



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en alimentos tradicionales de la población ecuatoriana

ARTÍCULO ACADÉMICO

AUTOR: Salcedo Ramírez, James Andrés.

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL ARTÍCULO ACADÉMICO

Magister.

Luis Emilio Cartuche Flores

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente artículo académico: Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en alimentos tradicionales de la población ecuatoriana realizado por Salcedo Ramírez James Andrés ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Salcedo Ramírez James Andrés declaro ser autor del presente artículo académico: Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en alimentos tradicionales de la población ecuatoriana de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f)
Salcedo Ramírez James Andrés
1104960560

DEDICATORIA

A Dios, que me ha dado las fuerzas, salud y la capacidad para poder elegir mi carrera.

A mi familia, con inmensa gratitud y amor, de manera muy especial le dedico a mi mamá, Nory F. Ramírez Asanza, quien con sus sabios consejos y amor incondicional, guio cada uno de mis logros obtenidos y me representó en cada uno de ellos con mucha responsabilidad y sacrificio abnegado, tanto moral como económico; haciendo posible mi meta propuesta.

A mi hermana, Noamy Salomé le dedico con mucho cariño, quien es mi motivación, para poder culminar mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

Al culminar la tercera etapa de mis estudios, quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento y gratitud, a todos los profesores de la Titulación de Bioquímica y Farmacia; de manera muy especial a mi director de tesis M. Sc. Luis Emilio Cartuche F., quien con su ayuda pedagógica y sus acertadas sugerencias, hizo posible que llegara con éxito a la culminación este trabajo investigativo.

También mi agradecimiento sincero a todos mis compañeros de carrera; que durante estos cinco años, compartimos maravillosos momentos y experiencias vividas; de manera especial a mi amiga y compañera Lisseth Torres con quien compartí la realización del proyecto y trabajo, dentro del laboratorio; brindándome su sincera amistad y ayuda académica.

De igual manera agradezco a mi amigo Luis David León, por ofrecerme su amistad y su ayuda incondicional, tanto en momentos alegres como en momentos difíciles.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL ARTÍCULO ACADÉMICO	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	viii
ÍNDICE DE CÁLCULOS	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Alimentos funcionales.....	6
1.2. Importancia nutricional de las legumbres.	6
1.2.1. <i>Fréjol cóndor (Phaseolus vulgaris).</i>	6
1.2.2. <i>Haba pallar (Phaseolus lunatus var. big lima).</i>	8
1.2.3. <i>Amaranto alegría (Amaranthus caudatus L.).</i>	8
1.2.4. <i>Gandúl (Cajanus cajan).</i>	9
1.2.5. <i>Quínua (Chenopodium quinoa).</i>	9
1.2.6. <i>Habichuela (Phaseolus lunatus var. baby lima)</i>	10
1.3. Antioxidantes.....	11
1.3.1. <i>Actividad Antirradicalaria y Antioxidante</i>	11
1.3.2. <i>Radicales Libres.</i>	12
1.4. Procesos de extracción.....	13
1.5. Ensayo para la determinación de compuestos fenólicos.....	14
1.5.1. <i>Método Folin & Ciocalteu.</i>	14
1.6. Ensayos para la determinación de actividad antioxidante.	14
1.6.1. <i>Método ABTS.</i>	14
1.6.2. <i>Método DPPH.</i>	15
1.6.3. <i>Método FRAP.</i>	15
CAPÍTULO II	16

METODOLOGÍA.....	16
2.1. Obtención de muestras.....	17
2.2. Obtención de extractos.....	17
2.3. Cuantificación de fenoles totales.....	18
2.3.1. Curva de calibración.....	18
2.3.2. Fenoles totales.....	18
2.4. Determinación de capacidad antioxidante.....	19
2.4.1. Curva de calibración.....	19
2.4.2. Análisis de resultados.....	21
CAPÍTULO III	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1. Calidad fenólica de alimentos tradicionales del Ecuador	24
3.2. Capacidad antioxidante de alimentos tradicionales del Ecuador	25
3.3. Evaluación de la capacidad de eliminación de radicales libres 50 (SC₅₀)	29
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS	37
Anexo 1. Preparación de reactivos para extracción	38
Anexo 2. Curva de calibración y cálculos para determinación de Fenoles Totales ..	39
Anexo 3. Preparación de estándares para los métodos DPPH, FRAP y ABTS.....	41
Anexo 4. Curvas de calibración y cálculos para determinación de la capacidad antioxidante en DPPH, FRAP y ABTS.....	42
Anexo 5. Porcentaje de Humedad y Rendimiento.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia de las legumbres para el estudio de actividad antioxidante.....	17
Tabla 2. Preparación de estándares de ácido gálico.....	18
Tabla 3. Preparación estándares de Trolox	19
Tabla 4. Contenido de compuestos Fenólicos Totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) en Base Seca (BS).....	24
Tabla 5. Actividad Antioxidante mediante el ensayo de DPPH, expresado en μ moles equivalentes de Trolox (μ M TE) en Base Seca.....	26
Tabla 6. Actividad Antioxidante mediante el ensayo de FRAP, expresado en μ moles equivalentes de Trolox (μ M TE) en Base Seca.....	27
Tabla 7. Actividad Antioxidante ensayo en ABTS expresados en μ moles equivalentes de Trolox (μ M TE) en Base Seca.....	28

Tabla 8. Capacidad de secuestro media SC_{50} , tanto de extractos crudos del fréjol y gandúl como del estándar Trolox, expresadas en $\mu\text{g/mL}$ de muestra.	29
Tabla 9. Concentraciones de ácido gálico.	39
Tabla 10. Concentraciones de Trolox para DPPH	42
Tabla 11. Concentraciones de Trolox para FRAP.....	45
Tabla 12. Concentraciones de Trolox para ABTS.....	49
Tabla 13. % Humedad de las muestras en crudo	51
Tabla 14. % Rendimiento de las muestras en crudo y cocido.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva estándar de Fenoles Totales	39
Gráfica 2. Curva estándar de DPPH	42
Gráfica 3. Curva estándar de FRAP	45
Gráfica 4. Curva estándar de ABTS.....	49

ÍNDICE DE CÁLCULOS

Ejemplo 1. Cálculos para Fenoles Totales	40
Ejemplo 2. Cálculos para DPPH	43
Ejemplo 3. Cálculos para FRAP	46
Ejemplo 4. Cálculos para ABTS.....	50

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la calidad fenólica y capacidad antioxidante de 6 muestras en harina cruda y cocida, que forman parte del proyecto de la red REDU y se clasifican dentro de las leguminosas y pseudocereales. Se obtuvieron extractos siguiendo los métodos descritos por Pérez J. & Saura-Calixto F. (2007). La calidad fenólica de amaranto, fréjol cóndor, haba pallar, habichuela, gandúl y quínoa; se evaluó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y, la capacidad antioxidante se midió con las metodologías de DPPH, ABTS y FRAP. El fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y gandúl (*Cajanus cajan*) destacaron por su capacidad antirradicalaria, tanto para los extractos obtenidos de muestra en harina cruda como cocida, con valores superiores a los 15 μM TE/g muestra BS. De la misma manera, para los ensayos de DPPH y ABTS, se calculó los valores de SC_{50} de fréjol (290 μg /mL) y gandúl (287,24 μg /mL), siendo estos superiores a sus homólogos, reportados por literatura.

Palabras claves: leguminosas, pseudocereales, actividad antirradicalaria, DPPH, ABTS, FRAP, compuestos fenólicos, Folin-Ciocalteu, SC_{50} , fréjol.

ABSTRACT

In the present research, the phenolic content and antioxidant capacity of 6 sample in raw and cooked flour. These foods are part of the REDU project, and they are classified into legumes and pseudocereals. Extracts were obtained following the methods described by Pérez J. & Saura-Calixto F. (2007). The phenolic content of amaranth, cóndor bean, pallar bean, bean, gandul and quinoa were evaluated using the Folin-Ciocalteu reagent and the antioxidant capacity was measured using the DPPH, ABTS and FRAP methods. Frejol (*Phaseolus vulgaris*) and gandúl (*Cajanus cajan*) exhibited the higher antiradical capacity, both for extracts obtained from sample in raw flour as cooked, with values higher than 15 $\mu\text{M TE / g BS}$. Similarly, for the DPPH and ABTS assays, the SC_{50} values of fréjol (290 $\mu\text{g / mL}$) and gandúl (287.24 $\mu\text{g / mL}$) were calculated, being higher than their homologues, reported in the literatura.

Keywords: legumes, pseudocereals, antiradical activity, DPPH, ABTS, FRAP, phenolic compounds, Folin-Ciocalteu, SC_{50} , fréjol.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el consumo de legumbres, en las familias del área urbana es menor en la Sierra (54%) y Oriente (44%), mientras que en la costa aumenta a 78% de las familias. El consumo mensual en la Costa y Oriente es de 0,5 kg y en la Sierra 0,4 kg; cuando lo recomendable es 0,8 kg por persona al mes (Caicedo V., & Peralta I., 1999). Por lo tanto, es indispensable incrementar el consumo de estos alimentos en las familias ecuatorianas, con el propósito de mejorar la calidad de vida en la población, con alimentos que aporten con antioxidantes, para que protejan al cuerpo de diferentes enfermedades degenerativas.

Los productos agrícolas, como las legumbres, son considerados alimentos de consumo popular; y son las clases socioeconómicas medio y bajo las que demandan en mayor cantidad estos subproductos. Además, la mayoría de la población urbana consume legumbres tanto secas como frescas por costumbre, tradición y porque conoce de alguna manera el valor nutritivo que aportan estos alimentos. Dentro del grupo de las legumbres, nos centraremos en las siguientes especies: amaranto alegría (*Amaranthus caudatus* L.), fréjol cóndor (*Phaseolus vulgaris* L.), haba pallar (*Phaseolus lunatus big lima*), habichuela (*Phaseolus lunatus baby lima*), gandúl (*Cajanus cajan*) y quínoa (*Chenopodium quinoa*), que son objeto de análisis para la presente investigación, debido no sólo a su contenido de proteínas, micronutrientes y vitaminas, necesarias para el desarrollo humano, sino también por la expectativa, respecto a su potencial en capacidad antioxidante, que pueda brindar a nuestro organismos.

Por lo tanto, el mercado de las legumbres tiene fortalezas socioeconómicas frente a otros productos alimenticios.

Se sabe que los diferentes beneficios que aportan para la salud, están asociados con la fibra dietética y productos fitoquímico, como los polifenoles presentes en las leguminosas (Marathe S., *et al.* 2011). Se cree generalmente que los antioxidantes barren a los radicales libres y especies reactivas del oxígeno e inhiben así los mecanismos oxidativos que conducen a enfermedades degenerativas. Los mecanismos biológicos antioxidantes que posee nuestro organismo, aunque combaten el estrés oxidativo, no suelen ser lo suficientemente eficaces, es por ello que los antioxidantes naturales, obtenidos en la dieta, fortalecen la protección de las células del cuerpo humano (Marathe S., *et al.* 2011).

Los polifenoles, en literatura se los considera como antioxidantes dietéticos importantes, y que pueden actuar como agentes reductores, quelantes de iones metálicos y supresores de oxígeno libre, por tanto, previenen la oxidación de biomoléculas tales como ADN, lípidos y proteínas. (Marathe S., *et al.* 2011)

Científicos han documentado el potencial antioxidante de polifenoles tanto en frutas como verduras y su correlación con la reducción de la incidencia de enfermedades degenerativas.

Sin embargo, estudios en leguminosas son escasos, a la vez se han documentado la detección de la actividad antioxidante in vitro de las leguminosas (Marathe S., *et al.* 2011).

Por tal motivo, se evaluó el potencial antirradicalaria y su relación con el contenido fenólicos de las siguientes legumbres: amaranto alegría, fréjol cóndor, haba pallar, habichuela, gandúl y quínoa; considerando que las muestras serán procesadas en harina cruda y harina cocida. Optimizando los parámetros de extracción, cuantificando fenoles totales y determinando la capacidad antirradicalaria; de tal manera, dando a conocer a la sociedad en general, acerca de las diferentes fuentes de antioxidantes, que las legumbres puedan aportar.

Para el desarrollo de la investigación, las muestras fueron provistas por parte de la Red Ecuatoriana de Universidades para Investigación y Posgrados (REDU) con el código del proyecto (Proy_Fin_0020), como fueron la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Escuela Politécnica Nacional e Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias; tales muestras se precisó trabajar con el tamaño adecuado de partícula (500 μm), la extracción se realizó mediante maceración dinámica, utilizado solventes como metanol al 50% acidificado (HCl) y acetona glacial al 70% y con relación muestra/solvente, descrita la metodología de extracción por Pérez & Saura- Calixto (2007).

Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida, y se les determinó el contenido de fenoles totales, con el método Folin- Ciocalteu, y para la determinación de antioxidante se utilizó los métodos de DPPH, FRAP y ABTS.

El presente trabajo, se encuentra dividido en tres capítulos. En el primer capítulo se describe el marco teórico que abarca toda la información científica para el desarrollo de la investigación. En el segundo capítulo se contempla la metodología con la que fue realizada, y en el tercer capítulo se analiza y discute los resultados obtenidos.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Alimentos funcionales.

En los últimos años, las industrias de alimentos, cosméticas y farmacéuticas, han tenido que enfrentarse a la tendencia de los consumidores a exigir en los productos ingredientes “no químicos”, con el fin de favorecer y cuidar su salud. En estas industrias, los antioxidantes fenólicos tienen aplicación como sustituto de componentes sintéticos y como ingredientes activos, por ejemplo un aditivo para proteger la piel en dermatología. Sin embargo no se reporta avances científicos considerables con respecto a legumbres, siendo primordiales en la dieta cotidiana en los ecuatorianos (Cerón I. & Cardona C., 2010).

Se conoce como alimentos funcionales a todos los productos alimenticios que son consumidos en la dieta diaria, y tienen la capacidad de aportar nutrientes gracias a sus componentes bioactivos, los mismos que ejercen varios efectos farmacológicos que interactúan entre ellas, con el fin de potenciar diversos tratamientos terapéuticos benéficos para la salud, nutrición, entre otros beneficios innovadores. Muchos componentes bioactivos han sido distribuidos comercialmente como productos nutracéuticos, como los suplementos dietéticos bioactivos que se ingieren en forma concentrada en píldoras, pastillas, cápsulas o tónicos. En la industria farmacéutica, también los alimentos funcionales de origen vegetal representan una fuente potencial de componentes bioactivos, los mismos que han servido para el desarrollo de fármacos inocuos y altamente eficaces (Serrano M. D., *et al.* 2006).

Sabiendo el gran aporte de muchos alimentos funcionales, es importante realizar ensayos y múltiples investigaciones enfocadas en la extracción de varios principios activos de la diversidad de alimentos que tal vez comúnmente consumimos y pocas veces sabemos los beneficios que prestan todos estos (Serrano M. D., *et al.* 2006).

1.2. Importancia nutricional de las legumbres.

La tendencia actual de la población, en el consumo creciente, nos indica que se debe tomar medidas para hacer frente a la provisión de proteínas de origen animal ya que es difícil y costoso su adquisición. Una alternativa para mejorar el estado nutricional de las personas es complementar la dieta con proteínas vegetales. Por lo tanto, se debe dirigir a la evaluación nutricional de proteínas de especies vegetales (Iqbal A., *et al.* 2006).

Las leguminosas juegan un papel importante en la nutrición humana, ya que son ricas fuentes de proteínas, calorías, ciertos minerales y vitaminas. En las dietas afroasiáticas, como también en latinas, las leguminosas son principales contribuyentes de proteínas y calorías por razones económicas y culturales (Iqbal A., *et al.* 2006).

1.2.1. Fréjol cóndor (*Phaseolus vulgaris*).

Es una leguminosa que se desarrolla perfectamente tanto en climas cálidos y templados, bajo condiciones ecológicas muy variadas. El fréjol es altamente susceptible a enfermedades, las

mismas que limitan la productividad, especialmente en los trópicos (Peralta I. & Mazón N., 2009).

Mayoritariamente a nivel de Sur América esta leguminosa es una de las más acogidas en la industria alimentaria, por su gran aporte nutricional y su valor económico relativamente bajo. (Peralta I. & Mazón N., 2009).

En Ecuador la superficie de fréjol comprende 121 mil hectáreas, prestando un aporte del 40 y 70% del ingreso familiar. Para los agricultores éste es un producto no perecible que puede almacenarse para su consumo durante todo el año. Hace algún tiempo, se consumía únicamente el 20% de la producción, mientras que el 80% restante se destinaba a la exportación hacia Colombia; actualmente según estadísticas, se adquiere un 20% de la producción para los programas de alimentación, lo que suma el 40% para el consumo nacional. La importancia de este producto también radica en que la comercialización se realiza a nivel de pequeños productores, lo que amplía el incentivo para el cultivo y mejora su calidad de vida (Peralta I. & Mazón N., 2009).

Esta leguminosa es considerada como un componente básico en la alimentación diaria, ya que proporciona aproximadamente un 22% de proteínas, siendo relativamente económico si lo comparamos con otro tipo de proteínas origen animal, especialmente la carne. Además, es una leguminosa que mejora los suelos debido a las bacterias nitrificantes que se adhieren a las raíces (Ochoa T., 2013). Diversas propiedades nutritivas que posee el fréjol están relacionadas por su alto contenido proteico y en menor medida a su aportación de carbohidratos, vitaminas y minerales. Dependiendo del tipo de fréjol, el contenido de proteínas varía entre el 14 al 33%, siendo rico en aminoácidos como la lisina y la fenilalanina más tirosina, de acuerdo a evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína del fréjol cocido puede llegar a contener hasta el 70% de proteínas (Rodiño M., 2000).

En Ecuador la calidad del fréjol no ha alcanzado los niveles esperados ya sea para consumo interno o para exportaciones, pues, únicamente se cultivan semillas tradicionales que son de bajo rendimiento debido a su constitución genética, entre ellos, la susceptibilidad a plagas y enfermedades, por cuanto un mayor enfoque al tratamiento de esta especie de leguminosa sería en lo posterior una gran inversión a nivel nacional e internacional (INEC 2014).

En los últimos años los frejoles han atraído mucho a atención ya que posee pigmentos funcionales y efectos promotores de la salud en relación con la prevención de enfermedades crónicas, incluidos diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. Previamente sean determinados algunos compuestos fitoquímicos de origen fenólicos importantes como, flavonoles, glicosidos de flavonol, antocianinas y procianidinas, que han sido aisladas e identificadas a partir de diferentes tipos de fréjol (Xu B., & Chang S. K., 2009).

1.2.2. Haba pallar (*Phaseolus lunatus* var. *big lima*).

En Ecuador el haba pallar constituye una de las fuentes alimenticias más comunes de la población; en algunos casos es el producto indispensable en la dieta como fuente de proteínas, especialmente en el sector rural andino, donde significativos grupos de indígenas y campesinos las consumen tanto en estado fresco como en seco (Peralta I & Mazón N., 2009).

El cultivo del haba, es poco exigente en cuanto a calidad de suelos, pudiendo desarrollarse en la mayoría de suelos, con un pH de 6 a 7.5, así mismo en suelos arcillo-limoso-calizos, provistos de materia orgánica. En nuestro país el haba se desarrolla en suelos ubicados entre los 2 000 a 3 600 metros sobre el nivel del mar, siendo su fecha de producción entre los meses de agosto a septiembre (Guillen-Portal, *et al.* 1999).

Existen tres variedades de haba, las mismas que se distinguen principalmente por el tamaño de sus semillas, cultivadas indistintamente, presentando mucha similitud en el valor nutritivo entre las diferentes variedades de semillas, pero se considera que las habas han demostrado un mayor aporte de nutrientes (Guillen-Portal, *et al.* 1999).

El haba es rica en vitaminas del complejo B y minerales como potasio, fósforo, calcio y hierro. El contenido de proteínas varía según sea el haba verde o seca y su cáscara se caracteriza por tener un alto contenido de sustancias antioxidantes. El aporte de vitamina B1 es superior a muchos cereales y carnes, y destaca también el contenido en riboflavina y vitamina A. Los granos se consumen generalmente cocidos en ensalada y acompañando diferentes platos (Guillen-Portal, *et al.* 1999).

1.2.3. Amaranto alegría (*Amaranthus caudatus* L.).

Al igual que la quinua, es considerado un pseudocereal, ya que tiene propiedades similares a los cereales, sin embargo botánicamente son diferentes; se encuentran dentro de las plantas anuales o perennes de origen tropical, creciendo en tierras poco fértiles y con una mínima cantidad de agua. Es por eso que se lo denomina un cultivo privilegiado al resistir a altas temperaturas, también es un buen transformador de energía solar, presenta un rápido crecimiento y habilidad de producir gran cantidad de biomasa en espacios reducidos (Guillen-Portal, *et al.* 1999).

Actualmente existen tres especies de amaranto para producir grano y que, a su vez, son las más apreciadas tales como: *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* (Estrella E., 2011).

En Ecuador el amaranto tiene buena acogida, ya que a diferencia de muchas harinas, la del amaranto no tiene gluten, siendo muy beneficiosa para ciertas enfermedades. Con el auge de los alimentos funcionales, claramente este es un cultivo que tiene buenas proyecciones para

el país. Es entonces que hace 20 años se introdujo en el país la semilla de amaranto blanco traída desde México donde se ha desarrollado el cultivo (Tustón S., 2007).

Una de las características más importantes del amaranto es sin duda su alto valor nutritivo y nutracéutico, ideal en anemias, desnutrición, mujeres en etapa de gestación y lactancia y niños, igualmente para personas con osteoporosis ya que es un alimento rico en hierro, proteínas, vitaminas y minerales, además el aceite de amaranto se dice que contiene altas concentraciones de tocotrienoles, formas raras de la vitamina E que inhiben la enzima dominante reguladora de la biosíntesis del colesterol (Lara N. & Ruales J., 2002).

Por todo lo expuesto el cultivo de amaranto es de gran interés para la nutrición humana, la comunidad científica, la industria de alimentos y los consumidores por sus características agronómicas de adaptabilidad, nutricional, funcional y tecnológico. El conocimiento de sus componentes, los procesos de obtención, su caracterización fisicoquímica y sus propiedades funcionales constituye un factor clave en el desarrollo de nuevos procesos y alimentos (Marcone, M. & Yada, R. 1991).

1.2.4. Gandúl (*Cajanus cajan*).

Dentro del género *Cajanus* existen 32 especies entre las cuales dos tipos de gandúl son los principales: *Cajanus cajan flavus*, *Cajanus cajan* bicolor (Véliz ,2006).

Sus granos contienen proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, se consume generalmente como granos tiernos, y granos secos, se lo puede usar como barrera viva para detener la erosión y como cultivo de sombra en los viveros. En Centroamérica las semillas de gandúl se utilizan demasiado por su elevado contenido de lisina y metionina. Con ellas se preparan sopas, papillas y harina, entre muchas otras variedades. Los granos de gandúl contienen en promedio entre un 18% a 25% de proteínas y tienen un buen equilibrio en aminoácidos; lo que hace que muchas personas de todo el mundo y de diferentes clases sociales lo consuman por su alto nivel nutricional y por sus diferentes usos, aparte de su bajo costo (García & Rodríguez, 2002)

En el Ecuador existen sembradas alrededor de 25000 hectáreas distribuidas en las provincias de Guayas, Los Ríos y Manabí. (García & Rodríguez, 2002)

1.2.5. Quínua (*Chenopodium quinoa*).

La quínua es considerada un pseudocereal de origen andino que se cultiva cada vez en más países y es considerada como uno de los alimentos de mayor valor nutricional de origen vegetal. Es quizá uno de los cultivos que mayor grado de adaptación a condiciones adversas y esto en gran parte se debe a la gran cantidad de ecotipos y variedades existentes alrededor de los países andinos (Bonifacio, 2006).

Es importante acotar que a la quínua no contiene gluten; característica propia de los cereales y que en el caso de la quínua es precisamente lo que la está volviendo atractiva para la

agroindustria. En este grano a la cantidad de proteína, se suma la calidad de la misma, la grasa de calidad (omega 6-omega 3), fibra, hierro, fósforo, zinc y otros contenidos útiles para la salud como las isoflavonas y los antioxidantes (Peralta *et al.*, 2012).

En la actualidad aún no existe un alimento que proporcione todos los nutrientes esenciales para la vida, sin embargo la quínoa es considerada como el único alimento del reino vegetal que contiene todos los aminoácidos, proteínas y nutrientes, lo que le permite cumplir con los estándares de nutrición establecidos por la FAO. Así mismo posee un alto valor medicinal, ya que hipotéticamente se dice que es capaz de prevenir el cáncer de mama, osteoporosis y otras enfermedades crónicas femeninas originadas por falta de estrógenos durante la menopausia (Peralta *et al.*, 2012).

Actualmente, en la industria ecuatoriana se encuentran básicamente tres tipos de quínoa: quínoa grande, blanca, perlada y libre de impurezas; quínoa mediana, parcialmente limpia; y una quínoa nacional, que es pequeña y dulce. Estas tres variedades de quínoa se comercializan a diferentes precios, principalmente en los mercados de la sierra ecuatoriana, sin embargo las variedades desarrolladas genéticamente por el INIAP, consideradas dulces para el consumo, son las que prometen cambiar el rumbo de la cultura alimenticia en el Ecuador, al poseer bajo contenido de saponina para la elaboración de derivados de quínoa (Pereira, S. 2010).

1.2.6. Habichuela (*Phaseolus lunatus* var. *baby lima*)

Este tipo de grano es muy similar al haba pallar, tanto funcionalmente como botánicamente. Siendo esta una leguminosa que pertenece a la familia Fabaceae originaria de América Central y del Sur, actualmente cultivada en regiones cálidas y tropicales alrededor de todo el mundo; sus semillas pueden ser consumidos frescos o secos (deben hacerlo por fermentación para destruir los glucósidos cianógenos tóxicos) (Gutiérrez- Salgado, *et al.* 1995).

El tipo de semilla que posee es de un tamaño grande, crecen anualmente, y tienen formas de arbustos erguidas; requieren una larga y cálida estación de crecimiento para que la semillas se desarrollen (Gutiérrez- Salgado, *et al.* 1995).

Las habichuelas son ricas en proteínas, vitaminas B y C, y varios minerales (hierro, magnesio, fósforo, y potasio). Y a su vez, los granos secos son una fuente importante de proteínas en muchas partes de África, Asia y América del Sur (Gutiérrez- Salgado, *et al.* 1995).

P. lunatus contiene lectinas, inhibidores de proteasas, ácido fítico, polifenoles, oligosacáridos y glucósidos cianogénicos. De la misma manera los polifenoles son conocidos como quelantes, por lo cual disminuyen la absorción de metales producidos por el propio organismo (Ramírez-Ortiz, *et al.*, 2015).

En la investigación de Betancur- Arcona (2004), los resultados obtenidos de actividad total antioxidante de la habichuela, considera medianamente efectivo con respecto a su actividad,

en comparación con otro tipo de alimentos como frutas cítricas, y a la vez asemejando el resultado, de esta especie, con el compuesto del α -tocoferol .

1.3. Antioxidantes.

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Patthamakanokporn O., 2008).

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante propia del metabolismo las cuales pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. (Matill, HA. 1947).

Esto se produce debido a que los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado con capacidad de unirse a cualquier otra molécula, por lo que son muy reactivos, y recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y lograr su función específica en la célula (Lampe J., 1999).

1.3.1. Actividad Antirradicalaria y Antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante, se han desarrollado algunos métodos que se describen en apartados posteriores, los cuales, debido a su importancia práctica, se emplean para el estudio de productos naturales y suplementos alimenticios. Algunos autores consideran que al menos se deberían emplear dos sistemas de pruebas diferentes para obtener resultados concluyentes.

La mayoría de los métodos de determinación de la actividad antioxidante, se caracterizan en la capacidad del compuesto o producto ensayado para eliminar radicales libres o para reducir iones metálicos complejos que provocan el proceso de oxidación. De ahí, que se desprendan dos conceptos relacionados: actividad antioxidante y actividad antirradicalaria.

Existe una gran diferencia entre la actividad antirradicalaria y antioxidante y que, según lo descrito por Tirzitis G. & Bartosz G. (2010), la actividad antirradicalaria se caracteriza por la capacidad de los compuestos para reaccionar con los radicales libres, en una sola reacción, pero la actividad antioxidante representa la capacidad de inhibir el proceso de oxidación (lo cual usualmente, al menos en el caso de lípidos, involucra una serie de reacciones diferentes). Por consiguiente, todos los sistemas de ensayos que utilizan un radical libre estable como los ensayos de DPPH, ABTS, entre otros, proporcionan información sobre la actividad de eliminación o secuestro de radicales libres; y esta actividad, en muchos casos no corresponde a la actividad antioxidante. Por lo tanto, para obtener la información sobre la actividad antioxidante real, es necesario realizar el estudio de inhibición de la oxidación, sobre el producto real (aceite vegetal, lipoproteínas, enzimas, etc.).

En el organismo humano, como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que son eliminados por receptores endógenos, pero también, pueden interactuar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad en diversas enfermedades (Estepa, V. *et al.* 2001).

Para la determinación de la magnitud de peroxidación lipídica, se utilizan los productos de degradación metabólica de lipoperóxidos. Existen diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos presentes en el suero, que son de interés en su cuantificación. El malondialdehído (MDA) es el más significativo obtenidos por las diferentes degradaciones y es el más cuantificado (Estepa, V. *et al.* 2001).

Para ello, tenemos métodos analíticos desarrollados para determinar el MDA endógeno, pero el más comúnmente utilizado es el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), el mismo que reacciona con el MDA en condiciones de bajo pH y alta temperatura, dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno en el cual puede ser detectable y medido por espectrofotometría o fluorescencia (Estepa, V. *et al.* 2001).

Teniendo en cuenta lo señalado anteriormente se puede visualizar directo en el ser humano, en forma general, como se podría cuantificar y determinar la capacidad antioxidante real de cualquier compuesto químico o molécula que se encuentre en investigación.

1.3.2. Radicales Libres.

Un radical libre es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, produciendo una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial (Núñez A., 2011).

Los compuestos en cuestión forman parte de las llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species). Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, radiaciones, entre otros. Se pueden relacionar con el consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación no adecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico (Núñez A., 2011).

Ante la presencia de radicales libres, el organismo debe neutralizarlos y defenderse, para así evitar la lesión de los tejidos. El problema propiamente dicho, aparece cuando la concentración de estos radicales libres es muy elevada, ya que cuando los mismos se encuentran presentes en el organismo en cantidades adecuadas aportan algunos beneficios, como: luchar contra bacterias y virus, regulación de la estructura y función de las proteínas,

control del tono muscular, etc. Las consecuencias del exceso de radicales libres en el organismo, afectan directamente nuestro estado de salud (Prior R., 2005).

1.4. Procesos de extracción.

Para la extracción de sustancias antioxidantes de muestras naturales, se utiliza disolventes polares, generalmente mediante el uso de agua, metanol o etanol que contiene una pequeña cantidad de ácido clorhídrico o ácido fórmico. La extracción con metanol es un 20% más eficaz que con etanol, y 73% más eficaz que solo agua. La acetona también ha sido utilizada para extraer antioxidantes de diferentes fuentes vegetales, lo que permite una extracción más eficiente y reproducible a bajas temperaturas, evitando problemas de pérdidas funcionales de las pectinas. La variable más importante en este tipo de extracción es la temperatura. La temperatura óptima de extracción reportada por García-Viguera *et al.*, (1998) y Mantell *et al.*, (2002), se encuentra entre 50 y 75 °C. Otra variable a tener en cuenta es la relación solvente-extracto, al aumentar la presión de extracción, los rendimientos aumentan (Cerón I. & Cardona C., 2010).

El proceso de extracción con solventes, tiene tres etapas principales: en la etapa inicial, el material vegetal debe ser reducido de tamaño con el fin de aumentar el área de contacto e incrementar la transferencia de masa; posteriormente, el material es secado para evitar problemas de inhibición en la extracción. La segunda etapa consiste en la extracción de los componentes con propiedades antioxidantes, la cual debe realizarse a una temperatura menor a 60 °C para evitar la degradación de los componentes. Finalmente, la última etapa consiste en la concentración del extracto. Cuando se realiza extracción con solventes, se requiere un fraccionamiento del extracto y eliminación del solvente, evitando la degradación del producto (Cerón I. & Cardona C., 2010).

La extracción de antioxidantes se realiza preferentemente sobre muestras de polvo seco del material vegetal. Para ello, frutas y verduras se someten a liofilización y molienda (tamaño partícula $\leq 0,5$ mm.). Para el secado de la muestra, en caso de carecer de liofilizador, puede emplearse secado a varias temperaturas (máximo 60 °C). Por la misma razón, para la molienda se recomienda el uso de molino centrífugo, o cualquier otro sistema (criomolienda, molienda en atmósfera reductora) que implique mínimo calentamiento de la muestra y tiempo de permanencia en atmósfera oxidante. De acuerdo a la metodología propuesta por Pérez J. & Saura-Calixto F. (2007), la extracción de antioxidantes procede de la siguiente manera: 0,5 g de muestra son tratados con 20 mL de metanol/agua acidificados con HCl 2N (50:50 v/v, pH 2), tras lo que se agita durante 1h. Tras centrifugar, se recoge el sobrenadante y el residuo se trata con 20 mL de acetona/agua (70:30 v/v) y se vuelve a agitar durante 1h. Tras centrifugar, ambos sobrenadantes se combinan. La determinación de capacidad antioxidante se lleva a cabo en las dos fracciones: líquida (sobrenadantes de la extracción) y sólida (residuos de la

extracción) La determinación de capacidad antioxidante en los sobrenadantes se efectúa directamente tomando alícuotas de los mismos (Pérez J., *et al.* 2007).

1.5. Ensayo para la determinación de compuestos fenólicos

1.5.1. Método Folin & Ciocalteu.

El método es utilizado para determinar los polifenoles totales utilizando dos tipos de reactivo (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico) que oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno – tungsteno de color azul (Singleton V., *et al.* 1999).

El contenido de polifenoles que ocurren en la naturaleza y el medio ambiente son de mucho interés ya sea por sus capacidades antioxidantes, astringencia, amargura, color, sustratos de oxidación, constituyentes proteicos entre otros (Singleton. V., *et al.*, 1999).

El hecho de que el ion fenolato sea importante se demuestra por el hecho de que la absorción de oxígeno por los fenoles puede completarse rápidamente cerca o alrededor de pH 10. Debido a la relativa facilidad de eliminación del electrón del fenolato, menos ácido es el fenol particular que es más fácil su oxidación. Dicho método basado en estas consideraciones puede ser muy útil, reproducible y aplicabilidad.

El uso adecuado del reactivo propuesto por Otto Folin y Vintila Ciocalteu, que determinaron los polifenoles totales usando una curva patrón de ácido gálico. (Singleton. V., *et al.*, 1999)

Originalmente, se utilizó carbonato sódico saturado para el reactivo alcalino, que tiene problemas obvios en efectos de la temperatura por lo que en la actualidad se realiza la alcalinización con carbonato de sodio a 1N. Siendo importante tener suficiente pero no excesiva alcalinidad. Aproximadamente pH 10 es deseado después de la combinación con el FCR ácido y las muestras. (Singleton. V., *et al.*, 1999). El fenol total por FC se puede comparar con los valores por otros análisis en las mismas muestras para subgrupos tales como taninos, flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos.

Con Folin-Ciocalteu da una mayor sensibilidad y reproducibilidad para compuestos fenólicos, realizando la lectura con longitud de onda a 725 nm. (Singleton. V., *et al.*, 1999)

1.6. Ensayos para la determinación de actividad antioxidante.

1.6.1. Método ABTS.

La generación de la ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico Ácido)] catión radical constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se han aplicado a la medición de la actividad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, en mezclas y bebidas acuosas. El ensayo ABTS original se basó en la activación de la metmioglobina con peróxido de hidrógeno en la presencia de ABTS para producir el catión radical, en presencia o ausencia de antioxidantes. (Re R. *et al.*, 1999).

La técnica mejorada para la generación de ABTS descrita por Re., R (1999) implica la producción directa del cromóforo azul / verde ABTS a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. Por tanto, los máximos de absorción luz son a longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, así como el más comúnmente utilizado es a 415 nm. Además los antioxidantes, al catión radical preformado lo reduce ABTS, en una medida y en una escala de tiempo para poder cuantificar la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Así, el alcance de descoloración como porcentaje de inhibición del ABTS se determina en función de la concentración y el tiempo y se calcula en relación con la reactividad de Trolox como un estándar, en las mismas condiciones. Este método es aplicable al estudio tanto de los antioxidantes liposolubles, compuestos puros, y extractos alimenticios (Re R. *et al.* 1999).

1.6.2.Método DPPH.

El método desarrollado por Brand Willians *et al.*, (1995) que sirve para evaluar el efecto antioxidante, actividad de compuestos o extractos específicos, dejándolos reaccionar con un radical estable, 2,2-difenil-picrilhidracil (DPPH) en una solución de metanol. La reducción de DPPH es seguido para controlar la disminución de su absorbancia en una característica longitud de onda durante la reacción. En su forma radical, DPPH se absorbe a 515 nm, tras la reducción por un antioxidante o por una especie radical, la absorción desaparece.

1.6.3.Método FRAP.

El método descrito mide la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). A pH bajo, cuando se reduce un complejo de férrica-tripiridiltriazina (Fe III-TPTZ) a la forma ferrosa (FeII), se produce un color azul intenso con un máximo de absorción a 593 nm, la reacción es inespecífica y cualquier reacción media que tenga un potencial redox, será menos positivo, en condiciones de reacción, que la reacción media FeIII / FeII-TPTZ conducirá a la reducción de FeIII-TPTZ. Las condiciones de ensayo favorecen la reducción del complejo y, por tanto, el desarrollo del color, siempre que esté presente un reductor (antioxidante). Ferrozina es un compuesto estrechamente relacionado con TPTZ, ha sido ampliamente utilizado, para medir el hierro en el ensayo FRAP, se utiliza el exceso de FeIII, y el factor de limitación de la tasa de FeII-TPTZ, y por lo tanto, la formación de color es la capacidad de reducción de la muestra (Benzie I, *et al.* 1996).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. Obtención de muestras

Las muestras fueron propuestas por entidades pertenecientes a la Red Ecuatoriana de Universidades para la investigación y posgrados con el código del proyecto (Proy_Fin_0020): escuela Superior Politécnica del Litoral, Escuela Politécnica Nacional e Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. En la tabla 1 se detalla cuales muestras fueron facilitadas por cada una de las universidades.

Tabla 1. Procedencia de las legumbres para el estudio de actividad antioxidante.

Entidad	Nombre Común	Nombre Científico
ESPOL	gandúl	<i>Cajanus cajan</i>
	haba pallar	<i>Phaseolus Lunatus big lima</i>
	habichuela	<i>Phaseolus Lunatus baby lima</i>
EPN	quínua	<i>Chenopodium quinoa</i>
INIAP	amaranto alegría	<i>Amaranthus caudatus L.</i>
	fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

2.2. Obtención de extractos.

Para el proceso de extracción, las muestras se procesaron de dos maneras: En el primer método, las muestras en harina se procesaron directamente siguiendo la metodología de Pérez J. & Saura- Calixto F. (2007); para ello, el tamaño de partícula optima requerida fue $\leq 500 \mu\text{m}$, posteriormente para la extracción, a cada una de las muestras, se adicionó 20 mL de la solución Metanol/Agua con pH 2 (Anexo 1), durante 1 hora se dejó en agitación 180 r.p.m., a temperatura ambiente, en un equipo agitador magnético; se centrifugó durante 30 min a 2850 r.p.m., para posteriormente tomar el sobrenadante A y sobre el residuo, se añadió 20mL de la solución Acetona/Agua (Anexo 1), para nuevamente dejar en agitación durante 1 hora 180 r.p.m., a temperatura ambiente, en el agitador magnético. Se centrifugó por 30 min a 2850 r.p.m., se tomó el sobrenadante B para unirlo con el sobrenadante A; se precedió a concentrar en presión reducida hasta eliminar completamente todos los solventes del sobrenadante y terminar de secar la muestra en una cámara al vacío. Todas las muestras fueron almacenadas a temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis.

En el segundo método, las muestras en harina fueron sometidas a un proceso de cocción, antes de aplicar la metodología de extracción anteriormente indicada. Para ello, se pesó 4 gramos, de muestra en polvo, luego se añadió 80 mL de agua, dejando cocinar por 25 min a $92 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la extracción, del producto cocido, se pesó 1 g por cada muestra y se sometió a las mismas condiciones de extracción propuesta por Pérez J. & Saura- Calixto F. (2007).

2.3. Cuantificación de fenoles totales.

2.3.1. Curva de calibración.

Para la curva de calibración se prepararon diferentes concentraciones de ácido gálico como estándar.

Se preparó una solución madre de 1 mg de ácido gálico (Ehrenstorfer Quality- Germany CA13998280) disuelto en 1 mL agua, y se realizaron siete soluciones de trabajo de acuerdo al esquema desarrollado en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de estándares de ácido gálico.

Estándar	Alícuota de sol. Madre (μL)	Aforo (Agua- μL)	Conc. Final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Conc. en el ensayo ($\mu\text{g}/\text{mL}$ - mg/L)
1	10	990	10	0,5
2	20	980	20	1
3	40	960	40	2
4	60	940	60	3
5	80	920	80	4
6	100	900	100	5
7	120	880	120	6

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Con los datos obtenidos se construyó una gráfica de concentración ácido gálico (mg/L) vs absorbancia y mediante regresión lineal se obtuvo la recta de regresión y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2). En Anexo 2 se detalla la estandarización del método.

2.3.2. Fenoles totales

Para el ensayo de fenoles totales se utilizó el reactivo de Folin–Ciocalteu (2N, Sigma F9252, St Louis, MO) de acuerdo a la metodología propuesta por Thaipong K., *et al*, (2006) con algunas modificaciones. El reactivo de Folin se diluyó a 0,25N colocando 35 mL de agua destilada más 5 ml del reactivo. Se utilizó carbonato de sodio 1N, pesando 1,06 g y se diluyó en 20 mL de agua destilada.

El ensayo consistió en mezclar 240 μL de agua destilada más 15 μL de la solución Folin–Ciocalteu y más 15 μL de muestra. Para el blanco de este ensayo se colocó la misma mezcla pero en lugar de la muestra se añadió 15 μL del disolvente de la muestra que en este caso fue metanol. Para la curva de calibración se colocan 15 μL del estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones, descritos en la Tabla 2. Luego se incubó por 15 min y se adiciona 30 μL de la solución de carbonato de sodio en cada uno de los pocillos.

El análisis de fenoles totales se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos fondo plano (TrueLine TR5003 96 Well) y se monitoreó a 20 °C por 2 horas a una longitud de onda de 725 nm en un lector de microplaca (BioTech, EPOCH 2).

2.3.2.1. Análisis de resultados.

A partir de la ecuación obtenida ($y=mx + b$) en la recta de regresión de la curva de calibración de Ácido Gálico, las absorbancias obtenidas en el ensayo se interpolaron para hallar los correspondientes valores de:

- mg EAG por gramo de extracto
- mg EAG por gramo de material seco.

2.4. Determinación de capacidad antioxidante.

Existen varias pruebas para la determinación de actividad antioxidante, que han sido desarrolladas por muchos investigadores con el fin sustentar sus hipótesis en función de varias técnicas adaptables a sus objetivos. Es por ello que para la cuantificación de capacidad antioxidante en alimentos tradicionales del Ecuador las pruebas a elección fueron: capacidad antioxidantes fueron: DPPH (2,2-difenil-picrilhidracil), FRAP (reducción férrica del plasma) y ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico Ácido)); las cuales mediante reacciones colorimétricas pueden ser medidas en base a una determinada longitud de onda para cada una de ellas.

2.4.1. Curva de calibración.

Para realizar la curva de calibración de cada uno de los métodos se preparó una solución madre de 1000 μ M de Trolox diluido en metanol (Merk, 64271, Billerica, MA.) y, se prepararon siete soluciones de trabajo de acuerdo al esquema desarrollado en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación estándares de Trolox

Estándar	Alícuota de sol. Madre (μ L)	Aforo (MeOH- μ L)	Conc. Final μ M	Conc. en el ensayo μ M
1	25	975	25	2,5
2	50	950	50	5
3	100	900	100	10
4	200	800	200	20
5	300	700	300	30
6	400	600	400	40
7	500	500	500	50

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Con los datos de obtenidos se construyó una gráfica de concentración de Trolox vs absorbancia y mediante regresión lineal se obtuvo la recta de regresión y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), cuyo valor fue mayor a 0,995. Cada ensayo realizado se describe

en los apartados 2.3.1.1., 2.3.1.2. y 2.3.1.3. La preparación de la Curva estándar se detalla en el Anexo 3.

2.4.1.1. Método DPPH.

El método de DPPH se utiliza para medir compuestos que sean de naturaleza lipofílica por que se utilizó este método, siguiendo la metodología de Brand-Willams *et al.* (1995) con algunas modificaciones realizadas por Thaipong K., *et al.* (2006) y Cheng Z., *et al.* (2006). Para realizar el ensayo de DPPH se preparó una solución madre de 0,625 mM en metanol, y a partir de ella se preparó la solución de trabajo, tomando una alícuota de solución madre y diluyendo en metanol (vol. Aprox. 2 mL Sol. Madre más 10 mL de MeOH) hasta ajustar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Si la absorbancia está por debajo del valor indicado, se debe añadir más volumen de la solución madre de DPPH; si por el contrario se encuentra sobre el valor indicado, se añadió MeOH hasta alcanzar la absorbancia deseada.

El ensayo se colocó 270 μ L de la solución de trabajo más 30 μ L de la muestra a analizar. Se realizó un control del máximo de absorbancia de la solución de trabajo de DPPH, empleando 270 μ L de DPPH más 30 μ L de MeOH. Para el estándar se añadió 270 μ L de solución de trabajo más 30 μ L de estándar de μ M de Trolox (Tabla 2). El blanco de la prueba lleva únicamente 300 μ L de MeOH. La curva de calibración se realizó añadiendo 30 μ L de cada uno de los estándares.

El ensayo se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos fondo plano (TrueLine TR5003 96 well) y se monitoreó por una hora a 20°C, a una longitud de onda de 715 nm en un lector de microplacas (BioTech, EPOCH 2).

2.4.1.2. Método FRAP

El método de FRAP se aplica para cuantificar el poder de reducción férrica por parte de los extractos que contengan capacidad antioxidante. Partiendo de la preparación de los reactivos: TPTZ 10 mM, cloruro férrico 40 mM y Buffer de Acetato pH 3,6 (Anexo 6) se tomaron en proporción 1:1:10 respectivamente, formando una sola solución de trabajo.

El ensayo de FRAP consiste en incubar a 37 ° C 270 μ L de la solución de trabajo para posteriormente añadir 30 μ L de la muestra a analizar. Para el estándar se colocó 270 μ L de la solución de trabajo más 30 μ L del estándar de μ M de Trolox (Tabla 2.). El blanco del ensayo se adiciono 270 μ L de la solución de trabajo más 30 μ L de MeOH. La curva de calibración se realizó añadiendo 30 μ L de cada uno de los estándares.

El ensayo se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos fondo plano (TrueLine TR5003 96 Well) y se monitoreó por media hora a una longitud de onda de 593 nm en un lector de microplacas (BioTech, EPOCH 2) a una temperatura de 37 °C. Los resultados obtenidos se reportan en μ M equivalente de Trolox por gramo de muestra seca.

2.4.1.3. Método ABTS.

Para el ensayo de captación del radical ABTS^{•+} se siguió la metodología propuesta por Thaipong K., *et al.* (2006), con algunas modificaciones.

Para realizar el ensayo, la solución madre consistió en una mezcla (1:1) de 7,4 mM de ABTS y 2,6mM de persulfato de potasio en agua destilada, misma que se dejó reaccionar durante 16 horas y protegido de la luz en agitación constante (200 r.p.m.), para generar el radical ABTS^{•+}. A partir de ella se preparó la solución de trabajo, tomando una alícuota de solución madre y diluyendo en metanol (vol. Aprox. 0,7 mL Sol. Madre más 17 mL de MeOH) hasta ajustar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Si la absorbancia está por debajo del valor indicado, se debe añadir más volumen de la solución madre de ABTS^{•+}; si por el contrario se encuentra sobre el valor indicado, se añade MeOH hasta alcanzar la absorbancia deseada.

Para el desarrollo del ensayo de ABTS^{•+} se colocó 270 μ L de la solución de trabajo más 30 μ L de la muestra a ensayar. Para el estándar se añadió 270 μ L de solución de trabajo más 30 μ L de estándar de μ M de Trolox (Tabla 2.) y para el control se colocó 270 μ L de solución de trabajo de ABTS más 30 μ L de MeOH. El blanco de la prueba lleva únicamente 300 μ L de MeOH. La curva de calibración se realizó añadiendo 30 μ L de cada uno de los estándares.

El ensayo se realizó por triplicado en microplaca de 96 pocillos fondo plano (TrueLine TR5003 96 Well) y se monitoreó por 1 hora a una longitud de onda de 734 nm en un lector de microplaca (BioTech, EPOCH 2) a una temperatura de 20 °C. Los resultados obtenidos se reportan en μ M equivalente de Trolox por gramo de muestra seca.

2.4.2. Análisis de resultados.

A partir de la ecuación obtenida ($y=mx + b$) en la recta de regresión de la curva de calibración de Trolox, las absorbancias obtenidas en el ensayo se interpolaron para hallar los correspondientes valores de:

- μ M equivalente de Trolox por gramo de extracto
- μ M equivalente de Trolox por gramo de material seco.

Para el cálculo de la capacidad de barrido de radicales libres 50 (SC₅₀) partimos del concepto, indicando que SC₅₀, es la concentración de la sustancia de prueba (antioxidante), que reduce el 50% del radical libre DPPH; para ello, se calcula el porcentaje de reducción (%R) con la fórmula descrita por Cheng Z., *et al.* (2006).

$$\%R = [1 - [(M) - (BLK)] / [(CTRL) - (BLK)]] \times 100$$

Donde,

M, Absorbancia de la muestra

BLK, absorbancia del blanco

CTRL, absorbancia de la solución de trabajo

Par el ensayo de FRAP no se determinó el valor de SC_{50} debido a que el método se basa en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} y esta reducción se logra añadiendo una sustancia antioxidante y detectando el aumento de absorbancia.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Calidad fenólica de alimentos tradicionales del Ecuador

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó la metodología descrita por Pérez & Saura-Calixto (2007); y para la determinación del contenido de fenoles totales se empleó el ensayo de Folin–Ciocalteu (Singleton. V., *et al.* 1999) y modificado por Thaipong K., *et al.* (2006). A partir de 1 gramo de muestra cocida se realizó la extracción de compuestos fenólicos con la metodología descrita anteriormente (Ver apartado 2.2.). Se considera muestra cruda al producto seco y particulado (polvo 500 µm).

En la Tabla 4 se describen los resultados obtenidos en la determinación de contenido de compuestos fenólicos para muestra cruda y para muestra cocida. En el Anexo 1 se describe la preparación de la curva de calibración con el estándar de ácido gálico.

Los coeficientes de regresión para el ácido gálico son:

$$y = 0,0827x - 0,0192$$

Y coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9952$

El rango de linealidad para la curva de calibración fue de 0,5 a 6 mg/L.

Tabla 4. Contenido de compuestos Fenólicos Totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) en Base Seca (BS).

	Muestra	mg EAG/g [†] extracto ± EEM	mg EAG/g [†] muestra BS ± EEM
CRUDO	AMARANTO	9,66 ± 0,07	0,57 ± 0,00
	FRÉJOL	16,49 ± 0,14	4,74 ± 0,04
	HABA	10,69 ± 0,21	0,88 ± 0,01
	HABICHUELA	9,69 ± 0,33	0,73 ± 0,02
	GANDÚL	19,01 ± 1,99	1,58 ± 0,02
	QUÍNUA	12,07 ± 0,23	0,75 ± 0,01
COCCIÓN	AMARANTO	30,35 ± 0,77	0,81 ± 0,02
	FRÉJOL	63,11 ± 1,37	2,42 ± 0,05
	HABA	37,19 ± 0,43	1,84 ± 0,02
	HABICHUELA	36,20 ± 0,60	1,80 ± 0,03
	GANDÚL	57,90 ± 1,33	2,50 ± 0,05
	QUÍNUA	59,54 ± 1,02	2,24 ± 0,03

[†] Los resultados se expresaron como el promedio de n=9 repeticiones ± el error estándar de la media

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Dentro de las leguminosas, para el caso de muestras crudas, el fréjol destaca por su mayor calidad fenólica con 4,74 mg EAG/g muestra BS, y al compararlo con otra leguminosa como la lenteja (*Lens culinaris* Medik), en el estudio de Sarmento Thaise R., (2012), se reporta un valor de 1,5 mg EAG/g muestra BS, siendo el resultado del fréjol superior.

Por otra parte, en el mismo estudio realizado por Sarmiento Thaise R., (2012), se reporta una disminución en el contenido de fenoles totales para muestra cocida (fréjol), en relación a muestra cruda, con valores de 1,4 y 0,8 mg EAG/g muestra, respectivamente, siendo lo opuesto a lo ocurrido en el presente trabajo, donde para la muestra cruda y cocida, de fréjol, los valores obtenidos fueron 4,74 y 2,42 mg EAG/g muestra (Tabla 4). En el caso de las restantes muestras, ocurre lo contrario, donde los valores reportados para muestra cocida, son mayores que en muestra cruda, lo cual puede deberse a la constitución nutricional específica de cada muestra ensayada, más no del tratamiento efectuado previo a la obtención de los extractos.

Los compuestos fenólicos, por sus características estructurales, tienen la facilidad de captar radicales libres, motivo por el cual se les atribuye su capacidad antioxidante, por lo que las muestras de fréjol y gandúl podrían aportar no solo con nutrientes esenciales para la dieta sino también con factores protectores para las células del organismo.

3.2. Capacidad antioxidante de alimentos tradicionales del Ecuador

Se desarrollaron tres tipos de ensayos, para la determinación de capacidad antioxidante, en el presente estudio, (DPPH, ABTS y FRAP), los cuales nos ayudan a determinar cuantitativamente la capacidad de captación de radicales libres por los compuestos contenidos en una muestra.

En la tabla 5 se describen los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH, para muestra cruda y para muestra cocida. En el anexo 4 se describe la preparación de la curva de calibración con el estándar de Trolox.

Los coeficientes de regresión para Trolox, utilizado como estándar, son:

$$y = -0,0176x + 1,0892$$

Y coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9971$

El rango de linealidad para la curva de calibración fue de 2,5 a 50 μ M.

Tabla 5. Actividad Antioxidante mediante el ensayo de DPPH, expresado en μmoles equivalentes de Trolox ($\mu\text{M TE}$) en Base Seca.

	Muestra	$\mu\text{M TE/g}^\dagger$ extracto \pm EEM	$\mu\text{M TE/g}^\dagger$ muestra BS \pm EEM
CRUDO	AMARANTO	68,19 \pm 1,60	4,02 \pm 0,09
	FRÉJOL	110,79 \pm 0,71	31,91 \pm0,20
	HABA	110,13 \pm 4,78	9,07 \pm 0,39
	HABICHUELA	65,25 \pm 0,76	4,94 \pm 0,05
	GANDÚL	180,61 \pm 1,39	15,08 \pm0,11
	QUÍNUA	123,05 \pm 2,06	7,70 \pm 0,12
COCCIÓN	AMARANTO	363,97 \pm 7,54	9,75 \pm 0,2
	FRÉJOL	314,66 \pm 5,42	12,08 \pm0,2
	HABA	154,38 \pm 2,36	7,65 \pm 0,11
	HABICHUELA	155,38 \pm 3,74	7,70 \pm 0,18
	GANDÚL	269,39 \pm 6,46	11,63 \pm0,27
	QUÍNUA	198,57 \pm 5,39	7,46 \pm 0,2

\dagger Los resultados se expresaron como el promedio de n=9 repeticiones \pm el error estándar de la media

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De acuerdo los resultados obtenidos destacan el fréjol y gandúl, con valores superiores a los 10 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS, tanto para muestra cruda como para muestra cocida.

En la tabla 6 se describen los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de FRAP, para muestra cruda y para muestra cocida. Anexo 3 se muestra la preparación de la curva estándar.

Los coeficientes de regresión para Trolox, utilizado como estándar, son:

$$y = 0,0351x - 0,0491$$

Y coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9977$

El rango de linealidad para la curva de calibración fue de 2,5 a 100 μM de Trolox

Tabla 6. Actividad Antioxidante mediante el ensayo de FRAP, expresado en $\mu\text{M TE}$ en Base Seca.

	Muestra	$\mu\text{M TE/g}^{\dagger}$ extracto \pm EEM	$\mu\text{M TE/g}^{\dagger}$ muestra BS \pm EEM
CRUDO	AMARANTO	59,42 \pm 1,72	3,51 \pm 0,10
	FRÉJOL	114,18 \pm 1,57	32,88 \pm 0,45
	HABA	65,96 \pm 1,83	5,34 \pm 0,15
	HABICHUELA	32,26 \pm 0,56	2,44 \pm 0,04
	GANDÚL	206,63 \pm 10,97	17,25 \pm 0,91
	QUÍNUA	116,16 \pm 3,99	7,26 \pm 0,25
COCCIÓN	AMARANTO	210,35 \pm 3,89	5,63 \pm 0,10
	FRÉJOL	242,62 \pm 4,21	9,31 \pm 0,16
	HABA	62,03 \pm 1,43	3,07 \pm 0,07
	HABICHUELA	63,13 \pm 1,32	3,13 \pm 0,06
	GANDÚL	193,84 \pm 4,17	8,37 \pm 0,18
	QUÍNUA	83,87 \pm 2,36	3,15 \pm 0,08

\dagger Los resultados se expresaron como el promedio de n=9 repeticiones \pm el error estándar de la media

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

A diferencia del ensayo de DPPH, en los resultados obtenidos mediante el método de FRAP, únicamente resultó promisorio la muestra de fréjol con un valor superior a los 30 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS.

En el estudio descrito por Xu, B., & Chang, S. K, (2009), se reporta la presencia de distintos tipos de ácidos fenólicos predominantes, para dos especies diferentes de fréjol (variedad pinto y negro), como: ácido clorogénico, sinapico y vanillico; y la presencia de flavonoides como: Kaempferol-3-O-glucósido, ácido cinámico, antocianinas y epicatequinas-galato. La evaluación de la actividad antioxidante (DPPH, FRAP) de los extractos obtenidos por cocción a ebullición y cocción al vapor de las dos variedades demuestra una reducción significativa de la capacidad antioxidante.

El fréjol presentó la mayor capacidad de actividad antioxidante con 31,91 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en DPPH y 32,88 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en FRAP frente al estudio realizado por Sarmiento Thaise R., (2012) de lenteja cruda, que presenta 3,7 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en DPPH y 7,3 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en FRAP, por lo tanto según lo expuesto el fréjol sigue siendo uno de las principales legumbres con mayor capacidad antioxidante.

En la Tabla 7 se describen los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de ABTS, para muestra cruda y para muestra cocida.

En el anexo 4 se muestra la preparación de la curva de calibración con el estándar de Trolox.

Los coeficientes de regresión para Trolox, utilizado como estándar, son:

$$y = -0,0226x + 1,0482$$

Y coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9969$

El rango de linealidad para la curva de calibración fue de 2,5 a 40 μM .

Tabla 7. Actividad Antioxidante ensayo en ABTS expresados en μmoles equivalentes de Trolox ($\mu\text{M TE}$) en Base Seca.

	Muestra	$\mu\text{M TE/g}^\dagger$ extracto \pm EEM	$\mu\text{M TE/g}^\dagger$ muestra BS \pm EEM
CRUDO	AMARANTO	189,09 \pm 0,10	11,16 \pm 0,00
	FRÉJOL	129,22 \pm 0,01	37,22 \pm 0,00
	HABA	189,36 \pm 0,02	15,60 \pm 0,00
	HABICHUELA	189,38 \pm 0,01	14,33 \pm 0,00
	GANDÚL	155,65 \pm 1,02	13,00 \pm 0,08
	QUÍNUA	189,15 \pm 0,05	11,83 \pm 0,00
COCCIÓN	AMARANTO	1774,91 \pm 48,15	47,56 \pm 1,29
	FRÉJOL	989,27 \pm 20,04	37,98 \pm 0,76
	HABA	764,70 \pm 6,00	37,92 \pm 0,29
	HABICHUELA	763,88 \pm 0,04	37,8 \pm 0,00
	GANDÚL	874,61 \pm 7,87	37,78 \pm 0,34
	QUÍNUA	1011,70 \pm 15,60	38,04 \pm 0,58

\dagger Los resultados se expresaron como el promedio de $n=9$ repeticiones \pm el error estándar de la media

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

En el estudio realizado por Marathe S. *et al*, (2011) sobre la capacidad antioxidante en el ensayo de ABTS con varias leguminosas, entre ellas una de las más destacada y semejante al fréjol del presente estudio, fréjol rojo; en condiciones de maceración dinámica por 3 horas, utilizando como único disolvente metanol al 80%, de igual forma, almacenó el sobrenadante; y reporta la capacidad antioxidante del fréjol rojo de 23,85 $\mu\text{M TE/g}$. Si comparamos con el presente estudio, donde se trabajó con maceración dinámica por 2 horas, y utilizando como disolvente metanol al 50% (HCl, 2N) y acetona al 70%, y se mezcló los sobrenadantes, se obtuvo un valor mayor de 37,21 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS, para el fréjol. Los resultados del estudio sugieren que la utilización de acetona y metanol al 50% en condiciones ácidas, mejoró el proceso de extracción de compuestos antioxidantes.

Por otro lado, el amaranto presenta mayor capacidad antioxidante en muestra cocida, con 47,56 $\mu\text{M TE/g}$ muestra en BS. Se puede justificar el comportamiento del amaranto cocido, por el incremento de la actividad antioxidante, debido a la formación de compuestos con altas propiedades antioxidantes o debido a la formación de productos de Maillard, los cuales han

demostrado poseer actividad antioxidante; tal y como nos indica en su investigación Manzocco L., *et al.*, (2002). Particularmente en cocción, se forman radicales altamente reactivos en las fases tempranas de la reacción de Maillard, justo antes del reordenamiento de Amadori, mientras que fuertes propiedades antirradicalarias son atribuibles a los compuestos marrones de alto peso molecular formados en las fases avanzadas de la reacción (Manzocco L., *et al.*, 2002).

Según lo reportado por Sarmento Thaise R. (2012), para la obtención de los extractos utilizó como disolvente metanol al 80% con HCl (0,1%) , agitando la muestra por 15 horas y tomando el sobrenadante para su análisis, de lo reportado, destaca la muestra de lenteja en cocción, con 4,1 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en DPPH, mientras que el fréjol cocido en estudio tuvo 12,08 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en DPPH; de la misma manera, en el ensayo de FRAP, Sarmento Thaise R. (2012) reporta al fréjol con una actividad de 3,2 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS. Comparado con el fréjol cocido de este estudio con 9,31 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS en FRAP; se demuestra que los resultados obtenidos de ambos estudios son diferentes, y posiblemente pueden verse afectados por el tiempo de extracción, tipos y concentraciones diferentes de disolventes utilizados para la obtención de los extractos.

3.3. Evaluación de la capacidad de eliminación de radicales libres 50 (SC₅₀)

La SC₅₀ es una medida que nos ayuda a valorar la efectividad de un extracto o muestra, indicando la cantidad necesaria para eliminar o reducir al 50% de la concentración de radicales libres inicial de DPPH y ABTS. Para expresar el resultado obtenido se graficó el porcentaje de secuestro radicalario, frente a la concentración del extracto. Es por ello que se consideró este parámetro para reportar la efectividad de los extractos que se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Capacidad de secuestro media SC₅₀, tanto de extractos crudos del fréjol y gandúl como del estándar Trolox, expresadas en $\mu\text{g/mL}$ de muestra.

Muestra	DOSIS $\mu\text{g/mL}$	SC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$ (DPPH)	DOSIS $\mu\text{g/mL}$	SC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$ (ABTS)
FRÉJOL	360,00	287,24 \pm 0,44	240,00	181,05 \pm 0,21
	240,00		180,00	
GANDÚL	355,00	290,09 \pm 0,33	175,00	142,36 \pm 0,14
	210,00		150,00	
TROLOX	0,64	7,65 \pm 0,09	0,32	5,93 \pm 0,14
	1,29		1,29	
	2,58		2,58	
	5,16		5,16	
	7,74		7,74	
	10,32		10,32	

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De acuerdo a los resultados obtenidos en los métodos de DPPH y ABTS, destacaban los obtenidos para fréjol y gandúl, por lo que la determinación del SC_{50} fue necesaria para poder comparar su eficacia frente al estándar comercial Trolox. Según los resultados presentados en la Tabla 8, la efectividad de las leguminosas desciende en el orden de 39 veces, para DPPH y de 23 veces para ABTS, siendo más efectivo el Trolox. Se ha encontrado en literatura, un estudio realizado por Salas A, *et al.* (2015); en cuatro variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) tanto en muestra cruda como cocida, se utilizó para la extracción condiciones diferentes a nuestro estudio; para la preparación de los extractos de cada muestra pesó 4 g en un frasco ámbar, con 10 mL metanol (99%), se maceró por 24 h, el líquido filtrado se centrifugó a 10000 r.p.m. /10 min a 4°C. Y los resultados que obtuvo se destacó una variedad de fréjol (Huallaguino crudo), que a la vez demuestra menores resultados con valores de SC_{50} de 7,42 mg/mL en DPPH y 10,49 mg/mL en ABTS, por lo que existe una diferencia significativa con respecto al valor obtenido del gandúl con 0,287 mg/mL en ABTS; y fréjol con 0,142 mg/mL en DPPH. Siendo estos dos últimos valores, los más eficaces en reducir la concentración media inhibitoria, respecto a lo reportado por Salas A, *et al.* (2015).

Así mismo para validar y confirmar los ensayos realizados con el estándar de Trolox se hizo la concentración media necesaria para eliminar el 50% de los radicales libres. Dando como resultado 7,653 μ g/mL (DPPH) y 5,925 μ g/mL (ABTS). Damiano S., *et al* (2016) demuestra 2,5 μ g/mL (DPPH) y 1,0 μ g/mL (ABTS) de Trolox, denotando una diferencia no significativa entre ambos valores; a su vez Huey-jiun, Ko., *et al.* (2009) reporta 5,8 μ g/mL (DPPH) y 29,03 μ g/mL (ABTS); teniendo una similitud en (DPPH) y una diferencia en (ABTS).

En el Anexo 5 se presentan los datos obtenidos para humedad, determinada en muestra cruda. A sí mismo, el rendimiento de cada una de las muestras, tanto en crudo como en cocido.

CONCLUSIONES

- En la determinación de compuestos fenólicos, las leguminosas, en especial el fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y gandúl (*Cajanus cajan*), presentaron mayor rendimiento y mayor cantidad de compuestos fenólicos con respecto los pseudocereales como son el amaranto (*Amaranthus caudatus L.*) y Quínua (*Chenopodium quinoa*).
- El fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y gandúl (*Cajanus cajan*) destacaron por su capacidad antioxidante, tanto para los extractos obtenidos de muestra cruda como cocida, con valores superiores a los 15 $\mu\text{M TE/g}$ muestra BS, siendo superiores a los valores reportados por literatura.
- La capacidad de captación radicalaria, para DPPH y ABTS, se evidenció con mayor predominancia para muestra cruda donde sus valores de SC_{50} (290 $\mu\text{g /mL}$, fréjol y 287,24 $\mu\text{g /mL}$, gandúl) fueron superiores a los reportados por literatura.

RECOMENDACIONES

- Realizar la cuantificación y aislamiento del tipo de compuestos fenólicos que cada una de las muestras analizadas.
- Durante el proceso de extracción de acuerdo a la metodología propuesta por Pérez y Saura-Calixto, al obtener los sobrenadantes se recomienda realizar una amortiguación del pH ácido de la muestra, para evitar posibles interferencias durante el proceso de evaluación de la actividad antioxidante.
- Para procesar las muestras en cocción se recomienda tomar en cuenta la ganancia de humedad que presentan cada una de ellas después de ser cocidas. Y a su vez se debería realizar la cocción a alta presión, ya que este método se asemeja a las condiciones diarias en la utilización de estos alimentos y además algunos estudios demuestran que los diferentes compuestos fenólicos no sufren modificaciones considerables.

BIBLIOGRAFÍA

- Betancur-Ancona, D., Peraza-Mercado, G., Moguel-Ordoñez, Y., & Fuertes-Blanco, S. (2004). Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. *Food Chemistry*, 84(2), 287-295.
- Bonifacio, A. (2006). El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. La Paz, BO. Organización de las naciones unidas para el desarrollo industrial. 34 p.
- Caicedo V., C., y Peralta I., E. (1999). Chocho, fréjol y arveja, leguminosas de grano comestible, con un gran mercado potencial en Ecuador. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas.
- Cerón, I., Higueta, J., & Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5, 5.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Damiano S, Forino M, De Arpan, Vitali L, Lupidi G & Taglialatela- Scafati O, (2016). Antioxidant and antiobiofilm activities of secondary metabolites from *Ziziphus jujuba* leaves used for infusión preparation., School of Pharmacy, University of camerino, Food Chemistry, Naples-Italy, No 230, 24-29.
- Estepa, V., Ródenas, S., & Martín, M. C. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 67, No. 3).
- Estrella E., (1990). El pan de América., 3a. ed., Quito-Ecuador., Abya-Yala., Pp. 101-102,181.
- García León, Wilman; Rodríguez, Johns (2002). "Evaluación de tres niveles de harina de gandul (*Cajanus cajan*) como alternativas de proteína en dietas en las fases de crecimiento y acabado de cerdos confinados". Escuela Politécnica del litoral.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- Guillen-Portal, F.R.; Baltensperger, D.D. y Nelson, L.A. (1999). "Plant population influence on yeld and agronomic traits in plainsman grain amaranth". In: Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. Alexandria, VA., ASHS Press, p. 190-193.
- Gülçin Y, Oktay M, Kierççi E, Küfreviolu ÖÝ (2003). Screening of antioxidante and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food

Chemistry; 83: 371-382. Recuperado en:
http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_2012_32_2/ANALISIS-NUTRICIONAL.pdf

Gutierrez-Salgado A., P. Gepts and D. G. Debouck (1995), Evidence for two gene pools of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L. in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2:15-28.

Huey-Jiun Ko, Airong Song, Min-Nan Lai & Lean-Teik Ng, (2009) Antioxidant and Antiradical Activities of Wu Ling Shen in a Cell Free System, *The American Journal of Chinese Medicine*, Taipei- Taiwan, Vol. 37, No. 4, 815–828,

INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC). 2014. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continúa. Ecuador.

Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331-335.

Lampe J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*. 70:475S- 490S. Disponible en línea en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3068/1/BQ34.pdf>

Lara, N. Ruales, J., (2002) .Popping of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) and its effect on the functional, nutritional and sensory properties., *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, Volumen 82: 797 – 805., Quito-Ecuador.

Manzocco, L., Calligaris, S., & Nicoli, M. C. (2002). Assessment of pro-oxidant activity of foods by kinetic analysis of crocin bleaching. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2767-2771.

Marathe, S. A., Rajalakshmi, V., Jamdar, S.N., & Sharma, A. (2011). Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2005-2012.

Marcone, M. F., & Yada, R. Y. (1991). Isolation, purification, and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agricultural and biological chemistry*, 55(9), 2281-2289.

Matill HA (1947). Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177–192. Recuperado en:
<http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3068/1/BQ34.pdf>

- Núñez, Núñez, Marco Antonio. (2010). "Evaluación del comportamiento agronómico de cinco líneas de gandul (*Cajanus cajan* L. Millsp) en tres comunidades tsimane". Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de agronomía. Recuperado en www.cas.northwestern.edu/anthropology/LHBR/Bolivia.html.
- Núñez, A. (2011), Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*. 37 (suppl.): 644-60.
- Ochoa Tarira, E. J. (2013). *Evaluación agronómica de 120 cultivares de fréjol arbustivo Phaseolus Vulgaris L. en la zona de Taura, provincia del Guayas* (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil).
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal. P. Changes. (2008). Antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Composition Analysis*; 21, 241-8.
- Peralta, E. Mazón, N. Murillo, A. Rivera, M. Rodríguez, D. Lomas, L. Monar, C. (2012). Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. 3 ed. Quito, EC. INIAP. Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Publicación Miscelánea N° 69 68 p.
- Peralta, I., Murillo, I., & Mazón, N. (2009). Producción y distribución de semilla de buena calidad de fréjol arbustivo con pequeños agricultores, a través de un sistema no convencional (Artesanal).
- Pereira Ordóñez, S. A. (2010). *Elaboración de leche de quinoa (Chenopodium quinoa, Willd)* (Bachelor's thesis, QUITO/EPN/2010).
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. In *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena* (pp. 1150-60).
- Prior RL, Wu X, Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J agric Food Chem*. 53:4290-4302. Recuperado en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3068/1/BQ34.pdf>
- Ramírez-Ortiz, M.E., Rodríguez-Canto, W., Corzo-Rios, L.J., Gallegos-Tintoré, S., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2015). Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 91-138

- Rodiño M., A. (2000). Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis de doctorado. Pontevedra, España.
- Salas A., Ordoñez G. & Reátegui D. (2015), Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en cuatro variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) Crudo seco, remojado y cocido., Centro de Investigación para el desarrollo Biotecnológico de la Amazonia., Perú, pág. 4-6.
- Sarmiento Thaise Rachel, (2012), Impacto del procesamiento sobre la pared celular y de las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, España- Madrid, pág. 178-183.
- Serrano, M. D., López, M. L., & Espuñes, T. D. R. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(004), 58-68.
- Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta biochimica polonica*, 57(1), 139-142.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Tustón, S., (2007). Adaptación de cinco líneas de amaranto de grano blanco *Amaranthus caudatus* y cinco líneas de ataco o sangorache *Amaranthus hybridus* en los cantones Otavalo y Antonio Ante., Universidad Técnica del Norte., Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales., Escuela de Ingeniería Agropecuaria., Ibarra-Ecuador., TESIS. Pp. 4-10
- Veliz Piguave, Maritza del Rosario. (2006). "Evaluación de diferentes alternativas de ensilaje de cáscara de gandul (*Cajanus cajan*) para la alimentación bovina". Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.
- Vera Moncayo, J. (2015). Proyecto de prefactibilidad para la exportación de quinoa hacia Estados Unidos periodo 2010-2014 (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Económicas).
- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4754-4764.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos para extracción

HCl 2N

$$N = \frac{[\#eq.sol][Ci]/[PM]}{[100g]/[d]}$$

Donde la cantidad a pesar de HCl es:

PM= 36,46094 g/mol

eq. Sol = 1

Ci= 37g

d = 1190 g/L

N= 12,07

Luego:

Donde el volumen que se debe tomar de HCl es:

$$Vi = [Cf \times Vf] / Ci$$

Cf = 2N

Vf =25 mL

Ci =12,07

Vi= 4,14 mL HCl aforar en balón de 25 mL con agua destilada

Metanol: Agua 1: 1

250 mL de solución (125 mL Metanol: 125 mL Agua destilada) adicionado HCl 2N

Solución acidificada hasta alcanzar pH 2

Acetona: Agua 7:3

250 mL de solución (175mL Acetona: 75mL de Agua destilada)

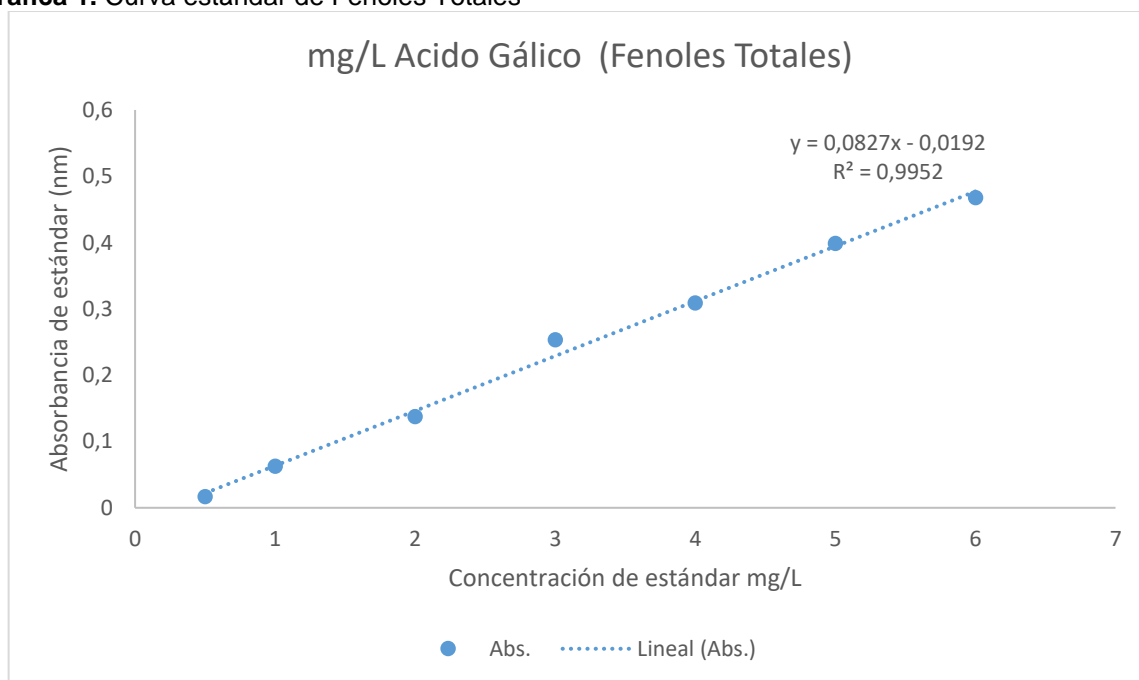
Anexo 2. Curva de calibración y cálculos para determinación de Fenoles Totales

Se construyó la curva en donde, se graficó la concentración calculada del estándar mg/L en el eje X y la absorbancia del estándar en eje Y, cuyo coeficiente de correlación R^2 debe ser igual o mayor a 0,995.

Tabla 9. Concentraciones de ácido gálico.

CÓDIGO	CONCENTRACIÓN INICIAL (mg/L)	CONCENTRACIÓN FINAL (mg/L)	ALICUOTA SOL. MADRE (μL)	AGUA (μL)
STD 1	10	0,5	10	990
STD 2	20	1	20	980
STD 3	40	2	40	960
STD 4	60	3	60	940
STD 5	80	4	80	920
STD 6	100	5	100	900
STD 7	120	6	120	880
		Pendiente	0,0827	
		Intersección	-0,0192	
		R^2	0,9952	

Gráfica 1. Curva estándar de Fenoles Totales



Cálculos para la determinación de compuestos fenólicos totales.

Ejemplo 1. Cálculos para Fenoles Totales

Muestra	Dosis inicial µg/mL (mg/mL)	Absorbancia (y)	y=ax+b (mgAG/L)	Dosis final en el ensayo µg/mL (mg/L)	mg EAG/ g extracto	% Rendimiento	mg EAG/ g muestra BS
AMARANTO	2500	0,084	1,24	125	9,92	5,90	0,59
		0,084	1,24		9,92		0,59
		0,082	1,22		9,76		0,58

Despejando la ecuación de la recta nos queda:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Pendiente (**a**) = 0,0827

Intersección (**b**) = -0,0192

Ordenadas (**y**) = absorbancia

Abcisas (**x**) = mgAG/L

Luego, convertimos la interpolación de la recta en mg EAG/ g de extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g extracto}} = \frac{1000 \times \text{mg ácido gálico} / \text{L}}{\text{Dosis final ensayo} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

$$\text{Dosis final ensayo} = \frac{\text{Dosis inicial} \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{20}$$

Finalmente, para expresar en mg EAG/ g muestra en BS ocupamos la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g muestra BS}} = \frac{\left(\frac{\text{mg EAG}}{\text{g extracto}}\right) \times \% \text{ rendimiento}}{100}$$

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g muestra BS}} = \frac{\left(\frac{9,92 \text{ mg EAG}}{\text{g extracto}}\right) \times 5,90}{100}$$

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g muestra Base Seca}} = 0,59$$

Anexo 3. Preparación de estándares para los métodos DPPH, FRAP y ABTS.

Solución Madre de Trolox 1000 μM

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf][R]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de Trolox en 10 mL de solución en Metanol:

$$PM = 250,29 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 1000 \mu\text{M}$$

$$Vf = 10 \text{ mL}$$

$$R = 0,97$$

$$M = 1000000 \mu\text{M}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = 2,42 \text{ mg Trolox}$$

Preparación del reactivo DPPH 0,625 mM

DPPH 0,625 mM

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de DPPH es:

$$PM = 394,32 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 0,625 \text{ mM}$$

$$Vf = 20 \text{ mL}$$

$$M = 1000 \text{ mmol}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = 0,004929 \text{ g} \rightarrow 4,929 \text{ mg en } 20 \text{ mL de MeOH}$$

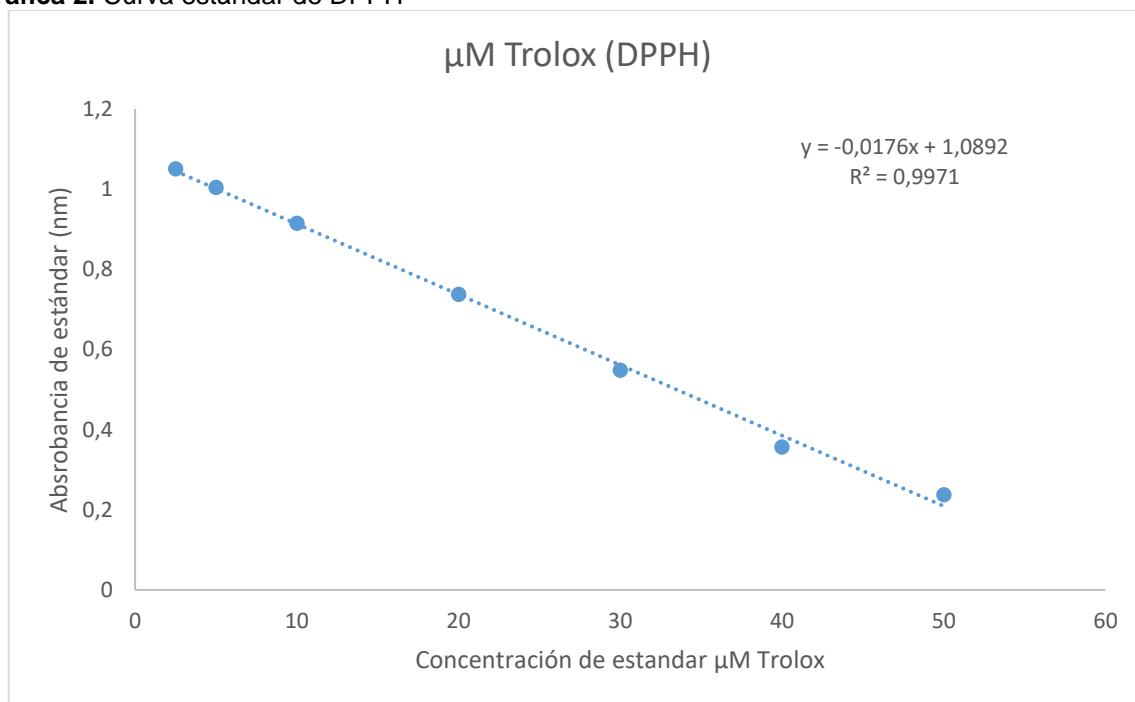
Anexo 4. Curvas de calibración y cálculos para determinación de la capacidad antioxidante en DPPH, FRAP y ABTS.

Se construyó la curva en donde, se graficó la concentración calculada del estándar μM Trolox en el eje X y la absorbancia del estándar en eje Y, cuyo coeficiente de correlación r^2 debe ser igual o mayor a 0,995.

Tabla 10. Concentraciones de Trolox para DPPH

Código	Concentración inicial (μM)	Concentración calculada (μM)	Solución	
			Madre Trolox (μL)	Metanol (μL)
STD 1	25	2,5	25	975
STD 2	50	5	50	950
STD 3	100	10	100	900
STD 4	200	20	200	800
STD 5	300	30	300	700
STD 6	400	40	400	600
STD 7	500	50	500	500
Pendiente		-0,0176		
Intersección		1,0892		
R^2		0,9971		

Gráfica 2. Curva estándar de DPPH



Cálculos para la determinación de la capacidad antioxidante en DPPH.

Ejemplo 2. Cálculos para DPPH

Muestra	Dosis inicial μg/mL (mg/L)	Absorbancia (y)	y=ax+b (μM Trolox)	Dosis final del ensayo μg/mL (mg/L)	μM ET/ g extracto	% Rendimiento	μM ET/ g muestra BS
AMARANTO	1400	0,909	10,43	140	74,50	5,90	4,40
		0,917	9,98		71,27		4,21
		0,902	10,82		77,32		4,56

Despejando la ecuación de la recta nos queda:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Pendiente (**a**) = -0,0176

Intersección (**b**) = 1,0892

Ordenadas (**y**) = absorbancia

Abcisas (**x**) = μM Trolox

Luego, convertimos la interpolación de la recta en μM ET/ g de extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu M ET}{g extracto} = \frac{1000 \times \mu M Trolox}{Dosis final ensayo \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}$$

$$Dosis final ensayo = \frac{Dosis inicial \frac{mg}{L}}{10}$$

Finalmente, para expresar en μM ET/ g de muestra en BS ocupamos la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu M ET}{g muestra BS} = \frac{\left(\frac{\mu M ET}{g extracto}\right) \times \% rendimiento}{100}$$

$$\frac{\mu M ET}{g muestra BS} = \frac{\left(\frac{10 \mu M ET}{g extracto}\right) \times 5,90}{100}$$

$$\frac{\mu M ET}{g muestra BS} = 4,40$$

Preparación de reactivos para ensayo FRAP

HCl 40 mM/50mL

Para ello:

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf][R]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a medir de HCl es:

$$PM = 36,46094 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 40 \text{ mM}$$

$$Vf = 50 \text{ mL}$$

$$R = 0,37$$

$$M = 1000 \text{ mM}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = \mathbf{0,02698 \text{ g}}$$

Luego:

$$v = \frac{m}{d}$$

Donde el volumen de HCl a medir es:

$$m = 0,02698 \text{ g}$$

$$d = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$v = \mathbf{0,02267 \text{ mL} \rightarrow 22,67 \mu\text{L}} \text{ aforar en un balón de 50 mL con Agua destilada}$$

TPTZ 10 mM

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de TPTZ es:

$$PM = 312,33 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 10 \text{ mM}$$

$$Vf = 15 \text{ mL}$$

$$M = 1000 \text{ mmol}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = \mathbf{0,0468495 \text{ g} \rightarrow 46,8495 \text{ mg}} \text{ en 15 mL de HCl (40 mM)}$$

Cloruro Férrico 20 mM/15mL

Para ello:

$$x = \frac{[PM][Cf][Vf]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de TPTZ es:

$PM = 270,204 \text{ g/mol}$

$Cf = 20 \text{ mM}$

$Vf = 15 \text{ mL}$

$M = 1000 \text{ mmol}$

$Vm = 1000 \text{ mL}$

$x = 0,0810612 \text{ g} \rightarrow 81,0612 \text{ mg en } 15 \text{ mL de agua destilada}$

Buffer de acetato pH 3,6

Mezclar 310 mg de acetato de sodio + 1,6 mL ácido acético y aforar en un balón de 100 mL con agua destilada.

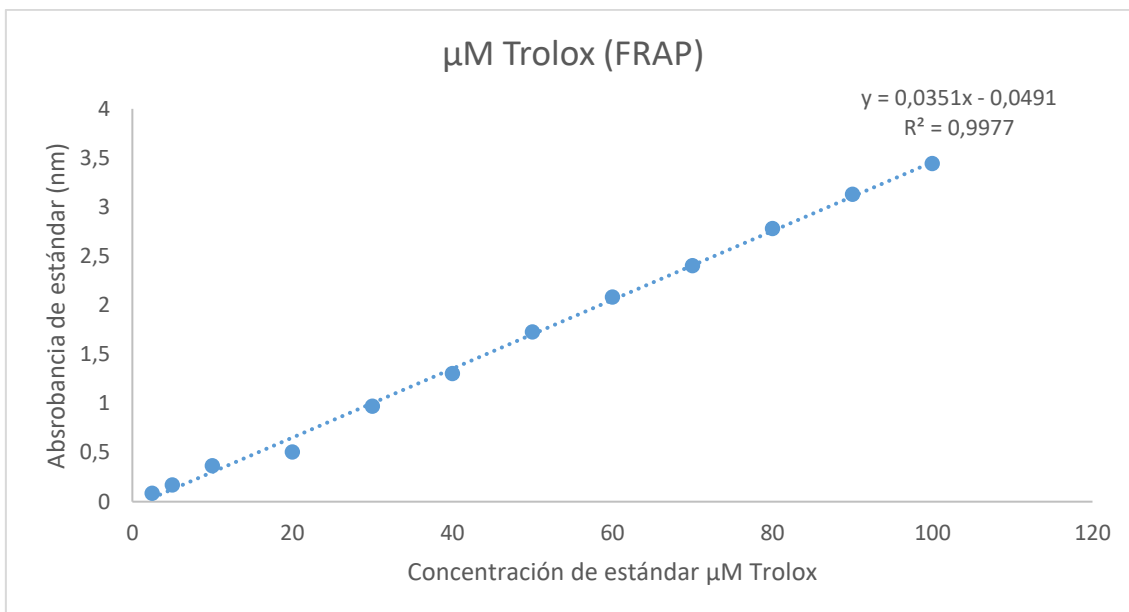
Curva de Calibración para FRAP

Se construyó la curva en donde, se graficó la concentración calculada del estándar μM Trolox en el eje X y la absorbancia del estándar en eje Y, cuyo coeficiente de correlación r^2 debe ser igual o mayor a 0,995.

Tabla 11. Concentraciones de Trolox para FRAP

Código	Concentración inicial (μM)	Concentración calculada (μM)	Solución Madre Trolox (μL)	Metanol (μL)
STD 1	25	2,5	25	975
STD 2	50	5	50	950
STD 3	100	10	100	900
STD 4	200	20	200	800
STD 5	300	30	300	700
STD 6	400	40	400	600
STD 7	500	50	500	500
STD 8	600	60	600	400
STD 9	700	70	700	300
STD 10	800	80	800	200
STD 11	900	90	900	100
STD 12	1000	100	1000	0
	Pendiente	0,0351		
	Intersección	-0,0491		
	R^2	0,9977		

Gráfica 3. Curva estándar de FRAP



Cálculos para la determinación de la capacidad antioxidante en FRAP.

Ejemplo 3. Cálculos para FRAP

Muestra	Dosis inicial µg/mL (mg/L)	Absorbancia (y) y=ax+b (µM Trolox)	Dosis final del ensayo µg/mL (mg/L)	µM ET/ g extracto	% Rendimiento	µM ET/ g muestra BS
AMARANTO	1400	0,264	6,12	43,73	5,90	2,58
		0,246	5,61	40,07		2,36
		0,258	5,95	42,51		2,51

Despejando la ecuación de la recta nos queda:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Pendiente (a) = 0,0351

Intersección (b) = -0,0491

Ordenadas (y) = absorbancia

Abcisas (x) = µM Trolox

Luego, convertimos la interpolación de la recta en µM ET/ g de extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{M ET}}{\text{g extracto}} = \frac{1000 \times \mu\text{M Trolox}}{\text{Dosis final ensayo } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

$$\text{Dosis final ensayo} = \frac{\text{Dosis inicial} \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{10}$$

Finalmente, para expresar en $\mu\text{M ET/g}$ de muestra en BS ocupamos la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{M ET}}{\text{g muestra BS}} = \frac{\left(\frac{\mu\text{M ET}}{\text{g extracto}}\right) \times \% \text{ rendimiento}}{100}$$

$$\frac{\mu\text{M ET}}{\text{g muestra BS}} = \frac{\left(\frac{10 \mu\text{M ET}}{\text{g extracto}}\right) \times 5,90}{100}$$

$$\frac{\mu\text{M ET}}{\text{g muestra BS}} = 2,58$$

Preparación de reactivos para el ensayo ABTS

ABTS 7,4 mM/10mL, cantidad necesaria para 5 ensayos en promedio en placa de 96 pocillos.

Para ello:

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de ABTS es:

$$PM = 548,68 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 7,4 \text{ mM}$$

$$Vf = 10 \text{ ml}$$

$$M = 1000 \text{ mmol}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = 0,040602\text{g} \rightarrow 40,602 \text{ mg en } 10 \text{ mL de agua destilada}$$

Persulfato de potasio 2,6 mM/10mL, cantidad necesaria para 5 ensayos en promedio en placa de 96 pocillos.

Para ello:

$$x = \frac{[PM] [Cf][Vf]}{[M][Vm]}$$

Donde la cantidad a pesar de persulfato de potasio es:

$$PM = 270,32 \text{ g/mol}$$

$$Cf = 2,6 \text{ mM}$$

$$Vf = 10 \text{ mL}$$

$$M = 1000 \text{ mmol}$$

$$Vm = 1000 \text{ mL}$$

$$x = 0,007028 \text{ g} \rightarrow 7,028 \text{ mg en } 10 \text{ mL de agua destilada}$$

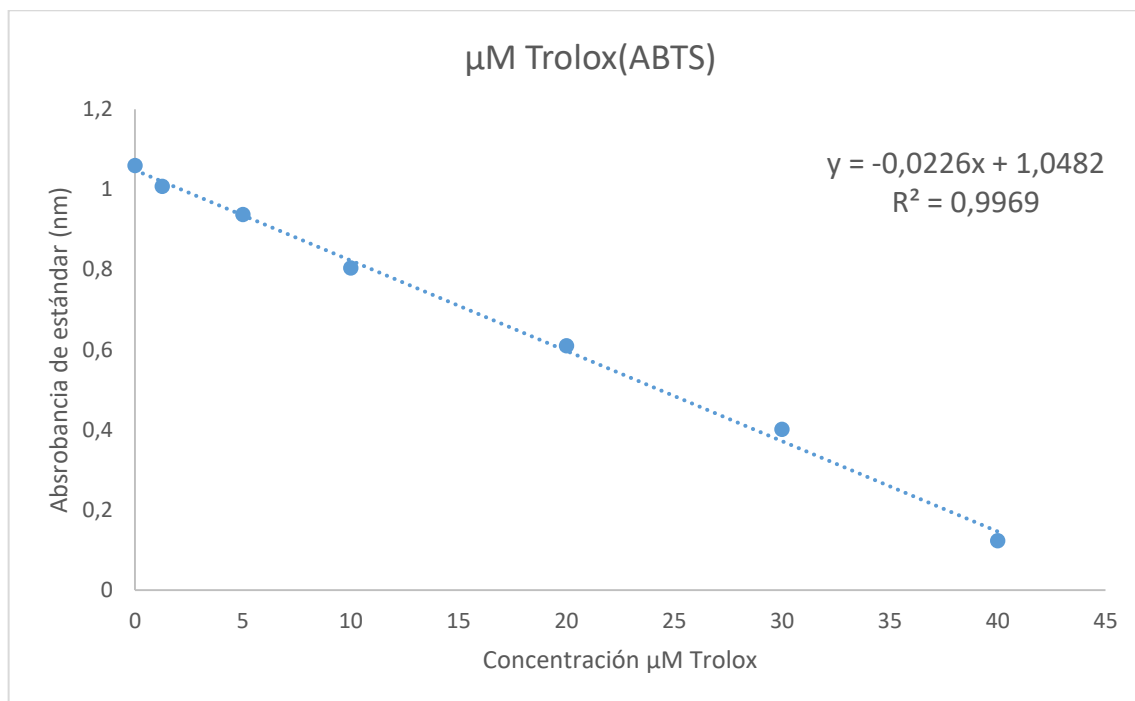
Curva de calibración para ABTS

Se construyó la curva en donde, se graficó la concentración calculada del estándar μM Trolox en el eje X y la absorbancia del estándar en eje Y, cuyo coeficiente de correlación r^2 debe ser igual o mayor a 0,995.

Tabla 12. Concentraciones de Trolox para ABTS

Código	Concentración inicial (μM)	Concentración calculada (μM)	Solución Madre Trolox (μL)	Metanol (μL)
STD 1	25	2,5	25	975
STD 2	50	5	50	950
STD 3	100	10	100	900
STD 4	200	20	200	800
STD 5	300	30	300	700
STD 6	400	40	400	600
Pendiente		-0,0226		
Intersección		1,0482		
R ²		0,9969		

Gráfica 4. Curva estándar de ABTS



Cálculos para la determinación de la capacidad antioxidante en ABTS.

Ejemplo 4. Cálculos para ABTS

Muestra	Dosis inicial $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia (y)	$y=ax+b$ ($\mu\text{M Trolox}$)	Dosis final del ensayo $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M ET/ g extracto}$	% Rendimiento	$\mu\text{M ET/ g muestra BS}$
AMARANTO	2500	0,985	2,80	250	111,86	5,904	6,60
		0,970	3,46		138,41		8,17
		0,997	2,27		90,62		5,35

Despejando la ecuación de la recta nos queda:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Pendiente (a) = -0,0226

Intersección (b) = 1,0482

Ordenadas (y) = absorbancia

Abscisas (x) = $\mu\text{M Trolox}$

Luego, convertimos la interpolación de la recta en $\mu\text{M ET/ g}$ de extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{M ET}}{g \text{ extracto}} = \frac{1000 \times \mu\text{M Trolox}}{\text{Dosis final ensayo} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

$$\text{Dosis final ensayo} = \frac{\text{Dosis inicial} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{10}$$

Finalmente, para expresar en $\mu\text{M ET/ g}$ de muestra en BS ocupamos la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{M ET}}{g \text{ muestra BS}} = \frac{\left(\frac{111,86 \mu\text{M ET}}{g \text{ extracto}}\right) \times 5,90}{100}$$

$$\frac{\mu\text{M ET}}{g \text{ muestra BS}} = 6,60$$

Anexo 5. Porcentaje de Humedad y Rendimiento.

Tabla 13. % Humedad de las muestras en crudo

MUESTRA	% Humedad
AMARANTO	11,54 ± 0,02
FRÉJOL	11,23 ± 0,05
HABA	11,49 ± 0,32
HABICHUELA	10,30 ± 0,28
GANDÚL	7,67 ± 0,40
QUÍNUA	10,50 ± 0,06

Tabla 14. % Rendimiento de las muestras en crudo y cocido

Tipo de muestra	Muestra	g (muestra)/mL	% Rendimiento
CRUDO	AMARANTO	0,0408	5,90
	FRÉJOL	0,1440	28,80
	HABA	0,0466	8,24
	HABICHUELA	0,0659	7,57
	GANDÚL	0,0919	8,35
	QUÍNUA	0,0366	6,26
COCCIÓN	AMARANTO	0,1072	2,68
	FRÉJOL	0,1536	3,84
	HABA	0,1984	4,96
	HABICHUELA	0,1984	4,96
	GANDÚL	0,1728	4,32
	QUÍNUA	0,1504	3,76