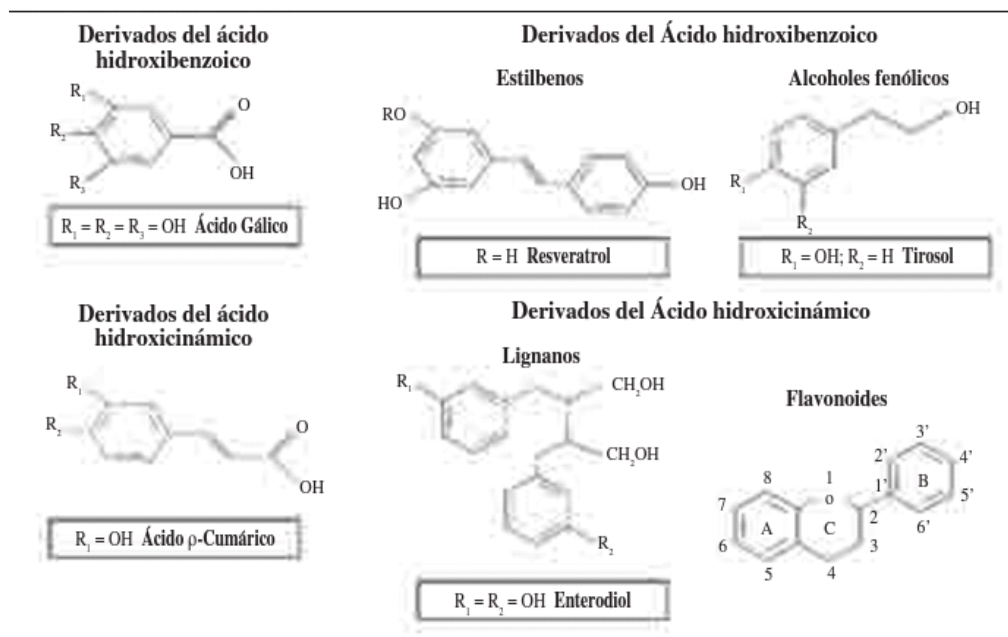


Figura 1. Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles ^[9].

2.1.1. Clasificación

Se pueden clasificar los compuestos fenólicos según su origen biosintético y su complejidad estructural, tomando en cuenta que el grupo más sencillo corresponde a los fenoles. Tenemos a los flavonoides que son aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en las plantas, los mismos se pueden clasificar en 5 grupos diferentes: antocianos (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonoles, isoflavonoides y taninos^[1].

Se puede clasificar a los polifenoles de distintas maneras debido a su gran diversidad estructural.

Por su estructura química tenemos 2 grandes grupos^[11]:

1. No flavonoides

Entre ellos hay dos subgrupos:

- Fenoles no carboxílicos: C₆, C₆-C₁, C₆-C₃.
- Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C₆-C₁ y derivados del ácido cinámico C₆-C₃.

2. Flavonoides C₆-C₃-C₆

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.

Subgrupos:

- Antocianos; flavononas, flavanoles y flavanonoles; taninos condensados y lignanos.

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades sustanciales por las plantas. Se han identificado alrededor de 4000 de estos compuestos, derivados

metoxilados, glicosilados del 2-fenilbenzo- γ -pirano e hidroxilados. Tienen actividad antioxidante y una gran capacidad para capturar radicales libres, de igual forma que las antocianidinas tienen actividad diurética además de poseer también acción laxante^[11].

2.1.2. Características químicas generales

Una de las principales características de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes; ya que por una parte son muy susceptibles a ser oxidados y por otra son los que impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación, es de esta manera que los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, dan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, razón por la que se les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. También pueden actuar como quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y constituir complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el aluminio y el hierro, lo que consigue poseer también implicaciones nutricionales^[12].

La naturaleza química de los grupos funcionales en compuestos fenólicos y proteínas puede aumentar su afinidad para formar complejos mediante enlaces covalentes, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos y enlaces de hidrógeno. La presencia del anillo aromático con un grupo hidroxilo y ácidos carboxílicos fenólicos aumentan su afinidad para conjugarse con los principales componentes de los alimentos tales como proteínas, minerales, hidratos de carbono y lípidos^[13].

2.2. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy extenso de compuestos polifenólicos los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares (plantas que contienen raíces, tallos y hojas), en forma de glicósidos. Ellos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante^[14].

2.2.1. Estructura química

Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo^[14] (Figura 2).

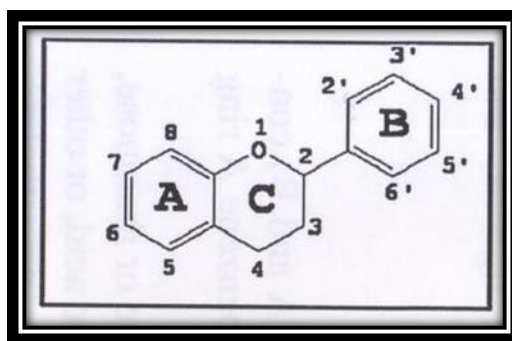


Figura 2. Estructura básica del esqueleto flavonólico^[14].

Los anillos son denominados A,B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B. Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres^[14].

2.2.2. Clasificación

Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B^[14].

En base a su variación estructural (Figura 3) su clasificación es^[1]:

1. Con dobles enlaces entre las posiciones 2 y 3:
 - a) Flavonas: con H en la posición 3.
 - b) Flavonoles: con OH en la posición 3.
2. Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3:
 - a) Flavononas: con H en la posición 3.
 - b) Flavonololes: con OH en la posición 3.
3. Chalconas: con el anillo C abierto.
4. Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3 (3-fenil-gamma-cromona).

Existen también dímeros de flavonoides, denominados diflavonoides. En general los flavonoides que contienen múltiples grupos hidroxilo tienen mayor capacidad antioxidante que los ácidos fenólicos contra radicales peróxidos^[1].

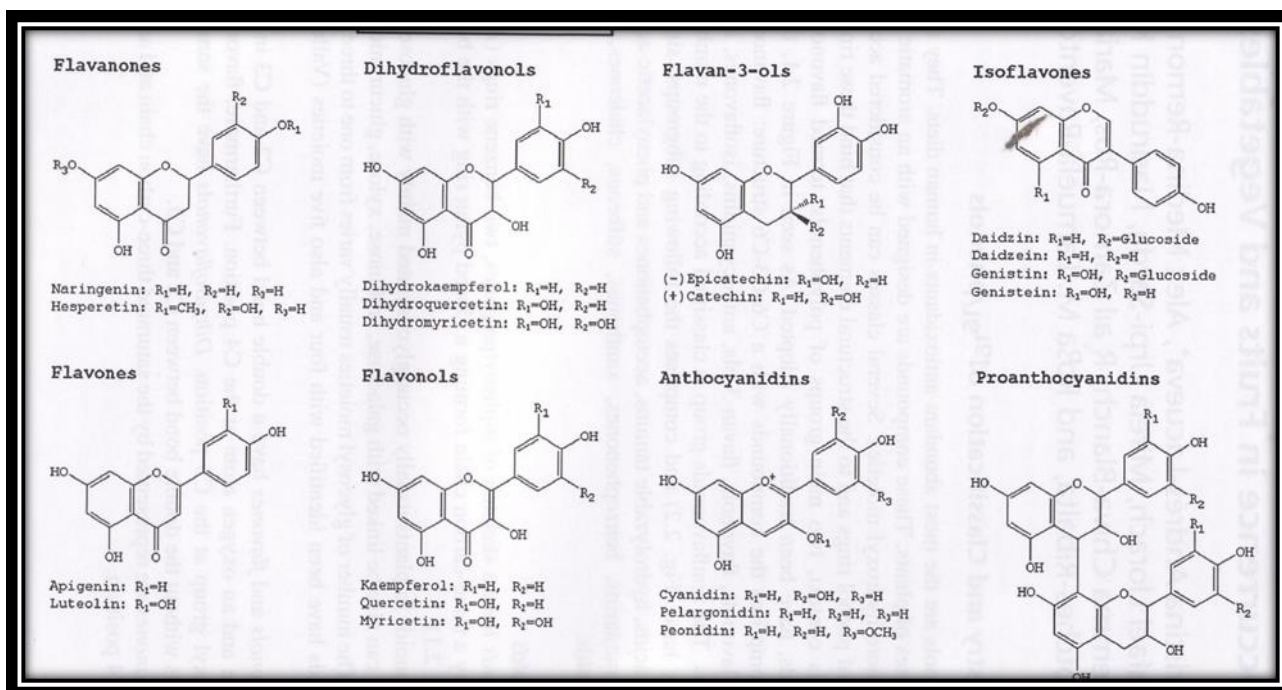


Figura 3. Estructura química de diversos compuestos C₆-C₃-C₆(flavonoides) encontrados en alimentos [27].

2.3. Taninos

Muchos flavonoides de los alimentos se polimerizan en las propias plantas o como resultado del procesamiento de los alimentos. Estos polímeros se conocen como taninos, los cuales son responsables de precipitar algunas proteínas y alcaloides para convertir la piel del animal en cuero^[15].

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular de 500 a 3000 Da (Daltons en unidades de masa). Estos compuestos contienen un número importante de grupos hidroxilos entre otros grupos funcionales, siendo capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas^[1].

Los taninos se clasifican en dos grupos: hidrolizables y no hidrolizables o condensados, estos últimos tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilos que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxiidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos respectivamente^[1].

Los taninos condensados también llamados proantocianidinas constan de unidades monoméricas de flavanos ligados por medio de carbono-carbono y uniones éter. Se han identificado quince subclases de proantocinidinas, pero sin embargo, sólo tres de ellas tienen hasta el momento importancia en los alimentos de origen vegetal para humanos; procianidinas (catequina y sus polímeros) prodelfinidinas (galocatequina y sus polímeros) y propelargonidinas (afselequina y sus polímeros) y sus mezclas. En estos taninos, las unidades monoméricas están primariamente unidas por medio de uniones 4-6 ó 4-8 carbono-carbono (unión β) o por medio de uniones 4-8 carbono-carbono y 2-7 uniones éter (uniones α). Se han identificado otras uniones aisladas en plantas no alimenticias o constituyendo compuestos menores en algunos alimentos como en el cacao. Los taninos pueden variar desde dímeros hasta grandes polímeros^[15].

Una segunda clase de taninos presentes en los alimentos son los derivados que se forman principalmente bajo condiciones enzimáticas oxidativas y atmosféricas o durante el procesamiento de alimentos, como por ejemplo los que se encuentran en vinos rojos, té y café. A causa de la complejidad de los compuestos, ha sido difícil utilizar una estricta denominación química y con frecuencia se les han asignado nombres populares^[2].

Otra clase de taninos hidrolizables en los alimentos, constan de ácido gálico o ácido elágico, al que se esterifica en un poliol no aromático como el azúcar o el ácido quínico. En esta clase de taninos, también pueden producirse otras uniones (C-C ó C-O-C), para formar dímeros y complejos superiores, que tienen varios grados de resistencia a la fractura química^[15].

2.4. Especies reactivas del oxígeno – ROS (Reactive Oxygen Species)

Las especies reactivas del oxígeno, conocidas como ROS, (Reactive Oxygen Species) por sus siglas en inglés, son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial. ROS, es un término agrupado que contiene radicales libres: anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y ciertas especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres^[16]. En la tabla 1 se presentan las principales especies reactivas del oxígeno.

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS)

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	$^{\bullet}OH$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	RO^{\bullet}	Oxígeno singlete	1O_2
Hidroperoxilo	HOO^{\bullet}	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	ROO^{\bullet}	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Catión nitrilo	NO_2^+
Dioxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^{\bullet}$
		Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
		Alquil peroxinitritos	$ROONO$
		Ozono	O_3
		Ácido hipobromoso	HBrO

Fuente: Halliwell y Whiteman^[16]

Las especies reactivas de oxígeno son radicales libres o precursores de radicales. Los electrones giran en pares con un espín particular, en los orbitales a esto se lo conoce como la máxima estabilidad natural; razón por la cual, si existen electrones desapareados en un orbital, se forman especies moleculares altamente reactivas que tienden a robar

un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica. El principal radical libre es el Oxígeno ya que posee dos electrones desapareados^[17].

2.4.1. Daño oxidativo a biomoléculas

Las especies reactivas de oxígeno que actúan como oxidantes biológicos son numerosas, pero el oxígeno (O_2) es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de H_2O_2 , convirtiéndose en un agente oxidante muy activo^[10] (Figura 4).

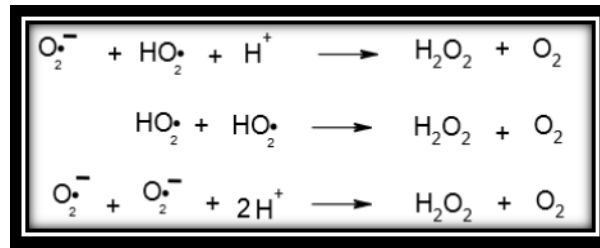


Figura 4. Reacción del radical superóxido^[1]

Sobre el metabolismo de los principios inmediatos las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones, las mismas que pueden ser el origen del daño celular^[10].

- En las proteínas, las especies reactivas de oxígeno pueden inducir en el extremo la fragmentación de proteínas, pero además existen una serie de alteraciones que pueden modificar notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros. Provocan inactivación y desnaturalización^[10].
- En los lípidos, donde se produce el mayor daño en un proceso conocido como peroxidación lipídica, que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular^[10].

- Ocasionando mutagénesis y carcinogénesis sobre los ácidos nucleicos por medio de la modificación de bases^[10].
- En los glicósidos, proceden alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores^[10].

2.4.2. Importancia de las especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno cumplen un papel muy importante en el organismo y a su vez también pueden ejercer efectos tóxicos. Son producidas como resultado del metabolismo y son fundamentales para la generación de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, siendo este un proceso relevante para el sistema inmunológico. Las especies reactivas de oxígeno desempeñan un rol vital en la traducción de señales, lo cual es importante para la comunicación y función de las células^[18].

2.5. Radicales Libres

Un radical libre (RL) es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un electrón no apareado. La mayoría de los radicales libres son en extremo reactivos y tienden a asociarse “apareando” el electrón libre. Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, mecanismo a través del cual provocan daño a nivel celular y tisular, con la consiguiente alteración de su función. Recientemente se les ha implicado en diversos padecimientos como la carcinogénesis, el envejecimiento y con desórdenes de tipo neurológico como la epilepsia, la enfermedad de Huntington y el mal de Parkinson^[19].

Los radicales libres recorren nuestro organismo deseando atrapar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica por medio de reacciones de óxido-reducción. Una vez que el radical libre ha conseguido atrapar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un nuevo radical libre, por quedar con un electrón desapareado; iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células; estas reacciones en cadena se combaten con la acción de los antioxidantes, los cuales neutralizan los átomos de oxígeno^[20].

La vida biológica media del radical libre es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un estrés oxidativo que puede conducir a diversas enfermedades, tales como envejecimiento, problemas del sistema cardiovascular (arterosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres)^[20].

2.5.1. Formación de los radicales libres

Los radicales libres se pueden formar en el interior de las células como producto de sus actividades fisiológicas normales o a partir de procesos como la hipoxia, en la que se observa un aumento en la formación de radicales libres, que pueden inducir lipoperoxidación en la membrana de las células del cerebro y con esto alteraciones en la función del mismo. En la tabla 2 se mencionan los sitios de la célula en donde pueden generarse radicales libres a partir de los procesos fisiológicos normales^[19].

Tabla 2. Sitios de la célula y reacciones químicas a partir de las que se generan radicales libres

Lugar	Reacción
Retículo endoplásmico	Transporte de electrones dependiente del Citocromo P-450
	Transporte de electrones dependiente del Citocromo b5
Mitocondria	Transporte de electrones (cadena respiratoria: principales sitios, complejo NADH-CoQ reductasa y formas reducidas de la coenzima Q: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$)
	Lipoperoxidación
Lisosomas	Sistema de mieloperoxidasa
Membranas	Lipoperoxidación
	Lipo-oxigenasa
	Prostaglandina sintetasa
	NADPH – oxidasa*
Peroxisomas	Oxidasas
	Flavoproteínas
Citoplasma	Auto-oxidación de la oxihemoglobina ($Hemo-Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Hemo-Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$)
	Auto-oxidación de moléculas pequeñas: adrenalina, tioles, flavín mononucleótido (FMN), Flavín adenín dinucleótido (FAD), glucosa.
	Proceso de transferencia de electrones mediados por metales de transición como el hierro y el cobre, o por enzimas.

Fuente: González y col. [19]

2.5.1.1. Fuentes endógenas de radicales libres

a) La autooxidación de compuestos de carbono reducidos como son: proteínas, aminoácidos, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos tienen como fin también la formación de estos compuestos^[19,8].

b) Usan el sistema de la NADPH-oxidasa para generar directamente $O_2^{\cdot-}$; las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), producen monóxido de nitrógeno (NO), por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular, como mecanismo de defensa. La combinación del $O_2^{\cdot-}$ con el NO da lugar a la formación del ONOO⁻ el cual es capaz de inducir en las lipoproteínas la peroxidación lipídica^[19,8].

c) La reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de los compuestos de la cadena respiratoria, así los seres vivos que dependen del oxígeno para la obtención de energía metabólica en forma de ATP, producen especies moleculares oxidantes cuya reactividad y potencial citotóxico debe ser estrictamente controlados. Como el 95 % del oxígeno que respiramos se reduce por una vía alterna de la citocromo oxidasa, da lugar a formas moleculares parcialmente reducidas de oxígeno (ROS, de Reactive Oxygen Species) responsables del fenómeno conocido como “Estrés Oxidativo” [19,8].

d) La activación catalítica de varias enzimas del metabolismo intermediario como la xantina y la hipoxantina oxidasa, lipoxigenasa, monoamino oxidasa, aldehído oxidasa, ciclooxigenasa, son fuentes particulares muy importantes de esta producción [19,8].

2.5.1.2. Fuentes exógenas con exceso de radicales libres

Los radicales libres pueden generarse también a partir de fuentes exógenas, como las radiaciones ionizantes, ultravioleta, la visible o térmica, drogas antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, agentes contaminantes, pesticidas y humo del cigarro; también diversos medicamentos pueden inducir la liberación de radicales libres, como el acetaminofén, la neomicina, la polimixina B, la kanamicina, la gentamicina y el cloramfenicol. Así como también por [19,8]:

- Alimentos procesados (alimentos sintéticos o tratados con químicos, calor o radiación)
- Alimentos viejos (congelados y enlatados posteriormente recalentados)
- Alimentos quemados (particularmente asados o grillados)
- Productos de procedencia animal, especialmente carnes rojas
- Consumo de tabaco (activo y pasivo)

- Alcohol y café
- Conservantes alimentarios.
- Pesticidas (insecticidas, repelentes y venenos)
- Herbicidas
- Artículos de limpieza, pinturas, pegamentos, agentes de propagación de fuego, limpiadores de muebles, entre otros artículos
- Humo de los vehículos
- Contaminación industrial
- Agua clorada (agua para beber y de las piscinas)
- Exceso de sol (cuando el sol provoca quemaduras, "despellejamiento" y dolor)
- Píldoras anticonceptivas.

1.5.2. Clasificación

1. Radicales libres inorgánicos o Primarios

Se forman por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, por tanto, representan distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por poseer una vida media muy corta; estos son el radical hidroxilo, el óxido nítrico y anión superóxido.

2. Radicales libres orgánicos o Secundarios

Se pueden producir por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, tienen una vida media un poco más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: nitrógeno, azufre y oxígeno^[8].

3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno

Se incluye aquí un grupo de especies químicas que a pesar de no ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o repercuten de la reducción o metabolismo de

ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el hidroperóxido orgánico, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito^[21].

2.5.3. Estrés oxidativo

Este estrés se podría definir como un desequilibrio entre los pro-oxidantes y/o radicales libres por una parte y los sistemas antioxidantes del organismo por otra. Detrás de muchas enfermedades crónicas, cuya aparición es retrasada y su gravedad disminuida por el consumo de alimentos de origen vegetal se encuentran procesos de estrés oxidativo mediados por radicales libres. El estrés oxidativo conduce progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células^[10].

2.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son defensas no enzimáticas del organismo contra especies reactivas como O y N, y son esenciales para la salud humana. La mayoría de los compuestos antioxidantes se introducen en el organismo a través de la dieta. Por lo tanto, es conveniente establecer métodos que puedan medir directamente la capacidad antioxidante total de extractos de plantas^[22].

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles^[1].

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres derivados de la activación del oxígeno pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. La protección de las células contra los radicales libres derivados del oxígeno comprende no solo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones^[1].

2.6.1. Clasificación

La primera línea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención, esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas de oxígeno^[19].

Dentro de las proteínas que se ligan a metales se pueden mencionar la ferritina, transferrina, ceruloplasmina, la albúmina y las metalotioneínas. En el plasma sanguíneo la mayor acción protectora es efectuada por la transferrina y la ceruloplasmina. La ferritina es una proteína intracelular que evita la acumulación de hierro libre, mientras que la ceruloplasmina es la encargada de captar aproximadamente el 90% del cobre extracelular. Su actividad más importante reside en inactivar el radical superóxido^[19].

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan a los radicales para suprimir su actividad nociva en la célula. Estos agentes pueden dividirse en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos^[19].

- a. Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (p. ej. las membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (p. ej. el

citoplasma), o bien, los transforman en radicales menos agresivos. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina y flavonoides entre otros. La vitamina E, el β -caroteno y la vitamina C son los únicos nutrientes esenciales que atrapan directamente radicales libres. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma celular, mientras que la vitamina E y el β -caroteno son solubles en lípidos^[19].

Otros ejemplos de antioxidantes no enzimáticos son las poliaminas esperminas, la coenzima Q y los flavonoides, la primera se encuentra normalmente en concentraciones milimolares en el núcleo y participa directamente como atrapador de radicales libres, actuando como el mayor compuesto natural ubicado intracelularmente y que es capaz de proteger al ADN del ataque de los radicales libres. La coenzima Q funciona como un antioxidante altamente eficiente en las membranas celulares en que se encuentra. Los flavonoides por su parte actúan como inhibidores de la lipoperoxidación, además de poder interactuar directamente con las especies reactivas de oxígeno y como agentes quelantes para iones divalentes^[19] (Ver tabla 3).

Tabla 3. Antioxidantes no enzimáticos (Exógenos)

Antioxidante	Fuente	Acción antioxidante	Efectos secundarios
Vitamina E (tocoferol)	Aguacate, batata, espárragos, espinacas, tomate, brócoli, zanahoria, aceites (oliva, maíz, cartamo, soya), cereales, arroz integral, lentejas, yema de huevo, mantequilla, plátano, moras, frutos secos.	Mantiene la integridad de la membrana celular, protege la destrucción de la vitamina , retarda el envejecimiento celular	No tiene
Vitamina C (ácido Ascórbico)	Acelgas, tomates, perejil, pimiento verde, coliflor, coles de Bruselas, nabos, grosellas, cítricos, melón, kiwi, fresas.	Inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera la vitamina E, ofrece protección contra todo tipo de cánceres.	Su ingesta en grandes cantidades puede ocasionar presencia de cálculo en los riñones o vías urinarias
β- caroteno (pro-vitamina A)	Zanahorias, tomates, espinacas, melón, melocotón, mango.	Protege al DNA, detiene el deterioro de tejidos	Su consumo excesivo produce descamaciones de la piel, caída del cabello, ahogo y vómito.
Flavonoides (polifenólicos)	Espinacas, cebolla, ajo, té verde, vino, manzanas, cítricos, peras.	Quela metales	No tiene
Oligoelementos: Selenio (Se), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Cobre (Cu)	Carne, pescado, cereales integrales, lácteos, ajo, cebollas, brócoli, té, frutos secos, piña, vísceras, cacao y derivados.	Forman parte del núcleo activo de las enzimas con actividad antioxidante, mantienen en buen estado las funciones hepáticas, cardíacas y reproductoras, protector contra el cáncer.	El Se es el más tóxico de los minerales, su ingestión en dosis altas produce pérdida de cabello, alteración de uñas y dientes, náuseas, vómitos y aliento a leche agria.

Fuente: González y col (2000)^[19]

b. Con respecto a los antioxidantes enzimáticos se puede señalar que en las células se presentan tres sistemas principales de enzimas antioxidativas: las superóxido dismutasas, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

- Las superóxido dismutasas (SOD) catalizan el cambio del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. La dismutación es una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes, en este caso una molécula de superóxido se oxida y la otra se reduce:



Estas son una familia de metaloenzimas, que contienen cobre y zinc. De ellas se conocen al menos tres formas diferentes, que se ubican en el citoplasma de la célula, en las mitocondrias y en los fluidos extracelulares respectivamente.

- La catalasa es una enzima de amplia distribución, que consiste de cuatro subunidades proteicas, cada una con un grupo hemo unido a su sitio activo. Se caracteriza además por presentar una tasa de renovación extraordinariamente elevada (>40 000 moléculas por segundo). Su actividad se localiza básicamente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno molecular en muchos tejidos.



- La glutatión-peroxidasa (GP) es una enzima que utiliza como cofactor al selenio, y que se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa.



Si después de la acción de los antioxidantes el daño persiste, el último nivel de protección de la célula consiste en la reparación de las lesiones, lo que reside básicamente en la actividad de enzimas que repararán el daño inducido por los radicales libres al ADN, y de

otras que destruirán las proteínas dañadas por los radicales libres o las que removerán los ácidos grasos oxidados de las membranas ^[19].

2.7. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia de inhibir la degradación oxidativa disminuyendo la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, DNA). Los compuestos antioxidantes son esencialmente importantes para los seres vivos, porque tiene la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo de los radicales libres, cumpliendo un rol preventivo en el desarrollo del envejecimiento y de ciertas enfermedades^[23].

Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que puede ser el origen del daño celular, porque actúan^[23]:

1. Sobre los lípidos polinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza a los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema

real se presenta cuando las especies reactivas del oxígeno (ROS) sobrepasan tanto las defensas endógenas como las exógenas ocasionando los daños antes mencionados^[24].

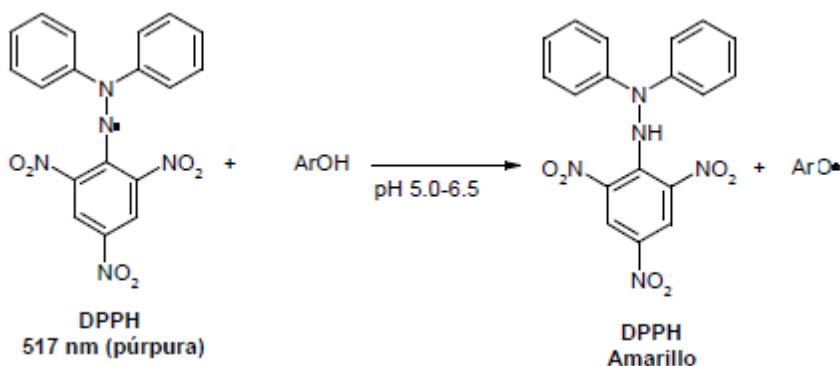
Cabe mencionar que la actividad antioxidante puede ser evaluada tanto experimental como teóricamente. Cada uno de los métodos que se enfoca en la evaluación de esta propiedad ofrece diferente confiabilidad de resultados. Si bien, las determinaciones hechas mediante métodos experimentales muestran el grado de interacción entre el radical libre y el antioxidante mediante un valor, los métodos teóricos pueden proporcionar los factores estructurales que provocan ese grado de interacción^[24].

2.8. Fuentes de antioxidantes naturales

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos, *vide supra*. Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos ^[41, 42].

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de “secuestrar” radicales libres^[43]. La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, ya que ha sido blanco de un sin número de estudios; este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de

grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres^[44]. La reacción se muestra en la ecuación 4.



(4)

Estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre el consumo diario de frutas y vegetales y el riesgo de enfermedades degenerativas y crónicas, los efectos protectores de las frutas y vegetales siempre se han atribuido a sus compuestos antioxidantes, como los polifenoles, carotenoides, y vitaminas C y E^[44].

Algunas frutas tropicales como la parchita o maracuyá (*Passiflora edulis*) poseen metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles, flavonoides glicosilados y glicósidos cianogénicos. La lechosa (*Carica papaya*) contiene dos importantes compuestos biológicamente activos, quimopapaína y papaína que son ampliamente utilizados para los trastornos digestivos. Se ha demostrado que la papaya, derivados papaína, caricaina, chymopaina, y endopeptidasa glicerina pueden mejorar las condiciones de pH ácido y la degradación de la pepsina. Otros compuestos activos de *Carica papaya* son lipasa, o CPL, una hidrolasa, que está estrechamente unida a la fracción insoluble en agua de la papaína cruda y se considera, pues como biocatalizador. La piel de la papaya, la pulpa y las semillas también contienen una variedad de fitoquímicos, incluidos fenoles naturales [31].

2.9. Determinación de compuestos fenólicos

2.9.1. Métodos de Extracción

Los métodos clásicos de extracción se basan principalmente en la selección de solvente, temperatura o agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa. Los compuestos se separan con base en sus solubilidades entre dos líquidos inmiscibles usualmente agua y un solvente orgánico para extracción líquido-líquido o por el grado de solubilidad de los componentes orgánicos de una muestra sólida en un solvente orgánico para extracción sólido-líquido. Estos procesos pueden ser acelerados utilizando diferentes técnicas analíticas como, Soxhlet, agitación y destilación [25, 26].

Los métodos de extracción con técnicas convencionales tienen algunas limitaciones en relación con el elevado consumo de disolvente, el largo tiempo de extracción y la calidad de los extractos. Recientemente, se han empleado nuevos métodos con técnicas no convencionales de extracción, donde las más notables son la extracción asistida por ultrasonido, la extracción por microondas, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción acelerada con disolventes que permiten solventar parte de estos inconvenientes. Se han utilizado una gran variedad de técnicas de extracción para separar compuestos bioactivos a partir de diversos materiales de plantas, por lo tanto, es importante evaluar cuál de estos métodos de extracción contribuyen de manera más eficiente para mejorar el análisis de los compuestos de interés [26].

2.9.1.1. Extracción asistida por ultrasonido (EUA) o sonicación

La mayoría de las técnicas de extracción consisten en la manipulación de las propiedades físicas de disolventes para reducir su tensión superficial, para aumentar la solubilidad del soluto y para mejorar la tasa de transferencia de masa; en algunos casos, estas

manipulaciones también inducen cambios en la polaridad del disolvente. La técnica EUA consiste en utilizar vibraciones mecánicas causadas por las ondas sonoras con frecuencias superiores a 20 kHz. Las ondas de sonido son intrínsecamente diferentes de las ondas electromagnéticas, ya que estas últimas pueden propagarse a través del vacío, mientras que las ondas de sonido necesitan un medio físico para propagarse ^[32].

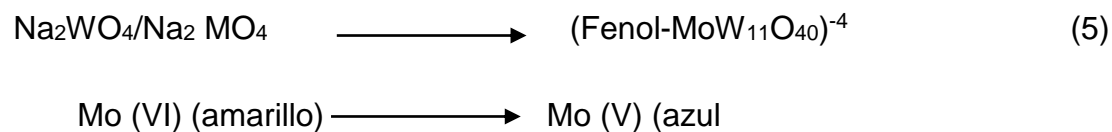
Durante la sonicación, las ondas sonoras que se propagan en el medio líquido generando altas presiones (compresión) y ciclos de baja presión (rarefacción), con tasas en función de la frecuencia. Durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas crean pequeñas burbujas de vacío o vacíos en el líquido. Cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber la energía, se colapsan violentamente durante un ciclo de alta presión. Este fenómeno se denomina cavitación. Durante la implosión se alcanzan localmente muy altas temperaturas (aprox. 5.000 °K) y presiones (aprox. 2.000atm). La implosión de la burbuja de cavitación también resulta en chorros de líquido de hasta 280 m/s de velocidad^[32].

Por estas fuerzas extremas ocurre sonólisis, las paredes celulares sufren “lisis” o rompimiento y se extrae material intracelular. La extracción asistida por ultrasonidos es una alternativa económica, simple y eficiente en comparación con las técnicas de extracción convencionales. Las principales ventajas de ultrasonido en la extracción sólido-líquido incluyen el aumento de rendimiento de la extracción y cinética más rápida^[30]. Las ventajas de la técnica de EUA incluyen la simplicidad de los equipos y la posibilidad de utilizar diferentes disolventes para la extracción, incluyendo mezclas como agua-etanol. En el campo alimentario y farmacéutico, EUA se utiliza para extraer varios compuestos bioactivos a partir de matrices botánicas, como flavonoides, polifenoles, alcaloides, terpenoides y antocianinas. El incremento en el rendimiento de la extracción de compuestos bioactivos cuando se aplica ultrasonido se atribuye al aumento de la tasa de transferencia de masa debido a la cavitación en el disolvente inducido por las ondas de ultrasonido que pasa por el medio^[32].

La extracción ultrasónica es una técnica usada con frecuencia en materias vegetales utilizando disolventes líquidos y ha demostrado ser un proceso rápido y más completo en comparación con los métodos tradicionales debido a que el área de superficie entre la fase sólida y el líquido es significativamente mayor debido a la interrupción de la célula y la dispersión de partículas. El uso de la sonicación reduce la aplicación de la temperatura, lo que permite la extracción de componentes sensibles a ésta y se puede utilizar con cualquier disolvente^[30].

2.9.2. Método para la determinación de polifenoles

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. El mecanismo de reacción es por óxido-reducción, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y molibdato sódico (Na_2MoO_4) en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad se relaciona con el contenido en polifenoles siguiendo la ecuación 5.



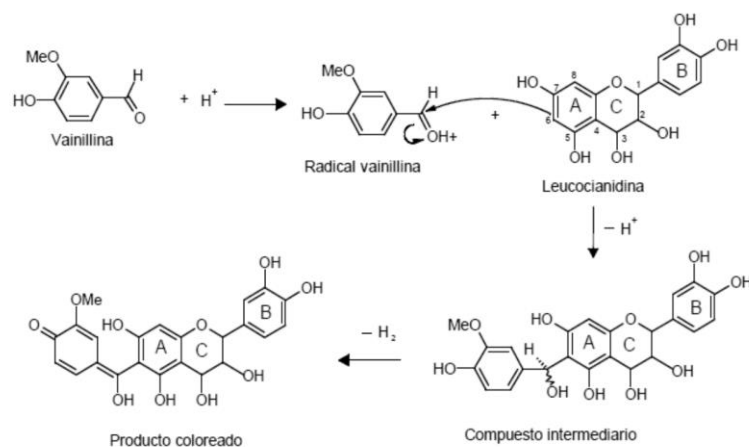
La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 760nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva patrón de ácido gálico. Se trata de un método

preciso y sensible, que puede pasar por numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción^[27].

También se pueden producir variaciones en el modo de expresar los resultados, sin embargo, el patrón recomendado es el ácido gálico que es el antioxidante y conservante más común de origen natural. Este ensayo de análisis de los polifenoles totales, se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como jugos de frutas, al tratarse de un parámetro que generalmente, muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante^[27].

2.9.3. Método para la determinación de taninos condensados.

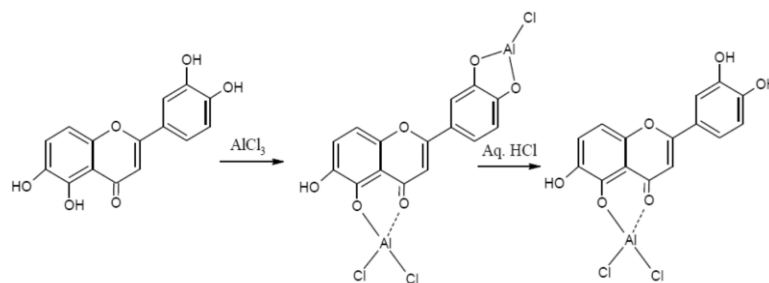
El método de la vainillina es utilizado para la determinación de taninos condensados en el material vegetal. Se basa en la condensación del reactivo vainillina con las proantocianidinas en solución ácida. La vainillina es protonada, se forma un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en las posiciones 6 u 8 siguiendo la ecuación 6. Las reacciones con vainillina pueden ser afectadas por la naturaleza ácida y concentración del sustrato, el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de la vainillina y el contenido del agua ^[27].



(6)

2.9.4. Método para la determinación de flavonoides

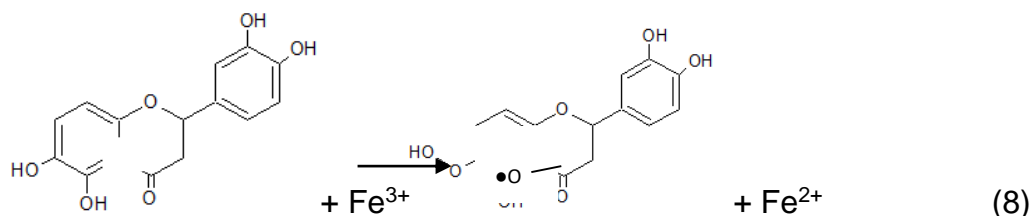
El método está basado en la formación de un complejo con aluminio [3]. El método es selectivo solamente para los flavonoles y flavonas e implica la medición de absorbancia entre 410 y 430nm después de la adición de la solución de $AlCl_3$ de acuerdo a la ecuación 7. El procedimiento en presencia de $NaNO_2$ en medio alcalino parece ser específica para la rutina, luteolina y catequinas, pero también los ácidos fenólicos presentan considerable absorbancia a 510 nm. Los resultados se expresan generalmente como equivalentes de rutina (RTE mg/ g de muestra seca)[28].



(7)

2.9.5. Poder reductor: reducción férrica de la potencia antioxidante

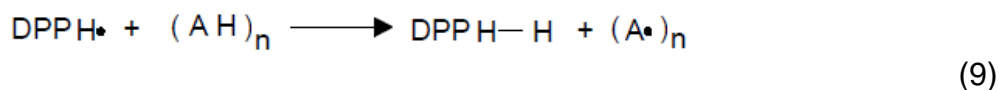
Este ensayo se utiliza comúnmente para estudiar la capacidad antioxidante de materiales de plantas. La capacidad antioxidante de los extractos de frutas es determinada por la capacidad que tienen dichos los antioxidantes en estos extractos de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} resultando en la formación de un complejo azul (azul de prusia) cuya absorbancia se puede leer a 700nm, siguiendo la ecuación 8. Los resultados pueden ser expresados como equivalentes de ácido ascórbico (EAAs g/ 100g de muestra seca) [29].



2.9.6. Método de barrido de radicales libres (DPPH)

Se basa en la generación de radicales libres a partir de una solución metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidracil. El DPPH es un radical libre el cual absorbe a una longitud de onda característica; esta absorbancia va disminuyendo por reducción de un agente oxidante o por especies radicales la cual se monitorea por la disminución de dicha longitud de onda [29].

En su forma de radical libre, el DPPH^\bullet absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción disminuye hasta el equilibrio. En consecuencia, la disminución del radical DPPH^\bullet proporciona un índice para estimar la capacidad de la muestra de atrapar radicales [29]. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la ecuación 9.



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado, radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas^[29].

2.9.7. Método de secado: Liofilización

Es un proceso de secado que se basa en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua, 0.01°C y 4.5 mmHg^[41].

2.10. Antecedentes en la determinación de polifenoles y actividad antioxidante

Yasoubi y col^[35] determinaron los compuestos fenólicos de la cáscara granada (*Punica granatum L.*) extraídos por dos métodos (disolvente y asistida por ultrasonido) con cinco disolventes (acetona, metanol, etanol, agua y acetato de etilo) y los compararon con extracción con fluidos supercríticos (SFE). Los compuestos fenólicos totales se determinaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu usando ácido tánico como estándar. Los resultados generales muestran que la acetona con sonicación produjo la máxima cantidad de compuestos fenólicos a partir de extractos de cáscara de granada. A un nivel de 0,050% del extracto de piel de la granada, su actividad antioxidante fue mayor que 0,02% de los dos antioxidantes sintéticos hidroxianisolbutilado (BHA) e

hidroxitoluenobutilado (BHT). Los extractos de piel de granada tenían una proporción relativamente alta de actividad antioxidante y podría ser considerado como una rica fuente de antioxidante natural.

Rodríguez y col^[33] determinaron actividad antioxidante con los cambios que se producen en las frutas durante el proceso de madurez, la composición proximal y la actividad antioxidante de cuatro frutas promisorias a las cuales se reconocen potenciales beneficios mediante ensayos de DPPH y poder reductor. Las frutas evaluadas fueron mora (*Rubus glaucus B*), maracuyá (*Passiflora edulis S.*), guayaba (*Psidium guajava L.*) y papayuela (*Carica cundinamarcensis J.*). Determinaron que los cambios de composición de las frutas durante la madurez en general fueron equivalentes para las frutas estudiadas, los sólidos solubles totales (SST) y los azúcares reductores aumentaron con la reducción de la firmeza. Los azúcares reductores alcanzan su máximo en el estado de madurez plena en contraste con la acidez titulable que decrece. El ácido ascórbico y los compuestos fenólicos aumentan continuamente durante la madurez y la actividad antioxidante aumenta del estado inmaduro al estado totalmente maduro para todas las frutas.

Sasikala y col^[36] investigaron la actividad antioxidante *in vitro* en éter de petróleo, etanol y extracto de agua caliente de la raíz de *Passiflora foetida*, hojas, flor, cáscara de la fruta y la semilla. El material vegetal se extrajo en el extractor Soxhlet sucesivamente con éter de petróleo y etanol. Los extractos de raíz *P. foetida*, hojas, flor, cáscara de frutos y semillas se analizaron para determinar la cantidad de fenoles totales, taninos y ácido ascórbico (vitamina C). La propiedad antioxidante se estima a través del poder reductor quelante de metales y la captación de radicales por ABTS+, DPPH y ensayos de β -caroteno. La cáscara de la fruta *P. foetida* es mucho más eficaz en comparación con otras partes tomadas para el presente estudio.

Gayosso-García y col^[37] Realizaron un análisis cualitativo y cuantitativo de los principales fitoquímicos que se encuentran en la pulpa y cáscara de la papaya (*Carica papaya L.*) llevándose a cabo en cuatro etapas de maduración, utilizando cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Obtuvieron que los compuestos fenólicos identificados en la piel del fruto tienden a disminuir con la maduración. Los compuestos identificados fueron el ácido ferúlico, el ácido p-cumárico y ácido cafeico además de los siguientes carotenoides; licopeno β -criptoxantina, β -caroteno y vitamina C.

Vasantha y col^[25] determinaron quercetina y glicósidos de quercetina que son moléculas de flavonoles biológicamente activas en cáscaras de manzanas. Realizaron extracciones con los disolventes agua, metanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y sus mezclas utilizando la técnica extracción asistida por ultrasonido (EUA) con una frecuencia de 20 kHz / 1000 vatios, se expusieron durante 60min (cuatro veces durante 15 minutos cada uno con 10 minutos de intervalo entre ellos) y la temperatura del ultrasonido fue entre 20 a 28°C. Concluyeron que la extracción asistida por ultrasonido es un método de extracción eficiente para la separación de los flavonoles en cáscaras de manzana.

Wong y col^[34] determinaron las propiedades antioxidantes potenciales de la cáscara de fruta de *Passiflora edulis*, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. Las condiciones de extracción seleccionadas se aplicaron para la posterior determinación del contenido de fenoles totales (TPC) del extracto de cáscara de la fruta utilizando el ensayo de Folin-Ciocalteu, y las actividades antioxidantes fueron evaluadas utilizando los radicales DPPH y ABTS, poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), y el ensayo de blanqueo β -caroteno (BCB). Observaron correlaciones positivas entre el TPC y la actividad antioxidante según la evaluación de DPPH, ABTS, FRAP, y ensayos de BCB. Por lo tanto, como una pérdida del consumo de la fruta *Passiflora edulis* o subproducto de la industria de los zumos de fruta, su cáscara podría ser considerada como una fuente

potencial de antioxidante natural para posible alimentos funcionales y aplicaciones industriales.

Athmouni y col^[38] determinaron el efecto de diferentes solventes en la extracción de compuestos fenólicos en raíces de *S. undulata*, para ello realizaron ensayos de DPPH, FRAP y ABTS, obteniendo que la extracción de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante varía significativamente en función del tipo y combinación de solventes.

Uribe y col^[26] compararon los diferentes métodos de extracción usando alta presión hidrostática (HHPE), ultrasonido (EUA), agitación (AE) y sus combinaciones para la extracción de los compuestos bioactivos de *Chilean papaya*. La actividad antioxidante fue evaluada por tres métodos, DPPH, FRAP y Voltametría. Los compuestos fenólicos y vitamina C fueron determinados por HPLC. Obtuvieron que la combinación HHPE-EUA es más efectiva en la extracción de los compuestos fenólicos y que por voltametría se obtiene una mejor determinación de la actividad antioxidante.

Kokila y col^[31] utilizaron las cáscaras de *Carica papaya* para la síntesis de nanopartículas de plata y evaluaron su potencial antimicrobiano y antioxidante realizando análisis espectrales UV-visibles y ensayos con DPPH. Obtuvieron que la cáscara de *C. papaya* es una fuente rica en antioxidantes que permite una buena síntesis de las nanopartículas de plata.

Zakia Bey-Ould Si Saida y col^[39] determinaron la composición química de los extractos de aceites esenciales de los frutos de *Eucalyptus globulus* (*E. globulus*), utilizando el método cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC / MS), y su actividad antioxidante (DPPH) comparándola con un estándar de Butilhidroxianisol (BHA). Obtuvieron altos valores de actividad antioxidante en comparación con los valores de BHA.

Morais y col^[53] determinaron la capacidad antioxidante de aguacate, piña, banana, papaya, parchita, patilla y melón en sus diferentes fracciones (pulpa, semilla, cáscaras húmedas y cáscaras secas) mediante ensayos DPPH• y FRAP. Así como también determinaron compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio. Cuantificación de ácidos orgánicos (cítrico, málico y tartárico) y compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS. Obtuvieron que la cáscara de aguacate presentó el más alto contenido de compuestos fenólicos totales (1252.31 ± 165.62 mgGAE/100 g en base seca), el mayor valor de capacidad antioxidante por ensayo FRAP (441.83 ± 67.86 μ mol FeSO₄/g en base seca) y el valor EC₅₀ más bajo (18.22 ± 1.45 μ g/mL de DPPH), seguido de la semilla de parchita (49.71 ± 2.17 μ g/mL). Asimismo, la cáscara húmeda de melón presentó los flavonoides totales más altos ($204.28 \pm 21,05$ mg EQ/100g en base seca).

Oliveira y col^[56] evaluaron los cambios en la calidad y metabolismo antioxidante de los polifenoles durante el proceso de maduración poscosecha de *Passiflora edulis* extraídos por sistemas orgánicos y convencionales. Fueron evaluados la calidad poscosecha, variables de metabolismo antioxidante (enzimas y no enzimas), actividad antioxidante total (TAA), grado de peroxidación lipídica como indicador del estrés oxidativo y la actividad de la enzima fenólica asociada, fenilalanina amoniaco liasa (PAL) en frutos cosechados en etapas de desarrollo: iniciándose / tornándose amarillo (fisiológicamente maduro) y completamente de color amarillo (maduro). Obtuvieron que, en la etapa inicial de maduración, la actividad PAL fue 24% mayor en sistemas orgánicos que en sistemas convencionales. Sin embargo, el contenido fenólico total fue mayor en los sistemas convencionales cosechadas en ambos, al inicio ($36,14$ mg GAE 100 g⁻¹) y en etapas maduras ($36,47$ mg GAE 100 g⁻¹). Determinaron que los resultados sugieren que el sistema de cultivo orgánico indujo un estrés oxidativo en parchita, influyendo negativamente el tamaño de la fruta, aunque inducen el mecanismo de defensa antioxidante, a través de incrementos de vitamina C y actividad de las enzimas antioxidantes.

Septembre-Malaterre y col^[57] evaluaron las propiedades nutricionales y antioxidantes del plátano, litchi, mango, papaya, parchita y piña de Reunion French Island. Los resultados mostraron que las cantidades totales de carbohidratos, vitamina C y carotenoides fueron 7,7-67,3 g equivalente de glucosa, 4,7-84,9 mg equivalente de ácido ascórbico y 26,6-3829,2 g equivalente de β -caroteno/100 g de peso fresco, respectivamente. Los polifenoles se detectaron como los más abundantes antioxidantes (33.0-286.6 mg equivalente de ácido gálico / 100 g de peso fresco) con el contenido más alto en parchita. El análisis de UPLC-MS condujo a identificar derivados de epigallocatequina y quercetina en plátano y litchi, ácido ferúlico, sinapico, syringico y gálico de piña y mango, y piceatannol en parchita.

Can-Cauich y col^[65] determinaron el contenido de compuestos bioactivos en extractos de once cáscaras de frutas tropicales en los cuales encontraron alto contenido de compuestos bioactivos y alta actividad antioxidante. Obtuvieron que las cáscaras de la manzana de azúcar verde y púrpura (riñón verde y morado) presentaron el contenido de fenoles totales más alto, flavonoides totales y valores de actividad antioxidante. El contenido de flavonoides totales y compuestos fenólicos totales fueron altamente correlacionados con la actividad antioxidante según se cuantificó mediante ABTS, DPPH y ensayos de poder reductor. Los tres ensayos de actividad antioxidante estaban altamente correlacionados. La cáscara de manzana de azúcar púrpura tenía el más alto contenido de catequina. Determinaron que las once cáscaras de frutas tropicales analizadas son fuentes prometedoras de ingredientes bioactivos con propiedades antioxidantes y aplicaciones potenciales en el diseño de alimentos funcionales o como conservantes de alimentos.

Rincón y col^[68] evaluaron el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante, fibra dietética y vitamina C en las fracciones liofilizadas de cáscara de níspero (*Manilkara achras*), pomagas (*Syzygium malaccense*) y dos variedades de guayaba, rosada y blanca (*Psidium guajava*) y (*Psidium acutangulum*). Los polifenoles totales se separaron

mediante una extracción líquido-líquido, usando mezcla de solventes orgánicos y agua y cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como estándar; la capacidad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrylhydracyl (DPPH•), y el contenido de fibra dietética y vitamina C se determinaron por métodos oficiales AOAC. Las cáscaras mostraron altos valores de polifenoles extraíbles (43,74 – 77,9 g GAE/Kg) b.s., así como fibra dietética y vitamina C. El alto contenido de polifenoles se correlaciona con la capacidad antioxidante. Estos resultados sugieren que las fracciones de las cáscaras de frutas podrían ser utilizadas para obtener «fibra dietética antioxidante», un nuevo concepto que combina las propiedades de la fibra y compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la influencia de solventes orgánicos y técnicas de extracción en la cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el contenido de polifenoles totales, taninos y flavonoides en cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*, extraídos con solventes de diferentes polaridades: metanol, etanol, isopropanol y acetona por agitación.
2. Evaluar el contenido de polifenoles totales, taninos y flavonoides en cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*, extraídos con solventes de diferentes polaridades: metanol, etanol, isopropanol y acetona por sonicación.
3. Determinar la Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos de las cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* utilizando el método del barrido de radicales libres (DPPH•).
4. Determinar el poder reductor de los compuestos fenólicos extraídos mediante reducción de un compuesto de hierro.
5. Establecer la relación entre el contenido de polifenoles, flavonoides, taninos y la actividad antioxidante de las fracciones de los frutos de *Passiflora edulis* y *Carica papaya*.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Equipos

Para el secado de la muestra se empleó un liofilizador marca Labconco, la extracción por agitación se realizó en un vortex Maxi- Mix Type 65800 marca Thermolyne, la extracción por ultrasonido se realizó en un sonicador marca Branson modelo 3510, para la determinación de polifenoles y actividad antioxidante se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible, marca Shimadzu, modelo PharmaSpec UV-1700. La molienda de las muestras se realizó en un molino Household mr. coffee modelo IDS-50. Para la determinación del grado de madurez se utilizó un refractómetro marca Atago, modelo 122049.

4.2. Reactivos

- Metanol 99.8%, grado HPLC, marca Merck.
- Etanol absoluto 99,8%, grado reactivo, marca Riedel-de Haën.
- Isopropanol al 99,8%, grado reactivo, marca Fluka.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 100%, marca Sigma-Aldrich.
- Carbonato de sodio 99,5%, marca Sigma-Aldrich.
- Tricloruro de aluminio 99%, marca Sigma-Aldrich.
- Rutina 95%, grado HPLC, marca Sigma-Aldrich.
- Vainillina 100%, marca Pandock C.A.
- Catequina hidratada 98%, marca Sigma-Aldrich.
- 1,1- difenil-2-picril-hidracil (DPPH) 100%, marca Sigma-Aldrich.

- HCl concentrado 37%, marca Riedel-de Haën
- Ácido ascórbico 99,7%, marca Sigma.
- Fosfato disódico 99%, marca J. T. Baker.
- Fosfato monosódico 99% marca Matheson Coleman & Bell.
- Ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) 99%, marca Aldrich.
- Tricloruro de hierro (III) ($FeCl_3$) 98%, marca Riedel-de Haën.
- Ácido gálico 100%, Marca Sigma-Aldrich.
- Ácido tricloroacético 99,5%, marca Riedel- deHaën.
- Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) 97%, marca Sigma-Aldrich.

4.3. Muestras

Las frutas que se utilizaron como materia prima para la obtención de las cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* fueron adquiridas en el mercado local de Parque Carabobo y la materia prima de *Carica papaya* fue adquirida en el mercado local de Quinta Crespo, ambos ubicados en la ciudad de Caracas, Venezuela, con un grado de madurez adecuado, con superficie lisa, sin daños visibles y firmes al tacto.

4.4. Grado de Madurez

Se determinó la cantidad de sólidos solubles totales (SST) en la pulpa de las frutas de acuerdo al método 953.16 de la AOAC el cual consiste en determinar el porcentaje de sólidos solubles totales (sacarosa) mediante refractometría^[44].

4.5. Humedad de las muestras

En una cápsula de porcelana previamente acondicionada se pesó exactamente 1g de muestra, luego se sometió a deshidratación a 103 ± 3 °C en la estufa con corriente de aire durante 12 horas, posteriormente se dejó enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente (1 hora), por diferencia de pesada se calculó el % de humedad^[40].

4.6. Preparación de la muestra

Las frutas *Carica papaya* y *Passiflora edulis* se lavaron con abundante agua, luego con agua destilada, se secaron con un paño y se procedió a separar las fracciones de las cáscaras y las semillas de la pulpa (descartando la pulpa). Las fracciones de las cáscaras de *Carica papaya* y *Passiflora edulis* se cortaron en trozos pequeños. Las semillas de *Passiflora edulis* se separaron de la pulpa colocándolas en un colador y presionando las semillas contra la malla y lavándolas con agua destilada. A cada fracción de cáscaras y semillas de *Carica papaya* y *Passiflora edulis* se le realizaron determinaciones de humedad de acuerdo al método 945.15 descrito por la AOAC^[40], así todos los resultados se expresaron en base seca. Luego fueron liofilizadas por separado con el fin de extraer el agua presente y para una mejor preservación de los constituyentes, especialmente los polifenoles, los cuales son termolábiles. Finalmente, cada fracción se molió por separado en un procesador de laboratorio hasta homogeneizar el tamaño de partícula de cada muestra y se pasaron las cáscaras a través de un tamiz de malla 40 mesh y las semillas se pasaron a través de un tamiz de malla 20mesh. Cada muestra se guardó en bolsas plásticas herméticas en un desecador al vacío.

4.7. Preparación del extracto

- 4.7.1.** Se pesaron 0,25 g de muestra.
- 4.7.2.** Se realizó la extracción por 60 min por agitación y durante 30min por ultrasonido.
- 4.7.3.** Ambas extracciones se realizaron por triplicado según el procedimiento descrito por Padilla y col^[3] en el cual se extrae primero con 10mL de una mezcla 50:50 v/v de metanol-agua acidificada a pH 2 (mezcla A) y luego con 10mL de una mezcla 70:30 v/v de acetona-agua (mezcla B). Luego se centrifugó por 10 min y los sobrenadantes se combinaron y llevaron a volumen con una mezcla 50:50 v/v de las mezclas A y B, enrasando a 25mL.
- 4.7.4.** Se sustituyó la mezcla de extracción metanol-agua acidificada a pH 2 por una mezcla de etanol-agua a pH 2 50:50 v/v. Asimismo, se usó otra mezcla de isopropanol-agua 50:50 v/v a pH 2.

4.8. Cuantificación de compuestos fenólicos totales expresados en base seca.

Los compuestos fenólicos en los extractos alcohólicos fueron determinados por espectrofotometría, basados en el procedimiento descrito por Padilla y col^[3] utilizando el método de Folin-Ciocalteu. 125 μ L del extracto de la muestra o estándar fueron diluidos adecuadamente con 0,5mL de agua destilada y se añadieron 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego se agregaron 1,25mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 7%. El volumen final se ajustó a 3mL con agua destilada. La mezcla se dejó en reposo 90 min y la absorción se leyó a 760nm. La cantidad de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg EAG /100g de muestra seca). El rango de la curva de calibración determinado experimentalmente fue 20-250 μ g/mL^{[3][29]}.

4.9. Contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado espectrofotométricamente. El método está basado en la formación de un complejo con aluminio. Se mezclaron 200µL del extracto con 200µL de AlCl_3 disuelto en etanol (20 g/L) y se diluyó a 5mL con metanol. Se midió la absorbancia a 415nm después de 40 minutos a 20°C. La concentración de flavonoides en la muestra se determinó con una curva de calibración empleando rutina como estándar en metanol y se midió bajo las mismas condiciones. Los resultados se expresaron como equivalentes de rutina (mg ERT/100g de muestra seca). El rango de la curva de calibración determinado experimentalmente fue 5-200µg/mL^[3].

4.10. Taninos condensados

El análisis de taninos condensados (procianidinas) se llevó a cabo de acuerdo con el método de la vainillina modificado ^[29]. A 500µL del extracto se le agregaron 3mL de una solución de metanol –vainillina al 4% y 1,5mL de HCl concentrado. La mezcla se dejó en reposo por 15min y se leyó la absorbancia a 500nm. La cantidad total de taninos condensados se expresó como equivalentes de (+)-catequina (mg CTE/100g de muestra seca). La curva de calibración de catequina se preparó en un rango entre 10-250µg/mL determinado experimentalmente ^[3].

4.11. Determinación de la capacidad antioxidante

4.11.1. Determinación del poder reductor

El poder reductor de los compuestos fenólicos se basa en la capacidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} con formación de azul de Prusia ^[29]. Se mezcló 1mL del extracto con 2,5mL de un buffer fosfato 200mM a pH=6,36 y 2,5mL de una solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 1%, se incubó por 30 minutos a 50°C, se añadieron 2,5mL ácido tricloroacético y la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 3000rpm. Finalmente, una alícuota de 2,5mL se mezcló con 2,5mL de

agua destilada y 0,5mL de FeCl₃ (0,1%). Posteriormente, se determinó la absorbancia a 700nm. Se cuantificó el poder reductor frente a una curva estándar de ácido ascórbico en un rango de 5-100mg/L, ya que el ácido ascórbico es un agente reductor natural bien caracterizado [3].

4.11.2. Método de barrido de radicales libres.

Se determinó la capacidad antioxidante utilizando el método descrito por Rincón y col [29]. Se basa en la reducción del radical DPPH• por los antioxidantes de la muestra. En forma de radical el DPPH• absorbe a 515nm, esta absorbancia va disminuyendo indicando un alto barrido del radical por parte del extracto rico en compuestos polifenólicos antioxidantes por suministro de átomos de H₂ o por donación de electrones. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (%Inhibición), el cual es la capacidad que tienen los polifenoles de inhibir los radicales libres.

Para el desarrollo de este ensayo se tomaron 25 µL del extracto de la muestra y se diluyó con 975 µL de DPPH• (solución de 60µM en metanol) y se midió la absorbancia a t=0 y cada 18 segundos a 515nm por 30 minutos. La cantidad de radicales libres que son reducidos por acción de los antioxidantes fenólicos se determinó mediante la ecuación 10.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Ab - Aa}{Ab} * 100 \quad (10)$$

Donde, Ab es la absorbancia del blanco de la muestra (t=0) y Aa es la absorbancia del extracto (t=30 min)[3].

Los resultados también fueron expresados como equivalentes de trolox (mM ETR/g muestra seca) por regresión lineal utilizando la ecuación 11, empleando una curva de calibración de trolox con un rango de concentración entre 0,02-0,32 mM[44].

$$\% \text{ Inhibición} = 7,350 * AA \text{ (mM ETR)} - 6,803 \quad (11)$$

Donde, AA es la actividad antioxidante.

El trolox es un fenol (figura 5) análogo a la vitamina E, soluble en agua. Se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés o daño oxidativo. También es un compuesto utilizado para cuantificar la capacidad antioxidante en una especie vegetal.

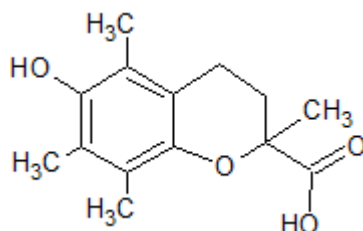


Figura 5. Estructura química del trolox

Para las fracciones de semillas de *P. edulis* y *C. papaya* el porcentaje de DPPH remanente (% DPPH rem) el cual es el porcentaje de DPPH que no fue atrapado por los antioxidantes o que no reaccionó fue calculado de la siguiente manera:

Se monitorearon cada 18 segundos los valores de absorbancia hasta alcanzar el equilibrio. Conociendo el valor de “m” (pendiente) y “b” (punto de corte) de la curva de calibración de DPPH• se calculó el valor de x (concentración de DPPH) según la ecuación (12)

$$\% \text{ DPPH rem} = [\% \text{ DPPH}]_T / [\% \text{ DPPH}]_{T=0} \quad (12)$$

Donde,

$[\% \text{ DPPH}]_T$ = Concentración de DPPH en el medio de reacción (g/L) determinada por regresión lineal y calculada a partir de una curva de calibración obtenida con diferentes concentraciones de la solución de DPPH vs la absorbancia.

$[\% \text{ DPPH}]_{T=0}$ = Concentración inicial del reactivo DPPH

Se realizó una gráfica entre el % DPPH rem (variable dependiente) vs las concentraciones de los extractos polifenólicos (variable independiente) para determinar la cantidad de antioxidante necesario para disminuir un 50% la concentración inicial de DPPH. Este parámetro se denomina EC_{50} . La concentración de EC_{50} es expresada en g de antioxidante/g de DPPH.

El tiempo (TEC_{50}) para alcanzar el estado de equilibrio a EC_{50} se calculó por regresión lineal graficando el tiempo en el estado de equilibrio vs las diferentes concentraciones de los extractos antioxidantes. También se calculó la eficiencia antirradical (EA), el cual es un parámetro que toma en cuenta el tiempo para alcanzar el estado de equilibrio y la concentración del antioxidante necesario para disminuir un 50% el radical DPPH. La ecuación que relaciona EC_{50} y TEC_{50} es ^[29]:

$$EA = 1 / (EC_{50} \times TEC_{50}) \quad (13)$$

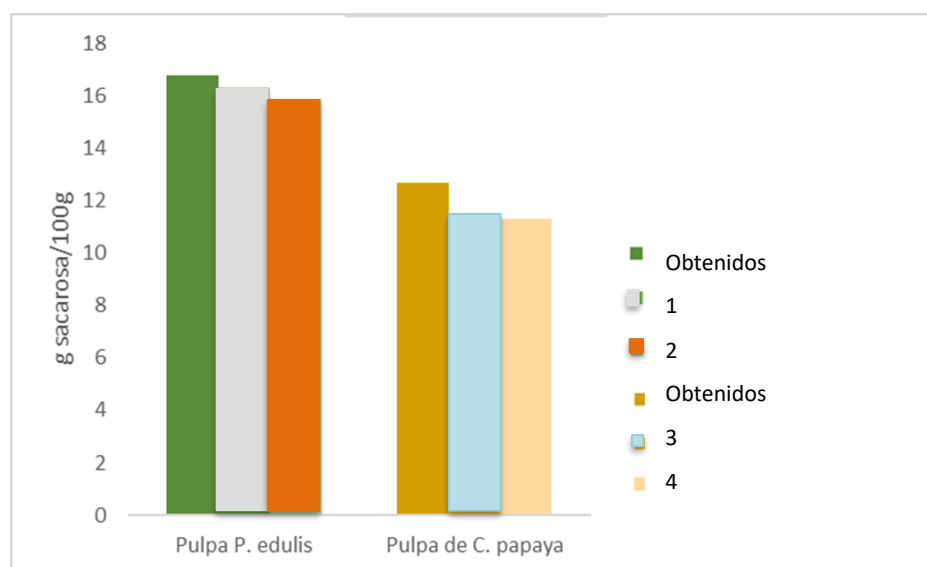
4.12. Análisis de resultados

Los datos se expresaron como promedio \pm desviación estándar ($n=3$). El análisis de varianza (ANOVA) se realizó usando el programa estadístico Statgraph plus, versión 5.0 para Windows. El análisis de correlación se realizó para evaluar la asociación entre el contenido de polifenoles totales, flavonoides, taninos y la actividad antioxidante. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de grado de madurez.

El proceso de maduración de la fruta da lugar a cambios fisiológicos y bioquímicos que modifican la composición de los frutos y fomentan su consumo como fruta fresca. La pérdida de firmeza de las frutas es consecuencia de los cambios en los constituyentes en las paredes de los enlaces débiles célula-célula y por lo tanto, pérdida de rigidez y firmeza, ocasionando ablandamiento, lo que indica madurez^[46]. El grado de madurez de las frutas se determinó en grados Brix por refractometría los cuales están directamente relacionados con la cantidad de sólidos solubles totales (SST) o azúcares (sacarosa) presentes en el material vegetal^[33]. La cantidad de SST encontrados en las pulpas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* se muestran en la figura 6.



1.- Rodríguez y col^[33]; 2.- Pinzón y col^[68]; 3.- Umaña y col^[69]; 4.- Santamaria y col^[70]

Figura 6. Comparación de sólidos solubles totales en pulpa de *P. edulis* y *C. papaya*.

La maduración es el conjunto de cambios externos e internos, como el sabor y la textura, que un fruto experimenta cuando completa su crecimiento. En esta fase de desarrollo del fruto cambia la coloración del pericarpio, disminuye el contenido de almidón, aumenta la concentración de azúcares, se reduce el contenido de ácidos, hay pérdida de firmeza y otros cambios físicos y químicos. Superada esta etapa, el fruto pierde firmeza y aumenta su sensibilidad a las condiciones del medio ambiente^[68]. Es decir; que en los frutos la maduración se define como la fase en la cual un producto ha alcanzado un estado suficiente de desarrollo como para que después de la cosecha y del manejo post-cosecha, su calidad sea aceptable^[69].

En la figura 6 podemos observar la cantidad de azúcares que posee la muestra comparados con los reportados en la bibliografía. Se puede observar que en el caso de *Pasiflora Edulis* los valores de madurez están alrededor de 16 g sacarosa/100g siendo la fruta de este trabajo de investigación la que posee mayor contenido de azúcares comparado con los reportados por Rodríguez y col^[33] y Pinzón y col^[68]. En el caso de *Carica papaya* Umaña y col^[69] y Santamaria y col^[70] reportan valores inferiores de azúcares a los determinados en este estudio (alrededor de 13g/100g). El contenido de SST está constituido por 80 a 95% de azúcares y la medida de SST se encuentra asociada con los azúcares disueltos en el jugo celular por lo que a mayor cantidad de sacarosa mayor madurez^[68]. Asimismo, las frutas se encontraban sin daños visibles y firmes al tacto por lo que se consideró que poseía un grado de madurez adecuada para los posteriores estudios.

5.2. Determinación de humedad

La determinación de humedad tanto en las muestras frescas como en las harinas de las fracciones de las frutas en estudio es de gran importancia, ya que los datos sobre contenido de humedad se utilizan para expresar los resultados analíticos en una base uniforme. La figura 7 muestra la humedad de las muestras frescas y en las harinas liofilizadas de cada fracción de *Passiflora edulis* (parchita) y *Carica papaya* (lechosa).

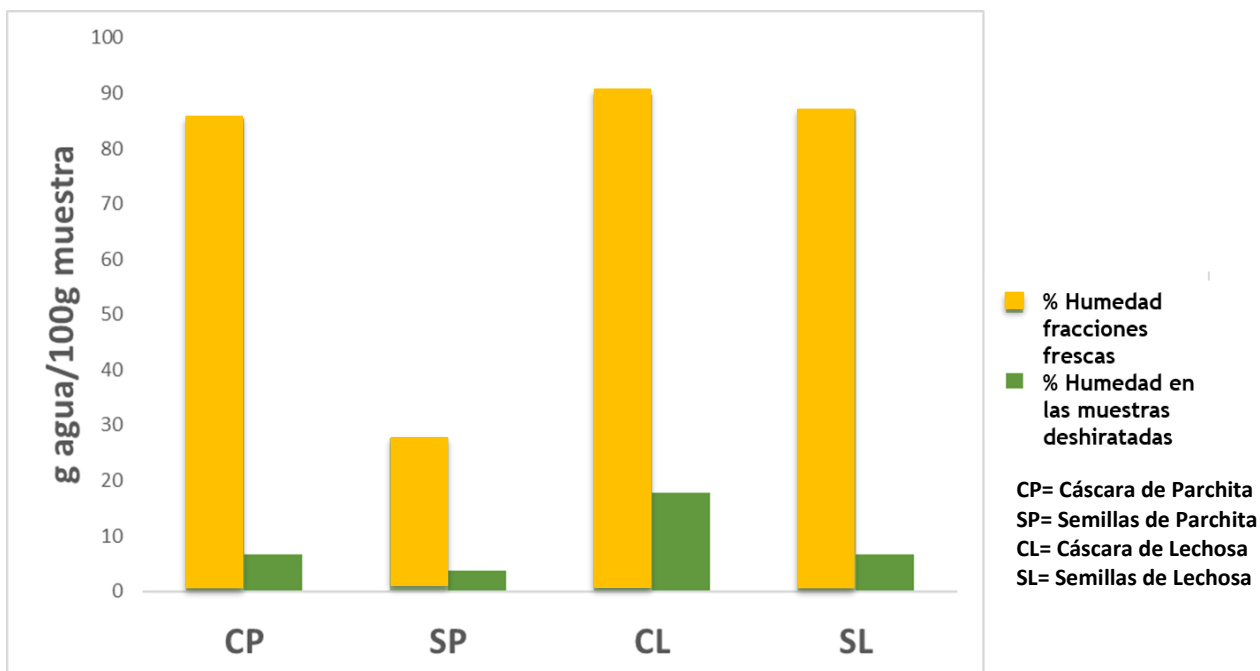


Figura 7. Resultados de la determinación de humedad en cáscaras y semillas de *P. edulis* (parchita) y *C. papaya* (lechosa) frescas y en las harinas.

La humedad se determina ya que todos los alimentos contienen agua en mayor o menor proporción, además, este parámetro indica la variabilidad en la composición de las frutas. El agua se encuentra en los alimentos en dos formas: agua libre y agua ligada. El agua libre es la forma predominante, se libera con facilidad por evaporación o por secado. El agua ligada está combinada o unida en alguna forma química a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y adsorbida en la superficie de las partículas coloidales^[46].

El hecho de conocer este contenido es de gran importancia y poder modificarlo tiene aplicaciones inmediatas: saber cuál es la composición centesimal del producto, controlar las materias primas en la industria y facilitar su elaboración, prolongar su conservación impidiendo el desarrollo de microorganismos y otras reacciones de deterioro químicas o enzimáticas indeseables, mantener su textura y consistencia^[46].

El contenido de humedad de las harinas utilizadas para el desarrollo de este estudio es mucho menor al de las muestras frescas, pudiendo estas almacenarse y utilizarse para posteriores estudios.

5.3. Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles son compuestos aromáticos que generalmente presentan grupos funcionales oxigenados y en la mayoría de los casos son fenoles. Esta expresión engloba una amplia gama de estructuras de las cuales los flavonoides y sus derivados son las más abundantes, entre los compuestos de bajo peso molecular. La tabla 4 muestra el contenido total de estos compuestos fenólicos en las fracciones de *P. edulis* y de *C. papaya* de acuerdo a la técnica de extracción utilizada y empleando diferentes solventes de extracción con distintas polaridades.

Tabla 4. Polifenoles totales en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* determinados por el método de Folin-Ciocalteu expresados como mg EAG/100g de muestra seca¹ utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona: agua².

Muestra	Agitación			Sonicación		
	Solventes de extracción ²			Solventes de extracción ²		
	MeOH (mg EAG/100g b.s)	EtOH (mg EAG/100g b.s)	IsopOH (mg EAG/100g b.s)	MeOH (mg EAG/100g b.s)	EtOH (mg EAG/100g b.s)	IsopOH (mg EAG/100g b.s)
CP	659 ^{a,A} ± 7	568 ^{b,A} ± 9	739 ^{c,A} ± 3	699 ^{d,A} ± 6	588 ^{e,A} ± 7	717 ^{f,A} ± 6
SP	1560 ^{a,A} ± 7	1049 ^{b,A} ± 5	1165 ^{c,A} ± 9	1291 ^{d,B} ± 13	1645 ^{e,B} ± 10	2219 ^{f,B} ± 7
CL	912 ^{a,A} ± 9	744 ^{b,A} ± 9	856 ^{c,A} ± 6	860 ^{cd,A} ± 9	847,2 ^{d,A} ± 0.5	867 ^{e,A} ± 4
SL	522 ^{a,A} ± 2	677 ^{b,A} ± 7	616 ^{c,A} ± 9	902 ^{d,B} ± 1	623 ^{c,B} ± 10	632 ^{f,B} ± 12

¹Datos son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

²Solventes empleados en el primer ciclo de extracción, siendo constante acetona:agua (70:30) en el segundo ciclo de extracción EAG: equivalentes de ácido gálico. CP= cáscara de parchita, SP= semillas de parchita, CL= cáscara de lechosa, SL= semilla de lechosa, MeOH= metanol, EtOH= etanol, IsopOH= isopropanol, b.s= base seca.

Letras minúsculas en el superíndice, indican el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de polifenoles. Letras mayúsculas en el superíndice, indican el efecto de la técnica de extracción sobre el contenido de polifenoles. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$.

Los polifenoles totales determinados espectrofotométricamente se cuantificaron por regresión lineal, usando una curva de ácido gálico (figura 8) en el rango de 20-250µg/mL como estándar.

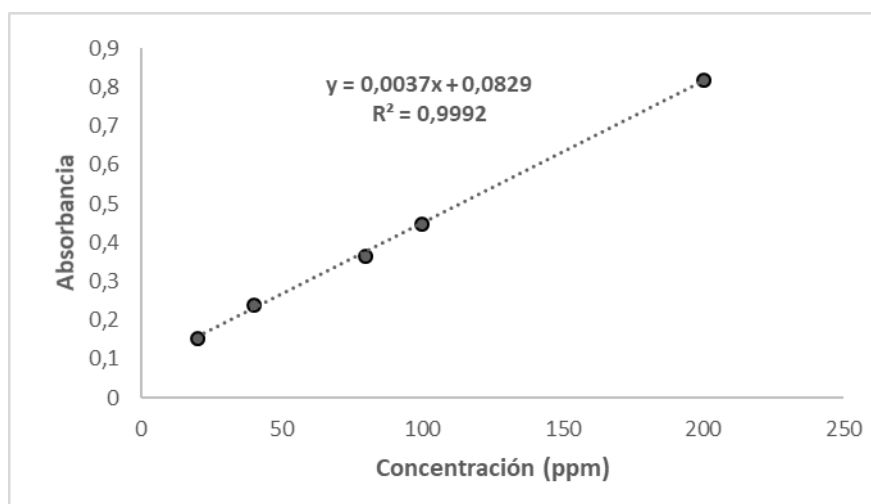


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales

La tabla 4 señala la cantidad de polifenoles totales, expresados como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra en base seca (mgEAG/100g b.s.), empleando dos técnicas de extracción y tres solventes con diferentes polaridades en el primer ciclo de extracción, manteniendo constante el segundo solvente de extracción acetona:agua (70:30) en el segundo ciclo de extracción.

Un factor influyente en la extracción de los compuestos fenólicos es la polaridad del solvente. Se puede observar que el mejor solvente para las fracciones de *P. edulis* es isopropanol y para las fracciones de *C. papaya* es metanol, esto es debido a la polaridad y afinidad de los compuestos fenólicos por el solvente. La polaridad del solvente es un parámetro que mide la solubilización de un soluto y aumenta con la disminución de la cadena carbonada en su estructura y la posición del grupo polar. Por otra parte, la polaridad de los solventes de extracción va en el orden MeOH>EtOH>IsopOH siendo el metanol el más polar y el isopropanol el menos polar; ya que este último posee tres

átomos de carbono en su estructura, posicionándose el grupo polar (OH-) en el C₂ el cual comparado con el grupo de solventes es el que posee mayor impedimento estérico, además puede tener más problemas para solvatar debido a su tamaño. Por lo tanto, se podría decir que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones de *P. edulis* son menos polares que los presentes en las fracciones de *C. papaya*; es decir, los compuestos fenólicos menos polares podrían estar sustituidos con unidades de isopreno mientras que los más polares podrían estar sustituidos con más grupos polares como OH-.

Al evaluar el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de polifenoles se encuentra que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el contenido de polifenoles en las fracciones de semillas de *Passiflora edulis* y, no existen dichas diferencias entre los extractos de semillas de *Carica papaya* utilizando isopOH/agitación y EtOH/sonicación. Asimismo, en las cáscaras de las frutas estudiadas no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) empleando las técnicas de agitación y de sonicación por separado observando que la eficiencia en la extracción se ve afectada por la naturaleza del disolvente (ver apéndice A).

En el caso de la cáscara de *P. edulis* (CP), el mejor solvente de extracción fue el alcohol isopropílico para ambas técnicas (agitación y extracción), obteniéndose el mayor contenido de polifenoles (PP) ($739 \pm 3 \text{mgEAG}/100\text{g}$ y $717 \pm 6 \text{mgEAG}/100\text{g b.s}$), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas usadas (agitación y sonicación, $p > 0,05$). En la semilla de *P. edulis* (SP), el isopropanol usando la sonicación resultó el mayor contenido de polifenoles totales ($2219 \pm 7 \text{mgEAG}/100\text{g b.s}$). La cáscara de *C. papaya* (CL) arrojó un mayor contenido de PP usando MeOH con agitación ($856 \pm 6 \text{mgEAG}/100\text{g b.s}$) sin diferencias significativas entre las técnicas de extracción, mientras que las semillas de *C. papaya* (SL) presentaron un mayor contenido de PP al usar MeOH y sonicación ($902 \pm 1 \text{mgEAG}/100\text{g b.s}$). Se puede resaltar que la cantidad de polifenoles extraídos en cáscara de *C. papaya* con los solventes MeOH y

EtOH usando sonicación no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, el contenido de polifenoles totales extraídos con los solventes IsopOH usando agitación y MeOH por el método de sonicación tampoco muestran diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

En las semillas de *P. edulis* la mayor cantidad de PP se obtuvo en el extracto isopropanólico por sonicación, esto se puede deber a que las semillas poseen grasa y las ondas de agua producidas por el ultrasonido penetran el tejido vegetal extrayendo con mayor facilidad los compuestos fenólicos. De esta manera, la fracción con mayor contenido de polifenoles son las semillas de *P. edulis* usando isopropanol y sonicación, luego la cáscara de *C. papaya* usando metanol sin diferencia entre las dos técnicas, seguida de las semillas de *C. papaya* empleando metanol y sonicación, y finalmente las cáscaras de *P. edulis* empleando isopropanol y agitación.

Comparando los valores reportados en la bibliografía para el contenido de polifenoles en fracciones de desecho de *P. edulis* y *C. papaya* con los obtenidos experimentalmente en este estudio, se obtiene los resultados de la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente de polifenoles totales en fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* con los reportados por otros autores.

Material vegetal	Valor obtenido	Valor reportado	Investigadores
Cáscara de <i>P. edulis</i>	717-739 mgEAG/100g	1584,00±0,63mgEAG/100g	Wong y col (2014) ^[34]
		253±3 mgEAG/100g	Da Silva y col (2014) ^[50]
		864,6±0,1mgEAG/100g	Sánchez y col (2010) ^[49]
		467±38 mg EAG/100g	Da Silva y col (2014) ^[51]
		269,75±15,31 mgEAG/100g	Morais y col (2015) ^[52]
semillas de <i>P. edulis</i>	2219mgEAG/100g	64 mg EAG/100g	López-Vargas y col (2013) ^[53]
Pulpa de <i>P. edulis</i>	N/D	36,47±3,80 mgEAG/100g	Oliveira y col (2016) ^[55]
		830±22mg EAG/100g	Da Silva y col (2013) ^[54]
		286,6±20,4 mg EAG/100g	Septembre-Malaterre y col (2016) ^[56]
Cáscaras de <i>C. papaya</i>	860-912 mgEAG/100g	0,99±0,04mgEAG/100g	Nieto-Calvache y col (2016) ^[57]
		344,47±57,60 mgEAG/100g	Morais y col (2015) ^[52]
		54mgEAG/100g	Faller y Fialho (2010) ^[58]
Semillas de <i>C. papaya</i>	902mgEAG/100g	67,95±0,73mgEAG/100g	Morais y col (2015) ^[52]
Pulpa de <i>C. papaya</i>	N/D	79,5±0,09mgEAG/100g	Pavan y col (2014)
		98mgEAG/100g	Faller y Fialho (2010) ^[58]
		171,68mgEAG/100g	Kelebek y col ^[59]
		325,97±64,46mgEAG/100g	Morais y col (2015) ^[52]
		“Solo” 41,3±5,5mgEAG/100g y “Colombo” 33,4±3,1mgEAG/100g	Septembre-Malaterre y col (2016) ^[56]

N/D = No determinado. EAG= Equivalentes de ácido gálico.

Esto muestra que el desarrollo fitoquímico de estos frutos naturales depende de la zona geográfica (suelos), el clima, la madurez, y si existen factores de estrés y tiempo de cosecha para su formación^{[56][47a]}. Sin embargo, al ser mayor el contenido de polifenoles en las fracciones de desecho se les podría considerar una fuente rica en compuestos

antioxidantes provenientes de una fuente natural y que pueden ser aprovechados en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética para su utilidad. Esto es muy importante ya que el contenido de polifenoles puede ser utilizado como un indicador de la capacidad antioxidante de la matriz de un producto alimenticio^[56].

De igual manera se puede observar en la tabla 6 la cantidad de polifenoles totales determinados en otras materias primas consideradas desechos de frutas reportados en la bibliografía.

Tabla 6. Valores de polifenoles totales reportados por otros investigadores determinados en cáscaras o semillas de diferentes frutas.

Material Vegetal	Valor reportado	Investigadores
Cáscaras de <i>Citrus reticulata</i> (tangerina)	5180±90mgEAG/100g	Chen y col (2017) ^[61]
Cáscaras de <i>Rusbus glaucus</i> (mora andina o mora de castilla)	12690±0,0 mgEAG/100g	Sánchez y col (2010) ^[49]
Cáscaras de <i>Cyphomandra betacea</i> (tamarillo)	1451±11mgEAG/100g	
Semillas de <i>Theobroma cacao</i> (cacao)	6660±60mgEAG/100g	Rincón y col (2011) ^[29]
Semillas de <i>Capsicum bacatum</i> (ají dulce verde)	790±80mgEAG/100g	
Semillas de <i>Capsicum bacatum</i> (ají dulce rojo)	740±90mgEAG/100g	
Semillas de <i>Artocarpus altilis</i> (fruto de pan)	260±10mgEAG/100g	
Semillas peladas de <i>Trachurus trachurus</i> (algarroba)	1722±84,4mgEAG/100g,	Albertos y col (2015) ^[62]
Semillas de <i>Visconcellea pubescens</i> (papaya chilena o papayuelo)	3,8mgEAG/100g por agitación	Briones-Labarca y col (2015) ^[63]
	4,2mg EAG/100g por sonicación	

EAG= Equivalentes de ácido gálico

El contenido de polifenoles totales es un indicador de actividad antioxidante en las frutas, y tradicionalmente son determinados en pulpas de frutas debido a que éstas son las fracciones que son consumidas como alimento. Esta actividad antioxidante de los polifenoles se debe, principalmente, a sus propiedades redox y su estructura química, que le confieren la capacidad para atacar radicales libres de forma directa, ya sea mediante una transferencia de un átomo de hidrogeno, o una transferencia de un electrón, así como la capacidad para quelar metales de transición. En este sentido, los elevados valores de polifenoles totales obtenidos en cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* (tabla 4) sugieren que estas fracciones de las frutas pueden ser utilizadas como antioxidantes y conservantes y se postulan como candidatas para estudios posteriores relacionados con la determinación, elucidación y medición de actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* de los polifenoles que posee, así como la biodisponibilidad y toxicidad de los mismos.

5.4. Cuantificación de flavonoides totales (flavonas y flavonoles).

Los flavonoides poseen un amplio rango de propiedades farmacológicas. Su importancia en la salud humana radica en su capacidad de secuestrar radicales libres^[38]. Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran en casi cualquier vegetal superior (frutas, árboles, entre otros), forman parte de los polifenoles siendo estos compuestos diversos y conocidos de plantas vasculares. Ellos poseen varias funciones. Así, se consideran como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales, y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, entre otros^[47b]. Los representantes más abundantes de los flavonoides naturales son las flavonas y los flavonoles, los cuales se han aislado tanto libres como formando glicósidos y están distribuidos en todos los órganos de las plantas. Los compuestos más frecuentes de estos grupos son apigenina, y apiína (7-O-apioglucósido), la luteonina y sus glicósidos, la quercetina (de mayor abundancia) y rutina

(3-O-rutinósido), el kampferol y sus glicósidos y generalmente la unidad de azúcar se encuentra en el anillo A^[47c].

Debido a que son los compuestos más comunes en todo material vegetal con una amplia gama de funciones naturales, se cuantificó el contenido de flavonoides totales (flavonas y flavonoles) presentes en las fracciones de cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* los cuales se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Flavonoides totales (flavonas y flavonoles) en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* determinado por acomplejamiento con tricloruro de aluminio expresados como mg ERT/100g de muestra seca¹ utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona:agua².

Muestra	Agitación			Sonicación		
	Solventes de extracción ²			Solventes de extracción ²		
	MeOH (mg ERT/100g b.s)	EtOH (mg ERT/100g b.s)	IsopOH (mg ERT/100g b.s)	MeOH (mg ERT/100g b.s)	EtOH (mg ERT/100g b.s)	IsopOH (mg ERT/100g b.s)
CP	231 ^{a,A} ± 10	148 ^{b,A} ± 9	263 ^{c,A} ± 6	205 ^{d,B} ± 10	168 ^{e,B} ± 8	195 ^{d,B} ± 7
SP	356 ^{a,A} ± 8	412 ^{b,A} ± 8	355 ^{a,A} ± 6	478 ^{c,B} ± 15	321 ^{d,B} ± 9	538 ^{e,B} ± 9
CL	216 ^{a,A} ± 10	129 ^{b,A} ± 10	131 ^{b,A} ± 5	222 ^{a,B} ± 8	130 ^{b,B} ± 5	383 ^{c,B} ± 4
SL	27 ^{a,A} ± 3	35 ^{b,A} ± 2	46 ^{c,A} ± 4	23 ^{d,B} ± 1	23 ^{d,B} ± 4	26 ^{ad,B} ± 5

¹Datos son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

²Solventes empleados en el primer ciclo de extracción, siendo constante acetona:agua (70:30) en el segundo ciclo de extracción ERT: equivalentes de rutina. CP= cáscara de parchita, SP= semillas de parchita, CL= cáscara de lechosa, SL= semilla de lechosa, MeOH= metanol, EtOH= etanol, IsopOH= isopropanol, b.s= base seca
Letras minúsculas en el superíndice, indican el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de flavonoides. Letras mayúsculas en el superíndice, indican el efecto de la técnica de extracción sobre el contenido de flavonoides. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas p<0,05.

El contenido de flavonoides se determinó espectrofotométricamente mediante el método de quelación con tricloruro de aluminio y se cuantificaron frente a una curva de rutina en un rango 5-200µg/ml (figura 9) por regresión lineal.

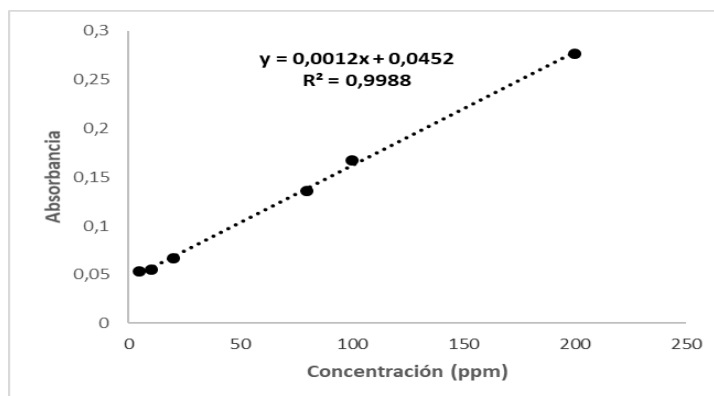


Figura 9. Curva de calibración de rutina para la determinación de flavonoides totales en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya*.

Se muestra en la tabla 6 el contenido de flavonoides totales extraídos en cada una de las fracciones de las muestras de *P. edulis* y de *C. papaya*. Se puede observar que los flavonoides en cada muestra presentaron mayor afinidad al solvente isopropílico, aspecto que sugiere que su polaridad podría ser similar; sin embargo, la técnica de extracción influyó en el contenido final obtenido. Se puede observar que para la cáscara de *P. edulis* el mayor contenido de flavonoides se obtuvo con el solvente isopropílico extraídos por agitación (263 ± 6 mgERT/100g de muestra seca), mientras que para las semillas el mayor contenido de flavonoides se obtuvo en el extracto isopropílico por sonicación (538 ± 9 mgERT/100g de muestra seca). Estos valores de flavonoides totales concuerdan con los obtenidos para los polifenoles totales en los mismos extractos (tabla 4) siendo el isopropanol un buen solvente de extracción de estos compuestos fenólicos.

Por otra parte, en la cáscara de *C. papaya* el mayor contenido de flavonoides totales se obtuvo en el solvente isopropílico por sonicación (383 ± 4 mgERT/100g de muestra seca) y para las semillas la mayor concentración fue para el extracto isopropílico por agitación (46 ± 4 mgERT/100g de muestra seca). En este caso, la obtención de mayores concentraciones de flavonoides con isopropanol como solvente no concuerda con lo encontrado en la determinación de polifenoles totales (tabla 4) para las mismas muestras. Este resultado podría atribuirse a que los flavonoides presentes en esta muestra son

menos polares que el metanol y poseen mayor afinidad con el isopropanol, lo que hace este solvente más eficiente en su extracción, debido a que el método es selectivo para flavonas y flavonoles (figura 3), y su extracción es impulsada por la técnica utilizada. Adicionalmente, extraer estos compuestos a partir de esta matriz natural puede ser complicado debido a la diversidad y sensibilidad de estos compuestos a la oxidación y a la hidrólisis^[38].

En el Apéndice B se resume la comparación estadística de las dos técnicas de extracción de flavonoides, así como de los solventes utilizados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas de sonicación y agitación ($p < 0,05$), indicando que esta tiene influencia en la extracción del contenido de flavonoides totales en cada muestra.

Adicionalmente, al comparar el contenido de flavonoides totales extraídos con cada uno de los solventes se puede observar que los flavonoides en la cáscara de *P. edulis* en el extracto metanólico por sonicación no poseen diferencias estadísticamente significativas con los extraídos con isopropanol por la misma técnica ($p > 0,05$). De igual forma, entre los flavonoides en los extractos metanólico e isopropílico usando agitación para las semillas de *P. edulis* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Esta misma tendencia se observó en el contenido de flavonoides en las cáscaras de *C. papaya* en los extractos etanólico e isopropílico por agitación y el extracto etanólico por sonicación a pesar de emplear dos métodos distintos. De igual manera, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los extractos metanólico por agitación y sonicación para la misma fracción ($p > 0,05$). En el caso de semillas de *C. papaya* los flavonoides en los extractos metanólico, etanólico e isopropílico por sonicación tampoco poseen diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) al igual que en los extractos metanólico por agitación e isopropílico usando sonicación. Esto puede ser debido a que la cantidad

de flavonoides en las muestras podrían ser similares y la aplicación de un método u otro facilita la extracción.

Se utilizaron valores reportados respecto al contenido de flavonoides en cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* frente a otras curvas de calibración los cuales se observan en la tabla 8.

Tabla 8. Valores obtenidos experimentalmente de flavonoides totales en fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* con los reportados por otros autores.

Material vegetal	Valor obtenido	Valor reportado	Investigadores
Cáscaras de <i>P. edulis</i>	263± 6 mgERT/100g	117±5 mgECT/100g	Da Silva y col (2014) ^[51]
		89,10±18,00mgEQ/100g	Morais y col (2015) ^[52]
Semillas de <i>P. edulis</i>	538± 9 mgERT/100g	76,49±12,82mgEQ/100g	Morais y col (2015) ^[52]
		(380mgERT/100g en extracto etanólico y 512mgERT/100g en dimetilsulfoxido (DMSO))	Lopez-Vargas y col (2013) ^[53]
Pulpa de <i>P. edulis</i>	N/D	vitexina (40±5mg/100g), isovitexina (50±4mg/100g) e isorientina (105±3mg/100g)	Da Silva y col (2013) ^[54]
		5,83±1,80mg/100g	Oliveira y col (2016) ^[55]
		70,1±0,5 mgEQ/100g	Septembre-Malaterre y col (2016) ^[56]
Cáscaras <i>C. papaya</i>	383± 4 mgERT/100g	119±17,29 mgEQ/100g	Morais y col (2015) ^[52]
Semillas <i>C. papaya</i>		65,37±14,86mgEQ/100g	
	46±4 mgERT/100g	1,59±0,03mgEQ/100g	
Pulpa de <i>C. papaya</i>	N/D	26,4±0,004mgECT/100g	Pavan y col (2014) ^[60]
		papaya "Solo" 1,7±0,0mgEQ/100g y papaya "Colombo" 1,5±0,2mgEQ/100g	Septembre-Malaterre y col (2016) ^[56]

N/D= No determinado

ETR= Equivalentes de rutina, ECT= equivalentes de catequina, EQ= equivalentes de quercetina.

En este sentido, se consideraría las fracciones de cáscaras y semillas de *Pasiflora edulis* y de *Carica papaya* como fuentes ricas en flavonas y flavonoles que actúan como antioxidantes naturales. De igual manera, se menciona la cantidad de flavonoides determinados en otras materias primas consideradas desechos de frutas las cuales se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de flavonoides totales determinados en pulpa, cáscaras y semillas de diferentes frutas reportados por otros investigadores.

Material Vegetal	Valor reportado	Investigadores
Semillas de <i>Vasconcellea pubescens</i> (papaya chilena)	55mgEQ/100g por extracción convencional	Briones-Labarca y col (2015) ^[63]
	110mgEQ/100g por sonicación	
semillas de <i>Persea americana</i> (aguacate)	30,02±6,26mgEQ/100g	Morais y col (2015) ^[52]
cáscara de <i>Persea americana</i> (aguacate)	10,72±1,80 mgEQ/100g	
cáscara de <i>Ananas comusus</i> (piña)	83,69±14,83 mgEQ/100g	
cáscara de <i>Musa acuminata</i> (plátano)	14,60±3,76 mgEQ/100g	
semillas <i>Citrullus lanatus</i> (patilla o sandía)	24,72±4,08mgEQ/100g	
Cáscaras <i>Citrullus lanatus</i> (patilla o sandía)	92,38±18,62mgEQ/100g	
Semillas de <i>Cucumis melo</i> (melón)	3,61±0,19mgEQ/100g	
Cáscara de <i>Cucumis melo</i> (melón)	199,98±59,68mgEQ/100g	
Pulpa de <i>Ananas comusus</i> (piña)	2,0±0,3mgEQ/100g	Septembre-Malaterre y col (2016) ^[56]
<i>Mangifera indica</i> L	mango José 6,4±2,0mgEQ/100g y mango americano 5,3±0,2mgEQ/100g	
Pulpa de <i>Musa acuminata</i>	plátano pequeño 9,1±1,5mgEQ/100g y plátano grande 9,9±2,8mgEQ/100g	
Pulpa de <i>Litchi sinensis</i> (Litchi)	53,3±5,9mgEQ/100g	

EQ= equivalentes de quercetina.

5.5. Cuantificación de taninos condensados.

Las plantas vasculares presentan una mezcla compleja de compuestos fenólicos y entre ellos los flavonoides poliméricos de alto peso molecular y estructuras mal definidas que por hidrólisis producen antocianidinas y flavanoles. Este grupo de sustancias se conocen como proantocianidinas y forman parte de los taninos condensados. Las proantocianidinas son responsables de un gran número de reacciones, por ejemplo, la precipitación de polisacáridos, alcaloides, proteínas y como parte de estas últimas, las enzimas de la saliva, confiriéndoles las características astringentes a los vegetales que los poseen, y que son atribuidos a los “taninos”.

Los taninos son sustancias que producen endurecimiento del cuero, están ampliamente distribuidos en dicotiledóneas leñosas; su función en las plantas no está clara, pero debido a su abundancia en los tejidos jóvenes y en las heridas causadas en el tallo, particularmente aquellas cerca del suelo, se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los árboles pobres en taninos se descomponen rápidamente). Se extraen con agua o solventes polares ya que a pesar de su complejidad estructural son altamente oxigenados y/o presentan azúcares en su composición que le dan carácter hidrofílico. Los taninos condensados son aquellos que por hidrólisis ácida no se degradan, sino que polimerizan aún más. Entre las proantocianidinas naturales hay dos tipos abundantes: aquellas formadas por la condensación de unidades de catequina y epicatequina que se relacionan con la cianidina y conocidas como procianidinas, y aquellas cuyas unidades monoméricas son galocatequina y epigalocatequina, que se asemejan a la delphinidina y son conocidas como prodelfinidinas^[47d].

Debido a la gran importancia que han tenido los flavonoides poliméricos (proantocianidinas) en el material vegetal ambos pertenecientes a los llamados taninos

en la industria de alimentos, se cuantificó el contenido de proantocianidinas en las fracciones de cáscaras y semillas de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* como se muestra en la tabla 7.

Tabla 10. Taninos totales en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* determinado por el método de vainillina expresados como mg ECT/100g de muestra seca¹ utilizando diferentes técnicas y solventes de extracción, manteniendo constante el solvente acetona:agua².

Muestra	Agitación			Sonicación		
	Solventes de extracción ²			Solventes de extracción ²		
	MeOH (mg ECT/100g b.s)	EtOH (mg ECT/100g b.s)	IsopOH (mg ECT/100g b.s)	MeOH (mg ECT/100g b.s)	EtOH (mg ECT/100g b.s)	IsopOH (mg ECT/100g b.s)
CP	121 ^{a,A} ± 8	336 ^{b,A} ± 9	223 ^{c,A} ± 7	389 ^{d,B} ± 7	364 ^{e,B} ± 6	331 ^{b,B} ± 7
SP	472 ^{a,A} ± 15	394 ^{b,A} ± 3	555 ^{c,A} ± 10	614 ^{d,A} ± 13	340 ^{e,A} ± 11	354 ^{f,A} ± 8
CL	545 ^{a,A} ± 10	434 ^{b,A} ± 6	482 ^{c,A} ± 2	648 ^{d,A} ± 7	519 ^{e,A} ± 3	363 ^{f,A} ± 3
SL	259 ^{a,A} ± 8	673 ^{b,A} ± 10	557 ^{c,A} ± 13	727 ^{d,A} ± 11	533 ^{e,A} ± 10	371 ^{f,A} ± 11

¹Datos son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

²Solventes empleados en el primer ciclo de extracción, siendo constante acetona:agua (70:30) en el segundo ciclo de extracción.

ECT: equivalentes de catequina. CP= cáscara de parchita, SP= semillas de parchita, CL= cáscara de lechosa, SL= semilla de lechosa, MeOH= metanol, EtOH= etanol, IsopOH= isopropanol, b.s= base seca.

Letras minúsculas en el superíndice, indican el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de taninos. Letras mayúsculas en el superíndice, indican el efecto de la técnica de extracción sobre el contenido de taninos. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas p<0,05.

El contenido de taninos condensados se obtuvo utilizando el método de la vainillina y se cuantificó espectrofotométricamente por regresión lineal frente a una curva patrón de catequina (figura 10) en un rango de 10-250µg/ml.

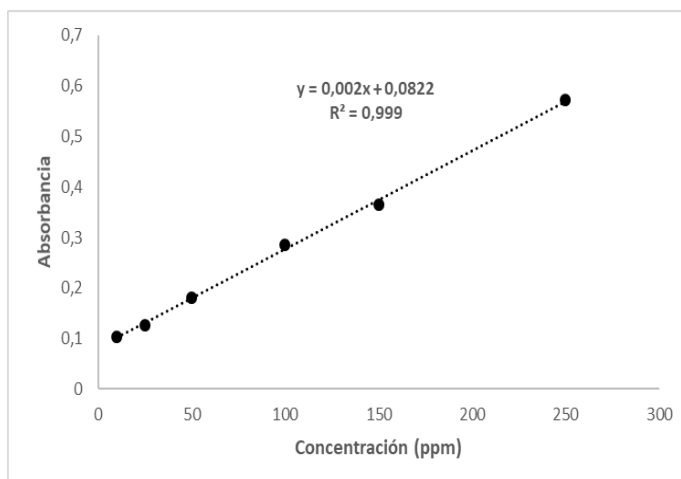


Figura 10. Curva de calibración de catequina para la determinación de taninos condensados en cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya*.

Se puede observar en la tabla 10 que la mayor cantidad de taninos condensados fueron obtenidos en los extractos metanólicos para cada una de las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* mediante sonicación. El mayor contenido de taninos se obtuvo en la semilla de *C. papaya* ($727 \pm 11 \text{mgECT}/100\text{g}$), seguido de las cáscaras de *C. papaya* ($648 \pm 7 \text{mgECT}/100\text{g}$), luego las semillas de *P. edulis* ($614 \pm 13 \text{mgECT}/100\text{g}$) y finalmente en las cáscaras de *P. edulis* ($389 \pm 7 \text{mgECT}/100\text{g}$) atribuido a que el metanol fue el mejor solvente para estos extractos, pudiendo ser a que el metanol es el más polar de los tres solventes y hay mayor facilidad y fuerza en la interacción de los grupos polares de los taninos con el grupo polar del solvente, siendo extraídos en mayor cantidad por las ondas magnéticas generadas por el sonicador penetrando en mayor magnitud en los tejidos vegetales. Se puede observar también que las fracciones de semillas *P. edulis* y *C. papaya* poseen mayor contenido de taninos que las cáscaras otorgándoles mayor astringencia.

De igual manera, se puede observar el Apéndice C que para la cáscara de *P. edulis* existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la agitación y la

sonicación como métodos de extracción, y no existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de taninos extraídos en etanol por agitación y los extraídos en isopropanol por sonicación ($p > 0,05$). Por otra parte, en semillas de *P. edulis* no existen diferencias significativas entre la agitación y la sonicación con un valor de significancia de $p > 0,05$ por lo que la técnica de extracción no influye en el contenido de taninos condensados. Sin embargo, en el análisis ANOVA para la cantidad de taninos extraídos con cada solvente para cada técnica si dieron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$). En semillas *C. papaya* tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas de extracción ($p > 0,05$) y si existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de taninos en función del solvente ($p < 0,05$). Esta misma tendencia se encontró en las cáscaras de *C. papaya* no encontrando diferencias significativas entre la agitación y la sonicación ($p > 0,05$), y si encontrándose en la cantidad de taninos extraídos con cualquiera de los solventes por las dos técnicas ($p < 0,05$).

Por otra parte, se puede indicar valores de taninos reportados en la bibliografía para cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya*, así como también para otras materias primas observándose en la tabla 11 que los subproductos poseen un contenido de taninos lo suficientemente bueno para considerarlos como fuentes ricas en estos compuestos.

Tabla 11. Valores de taninos reportados en la bibliografía en cáscaras, semillas, pulpa y raíces de *P. edulis* y otras plantas.

Material Vegetal	Valor obtenido	Valor reportado	Investigadores
Cáscaras de <i>P. edulis</i>	389± 7 mgECT/100g	9,4±1 mgEC3G/100g	Sánchez y col (2010) ^[49]
Pulpa de <i>P. edulis</i>	N/D	0,68±10,35mg ECT/100g	Oliveira y col (2016) ^[55]
<i>Scorzonera undulata</i> (asteraceae)	N/D	En etil-acetato (325±6mgECT/100g), seguido de n-hexano (221±26mgECT/100g), extracto metanólico (212±5 mgECT/100g) y extracto acuoso (117±2mgECT/100g)	Athmouni y col (2015) ^[38]
Semillas de <i>Trachurus trachurus</i> (algarroba)	N/D	1350±50mgEL/100g	Albertos y col (2015) ^[62]
<i>Brosimum utile</i> (palo de vaca)	N/D	391±40mgECT/100g	Padilla y col (2008) ^[3]
<i>Protium neglectum</i> (currucay)	N/D	410±51mgECT/100g	
<i>Podocalyx loranthoides</i> (palo de agua)	N/D	4483± 279mgECT/100g	

N/D= No determinado.

EC3G= Equivalentes de cianidina-3-glucosido, ECT= Equivalentes de catequina.

5.6. Actividad Antioxidante

Existen varios métodos para la evaluación de la actividad antioxidante. Los extractos de plantas o en este caso los extractos de cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* son una mezcla de diferentes compuestos fenólicos con diferentes grupos funcionales, polaridad y comportamiento químico que podrían conducir a diversos resultados de acuerdo al ensayo utilizado. Por ello, el uso de varios métodos para la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos arrojaría más información para entender la actividad biológica de un antioxidante^[3]. Hay varios factores que influyen en la efectividad de los antioxidantes en alimentos heterogéneos complejos y sistemas biológicos y en

modelos multifásicos. Estos incluyen los lípidos/propiedades de partición de la fase acuosa de los antioxidantes, las condiciones de oxidación y el estado físico del sustrato oxidable. La influencia de todos los parámetros relevantes no puede ser evaluado usando solo un protocolo de ensayo, por lo que se eligieron dos sistemas para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *P. edulis* y *C. papaya*. El ensayo del DPPH• y el poder reductor férrico miden la actividad de eliminación de radicales y el poder de reducción total en los sistemas orgánicos respectivamente^[68]. Los resultados de estos procedimientos se discuten a continuación (tabla 12).

La actividad antioxidante fue medida en los extractos con mayor contenido de polifenoles totales. Para las muestras en estudio se realizó en la cáscara de *P. edulis* en el extracto isopropílico por agitación, para las semillas de *P. edulis* se realizó en el extracto isopropílico por sonicación, en las cáscaras de *C. papaya* se realizó en el extracto metanólico por agitación y para las semillas de *C. papaya* se realizó en el extracto metanólico por sonicación, ya que estos son los extractos con mayor contenido de compuestos que poseen actividad antioxidante.

Tabla 12. Actividad antioxidante en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* determinada por el método de poder reductor expresados como mg EAAs/100g muestra seca¹ y por el método de barrido de radicales libres con DPPH• expresado como %Inhibición, como mM ETR/g muestra seca¹, EC₅₀, TEC₅₀ y eficiencia antirradical (EA).

Muestra	Poder Reductor (mg EAAs/100g b.s)	Método de DPPH•				
		% Inhibición	mM ETR/g muestra seca	EC ₅₀ (g antiox/g DPPH)	TEC ₅₀ (min)	EA
CP-IsopOH-ag	597 ± 1	18,8±0,2	4965± 206	ND	ND	ND
SP-IsopOH-son	1515 ± 3	57,6±0,2	12003± 524	13,76	15±3	0,0050
CL-MeOH-ag	748 ± 3	24,0 ± 0,3	6785± 342	ND	ND	ND
SL-MeOH-son	1120 ± 3	31,7±0,3	8471± 333	113,69	42±8	0,00021

¹ Datos son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

ETR= equivalentes de trolox. EAAs= equivalentes de ácido ascórbico. mM= milimolar.

CP-IsopOH-ag= extracto isopropílico de cáscara de parchita (*P. edulis*) por agitación. SP-IsopOH-son= extracto isopropílico de semillas de parchita (*P. edulis*) por sonicación. CL-MeOH-ag= extracto metanólico de cáscara de lechosa (*C. papaya*) por agitación. SL-MeOH-son= extracto metanólico de semillas de lechosa (*C. papaya*) por sonicación. EC₅₀: concentración del extracto metanólico requerido para "barrer" o "secuestrar" el 50% del radical DPPH•; TEC₅₀: tiempo requerido para que el extracto metanólico "barra" "a trape" o "secuestre" el 50% del radical DPPH•; EA: eficiencia antirradical. ND= no determinado.

5.6.1. Poder Reductor Férrico

Generalmente, la actividad antioxidante es conocida por la presencia de especies reductoras como lo son los compuestos fenólicos conocidos por ser inhibidores de cadenas de radicales libres. La determinación de la capacidad antioxidante en los subproductos de *P. edulis* y *C. papaya* es importante debido a que este parámetro indica la capacidad que tiene los compuestos fenólicos encontrados en estas fracciones de inhibir los radicales libres; es decir, determinar su potencial antioxidante^[3]. En la tabla 12 se presentan los valores del poder reductor, expresados como mg equivalentes de ácido ascórbico por 100 gramos de muestra medidos contra una curva patrón de ácido ascórbico (figura 11). En este ensayo, el color amarillo de la solución de ensayo cambia a diferentes matices entre el azul y el verde, dependiendo del poder reductor de cada compuesto. La presencia de reductores como los antioxidantes, causa la conversión del Fe^{+3} del complejo ferricianuro usado en este método, a la forma ferrosa. Así, por la medición del azul de prusia a 700 nm, se puede monitorear la concentración de Fe^{+2} . Altos valores de absorbancia a 700 nm indican un poder reductor alto^[29].

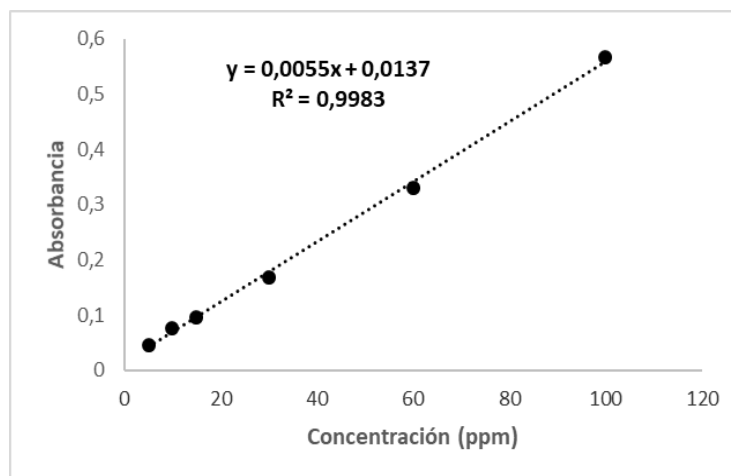


Figura 11. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación del poder reductor férrico en cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya*.

Se puede observar en la tabla 13 que los extractos redujeron los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} ; obteniendo que, el mejor extracto con poder reductor de radicales libres son las semillas de *P. edulis* seguida de las cáscaras de *C. papaya*, luego las semillas de *C. papaya* y finalmente las cáscaras de *P. edulis*. Esto demuestra que la actividad antirradical no siempre está relacionado en el mismo orden del contenido de polifenoles, pudiendo esto corroborarse en la tabla 13.

Tabla 13. Comparación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de las fracciones de cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya*.

Muestra	Polifenoles totales	Actividad antioxidante: Poder reductor férrico.
Semillas de <i>P. edulis</i>	2219 ± 7 mgEAG/100g	1515 ± 3 mg EAAs/100g
Cáscara de <i>C. papaya</i>	912 ± 9 mgEAG/100g	748 ± 3 mg EAAs/100g
Semillas de <i>C. papaya</i>	902 ± 1 mgEAG/100g	1120 ± 3 mg EAAs/100g
Cáscara de <i>P. edulis</i>	739 ± 3 mgEAG/100g	597 ± 1 mg EAAs/100g

De igual manera, se señalan los resultados citados por otros autores para la determinación del poder reductor férrico determinados equivalentes de trolox en cáscaras, pulpa, semillas de *P. edulis* y *C. papaya*, así como semillas de otros materiales vegetales, los cuales se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de poder reductor para las fracciones de diferente material vegetal consideradas fracciones de desecho reportado en la bibliografía.

Material Vegetal	Valor obtenido	Valor reportado	Investigadores
Cáscaras de <i>P. edulis</i>	597 ± 1 mg EAAAs/100g	3094±296µgETR/100g	Wong y col (2014) ^[34]
Cáscaras de <i>P. edulis</i>	N/D	11,3±8 mgEAAAs/100g	Sánchez y col (2010) ^[49]
Pulpa de <i>P. edulis</i>	N/D	205,7±4,12 µmolETR/g	Da Silva y col (2013) ^[54]
Semillas de <i>P. edulis</i>	1515 ± 3 mg EAAAs/100g	0,8 MmETR/100g en extracto acuoso	López-Vargas y col (2013) ^[53]
		1,1 MmETR/100g en DMSO	
Semillas de <i>Vasconcellea pubescens</i>	N/D	38µmolETR/g por extracción convencional	Briones-Labarca y col (2014) ^[63]
	N/D	51µmolETR/g por sonicación	
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	N/D	5,8±0,08gEAAAs/100g	Rincón y col (2011) ^[29]
Semillas de <i>Capsicum bacatum</i> (ají dulce verde)	N/D	3,4±0,02gEAAAs/100g	
Semillas de <i>Capsicum bacatum</i> (ají dulce rojo)	N/D	2,9±0,02gEAAAs/100g	
Semillas de <i>Artocarpus altilis</i> (fruto de pan)	N/D	0,5±0,01gEAAAs/100g	
Cáscara de <i>C. Papaya</i>	748 ± 3 mg EAAAs/100g	25±1 µmolETR/100g	
Pulpa de <i>C. Papaya</i>	N/D	10,2±0,6 µmolETR/100g	Nieto-Calvache y col (2016) ^[57]
Cáscaras de <i>Annona squamosa</i> L (riñón verde)	N/D	46,76±2,40 mMETR/100g	Can-Cauich y col (2017) ^[67]
Cáscaras de <i>Annona squamosa</i> L (riñón morado)	N/D	41,85±0,77 mMETR/100g	
Cáscaras de <i>Annona diversifolia</i> (ilama)	N/D	15,36±0,074 mMETR/100g	
Cáscaras de <i>Lucuma hypoglauca</i> (sapote blanco)	N/D	16,87±0,33mMETR/100g	
Cáscaras de <i>Hylocereus undulatus</i> (fruta dragón)	N/D	1,66±0,01mMETR/100g	
Cáscaras de <i>Melicoccus bijugatus</i> (mamón)	N/D	4,55±0,02mMETR/100g	

N/D= No determinado.

ETR= equivalentes de trolox

EAAAs= equivalentes de ácido ascórbico.

Estos resultados sugieren que las fracciones cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* pueden ser utilizados como fuente para la extracción de conservantes antioxidantes potenciales naturales que pueden ser utilizados en la industria de alimentos y cosméticos.

5.6.2. Barrido de radicales libres (DPPH•)

El radical libre DPPH• posee una absorción característica a 515nm (color púrpura), la cual decrece significativamente cuando está expuesto a la acción de «barrido» por parte de un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes por suministro de átomos de hidrógeno o por donación de electrones. Una disminución en la absorbancia, a 515nm, indica un alto barrido del radical por parte del extracto. El barrido de los radicales libres es uno de los mecanismos conocidos mediante el cual los antioxidantes inhiben la oxidación de los lípidos. El ensayo permite evaluar en forma rápida la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos específicos o extractos^[29].

La actividad antioxidante por este método se expresó como mM equivalente de trolox medidos frente a una curva patrón de trolox (figura 12) y como porcentaje de inhibición de cada muestra (tabla 12).

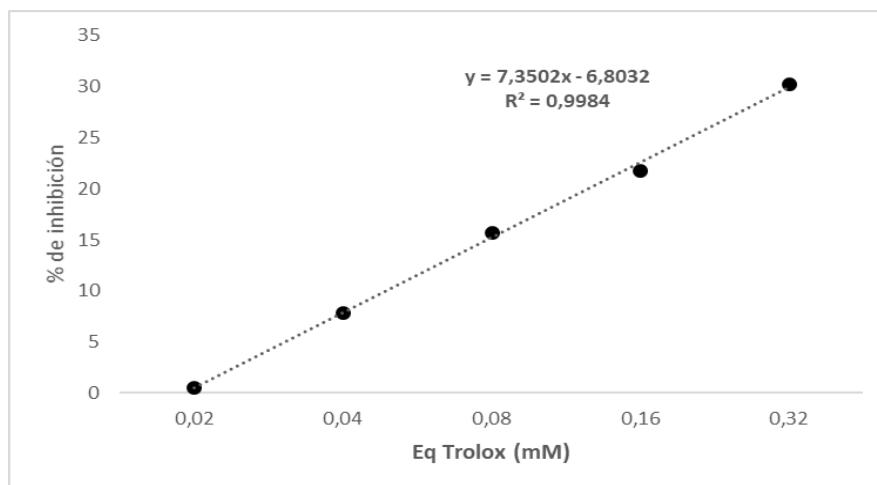


Figura 12. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la actividad antioxidante en cáscaras y semillas de *P. edulis* y *C. papaya* por el método de barrido de radicales libres.

El extracto con mayor actividad antioxidante es aquel que genere la decoloración del radical DPPH• con mayor rapidez^[3]. Del porcentaje de inhibición del barrido de radicales libres podemos observar que tres de las fracciones inhiben alrededor del 25% de los radicales libres, de lo que se infiere que poseen una importante cantidad de polifenoles que podrían ser utilizados como preservantes naturales.

Podemos observar, que las semillas de *P. edulis* poseen mayor porcentaje de inhibición seguido de las cáscaras de *C. papaya*, luego las semillas de *C. papaya* y finalmente las cáscaras de *P. edulis*. Igualmente siguen ese orden expresados como mM equivalentes de trolox. Esto concuerda con los resultados obtenidos de poder reductor.

También se determinó el porcentaje de concentración necesaria para barrer un 50% de los radicales libres DPPH• (EC_{50}) y el tiempo necesario para que esto ocurra (TEC_{50}), así como la actividad antirradical (tabla 12) de las semillas de *P. edulis* y *C. papaya* únicamente ya que éstas son las que inhibieron más del 25% de los radicales libres DPPH•.

La tabla muestra la eficiencia antirradical de los extractos de las semillas de *P. edulis* (isopOH/sonicación) y *C. papaya* (MeOH/sonicación), además de los parámetros EC₅₀ y TEC₅₀. Para ello se realizó una regresión lineal entre el % DPPH remanente (que no reaccionó) y la concentración del extracto a fin de obtener el valor de EC₅₀. De igual manera se realizó una regresión entre el tiempo en que esto ocurre y la concentración del extracto (TEC₅₀). Se observa que las semillas de *P. edulis* requieren 13,76 g de antioxidante por cada gramo de DPPH exhibiendo mayor actividad de barrido de radicales libres y eficiencia antirradical comparado con las semillas de *C. papaya* las cuales requieren 113,6 g de antioxidantes por cada gramo de DPPH• y exhiben una menor EA. Por lo tanto, esta última posee menor actividad antioxidante ya que requiere mayor cantidad de muestra para inhibir el 50% de los radicales libres.

Los valores EC₅₀, expresados en (g antioxidante/g DPPH•), de algunos estándares son los siguientes: ácido gálico: 0,026; ácido tánico: 0,059; ácido caféico: 0,069; quercertina: 0,084 y DLα-tocoferol: 0,201^[66]. Si comparamos el valor de EC₅₀ de DL α-tocoferol con los valores de EC₅₀ obtenidos en este estudio, encontramos que 1 g de semilla de *P. edulis* es equivalente a la actividad antioxidante de 14,6 mg de DL α-tocoferol, mientras que 1 g de semilla de *C. papaya* equivale a la actividad antioxidante de 1,76 mg del mismo estándar^[66].

Haciendo referencia a valores del mismo estudio se señalan los reportados por Rincón y col^[66] indicando valores de EC₅₀, TEC₅₀ y EA en cáscaras de níspero (*Manilkara achras*) (6,41±0,181g/g DPPH; 41,51±0,56min y 0,0033), pomagás (*Syzygium malaccense*) (6,81±0,136g/g DPPH; 41,76±0,3 min y 0,0035) y dos variedades de guayaba, rosada (*Psidium guajava*) (1,92±0,24 g/g DPPH; 38,45±0,42 min y 0,0140) y blanca (*Psidium acutangulum*) (2,62±0,57 g/g DPPH; 54,74±1,23 min y 0,010) respectivamente. Igualmente, Jiménez y col^[67] citan valores de EC₅₀, TEC₅₀ y EA en cáscara (1.92±0.08 g/g DPPH; 54.74±2.05 min y 0.007±0.002) y pulpa (3.70±0.06 g/g DPPH; 30.75±2.64 min y 0.009±0.002) de *Psidium guajava*. Al comparar los valores reportados de EC₅₀ y EA con los obtenidos en este estudio vemos que los compuestos fenólicos presentes en los

extractos de las semillas *Passiflora edulis* y *Carica papaya* poseen una menor eficiencia antiradical pero poseen tiempos de acción más cortos por lo que se les puede llamar antioxidantes moderados. Esto se explica debido a que las semillas de las muestras de *Passiflora edulis* y *Carica papaya* solamente inhiben en un 54% y 31% de los radicales libres DPPH● lo cual se consideran valores medios al tratarse de factores de desecho de las frutas.

Por otra parte, se determinó la correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante las cual se determinó mediante una regresión lineal entre la cantidad de polifenoles y la actividad antioxidante en *P. edulis* para las cáscaras en extracto isopropílico por agitación y semillas en extracto isopropílico por sonicación y, en *C. papaya* para las cáscaras en extracto metanólico por agitación y para las semillas en extracto metanólico por sonicación obtenidos en los análisis 5.2 y 5.5.2. Esto se muestra en las figuras 13, 14, 15 y 16.

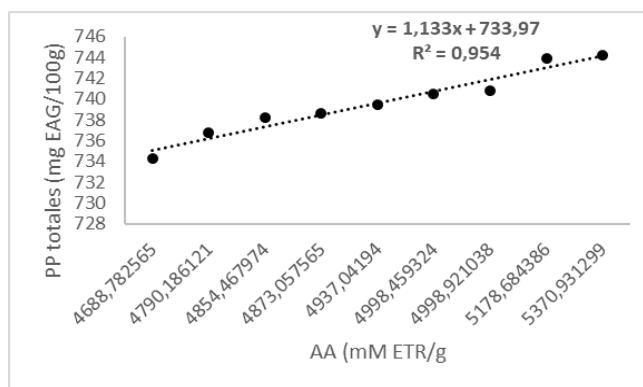


Figura 13. Relación entre polifenoles de cáscara de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

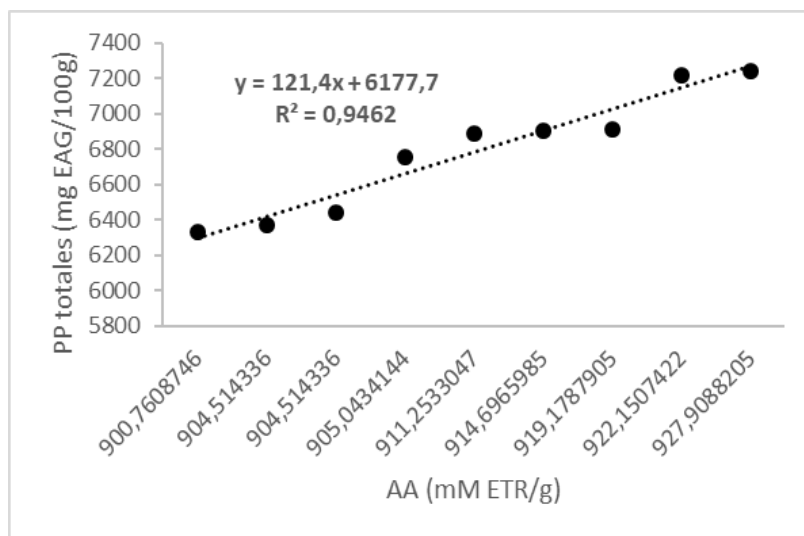


Figura 14. Relación entre polifenoles de cáscara de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA)

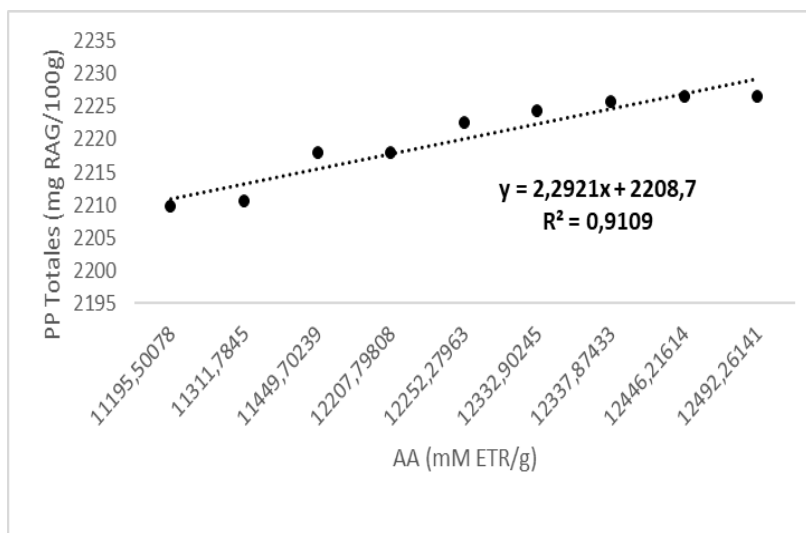


Figura 15. Relación entre polifenoles de semillas de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

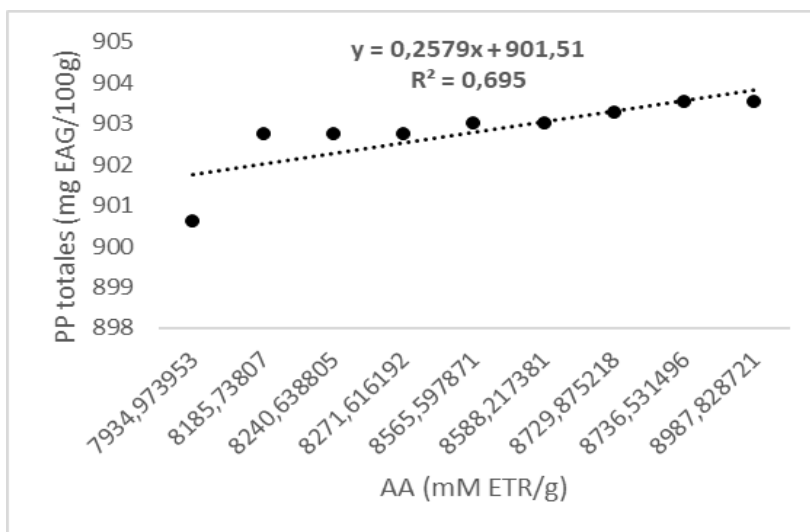


Figura 16. Relación entre polifenoles de semillas de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA).

Es frecuente relacionar la capacidad antioxidante de los productos naturales con el contenido de polifenoles totales presentes; en algunos trabajos se ha reportado una correlación baja entre estos parámetros y hasta se ha indicado no existir relación alguna entre el contenido total de polifenoles, concentración de ácido ascórbico y la capacidad antioxidante. La bibliografía señala que aunque se empleen métodos diferentes, los resultados obtenidos son comparables para la determinación de la actividad antioxidante en muestras de uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética [29].

En efecto, las muestras evaluadas presentaron una alta actividad antioxidante que se correlacionó significativamente con el contenido de polifenoles totales (Correlación 0,95 para cáscara de *P. edulis*, 0,95 para cáscara de *C. papaya*, 0,91 para semillas de *P. edulis* y 0,70 para semillas de *C. papaya*). La correlación más baja se obtuvo en las semillas de *C. papaya* a pesar de ser la segunda de las muestras con mayor contenido de polifenoles y taninos, esto se puede deber a que la propiedad antioxidante es conferida a los polifenoles por los grupos hidroxil unidos a la molécula los cuales son donadores de átomos de hidrógeno o electrones, la disposición de esta molécula a donar dichos

electrones o átomos de hidrogeno hacen que el compuesto posea mayor o menor actividad antioxidante [29].

Por otra parte, se señala el % de inhibición y los equivalentes de trolox encontrados en la bibliografía para factores de desechos de *P. edulis* y *C. papaya*. tal es el caso de Wong y col^[34] (68,54%) determinado por blanqueamiento de β -caroteno (BCB) en cáscaras de *P. edulis*, Barrales y col^[68] (2,6 mg ETR/g) en semillas de *P. edulis* y López-Vargas y col^[54] (19% inh en extracto metanólico y 50% inh en DMSO) en semillas de *P. edulis*. Asimismo, Nieto-Calvache y col^[58] reportan $12 \pm 1 \mu\text{mol ETR}/100\text{g}$ y $54,86 \pm 0,08 \mu\text{mol ETR}/100\text{g}$ en pulpa y cáscara de *C. papaya*, siendo la actividad antioxidante mayor en la fracción de desecho de la fruta.

De igual manera, otros autores reportan % de inhibición en fracciones de cáscaras, semillas y piel de otras frutas las cuales se pueden observar en la tabla 15.

Tabla 15. Porcentaje inhibición (% Inhibición) en cáscaras, semillas y pulpa reportados para diversas frutas.

Material vegetal	Valor reportado	Investigadores
pulpa de <i>C. papaya</i>	330,2mMETR/100g	Kelebek y col ^[60]
semillas de <i>Trachurus trachurus</i> (algarroba)	687,59 \pm 24,43 $\mu\text{mol ETR}/\text{g}$	Albertos y col ^[63]
cáscaras de <i>Annona squamosa</i> L (riñon verde)	48,3 \pm 0,2mMETR/100g	Can -Cauch y col ^[65]
<i>Annona squamosa</i> (riñon morado)	39,81 \pm 0,91mMETR/100g	
<i>Chrysophyllum cainito</i> (caimito verde)	29,44 \pm 1,27mMETR/100g	
<i>Chrysophyllum cainito</i> (caimito morado)	16,88 \pm 0,87mMETR/100g	
<i>Annona diversifolia</i> (ilama)	4,63 \pm 0,66mMETR/100g	
<i>Lucuma hypoglauca</i> (sapote blanco)	3,54 \pm 0,09mMETR/100g	
<i>Melicoccus bijugatus</i> (mamón)	0,69 \pm 0,02mMETR/100g	

mMETR= milimolar equivalente de trolox; $\mu\text{mol ETR}$ = micromolar equivalente de trolox.

Al observar los valores presentados en fracciones de otros frutos se puede determinar que las fracciones de desecho son fuentes ricas en compuestos antioxidantes. En el caso de *P. edulis* y *C. papaya* dichas fracciones son ricas en compuestos antioxidantes para ser utilizadas en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética para la extracción de antioxidantes naturales.

Las figuras 17,18, 19 y 20 muestran la correlación entre el contenido de flavonoides y la actividad antioxidante en *P. edulis* para las cáscaras en extracto isopropílico por agitación y semillas en extracto isopropílico por sonicación y en *C. papaya* para las cáscaras en extracto metanólico por agitación y para las semillas en extracto metanólico por sonicación determinando la variación entre el contenido de ambos utilizadas para los análisis 5.3 y 5.5.2.

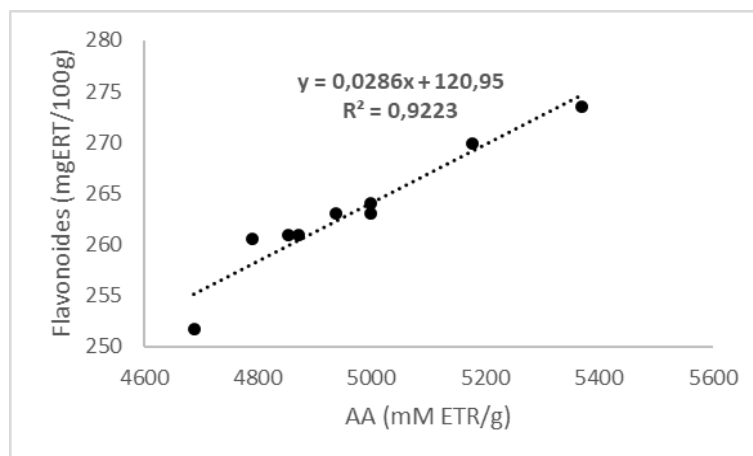


Figura 17. Relación entre flavonoides de cáscara de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

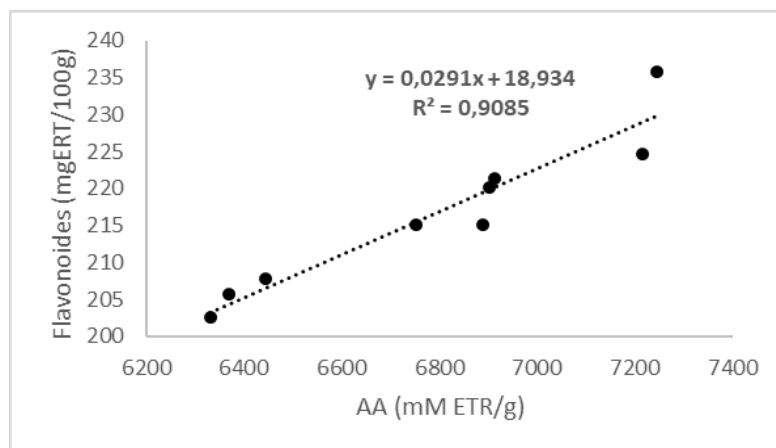


Figura 18. Relación entre flavonoides de cáscara de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA).

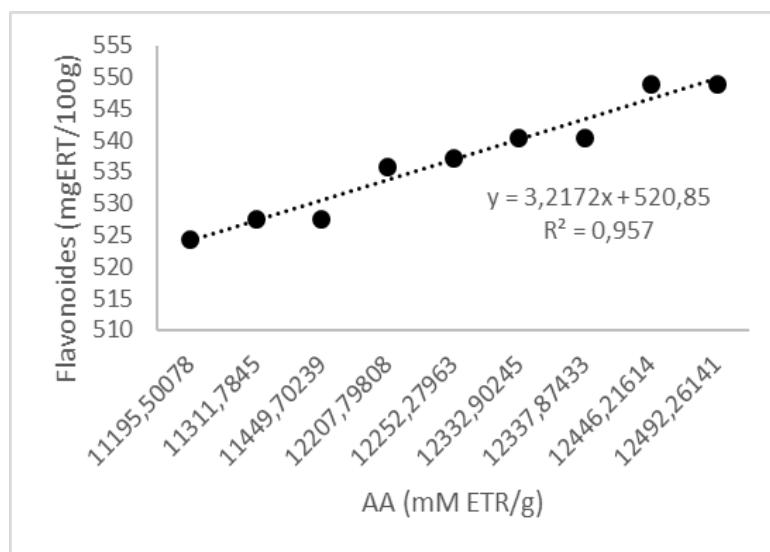


Figura 19. Relación entre flavonoides de semillas de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

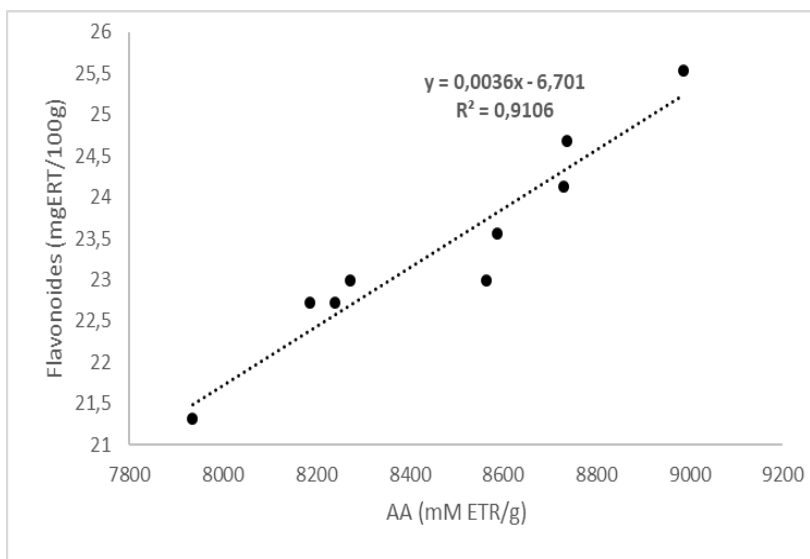


Figura 20. Relación entre flavonoides de semillas de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA).

Las muestras evaluadas presentaron igualmente una alta correlación entre el contenido de flavonoides y la actividad antioxidante (Correlación 0,92 para cáscara de *P. edulis*, 0,90 para cáscara de *C. papaya*, 0,95 para semillas de *P. edulis* y 0,91 para semillas de *C. papaya*). Se observa que a mayor contenido de flavonoides responden positivamente al método por lo que se puede inferir que las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* poseen compuestos con propiedades antioxidantes que podrían ser utilizados en formulaciones cosméticas y farmacéutica, así como conservantes de alimentos por esta acción anti-radical y pudiendo resultar como una excelente materia prima para la obtención de antioxidantes naturales.

Finalmente, las figuras 21, 22, 23 y 24 muestran la correlación entre el contenido de taninos y la actividad antioxidante en *P. edulis* para las cáscaras en extracto isopropílico por agitación y semillas en extracto isopropílico por sonicación y, en *C. papaya* para las cáscaras en extracto metanólico por agitación y para las semillas en extracto metanólico

por sonicación determinando la variación entre el contenido de ambos obtenidos en los análisis 5.3 y 5.5.2.

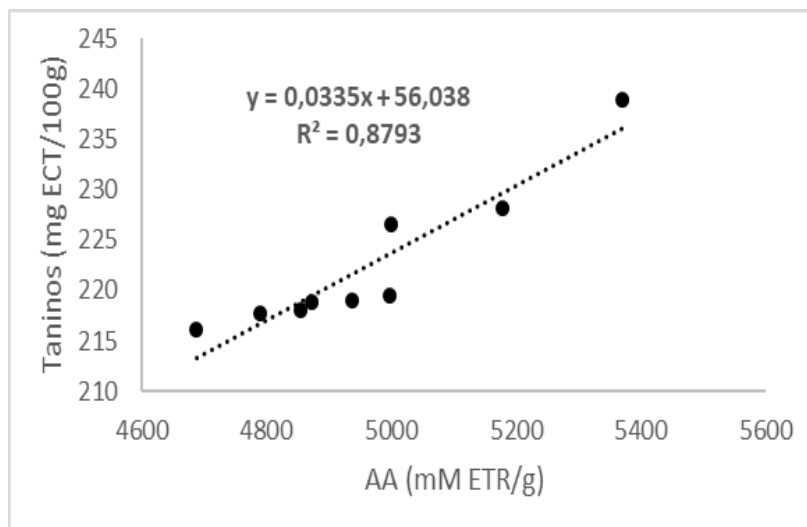


Figura 21. Relación entre taninos de cáscara de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

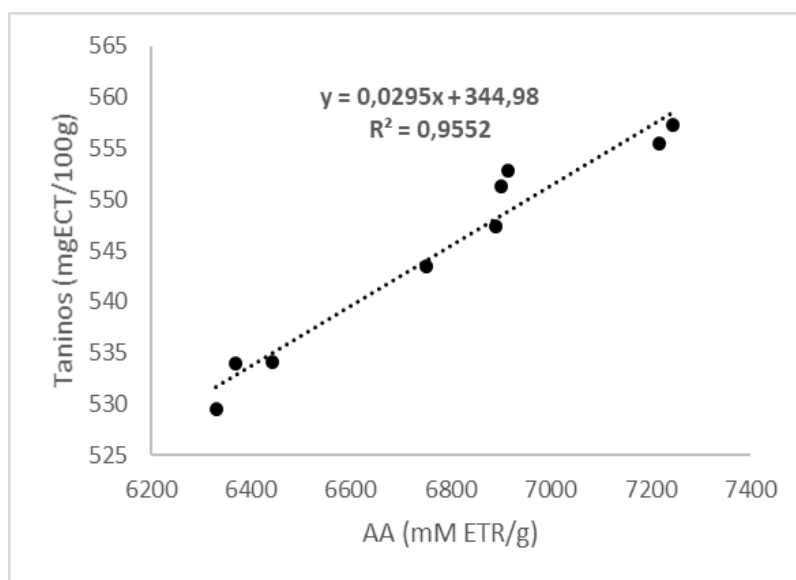


Figura 22. Relación entre taninos de cáscara de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA).

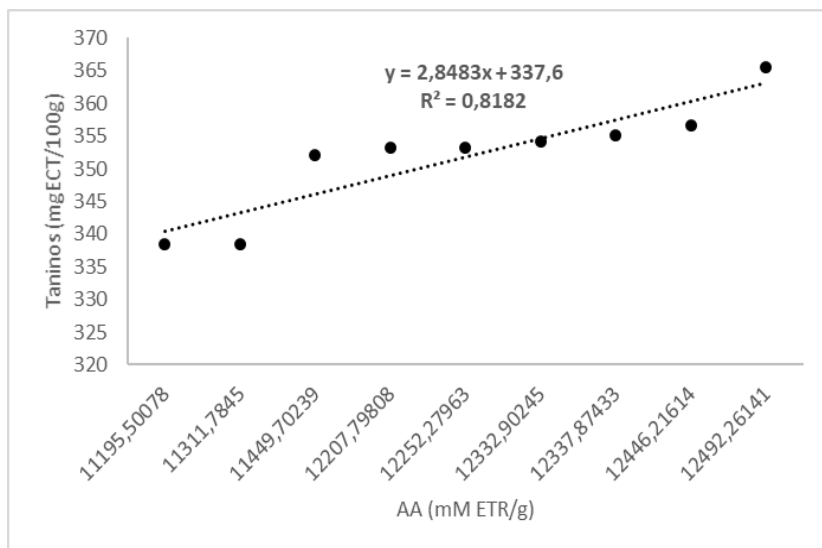


Figura 23. Relación entre taninos de semillas de *P. edulis* y la actividad antioxidante (AA).

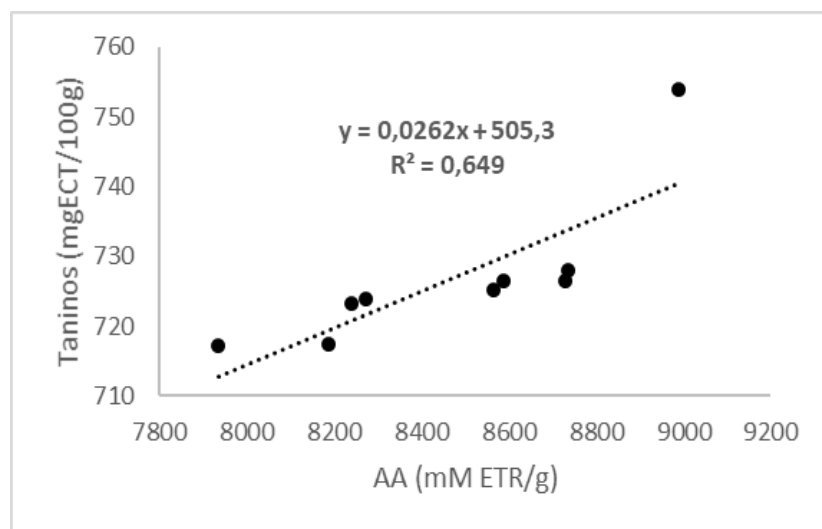


Figura 24. Relación entre taninos de semillas de *C. papaya* y la actividad antioxidante (AA).

Las muestras de cáscaras y semillas de *P. edulis* *C. papaya* presentaron igualmente una alta correlación entre el contenido de taninos y la actividad antioxidante (correlación 0,87 para cáscara de *P. edulis*, 0,95 para cáscara de *C. papaya*, 0,81 para semillas de *P. edulis* y 0,64 para semillas de *C. papaya*). Estos valores son más bajos que los obtenidos con polifenoles y flavonoides teniendo una correlación positiva entre el contenido de taninos y la actividad antioxidante. La correlación en semillas de *C. papaya* es muy similar a la obtenida con polifenoles, y la mejor correlación es el obtenido en cáscaras de *C. papaya*. Sin embargo, todos aumentan la actividad antioxidante al aumentar la cantidad de taninos por lo que se pueden considerar fuentes de compuestos antioxidantes como los taninos.

6. CONCLUSIONES

- La mayor cantidad de polifenoles se obtuvo cuando se combinaron alcohol isopropílico/agitación en las cáscaras de *P. edulis* y alcohol isopropílico/sonicación en semillas de la misma fruta. En el caso de *C. papaya*, se extrajo más polifenoles cuando se empleó metanol, combinado con agitación y sonicación para cáscara y semillas respectivamente.
- Los flavonoides de las muestras de fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* se extrajeron con isopropanol siendo estos compuestos con pocos grupos polares y afines a este solvente.
- El mayor contenido de taninos condensados se obtuvo en el extracto metanólico para las muestras de fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* por la técnica de sonicación debido a la presencia de grupos polares en las estructuras que son afines a este solvente.
- Los valores de poder reductor de las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya* fueron altos, por lo que la mayor actividad antioxidante no siempre está relacionada con el mayor contenido de polifenoles.
- El porcentaje de inhibición y el contenido mM de trolox se encontraron en el mismo orden de poder reductor, corroborando que no siempre el mayor contenido de polifenoles otorga una mayor actividad antirradical en las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya*.
- Se requiere menor cantidad de muestra de semillas de *P. edulis* para inhibir el 50% de los radicales libres DPPH• en comparación con las semillas de *C. papaya*.

- De igual manera, los extractos de semillas *P. edulis* actúan en menor tiempo ya que requieren menor cantidad de compuestos fenólicos para inhibir el 50% de los radicales libres DPPH• que el extracto de *C. papaya*.
- Al realizar estudios con fracciones de muestras vegetales, se debe realizar optimización de las extracciones con el fin de obtener un mejor rendimiento para estudios posteriores.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de toxicidad en los extractos de las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya*.
- Determinar y cuantificar individualmente cuáles son los polifenoles presentes en las muestras de las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya*.
- Realizar ensayos microbiológicos para determinar las propiedades antimicrobianas de las fracciones de *P. edulis* y *C. papaya*.
- Realizar determinaciones de polifenoles totales cáscaras, semillas y pulpa de *P. edulis* y *C. papaya* de diferentes cosechas, en distintas épocas del año y ubicación geográfica a fin de estudiar el comportamiento y desarrollo de los compuestos bioactivos.
- Incorporar las fracciones de desecho de *P. edulis* y *C. papaya* en sistemas alimenticios y/ o cosméticos sustituyendo antioxidantes sintéticos y realizar ensayos de estabilidad.
- Evaluar otros parámetros de extracción como temperatura, tiempo de extracción, técnica, entre otros.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Porras A, López A. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas selectos de Ingeniería de alimentos. 2009; 3(1): 121-134.
2. Clifford MN. Sensory and dietary properties of phenols. Proceedings of the 16th international conference of grape polyphenol. 1992; 16(11); 18-23.
3. Padilla F, Rincón A, Bou Rached L, Suárez A. *Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides* and *Brosimum utile* source of flavonoids and other phenolic compounds with antioxidant activity. Revista Facultad de Farmacia. 2008; 71(1): 8-14.
4. Beserra M, Machado P, Campos A, Matias G, Carvalho E, Arraes G, Gomes T. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Research International. 2011; 44: 2155-2159.
5. Olaya J, Mauricio E. La guayaba, fuente de fenoles con actividad antioxidante. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2010; 30p. Disponible en:
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2879/1/CD000015-TRABAJO%20COMPLETO-pdf> Consultado 01/10/2016
6. Singh RP, Murthy K, Jayaprakasha G. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. J Agric Food Chem. 2002; 50: 56-81.
7. Caravaca E. Aplicación de los métodos espectroscópicos al estudio de las características cromáticas de los componentes polifenólicos presentes en vinos. Universidad del País Vasco. 1999; 5: 39-66.
8. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana Medicina Militar. 2002; 31(2): 126-133. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf Consultado el 15-09-2016
9. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 2012; 27(1): 76-89.

10. Barberán T. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 2003; 10(2): 41-53.
11. Naranjo A. Evaluación de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*.) cultivada en Pomona Pastaza-Ecuador. Trabajo especial de grado. Bioq. Farm. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador. 2013; 12-15. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2693/1/56T00396.pdf>
12. Gimeno C. Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*. 2004; 23 (6): 5.
13. Alu'datt M, Rababah T, Alhamah M, Gammah S, Ereifej K, Kubow S, Alli I. Characterization and antioxidant activities of phenolic interactions identified in byproducts of soybean and flax seed protein isolation. *Food Hydrocolloids*. 2016; 61: 119-127.
14. Cartaya O, Reynaldo I. "Flavonoides: características químicas y aplicaciones." *Cultivos Tropicales*. 2001; 22 (2):5.
15. Sarría CA. Flavonoides: compuestos bioactivos de los alimentos. *Boletín pediátrico de la sociedad Aragonesa*. 2005; 34: 88-92.
16. Halliwell B, Whiteman M. *Free radical in Biology and Medicine*. Oxford, Science Publications. (British Journal of Pharmacology), Third edition. 2004; 143(3): 231.
17. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. 2003; 23: 1719-1726.
18. Papas AM. Diet and antioxidant status. In A. M. Papas (Ed.), *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. 1999; Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press.
19. González M, Betancourt M, Ortiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 2000; 25(1): 3-9.
20. López A. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM*. 2012; 6(1): 49-51.

21. Mayor R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del instituto médico tropical (Paraguay)*. 2010; 5(2): 1-6.
22. Berker KI, Guclu K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridiltriazine (FRAP) and ferricnide reagents. *Talanta*. 2007; 72: 1157-1165.
23. Valderrama J. *Información Tecnológica.*, 3a ed., La Serena – Chile., CIT; 2003. p 15-20.
24. Salinas D. Inhibición del tránsito intestinal por el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L (Guanábana) en ratones. *Revista Peruana de Ciencia e investigación*, Lima- Perú. 2011; 14(11): 9-13.
25. Vasantha R, Priya K, and Gwendolyn M. H. Ultra-Sonication-Assisted Solvent Extraction of Quercetin Glycosides from 'Idared' Apple Peels. *Molecules*. 2011; 16: 9783-9791.
26. Uribe E, Delgadillo A, Giovagnoli C, Quispe I, Zura L. Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*. 2015; 1.
27. Lacueva AC, Medina A, Lorach R; Urpi M, Khan N, Chiva G, Zamora R, Rotches M, Larnuela RM. "Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables", en L. A De la Rosa; E. Alvarez-Parrilla G. A González-Aguilar Editors. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. 5st ed. USA: Blackwell Publishing Iowa; 2010; p 53-88.
28. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*. 2014; 7:1776–1782.
29. Rincón AM, Pérez M, Bou Rached L, Romero A, Bucarito L, Padilla F. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de vegetales. *Revista Facultad de Farmacia UCV*. 2011; 74(1): 24-28.
30. Wang L, Weler C. Los recientes avances en la extracción de nutraceuticos a partir de plantas. *Tendencias en ciencia y tecnología*. 2006; 17: 300-312.

31. Kokila T, Ramesh P, Geetha D. Biosynthesis of AgNPs using *Carica Papaya* peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016.
32. Moraes M, Zobot G, Prado J, Meireles A. Obtaining Antioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques. *Food and Public Health*. 2013, 3(4): 195-214.
33. Rodríguez L, López L, García M. determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus b.*), maracuyá (*Passiflora edulis s.*), guayaba (*Psidium guajava l.*) y papayuela (*carica cundinam*). *Revista de la asociación colombiana de ciencia y tecnología de alimentos*. 2010; 19(21): 22-61
34. Wong Y, Mei C, Eng H, Kwang Y, Kiat S, Seng H. Influence of extraction conditions on antioxidants properties of Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2014; 13(3): 257-265.
35. Yasoubi P, Barzegar M, Sahari M. A and Azizi M. H. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extracts. *J. Agric. Sci. Technol*. 2007; 9: 35-42.
36. Sasikala V, Saravana S, Parimelazhagan T. Evaluation of antioxidant potential of different parts of wild edible plant *Passiflora foetida* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 1(04): 89-96.
37. Gayosso L, Yahia E, González G. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya L.*, cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*. 2011; 44: 1284–1291
38. Athmouni K, Belghith T, Bellassouad K, El Feki A, Ayadi H. Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (asteraceae): application of factorial design optimization phenolic extraction. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 2015; 14(4): 313–330.

39. Zakia S, Hayate H, Boulekbache-Makhloufa L, Rigoub P, Reminia H, Adjaouda A, Khoudjaa N, Madani K. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*. 2016; 89: 167–175.
40. Horwitz W. editor. Malt beverages & brewing materials. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Vol II. 17th ed. USA: Association of Official Analytical Chemists; 2000. p. 31.
41. Secado por liofilización. Practicas docentes en la facultad de ciencias. Universidad de Granada. Disponible en:
<https://ciencias.ugr.es/practicasdcentes/cop-content/uploadsguiones/secadoporliofilizacion.pdf> consultado 15-08-17
42. Cao G, Booth S.L, Sadowski J.A, Prior R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68: 1081.
43. Young J.F, Nielsen S.E, Haraldsdottier J, Danesfvar B, Lauridsen S.T, Knuthsen P, Crozier ., Sandstrom B, Dragsted L.O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69: 87-94.
44. Horwitz W. editor. Fruits & fruit products. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Vol II. 17th ed. USA: Association of Official Analytical Chemists; 2000. p. 2.
45. Ikram E, Stanley R, Netzel M, Fanning K. Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses – A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015; 41: 201–211.
46. García E, Fernández I. Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinaci%C3%B3n%20de%20humedad.pdf> consultado 11-10-17.

47. Marcano D, Hasegawa M. Compuestos aromáticos. Fotoquímica Orgánica. 2da edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. Editorial Torino; 2002. pp a)237-261, b)137-138, c)159-160, d)177-181, e)165-166.
48. Miller J and Miller J. Estadística y quimiometría para química analítica. Contrastes de significación. 4ta edición. Madrid, España. Editorial Pearson Education S.A. 2002. Pp 43-76.
49. Sánchez W, Murillo E, Méndez JJ. potencial antioxidante de residuos agroindustriales de tres frutas de alto consumo en el Tolima. Scientia et Technica. 2010; 46: 138-143.
50. Da Silva JK, Baú Betim C, Bogusz S, Augusto F, Maróstica M, Zollner R. Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel increases colonic production of short-chain fatty acids in Wistar rats. LWT - Food Science and Technology. 2014; 30: 1-6.
51. Da Silva JK, Baú Betim C, Batista A, Maróstica M. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. LWT - Food Science and Technology. 2014; 59: 1213-1219.
52. Morais D, Rotta E, Sargi S, Schmidt E, Guntendorfer Bonafe E, Eberlin M, Sawaya A, Visentainer J. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. Food Research International. 2015; 8 (36): 1-8.
53. López-Vargas J, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J, Viuda-Martos M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. Food Research International. 2013; 51: 756–763.
54. Da Silva JK, Baú Betim C, Colomeu T, Batista A, Meletti L, Rizzato J, Bogusz S, Fontes M, Reyes Reyes F, Augusto F, Maróstica M, Zollner R. Antioxidant activity

- of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*)leaves: In vitro and in vivo study. Food Research International. 2013; 53: 882–890.
55. Oliveira C, Giordani D, Lutckemier D, Deyse Gurak P, Cladera-Olivera F, Ferreira L. Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. Food Science and Technology. 2016; 71: 110-115.
 56. Septembre-Malaterre A, Stanislas G, Douraguia E, Gonthier MP. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. Food Chemistry. 2016; 212: 225–233.
 57. Nieto Calvache J, Cueto M, Farroni A, Escalada M, Gerschenson LN. Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya L.*). Journal of Functional Foods. 2016; 27: 319–328.
 58. Faller A, Fialho E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. Journal of Food Composition and Analysis. 2010; 23: 561–568.
 59. Kelebek H, Selli S, Gubbuk H, Gunes E. Comparative evaluation of volatiles, phenolics, sugars, organic acids and antioxidant properties of Sel-42 and Tainung papaya varieties. Food Chemistry. 2014; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.116>.
 60. Pavan V, Sancho RA, Pastore GM. The effect of in vitro digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and *Annona marcgravii*). Food Science and Technology. 2014; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.040>.
 61. Chen X, Tait A, Kitts D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Chemistry. 2017; 218: 15–21.
 62. Albertos I, Jaime I, Diez AM, González-Arnáiz L, Rico D. Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4°C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). Food Science and Technology. 2015; 64: 650-656.

63. Briones-Labarca V, Plaza-Morales M, Giovagnoli-Vicuña C, Jamett F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulfuraphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *Food Science and Technology*. 2015; 60: 525-534.
64. Barrales F, Rezende C, Martínez J. Supercritical CO₂ extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *J. of Supercritical Fluids*. 2015; 104: 183–192.
65. Rincón AM, Tapia MS, Padilla F. Evaluación de fitoquímicos en el exocarpio (cáscara) de algunas frutas cultivadas en Venezuela. *Revista Facultad de Farmacia*. 2003; 66 (2): 73-78.
66. Jiménez-Escrig A, Rincón AM, Pulido R, Saura-Calixto F. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49: 5489-5493.
67. Can-Cauich C, Sauri-Duch E, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L, González-Aguilar G, Cuevas-Glory L, Pérez-Pacheco E, Moo-Huchin V. Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2017; 37: 501–506.
68. Pinzon I, Fischer G, Corredor G. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis Sims.*). *Agronomía Colombiana*, 2007; 25(1): 83-95.
69. Umaña G, Loría CL, Gómez JC. Efecto del grado de madurez y las condiciones de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas de la papaya híbrido pococí. *Agronomía Costarricense*. 2011; 35(2): 61-73.
70. Santamaría F, Díaz R, Sauri Duch E, Espadas F, Santamaría JM, Larqué Saavedra A. Características de calidad de frutos de papaya maradol en la madurez de consumo. *Agricultura Técnica en México*. 2009; 35(1): 347-353.

9. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Polifenoles: Compuestos aromáticos que generalmente presentan grupos funcionales oxigenados que en la mayoría de los casos son fenoles.

Flavonoides: Son metabolitos secundarios polifenólicos comúnmente con un grupo cetona y normalmente pigmentos de coloración amarilla.

Taninos: Flavonoides polimerizados de alto peso molecular. También llamados proantocianidinas.

Ultrasonido: Extracción catalítica de compuestos impulsados por ondas magnéticas de alto esfuerzo cortante y cavitacional que mejoran las velocidades de disolución de los solutos y conducen significativamente a una extracción más rápida y completa

DPPH: 2,2-difenil-picril-hidracil. Reactivo que en condiciones *in vitro* genera radicales.

Poder reductor: Capacidad que tienen los compuestos fenólicos de reducir un determinado compuesto mediante una reacción de óxido reducción.

Liofilización: Deshidratación al frío de compuestos termolábiles. Elimina el agua presente en una muestra por sublimación de la misma.

Sólidos solubles totales: Contenido de azúcares (sacarosa) en la pulpa de las frutas.

EC₅₀: Concentración que requiere un extracto para capturar el 50% de los radicales libres presentes en el medio de reacción.

TEC₅₀: Tiempo requerido para obtener el EC₅₀.

10. ABREVIATURAS

EUA: Extracción asistida por ultrasonido

HHPE: Alta presión hidrostática

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RL: Radicales libres

SOD: Superóxido dismutasa

CAT: Catalasa

UV: Ultravioleta

C. papaya: *Carica papaya*

P. edulis: *Passiflora edulis*

DPPH●: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

FRAP: Análisis del poder reductor férrico/antioxidante

DMSO: Dimetilsulfóxido

SST: Sólidos solubles totales.

OH: Grupo hidroxilo

MeOH: Metanol

EtOH: Etanol

IsopOH: Isopropanol

µg: microgramos

mM: milimolar

CP: cáscaras de parchita

SP: semillas de parchita

CL: cáscara de lechosa

SL: semilla de lechosa

AA: actividad antioxidante

11. APÉNDICE

Se realizó el análisis ANOVA de los valores de polifenoles, flavonoides y taninos para determinar cómo influyen sobre estos dos factores: solvente y método de extracción. Para ello se colocó en una columna los solventes de extracción identificados como 1: metanol, 2: etanol y 3: isopropanol. En la segunda columna se colocó el método empleado siendo 1: agitación y 2: sonicación. En las 3ra, 4ta y 5ta columnas se colocaron los valores de polifenoles, flavonoides o taninos para cada muestra respectivamente.

Para señalar el efecto del solvente se tomaron todos los resultados de estos en un mismo método y se compararon unos con otros. Asimismo, se compararon entre sí los datos de polifenoles, flavonoides y taninos para cada solvente de extracción independientemente de la técnica utilizada.

Por otra parte, para determinar la influencia de la técnica de extracción se tomaron todos los valores de polifenoles, flavonoides y taninos de un mismo método y se compararon con los valores obtenidos por el otro método.

Seguidamente se presentan las tablas resumen de aplicación de ANOVA entendiéndose que probabilidades $p < 0.05$ indica que hay un efecto de las variables estudiadas; es decir, que hay diferencias estadísticamente significativas. En este apartado solo se muestran los resultados de ANOVA obtenidos y la explicación de los resultados se les presenta en el apartado de resultados y discusión.

11.1. Apéndice A: Polifenoles totales

Tabla 16. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en cáscaras de *P. edulis*.

ANOVA Table for PP CP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	211865,0	2	105932,0	380,38
Within groups	14203,0	51	278,49	
Total (Corr.)	226068,0	53		

Multiple Range Tests for PP CP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	18	578,632	X
1	18	681,064	X
3	18	728,773	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*102,432	11,1
1 - 3	*-47,7091	11,1
2 - 3	*-150,141	11,1

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 17. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CP por sonicación.

Analysis of Variance for PP CP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	87626,4	2	43813,2	861,94	0,0000
RESIDUAL	1219,95	24	50,8311		
TOTAL (CORRECTED)	88846,3	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for PP CP S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	590,812	2,37653	X
1	9	704,251	2,37653	X
3	9	717,91	2,37653	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*113,439	6,93662
1 - 3	*-13,6591	6,93662
2 - 3	*-127,098	6,93662

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 18. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en CP independientemente del solvente.

ANOVA Table for PP CP Todos by METODO

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2463,29	1	2463,29	0,57	0,4525
Within groups	223605,0	52	4300,09		
Total (Corr.)	226068,0	53			

Multiple Range Tests for PP CP Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD					
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups		
1	27	656,069	X		
2	27	669,577	X		
Contrast			Difference	+/-	Limits
1 - 2			-13,508	35,8132	

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 19. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SP por agitación.

ANOVA Table for PP SP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-R
Between groups	1,18954E6	2	594769,0	
Within groups	6,90241E6	51	135341,0	
Total (Corr.)	8,09195E6	53		

Multiple Range Tests for PP SP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups	
2	18	1346,88	X	
1	18	1426,66	X	
3	18	1693,94	X	
Contrast			Difference	+/- L:
1 - 2			79,7779	246,183
1 - 3			*-267,283	246,183
2 - 3			*-347,061	246,183

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 20. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SP por sonicación.

Multiple Range Tests for PP SP S by STE

STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	9	1292,3	3,39627	X
2	9	1642,52	3,39627	X
3	9	2220,05	3,39627	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-350,222	9,91302
1 - 3	*-927,751	9,91302
2 - 3	*-577,529	9,91302

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for PP SP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	3,95075E6	2	1,97537E6	19028,47	0,0000
RESIDUAL	2491,48	24	103,812		
TOTAL (CORRECTED)	3,95324E6	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 21. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en SP independientemente del solvente.

ANOVA Table for PP SP Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Rat
Between groups	2,84908E6	1	2,84908E6	28,
Within groups	5,24287E6	52	100824,0	
Total (Corr.)	8,09195E6	53		

Multiple Range Tests for PP SP Todos by METODO

METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	1259,46	X
2	27	1718,86	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*-459,394	173,

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 22. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CL por agitación.

ANOVA Table for PP CL Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	83453,2	2	41726,6	31,70
Within groups	67123,7	51	1316,15	
Total (Corr.)	150577,0	53		

Multiple Range Tests for PP CL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	18	793,607	X
3	18	861,732	X
1	18	886,607	X
Contrast	Difference		+/- Lim
1 - 2	*93,0004		24,2776
1 - 3	*24,8755		24,2776
2 - 3	*-68,1249		24,2776

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 23. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en CL por sonicación.

Multiple Range Tests for PP CL S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	847,26	1,96405	X
1	9	860,99	1,96405	X
3	9	867,462	1,96405	X
Contrast	Difference		+/- Limits	
1 - 2	*13,7306		5,73268	
1 - 3	*-6,47165		5,73268	
2 - 3	*-20,2023		5,73268	

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for PP CL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	1915,63	2	957,817	27,59	0,0000
RESIDUAL	833,221	24	34,7176		
TOTAL (CORRECTED)	2748,86	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 24. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en CL independientemente del solvente.

ANOVA Table for PP CL Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	6840,62	1	6840,62	2,4
Within groups	143736,0	52	2764,16	
Total (Corr.)	150577,0	53		

Multiple Range Tests for PP CL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	836,06	X
2	27	858,571	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	-22,5103	28,71

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 25. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SL por agitación.

ANOVA Table for PP SL Todos by STE

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	74494,4	2	37247,2	2,84	0,0679
Within groups	669546,0	51	13128,4		
Total (Corr.)	744041,0	53			

Multiple Range Tests for PP SL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
3	18	624,053	X
2	18	650,664	XX
1	18	712,702	X

Contrast	Difference	+/-	Limit:
1 - 2	62,0386	76,6758	
1 - 3	*88,6498	76,6758	
2 - 3	26,6112	76,6758	

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 26. Análisis de varianza del efecto solvente para polifenoles totales en SL por sonicación.

Multiple Range Tests for PP SL S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	621,611	2,87633	X
3	9	633,934	2,87633	X
1	9	902,803	2,87633	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*281,192	8,39543
1 - 3	*268,87	8,39543
2 - 3	*-12,3227	8,39543

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for PP SL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	454536,0	2	227268,0	3052,23	0,0000
RESIDUAL	1787,03	24	74,4595		
TOTAL (CORRECTED)	456323,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 27. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para polifenoles totales en SL independientemente del solvente.

ANOVA Table for PP SL Todos by METODO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	170465,0	1	170465,0	15,45	0,0003
Within groups	573576,0	52	11030,3		
Total (Corr.)	744041,0	53			

Multiple Range Tests for PP SL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD

METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	606,288	X
2	27	718,658	X

Contrast	Difference	+/- I
1 - 2	*-112,37	57,358

* denotes a statistically significant difference.

11.2. Apéndice B: Flavonoides totales

Tabla 28. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CP por agitación.

ANOVA Table for FV CP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	52999,3	2	26499,6	45,51
Within groups	29699,3	51	582,34	
Total (Corr.)	82698,6	53		

Multiple Range Tests for FV CP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups	
2	18	157,856	X	
1	18	218,413	X	
3	18	228,954	X	
Contrast			Difference	+/
1 - 2			*60,5573	16
1 - 3			-10,5406	16
2 - 3			*-71,0979	16

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 29. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CP por sonicación.

Multiple Range Tests for FV CP S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	8	167,666	3,82688	X
3	9	194,821	3,60802	X
1	10	201,887	3,42287	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*34,2209	10,5967
1 - 3			7,06618	10,2644
2 - 3			*-27,1547	10,8552

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of variance for FV CP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	5602,62	2	2801,31	23,91	0,0000
RESIDUAL	2811,85	24	117,16		
TOTAL (CORRECTED)	8414,47	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 30. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en CP independientemente del solvente.

ANOVA Table for FV CP Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	8234,17	1	8234,17	5,75
Within groups	74464,4	52	1432,01	
Total (Corr.)	82698,6	53		

Multiple Range Tests for FV CP Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD				
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups	
2	27	189,392	X	
1	27	214,089	X	
Contrast			Difference	+/- 1
1 - 2			*24,6969	20,66'

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SP por agitación.

ANOVA Table for FV SP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Rat
Between groups	60479,4	2	30239,7	6,
Within groups	248292,0	51	4868,46	
Total (Corr.)	308771,0	53		

Multiple Range Tests for FV SP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups	
2	18	364,974	X	
1	18	415,311	X	
3	18	446,175	X	
Contrast			Difference	+/- Lir
1 - 2			*50,3365	46,6927
1 - 3			-30,8641	46,6927
2 - 3			*-81,2006	46,6927

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 32. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SP por sonicación.

Multiple Range Tests for FV SP S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	8	322,171	12,0044	X
1	10	455,803	10,737	X
3	9	537,33	11,3178	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*133,633	33,2403
1 - 3	*-81,527	32,198
2 - 3	*-215,16	34,0512

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for FV SP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	198517,0	2	99258,6	86,10	0,0000
RESIDUAL	27668,2	24	1152,84		
TOTAL (CORRECTED)	226185,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 33. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en SP independientemente del solvente.

ANOVA Table for FV SP Todos by METODO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	64513,3	1	64513,3	13,73
Within groups	244258,0	52	4697,26	
Total (Corr.)	308771,0	53		

Multiple Range Tests for FV SP Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	374,256	X
2	27	443,384	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*-69,1286	37,

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 34. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CL por agitación.

ANOVA Table for FV CL Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	154381,0	2	77190,3	13,55
Within groups	290510,0	51	5696,27	
Total (Corr.)	444890,0	53		

Multiple Range Tests for FV CL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD

STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	18	129,56	X
1	18	219,434	X
3	18	257,002	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*89,8742	50,5
1 - 3	-37,5676	50,5
2 - 3	*-127,442	50,5

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 35. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en CL por sonicación.

Multiple Range Tests for FV CL S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	8	130,616	6,75145	X
1	10	213,034	6,03868	X
3	9	383,378	6,36532	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*82,4185	18,6949
1 - 3	*-170,343	18,1087
2 - 3	*-252,762	19,1509

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of variance for FV CL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	287219,0	2	143610,0	393,82	0,0000
RESIDUAL	8751,75	24	364,656		
TOTAL (CORRECTED)	295971,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 36. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en CL independientemente del solvente.

ANOVA Table for FV CL Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	101696,0	1	101696,0	15,41
Within groups	343194,0	52	6599,89	
Total (Corr.)	444890,0	53		

Multiple Range Tests for FV CL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	158,602	X
2	27	245,395	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*-86,7931	44,36

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 37. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SL por agitación.

ANOVA Table for FV SL Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	1129,39	2	564,696	9,74
Within groups	2955,84	51	57,9577	
Total (Corr.)	4085,23	53		

Multiple Range Tests for FV SL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	18	25,1564	X
2	18	28,8376	X
3	18	36,1596	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	-3,68123	5,0
1 - 3	*-11,0032	5,0
2 - 3	*-7,32194	5,0

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 38. Análisis de varianza del efecto solvente para flavonoides totales en SL por sonicación.

Multiple-Range Tests for FV SL S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	10	23,1575	1,179	X
2	8	23,3228	1,31816	X
3	9	26,4289	1,24277	X
Contrast		Difference		+/- Limits
1 - 2		-0,165305		3,65
1 - 3		-3,2714		3,53555
2 - 3		-3,1061		3,73904

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for FV SL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	61,4822	2	30,7411	2,21	0,1314
RESIDUAL	333,608	24	13,9003		
TOTAL (CORRECTED)	395,09	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 39. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para flavonoides totales en SL independientemente del solvente.

ANOVA Table for FV SL Todos by METODO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	1788,0	1	1788,0	40,4
Within groups	2297,24	52	44,1776	
Total (Corr.)	4085,23	53		

Multiple Range Tests for FV SL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	27	24,297	X
1	27	35,8054	X
Contrast		Difference	
1 - 2		*11,5084	

* denotes a statistically significant difference.

11.3. Apéndice C: Taninos condensados.

Tabla 40. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CP por agitación.

ANOVA Table for TN CP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	87551,0	2	43775,5	5,8
Within groups	383189,0	51	7513,5	
Total (Corr.)	470740,0	53		

Multiple Range Tests for TN CP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	18	255,465	X
3	18	277,332	X
2	18	349,689	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*-94,224	58,0
1 - 3	*-21,8673	58,0
2 - 3	*72,3567	58,0

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 41. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CP por sonicación.

Multiple Range Tests for TN CP S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	332,093	2,05748	X
2	9	363,458	2,05748	X
1	9	389,466	2,05748	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*26,0085	6,00537
1 - 3	*57,3733	6,00537
2 - 3	*31,3647	6,00537

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for TN CP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	14855,6	2	7427,82	194,96	0,0000
RESIDUAL	914,377	24	38,0991		
TOTAL (CORRECTED)	15770,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 42. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en CP independientemente del solvente.

ANOVA Table for TN CP Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	246113,0	1	246113,0	56,97
Within groups	224627,0	52	4319,75	
Total (Corr.)	470740,0	53		

Multiple Range Tests for TN CP Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	226,652	X
2	27	361,672	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*-135,021	35,89

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 43. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SP por agitación.

ANOVA Table for TN SP Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	276334,0	2	138167,0	23,7
Within groups	297338,0	51	5830,16	
Total (Corr.)	573673,0	53		

Multiple Range Tests for TN SP Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	18	365,489	X
3	18	454,343	X
1	18	540,708	X

Contrast	Difference	+/-
1 - 2	*175,219	51,0
1 - 3	*86,3642	51,0
2 - 3	*-88,8549	51,0

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 44. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SP por sonicación.

Multiple Range Tests for TN SP S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	337,545	3,24455	X
3	9	353,22	3,24455	X
1	9	613,095	3,24455	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*275,55	9,47018
1 - 3	*259,875	9,47018
2 - 3	*-15,675	9,47018

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for TN SP S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	431125,0	2	215562,0	2275,21	0,0000
RESIDUAL	2273,85	24	94,7438		
TOTAL (CORRECTED)	433399,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 45. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en SP independientemente del solvente.

ANOVA Table for TN SP Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	19275,1	1	19275,1	1,81
Within groups	554397,0	52	10661,5	
Total (Corr.)	573673,0	53		

Multiple Range Tests for TN SP Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	27	434,62	X
1	27	472,406	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	37,786	56,39

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 46. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CL por agitación.

ANOVA Table for TN CL Todos by STE

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	283742,0	2	141871,0	49,80
Within groups	145280,0	51	2848,63	
Total (Corr.)	429022,0	53		

Multiple Range Tests for TN CL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD

STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
3	18	422,821	X
2	18	476,663	X
1	18	596,271	X

Contrast	Difference	+/- Li
1 - 2	*119,609	35,7167
1 - 3	*173,451	35,7167
2 - 3	*53,842	35,7167

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 47. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en CL por sonicación.

Multiple Range Tests for TN CL S by STE

Method: 95,0 percent LSD

STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	363,468	1,56755	X
2	9	519,38	1,56755	X
1	9	647,541	1,56755	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*128,161	4,57536
1 * 3	*284,073	4,57536
2 - 3	*155,912	4,57536

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for TN CL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:STE	364294,0	2	182147,0	8236,42	0,0000
RESIDUAL	530,756	24	22,1148		
TOTAL (CORRECTED)	364825,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 48. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en CL independientemente del solvente.

ANOVA Table for TN CL Todos by METODO

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ra
Between groups	7196,94	1	7196,94	C
Within groups	421825,0	52	8112,02	
Total (Corr.)	429022,0	53		

Multiple Range Tests for TN CL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	487,04	X
2	27	510,129	X

Contrast	Difference
1 - 2	-23,0891

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 49. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SL por agitación.

ANOVA Table for TN SL Todos by STE

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ra
Between groups	196905,0	2	98452,3	4
Within groups	1,24007E6	51	24315,0	
Total (Corr.)	1,43697E6	53		

Multiple Range Tests for TN SL Todos by STE

Method: 95,0 percent LSD			
STE	Count	Mean	Homogeneous Groups
3	18	462,335	X
1	18	491,424	X
2	18	602,474	X

Contrast	Difference	+/- L
1 - 2	*-111,05	104,35
1 - 3	29,0895	104,35
2 - 3	*140,14	104,35

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 50. Análisis de varianza del efecto solvente para taninos condensados en SL por sonicación.

Multiple Range Tests for TN SL S by STE

Method: 95,0 percent LSD				
STE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	371,167	3,43393	X
2	9	532,844	3,43393	X
1	9	726,872	3,43393	X
Contrast		Difference		+/- Limits
1 - 2		*194,028		10,023
1 - 3		*355,705		10,023
2 - 3		*161,676		10,023

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for TN SL S - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-value
MAIN EFFECTS					
A:STE	570936,0	2	285468,0	2689,87	0,0000
RESIDUAL	2547,05	24	106,127		
TOTAL (CORRECTED)	573483,0	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 51. Análisis de varianza del efecto de la técnica de extracción para taninos condensados en SL independientemente del solvente.

ANOVA Table for TN SL Todos by METODO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	33435,5	1	33435,5	1,24
Within groups	1,40354E6	52	26991,1	
Total (Corr.)	1,43697E6	53		

Multiple Range Tests for TN SL Todos by METODO

Method: 95,0 percent LSD			
METODO	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	27	493,861	X
2	27	543,628	X
Contrast		Difference	+/- Limit:
1 - 2		-49,7665	89,7253

* denotes a statistically significant difference.