



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

BIOQUIMICO FARMACEUTICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad
antioxidante de *Solanum pimpinellifolium*

Autora: Alvarado Ludeña, Elayne Natasha

Director: Romero Benavides, Juan Carlos

LOJA - ECUADOR

2021



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>

2021

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 25, de noviembre, del 2021

Mgtr.

Claudia Teresa Cruz Erazo

Coordinador(a) de Titulación

Ciudad. -

De mi consideración:

El presente Trabajo de Titulación denominado: Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante de *Solanum pimpinellifolium*. realizado por Elayne Natasha Alvarado Ludeña, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma del Director del Trabajo de Titulación

Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides

C.I.: 1109018477

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Elayne Natasha Alvarado Ludeña, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor(a) del Trabajo de Titulación denominado: Estudio fotoquímico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante de *Solanum pimpinellifolium* específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico, generalidades del género *Solanum lycopersicum* y especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* y fundamento de los métodos a aplicarse en este estudio. Capítulo 2. Materiales y métodos implementados para el cumplimiento de los objetivos, Capítulo 3. Resultados y discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Romero Benavides, Juan Carlos, Ph.D. director del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autor: Elayne Natasha Alvarado Ludeña

C.I.: 1150711859

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación se lo dedico a mis padres Galo Alvarado y Tania Ludeña, a mi hermano Galo Alvarado y a mi abuelito Celio por su amor y apoyo incondicional a lo largo de este gran proyecto, por el gran esfuerzo que han realizado para apoyarme y que no me falte nada, gracias por ser un ejemplo de amor y lucha, dedicación, constancia y superación de ética personal y profesional, nada de esto sería posible sin su apoyo y sin sus oraciones.

A mis primas María Ángeles, Johanna y Karina, a mis amigos y amigas que han sido parte de mis buenos y malos momentos durante esta etapa, que me han motivado y ayudado de una u otra forma a seguir adelante y no rendirme, gracias por su tiempo y su sabiduría, pero sobre todo gracias por ese cariño infinito.

Agradecimiento

Agradezco primeramente a Dios porque es el quien ilumina y guía mi camino porque en sus manos estaban, están y estarán siempre puestos todos mis sueños, a mis papás por tanto amor y esfuerzo que han puesto para construir un hogar que amo y que me ha formado como persona con excelentes valores y principios, a mi hermano por su tiempo y paciencia en esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer a mis amigos, Fabiana y Hernán por apoyarme, por motivarme, por regalarme sus palabras de aliento por ese amor incondicional y esa amistad verdadera por acompañarme en los buenos momentos, pero sobre todo en los malos.

A mi tutor Juan Carlos Romero Benavides, por sus conocimientos, orientación y sobre todo por la paciencia durante el desarrollo de esta tesis, gracias porque he aprendido mucho durante este proceso.

Al PhD. Geovanny Figueroa por sus conocimientos, ayuda incondicional, su tiempo y paciencia en el desarrollo de los ensayos.

A la amiga más linda que me ha regalado la universidad, Ashli Jiménez, gracias por ser ese sistema de apoyo incondicional, por retarme cada día de este recorrido, por la paciencia, por las risas, llantos vividos, bromas y ocurrencias sin duda con quien crecí y aprendí mucho.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, a los docentes de la Titulación de Bioquímica y Farmacia por todos sus conocimientos impartidos

Índice de Contenidos

Aprobación del director del Trabajo de Titulación.....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimiento.....	V
Índice de Contenidos.....	VI
Abreviaturas.....	IX
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Capítulo uno.....	5
Marco Teórico.....	5
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Solanum lycopersicum L. (tomate).....	6
1.3 Solanum pimpinellifolium.....	7
1.4 Compuestos Fenólicos.....	7
1.4.1 Patologías y su relación con compuestos fenólicos.....	9
1.4.2 Compuestos fenólicos presentes en los alimentos.....	10
1.4.3 Determinación de fenoles totales (TPC).....	10
1.5 Actividad antioxidante.....	10
1.6 Métodos cromógenos para determinar la capacidad antioxidante.....	11
1.6.1 Método ABTS.....	11
1.6.2 Método DPPH.....	11
1.7 Estudio fitoquímico.....	12
1.8 Metabolitos secundarios.....	12
1.9 Tamizaje fitoquímico.....	13
Capítulo dos.....	14
Materiales y Métodos.....	14
2.1 Metodología experimental.....	14
2.2 Selección y recolección de la materia vegetal.....	15
2.3 Obtención de extractos.....	15
2.3.1 Liofilización.....	15
2.3.2 Maceración estática.....	15
2.4 Tamizaje fitoquímico.....	15
2.4.1 Determinación de proteínas (Ensayo de Biuret).....	16

2.4.2	Determinación de carbohidratos (Ensayo de Fehling).....	16
2.4.3	Determinación de grasas (Ensayo de Sudan).....	17
2.4.4	Determinación de alcaloides (Ensayo de Dragendorff)	17
2.4.5	Determinación de terpenos-Esteroides (Ensayo de Liebermann-Burchard) ...	17
2.4.6	Determinación de flavonoides (Ensayo de Shinoda).....	18
2.4.7	Determinación de saponinas (Ensayo de espuma).....	18
2.4.8	Determinación de quinonas (Ensayo de Borntragen).....	18
2.4.9	Determinación de taninos (Ensayo de Cloruro Férrico).....	19
2.5	Determinación de actividad antioxidante.....	19
2.6	Determinación de fenoles totales.....	20
Capitulo tres.....		21
Resultados.....		21
3.1	Rendimiento de los extractos.....	21
3.2	Determinación de proteínas (Ensayo de Biuret).....	23
3.3	Determinación de carbohidratos (Ensayo de Fehling).....	24
3.4	Determinación de grasas (Ensayo de Sudan).....	25
3.5	Determinación de alcaloides (Ensayo de Dragendorff).....	26
3.6	Determinación de Terpenos- Esteroides (Ensayo de Libermann – Burchard)	27
3.7	Determinación de Flavonoides (Ensayo de Shinoda).....	28
3.8	Determinación de Saponinas (Ensayo de espuma).....	30
3.9	Determinación de Quinonas (Ensayo de Borntragen)	31
3.10	Determinación de Taninos (Ensayo de cloruro férrico).....	32
3.11	Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	33
3.12	Determinación de la actividad antioxidante	36
Conclusiones		39
Recomendaciones		40
Referencias.....		41

Índice de Tablas

Tabla 1:	Peso y rendimiento de los extractos de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	21
Tabla 2:	Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y etanólico-acuoso de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	22
Tabla 3:	Contenido de fenoles totales en los frutos de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	34
Tabla 4:	Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante en los frutos de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	36
Tabla 5:	Valor de IC ₅₀ para los extractos de EtOH y EtOH-H ₂ O del ensayo DPPH de los frutos de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	37

Índice de Figuras

Figura 1. Molécula básica.....	8
Figura 2. Clasificación general de los compuestos fenólicos	9
Figura 3. Metodología experimental	14
Figura 4. Determinación de proteínas mediante ensayo de Biuret.....	24
Figura 5. Determinación de carbohidratos mediante ensayo de Fehling.....	25
Figura 6. Determinación de grasas mediante el ensayo de Sudan.	26
Figura 7. Determinación de alcaloides mediante el ensayo de Dragendroff.....	27
Figura 8. Determinación de Terpenos- Esteroides mediante el ensayo de Libermann – Burchard	28
Figura 9. Determinación de Flavonoides mediante el ensayo de Shinoda.....	29
Figura 10. Determinación de Saponinas mediante el ensayo de espuma.....	30
Figura 11. Determinación de Quinonas mediante el ensayo de Borntragen	32
Figura 12. Determinación de Taninos mediante el ensayo de cloruro férrico.....	33
Figura 13. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	34

Abreviaturas

ENT: Enfermedades no Transmisibles

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

DNA: Ácido desoxirribonucleico

TPC: Contenido de Fenoles Totales

FC: Folin-Ciocalteu

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)

DPPH: (2,2-difenil-1-picril hidrilo)

EtOH: Etanol

EtOH-H₂O: Etanol- agua

H₂O: Agua

Na₂CO₃: Carbonato de Sodio

Sp: *Solanum pimpinellifolium*

TLC: Cromatografía en capa fina

GAE: Equivalente ácido gálico

TEAC: Concentración de antioxidante equivalente a Trolox

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

AAI: Índice de actividad antioxidante

Resumen

Solanum pimpinellifolium L., conocido como “tomate grosella” es una especie silvestre de tomate. Este trabajo de investigación tuvo como objetivos realizar un estudio preliminar fitoquímico de esta especie, se obtuvieron extractos polares en etanol (EtOH), etanol-agua (EtOH-H₂O) y agua (H₂O), se evaluó la capacidad antioxidante y la cantidad de fenoles totales. Los extractos se obtuvieron a partir de los frutos maduros de la planta, después de ser liofilizados, mediante un proceso de maceración estática, utilizando como disolventes etanol y agua, para la evaluación del contenido de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu y para la evaluación de la capacidad antioxidante se emplearon los métodos ABTS y DPPH, los extractos se les realizó un estudio fitoquímico preliminar mediante métodos de presencia-ausencia para proteínas, carbohidratos, grasas, alcaloides, terpenos-esteroides, flavonoides, saponinas, quinonas y taninos, el extracto de EtOH-H₂O presentó mayor contenido de compuestos fenólicos 3.53 ± 0.13 mg/Eq ácido gálico/ 100 g de fruto seco, el extracto de EtOH presentó 2.48 ± 0.43 equivalentes a Trolox (TEAC)/ g de muestra de fruto seco y el extracto de EtOH-H₂O presentó 2.55 ± 2.19 equivalentes a Trolox (TEAC)/ g de muestra de fruto seco de actividad antioxidante.

Palabras clave: *Solanum pimpinellifolium*, Fenoles totales, ABTS, DPPH

Abstract

Solanum pimpinellifolium L., known as "currant tomato" is a wild species of tomato. The objectives of this research were to carry out a preliminary phytochemical study of this species. Polar extracts were obtained in ethanol (EtOH), ethanol-water (EtOH-H₂O) and water (H₂O), and the antioxidant capacity and the amount of total phenols were evaluated. The extracts were obtained from the mature fruits of the plant, after being lyophilized, by a static maceration process, using ethanol and water as solvents. The Folin-Ciocalteu method was used to evaluate the total phenol content, and the ABTS and DPPH methods were used to evaluate the antioxidant capacity, the extracts were subjected to a preliminary phytochemical study using presence-absence methods for proteins, carbohydrates, fats, alkaloids, terpenes-steroids, flavonoids, saponins, quinones and tannins; the EtOH-H₂O extract had a higher content of phenolic compounds 3.53 ± 0.13 mg/Eq gallic acid/ 100 g of dried fruit, EtOH extract presented 2.48 ± 0.43 Trolox equivalents (TEAC)/ g of dried fruit sample and EtOH-H₂O extract presented 2.55 ± 2.19 Trolox equivalents (TEAC)/ g of dried fruit sample antioxidant activity.

Keywords: *Solanum pimpinellifolium*, Total phenols, ABTS, DPPH

Introducción

El tomate representa una de las hortalizas más consumidas y de gran importancia en el ámbito nutricional, debido a su sinnúmero de beneficios en la alimentación humana, el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) especie reconocida a nivel internacional y mayormente comercializada por su actividad antioxidante y su alto contenido de compuestos fitoquímicos importantes en los que destacan compuestos fenólicos, carotenoides y vitaminas entre otros compuestos de gran importancia para ser humano debido a que sus efectos benéficos, pueden ayudar a prevenir la producción de especies reactivas de oxígeno que dan origen a enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas junto con otros tipos de cáncer (Ferrer-Dubois, Fung-Boix, Isaac-Alemán, & Beenaerts, 2018).

S. lycopersicum es poseedora de una base genética común con sus cultivares silvestres, mismos que se encuentran distribuidos a lo largo de los Andes (Ecuador, Perú, Chile, México y las islas Galápagos), estas especies silvestres poseen una fácil adaptación a distintas condiciones ambientales, pueden crecer a diferentes altitudes, diferentes microclimas y suelos, por lo que han permitido la diversidad genética entre especies sin embargo no existen estudios realizados de estas especies en donde se presenten sus principales componentes nutricionales generadores de beneficios a la salud por su consumo (Flores-Hernández et al., 2017).

S. pimpinellifolium L, es una de las especies de tomate silvestres que crece en Ecuador y las Islas Galápagos, conocida como tomate grosella ha aportado un sinnúmero de genes de resistencia al estrés biótico y abiótico y a el mantenimiento y diversidad de especies de tomate, además mantiene una estrecha relación con *S. lycopersicum* (Palomo et al., 2010).

S. pimpinellifolium L contiene compuestos como: ácido málico y cítrico, contribuyentes principales del sabor del tomate, esta especie aporta a su vez rasgos útiles para el mejoramiento de características como el color y la calidad del fruto (Çolak et al., 2020).

Con lo anteriormente mencionado se pretende obtener mayor información de esta especie silvestre de tomate, realizando un estudio fitoquímico preliminar y a partir de los extractos polares evaluar la capacidad antioxidante y la determinación de su contenido de compuestos fenólicos de *S. pimpinellifolium* L.

Capítulo uno

Marco Teórico

3.1 Generalidades

El “tomate de mesa” o “tomate riñón” comúnmente conocido, es una de las especies con un alto nivel de consumo en distintos continentes, junto con otras especies de gran interés alimentario como el ají, el pimiento, la papa y el tomate de árbol pertenecen a la familia de las solanáceas (Acosta, 2015).

El tomate cultivado al igual que el tomate silvestre son principalmente originarios de Los Andes, pero el proceso de domesticación de este fruto fue llevado a cabo en territorio mexicano, donde los aztecas lo hicieron parte muy importante de sus campos de cultivo, tras ser llevado a Europa fue que aumentó el consumo del tomate como fuente principal de la alimentación humana y es fuertemente apreciado en la gastronomía italiana, los españoles y también los portugueses empezaron el cultivo y difusión de su uso, consumo y cultivo por todo el mundo (Zuriaga et al., 2009).

Tras la gran acogida del tomate a nivel mundial y los distintos factores climáticos de cada lugar al que fueron llevados, han perdido un porcentaje pequeño de cualidades que les generaba resistencia a ciertos factores climáticos y a ciertas enfermedades de plagas referentes a los cultivos, pequeño inconveniente que ha generado reducción en la variabilidad genética, es aquí donde las especies silvestres ejercen sus funciones, ya que debido a su elevada diversidad genética otorgada a lo largo de los años, poseen genes que generan mayor resistencia a factores externos, que permiten adaptarse al clima y otras condiciones ambientales (Estrada, Hinostroza, & Chávez, 2006)

En la actualidad, los beneficios nutricionales proporcionados por especies de tomate como *S. lycopersicum* y sus parientes silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* están relacionadas con su contenido de vitaminas, minerales fibra, etc. Dentro de su contenido fitoquímico, poseen compuestos con efecto antioxidante, que ayudan a prevenir enfermedades no transmisibles (ENT) (Palomo et al., 2010).

A nivel mundial se han reconocido 13 especies de tomates, de las cuales 12 son silvestres y las restantes corresponde al tomate cultivado *Solanum lycopersicum*. (Acosta, 2015) de este grupo pequeño de variedades silvestres, 5 como: *S neurickii*, *S habrochaites*, *S pimpinellifolium*, *S galapagense* y *S cheesmaniae* se encuentran distribuidas entre: Loja, Zamora Chinchipe, El Oro, Azuay, Cañar, Chimborazo, Guayas, Manabí y Galápagos.

3.2 *Solanum lycopersicum* L. (tomate)

Es una de las hortalizas más consumida en el mundo, considerada nutrácético por ser una fuente importante de fitonutrientes, cuyas propiedades son de alta relevancia entre los que se encuentran el ácido ascórbico, compuestos fenólicos también carotenoides (López-Palestina et al., 2019) que le proporcionan actividad antioxidante y que al mismo tiempo pueden prevenir la producción de especies reactivas de oxígeno (Albys, Yilan, Aleman, & Cuypers, 2018).

Su alto contenido de licopeno, el cual es el compuesto más característico del tomate, representa el 80% de carotenoides totales, mismo que es el responsable de aquel color rojo llamativo del tomate, conjuntamente con el β -caroteno, otro carotenoide principal de esta hortaliza, son los responsables mayoritarios de las actividades antioxidantes de los tomates, ya que estos compuestos son capaces de inhibir la producción de oxígeno singlete (1O_2) lo que les permite atrapar radicales peróxido ($ROO\cdot$) (Albys, Yilan, Aleman, & Cuypers, 2018).

Patologías gástricas, cardíacas, óseas, respiratorias, multiorgánicas, entre otras son resultado del exceso de producción de moléculas de gran inestabilidad como los radicales libres, que generan estrés celular produciendo un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas (Corrales MSc & Muñoz Ariza, 2012), condición que a lo largo de los años ha ido mejorando por la adición de frutas y hortalizas ricas en vitaminas, fibras, antioxidantes naturales y minerales (Castañeda C. et al., 2008).

3.3 *Solanum pimpinellifolium*

Especie de tomate silvestre perteneciente al dominio Eukaryota, reino Plantae, filo Magnoliophyta, clase Magnoliopsida (= Dicotyledoneae), orden Solanales, familia Solanaceae, género, *Solanum*, especie pim

pimpinellifolium (Robinson, 1902). cuyos nombres comunes por los que se la conoce son: “tomate grosella” o “tomate pasa”, “tomatillo de campo” es una leguminosa perenne anual (Chang, 2016)

Çolak et al., 2020 menciona que tras una serie de estudios de rasgos genéticos *S. pimpinellifolium* es poseedora de compuestos como: ácido málico y cítrico, esta especie silvestre posee un potencial relativamente alto para mejorar el sabor del tomate fresco y así mismo el color,

Esta especie silvestre de tomate, se encuentra estrechamente relacionada con *Solanum lycopersicum* L. por su capacidad de hibridarse fácilmente, acción que ha permitido el mantenimiento de la misma, *S. pimpinellifolium* posee características valiosas para la mejora de cultivos, (Ceballos & Vallejo, 2012) evaluaron que los valores más altos del contenido de β -caroteno, licopeno y vitamina C se han encontrado en el cultivar silvestre *S. pimpinellifolium*, componentes que determinan el contenido antioxidante.

3.4 Compuestos Fenólicos

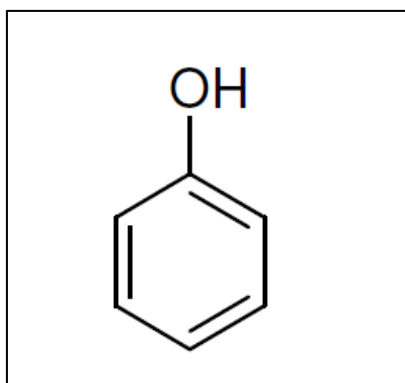
Estos compuestos comprenden un grupo amplio de sustancias químicas, que se consideran metabolitos secundarios en muchas plantas, presentan diferentes estructuras y actividades, abarcan alrededor de 8.000 compuestos diferentes, dentro de las plantas su presencia es esencial para el crecimiento y reproducción, como también para actuar como protección y defensa ante patógenos, los fenoles o polifenoles otorgan características referentes a la calidad sensorial de los alimentos frescos, como por ejemplo las antocianinas relacionadas con el pigmento de los alimentos, las quinonas relacionadas al pardeamiento de

los alimentos y así también los taninos relacionados con la astringencia de algunas frutas (Martinez, Periago, & Ros, 2000).

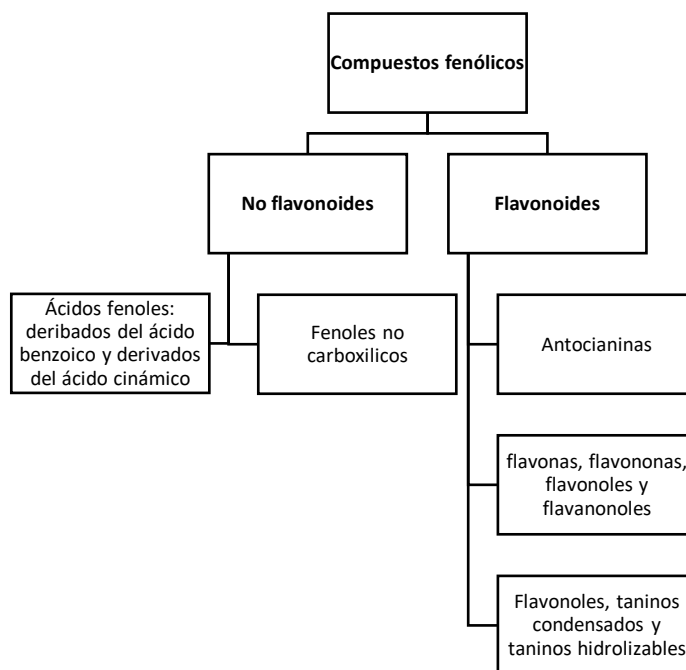
Los compuestos fenólicos, son un grupo de moléculas que poseen entre uno y más grupos hidroxilo, los cuales se encuentran adheridos a un anillo aromático, su molécula básica se encuentra conformada por un anillo aromático y uno grupo hidroxilo (OH), como se muestra en la figura 1 (Peñarrieta et al., 2014).

Figura 1

Molécula básica



(Creus, 2004), menciona que este grupo de compuestos de acuerdo a su estructura, se pueden clasificar en diferentes clases, no flavonoides y flavonoides como se muestran en la figura 2.

Figura 2*Clasificación general de los compuestos fenólicos*

1.1.1 Patologías y su relación con compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran relacionados con funciones beneficiosas para la salud como actividades farmacológicas y médicas, debido a algunos de estos compuestos presentan capacidades vasodilatadoras, antiinflamatorias, bactericidas, antivirales, antitumorales, etc. debido a la protección que ejercen dichos compuestos al daño del ADN generado por el daño oxidativo (Martinez, Periago, & Ros, 2000).

Del gran grupo que comprenden los compuestos fenólicos, los flavonoides están presentes con mayor frecuencia así como los flavonoles a quienes se les otorga una actividad antioxidante mayoritaria, relacionada a beneficios por disminuir probables riesgos de colesterol elevado y también a la disminución del riesgo de enfrentar una enfermedad cardiovascular, así también se le otorga propiedades antioxidantes debido a ser quelantes de compuestos metálicos como también ser donadores de hidrógeno, por estas propiedades se

encuentran implicados en el mejoramiento de la calidad y condición de salud humana y también en la prevención de ciertos cánceres y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Creus, 2004)

1.1.2 Compuestos fenólicos presentes en los alimentos

En la gran variedad de alimentos que a diario se consume, la presencia de compuestos fenólicos varía de acuerdo a su concentración, esta concentración se encuentra determinada por factores como el grado de maduración del fruto o vegetal, existe un alto contenido de flavonoles y otros compuestos fenólicos en frutas y vegetales, la presencia de estos depende únicamente de la especie, se conoce que la familia Solanaceae comprende la fuente de mayor contenido de estos compuestos, así pues los tomates, pimientos maduros y patatas están constituidos por un 88.9% de ellos (Martinez, Periago, & Ros, 2000).

1.1.3 Determinación de fenoles totales (TPC)

Uno de los métodos comúnmente utilizados para el análisis de los compuestos fenólicos de diferentes extractos vegetales es el método de Folin-Ciocalteu (FC), el cual corresponde a una mezcla de dos ácidos de color amarillo: ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico los cuales forman el reactivo de FC produciendo iones de molibdato y tungsteno, que generan una reacción de oxidación/reducción, dando lugar a una coloración azul la cual es medida espectrofotométricamente a 765 nm (Muñoz-Bernal et al., 2017).

3.5 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la facultad que tienen ciertas sustancias para evitar o retardar la degradación oxidativa, esto gracias a la capacidad de reacción ante radicales libres, la mayoría de las moléculas presentes en la naturaleza, representan un punto específico potencial de daño oxidativo, ya que el oxígeno presente en el organismo genera especies reactivas (ROS) o radicales libres, sin embargo el organismo presenta un sistema que los inhibe, mediante la presencia de enzimas y antioxidantes, aunque al existir una falta o carencia de estos las especies reactivas producen inactivación de proteínas, lípidos o a su

vez daño del DNA, encontramos antioxidantes de origen natural que se encuentran mayormente presentes en vegetales, frutos, semillas y aceites como son los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, el tocoferol y los carotenoides (Sotero, Silva, García, & Imán, 2009) así también los flavonoides, quienes han demostrado estar presentes en altas cantidades en frutas, vegetales, té, vino, café, cacao en comparación con otros antioxidantes en donde la presencia de estos es mucho menor como lo es la vitamina E y vitamina C (Lodoño, 2011), los antioxidantes que se adquieren en la dieta pueden ayudar a prevenir enfermedades como lo es el cáncer (Márquez et al., 2014).

3.6 Métodos cromógenos para determinar la capacidad antioxidante

Diferentes compuestos cromógenos, que producen coloración, son mayormente utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de diferentes frutos, los métodos más comunes de aplicación son ABTS y DPPH, ambos métodos muy estables (Kuskoski & al., 2005).

1.1.4 Método ABTS

Es un método de captura de radicales ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)), se basa en la decoloración del radical ABTS por las interacciones con aquellas especies donadoras de electrones o de hidrógeno, el radical ABTS es un cromógeno que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se origina tras reaccionar con un agente oxidante y el radical ABTS (Monsalve & Rojano, 2015).

El método ABTS permite medir la actividad antioxidante de compuestos cuya naturaleza es hidrofílica y lipofílica, una ventaja de este método es que establece máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y finalmente 815 nm en un medio alcohólico (Monsalve & Rojano, 2015).

1.1.5 Método DPPH

Es un método de captura de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrilo), este radical posee un electrón desapareado, el cual presenta una coloración azul-violeta, que pasa hacia

amarillo pálido, decolorándose por la reacción que evidencia la presencia de una sustancia antioxidante, misma que es medida espectrofotométricamente a 517 nm (Castañeda C. et al., 2008).

Una ventaja de este método es que puede obtenerse directamente sin preparación previa, sin embargo solo puede disolverse en un medio orgánico (Monsalve & Rojano, 2015).

3.7 Estudio fitoquímico

El estudio fitoquímico de especies vegetales y plantas da la oportunidad de determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos, primarios y secundarios dentro de este último grupo pueden ser: alcaloides, quinonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, ya que cada uno de estos grupos de compuestos presenta relación con actividades biológicas (Carvajal-Rojas et al., 2009) específicas que permiten orientar investigaciones posteriores de interés farmacológico como fitoterapia popular, hipoglucemiantes, antiespasmódicos, antioxidantes, etc. Además de evaluar la complejidad de las rutas de biosíntesis, degradación y mecanismos de regulación. (Sampietro et al., 1997).

3.8 Metabolitos secundarios

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en el organismo corresponden al metabolismo, proceso que consume la mayor parte de carbono, nitrógeno y energía para la producción de moléculas necesarias para el funcionamiento de los organismos como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, que corresponden al metabolismo primario, pero las plantas destinan un porcentaje de carbono y energía para producir una amplia variedad de moléculas orgánicas que son los metabolitos secundarios cuyas funciones no están relacionadas con procesos fotosintéticos, de asimilación de nutrientes o de síntesis de componentes nutricionales, síntesis de proteínas carbohidratos o lípidos, difieren de los metabolitos primarios porque su distribución se encuentra restringida en el reino vegetal (Ávalos & Elena, 1998).

Los metabolitos secundarios poseen funciones ecológicas como: atrayentes o repelentes por sus sabores dulces o amargos para los animales, otros son pigmentos importantes para la reproducción ya que proporcionan color a las flores y frutos atrayendo a insectos polinizadores y animales que utilizan el fruto para su alimentación, otros actúan como pesticidas naturales (Ávalos & Elena, 1998).

Se sintetizan en pequeñas cantidades, poseen un valor importante en la medicina, en la cosmetología, en la industria alimentaria y farmacéutica, poseen además un amplio uso como medicina natural, utilizada desde periodos muy antiguos de la humanidad, se agrupan en cuatro grupos principales: Terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos & Elena, 1998).

3.9 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje o “screening” fitoquímico, es aquella etapa de la investigación fitoquímica que permite al investigador realizar una determinación cualitativa de los grupos principales presentes en la planta, lo cual nos brinda un punto de inicio para la obtención de extractos que faciliten el aislamiento de grupos de compuestos de interés aún más relevante, un screening fitoquímico, ofrece la posibilidad de realizar una evaluación rápida, mediante la implementación de reacciones fácilmente reproducibles, bastante sensibles y a un precio bastante económico (Balseca, 2017).

Capítulo dos

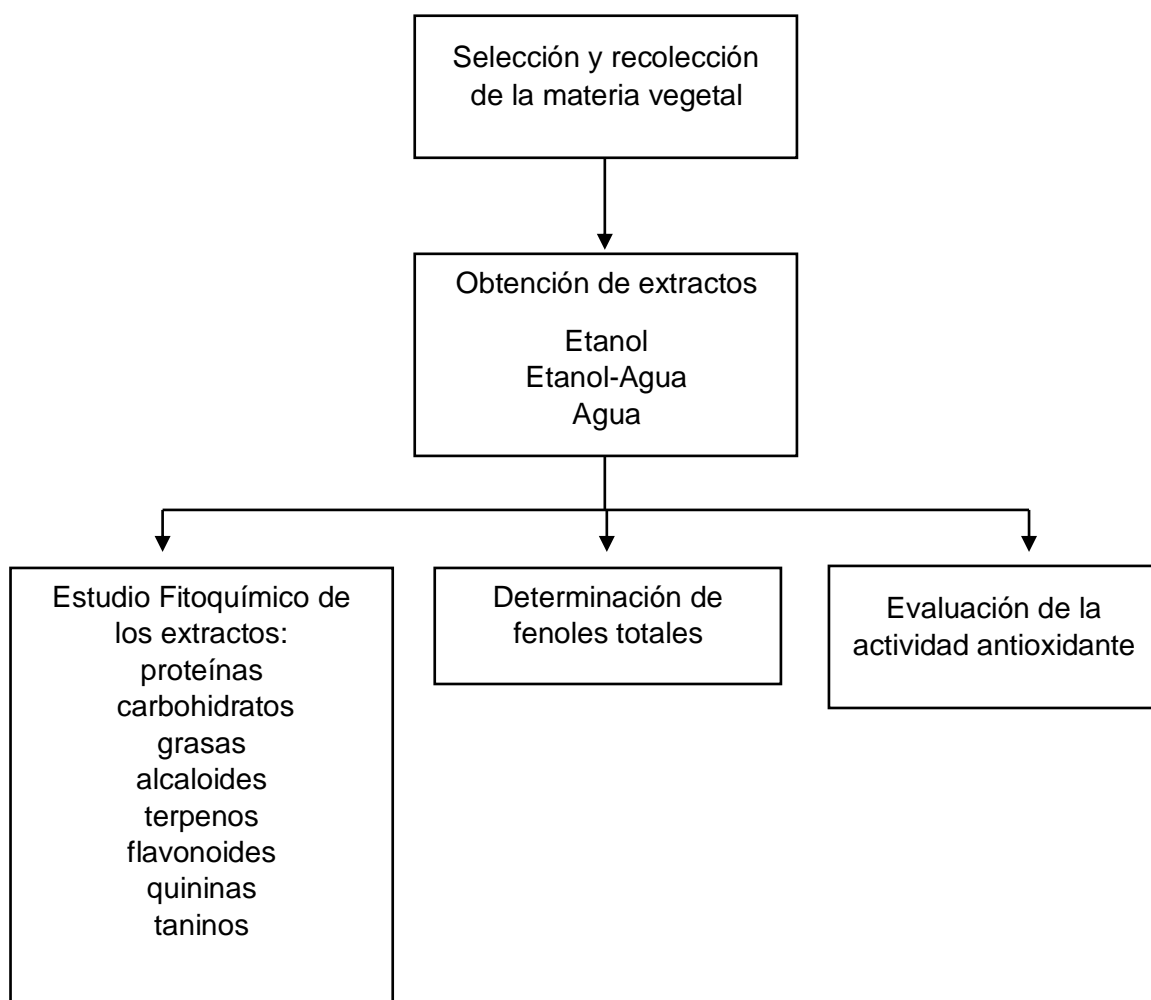
Materiales y Métodos

3.10 Metodología experimental

El presente trabajo experimental realizado utilizando frutos de en *Solanum pimpinellifolium* L. se resume en la figura 3 para tamizaje fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y determinación de fenoles totales.

Figura 3

Metodología experimental



Nota. Descripción esquematizada de la metodología realizada.

3.11 Selección y recolección de la materia vegetal

La materia vegetal donada por el Ph.D. Pablo Acosta, fue cultivada en el invernadero de la Universidad Técnica Particular de Loja ubicada en San Cayetano Alto, Calle París, se seleccionó únicamente los frutos maduros.

3.12 Obtención de extractos

2.2.1 Liofilización

A 166 gramos de muestra de frutos maduros se los lavó y se los perforó de 3 a 4 veces con ayuda de una aguja seguidamente se los colocó en frascos Boeco de 1000 mL, se procedió a congelar a temperatura de -80°C , después se los liofilizó en un equipo LABCONCO modelo 7.754.047

2.2.2 Maceración estática

Para 26.41 gramos de material vegetal liofilizado, se utilizaron disolventes polares como: Etanol (EtOH), etanol-agua (EtOH: H₂O) y agua (H₂O), para cada extracción se empleó 500 mL de cada disolvente, se dejó reposar durante 72 horas y posterior a ello se procedió a filtrar y a concentrar al vacío con la ayuda de un rotaevaporador Buchi 210, proceso que se repitió para cada extracción.

Se obtuvieron 3 extractos a los cuales se les asignó un código correspondiente a

- Etanol: Sp EtOH
- Etanol Agua: Sp EtOH-H₂O
- Agua: Sp H₂O

3.13 Tamizaje fitoquímico

El estudio fitoquímico preliminar, se realizó utilizando la metodología de (Mandal et al., 2015) y Miranda & Cuellar, 2001, que permite determinar cualitativamente presencia / ausencia de metabolitos primarios (proteínas, carbohidratos, y grasas) y metabolitos

secundarios (alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, saponinas, y quinonas), para la solución madre se disolvió en 10 ml de agua destilada la cantidad de 50 mg de muestra de cada extracto obtenido (EtOH y EtOH-H₂O), a 6 tubos se acondiciono 1 ml de la solución madre, concentración 1:5, preparada anteriormente para la realización de los ensayos de: proteínas, carbohidratos, grasas, flavonoides, saponinas y taninos, por otro lado, para los ensayos de terpenos-esteroides y quinonas se utilizó 5 mg de muestra directa de los extractos secos, en 2 tubos acondicionados para cada ensayo respectivamente y para el ensayo de alcaloides, se utilizó una cantidad mínima correspondiente a 2 mg de muestra de cada extracto seco, las que se diluyó en solventes previamente para ser sembrados en placas TLC.

2.2.3 Determinación de proteínas (Ensayo de Biuret)

Al primer tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se le añadió cantidades iguales del reactivo de Biuret (1 o 2 mL), se homogenizó cuidadosamente y se dejó reposar por el lapso de 5 minutos, después del transcurso de este tiempo, terminada la reacción se observó el cambio de color de azul a violeta, el cual es indicador de un resultado positivo de presencia de proteínas o enlaces peptídicos.

Los controles positivos fueron 2 mg de: ácido glutámico, albumina de huevo y leche en polvo respectivamente, diluidos en agua

2.2.4 Determinación de carbohidratos (Ensayo de Fehling)

Se mezcló en cantidades iguales las soluciones A y B del ensayo de Fehling, a continuación, en el segundo tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se le añadió 6 gotas de la mezcla de las soluciones A y B, se llevó el tubo de ensayo a baño de agua durante 10 minutos. Se observó finalmente el cambio de color, interpretando como positivo la presencia de un color rojizo al final de la reacción o un precipitado por las paredes indicativo de la presencia de azúcares reductores.

Se utilizó dos controles, uno para azúcares reductores, glucosa (2 mg), cuya reacción se interpretó como positiva al cambiar la coloración de azul a rojo y otro para azúcares no

reductores, sacarosa (2 mg), cuya reacción positiva generó el cambio de color de azul a una tonalidad verdosa.

2.2.5 Determinación de grasas (Ensayo de Sudan)

Al tercer tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se le añadió 3 gotas del reactivo de Sudan III, posterior a ello, se lo llevo a baño de agua hasta que se evaporó el disolvente, la prueba se interpreta como positiva cuando aparecen gotas coloreadas con una tonalidad rojiza por las paredes o en la parte superior de la muestra.

Se utilizó como control positivo aceite vegetal.

2.2.6 Determinación de alcaloides (Ensayo de Dragendorff)

Se realizó mediante cromatografía de capa fina (TLC), se ocupó 2 mg de muestra de los extractos (EtOH y EtOH-H₂O), para el extracto de etanol se empleó etanol con alta pureza (99.5) para su dilución, para el extracto de etanol-agua se utilizó agua para su respectiva dilución, enseguida se procedió a sembrar los distintos extractos en placas TLC, directa para el extracto etanólico e inversa para el extracto etanolito acuoso, a continuación se corrieron las placas en etanol y agua respectivamente, después de ello, se procedió a teñir cada TLC con el reactivo de Dragendorff, el cual fue secado con aire frío por unos segundos, seguidamente se añadió ácido sulfúrico al 5% para intensificar la coloración que indica la presencia de alcaloides

Se utilizó como control positivo cafeína

2.2.7 Determinación de terpenos-Esteroides (Ensayo de Liebermann-Burchard)

Se utilizó 1mL de cloroformo con 1mL de anhídrido acético, directamente sobre 5 mg de la materia vegetal, en un tubo de ensayo, tras la mezcla, la cual se dejó enfriar a baño de hielo a 0 °C y posteriormente con cuidado, por las paredes del tubo de ensayo se dejó caer 3-5 gotas de ácido sulfúrico para luego ser agitada, finalmente se observó el resultado de la reacción. Interpretándose de tres maneras diferentes a un ensayo positivo

- Rosado-azul al instante

- Verde visible al pasar unos segundos
- Verde oscuro-negro al finalizar la reacción

Se utilizó como control positivo Argentatina B

2.2.8 Determinación de flavonoides (Ensayo de Shinoda)

Al cuarto tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se le agregó una porción de viruta de magnesio metálico acompañada de 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, dejando reposar así por un tiempo aproximado de 5 minutos, finalmente se añadió 1 mL de alcohol amílico, tras la mezcla se dejó reposar la misma hasta que se visualizó una separación de fases, se considera un resultado positivo cuando el alcohol amílico presenta coloración amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos que indican la presencia de flavonoides.

Se utilizó como control positivo Esperidina

2.2.9 Determinación de saponinas (Ensayo de espuma)

Al quinto tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se lo llevo a baño de agua a una temperatura de 40-50°C seguidamente se le añadió 5 mL de agua destilada a cada tubo y se agitó por un tiempo aproximado de 5 a 10 minutos. La espuma presente al final del ensayo en la parte superior del contenido debe persistir por más de 2 minutos para considerarlo positivo.

Se utilizó como control positivo papa rayada una cantidad de aproximadamente 2 mg en 5 mL de agua destilada

2.2.10 Determinación de quinonas (Ensayo de Borntragen)

Se añadió 1 mL de cloroformo seguido de 1 mL de hidróxido de sodio y finalmente 1 mL de hidróxido de potasio al 5% en agua a una cantidad de 10 mg aproximadamente del extracto de etanol y etanol-agua, en un tubo de ensayo, a continuación, se prosiguió a agitar vigorosamente para que finalmente se observara la separación de fases, la fase acuosa alcalina cambia de color a rosado o rojo interpretando así un ensayo positivo.

Visualizando cualitativamente los posibles ensayos positivos de la siguiente manera

- Color rosado en la parte superior (++)
- Color rojo en la parte superior (+++)

Se utilizó como control positivo Hidroquinona

2.2.11 Determinación de taninos (Ensayo de Cloruro Férrico)

Al sexto tubo con 1 mL de la solución de cada extracto (EtOH y EtOH-H₂O), se le añadió 4 gotas de la solución madre de cloruro férrico al 5%, en solución salina, finalmente se observa la aparición de un precipitado que puede generar tres coloraciones distintas:

- Rojo vino, compuestos fenólicos en general
- Verde intenso, taninos de tipo pirocatecólicos
- Azul, taninos de tipo pirogalotánicos

Se utilizó como control positivo vainillina al 1%

3.14 Determinación de actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de eliminación de radicales ABTS se siguió el procedimiento descrito por (Thaipong et al., 2006) con ligeras modificaciones, para lo cual se prepararon diluciones de los tres extractos EtOH, EtOH-H₂O y H₂O y de cada uno se tomó una alícuota de 10 uL y una solución de 190 uL del reactivo de ABTS colocados en una microplacas de 96 pocillos, se realizaron por triplicado las lecturas y su absorbancia se midió a 734 nm, en un espectrofotómetro de microplacas Biotek, se realizaron los cálculos correspondientes y se expresaron como micromoles equivalente trolox/g de extracto.

Para el ensayo de eliminación de radicales DPPH, se realizó el ensayo en una microplaca, siguiendo el procedimiento descrito por (Thaipong et al., 2006) con

modificaciones, de los extractos de *S. pimpinellifolium*, se tomó una alícuota de 10 uL de cada uno a diferentes concentraciones tanto para las muestras como los estándares y se mezclaron con 270 uL de DPPH, en una solución de metanol ajustado, después de transcurridos 120 min se realizó las lecturas utilizando un lector de microplacas Biotek a 515 nm, se realizaron los cálculos correspondientes utilizando Trolox como compuestos de referencia. Expresando los resultados como micromoles equivalente trolox/ g de extracto.

3.15 Determinación de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Thaipong, 2006), con modificaciones, inicialmente se preparó una curva de calibración de ácido gálico, posterior a ello se adicionó 200 uL de muestra, con 10 uL del reactivo de Folin, se agitó cuidadosamente y se dejó reposar por 10 minutos, a continuación se añadió 100 uL de carbonato de sodio (Na_2CO_3), se agitó y se dejó reposar por el lapso de dos horas teniendo cuidado de la luz, se colocaron a continuación 100 uL de cada muestra en la placa y se realizó la lectura.

Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro de microplacas Biotek. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto.

Para todos los ensayos realizados en este trabajo de fin de titulación no se tomó en cuenta el extracto de agua, debido a la baja cantidad de rendimiento de la extracción con agua durante el proceso de obtención del extracto.

Capítulo tres

Resultados

3.16 Rendimiento de los extractos

Los resultados de los rendimientos de los extractos obtenidos de *Solanum pimpinellifolium* L. se muestran en la Tabla 1, el rendimiento está calculado con respecto al peso del fruto seco.

Tabla 1

Peso y rendimiento de los extractos de Solanum pimpinellifolium.

Disolventes	Código	Peso (g)	Rendimiento (%)
Etanol	SpEtOH	6.26	23.7
Etanol-Agua	SpEtOH-H2O	5.11	19.3
Agua	SpH2O	0.26	1.0

Obteniendo mayor rendimiento en el extracto de etanol 6.26 g de extracto seguido del extracto de etanol agua con 5. 11 g de extracto y para el extracto acuoso se obtuvo una cantidad baja correspondiente a 0.26 g de extracto.

Los resultados de los ensayos del tamizaje fitoquímico realizados a los extractos EtOH y EtOH-H₂O se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y etanólico-acuoso de Solanum pimpinellifolium L.

Grupos identificados	Extractos	
	Etanólico EtOH	Etanol- Agua EtOH- H ₂ O
Proteínas (Ensayo de Biuret)	-	-
Carbohidratos (Ensayo de Fehling)	+++	+++
Grasas (Ensayo de Sudán)	+	+
Alcaloides (Ensayo de Dragendorff)	-	+
Terpenos- esteroides (Ensayo de Libermann – Burchard)	+ (verde-azul)	-
Flavonoides (Ensayo de Shinoda)	+++	+
Saponinas (Ensayo de espuma)	-	+
Quinonas (Ensayo de espuma)	+	+
Taninos (Ensayo de cloruro férrico)	++	++

- = ausencia
 + = levemente presente
 ++ = medianamente presente
 +++ altamente presente.

Para el extracto etanólico se muestra una leve presencia de grasas, terpenos y quinonas, una moderada presencia de taninos, una alta presencia de carbohidratos y flavonoides y una ausencia de proteínas, alcaloides y saponinas. Mientras que para el extracto etanólico-acuoso, se evidenció una leve presencia de grasas, alcaloides, flavonoides, saponinas y quinonas, una alta presencia de carbohidratos y taninos y finalmente la ausencia de proteínas y de terpenos-esteroides.

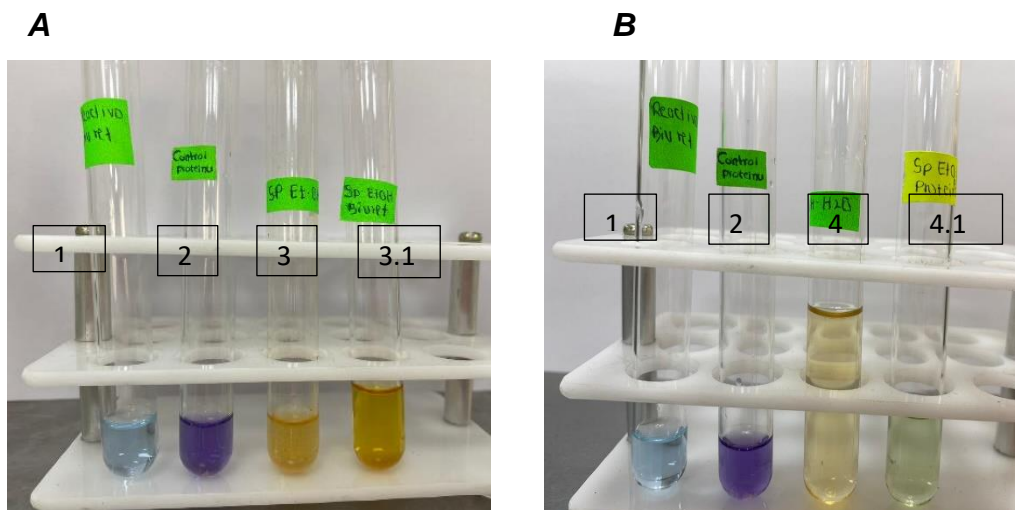
Solanum lycopersicum L. en sus extractos acuosos preparados a partir de los frutos, revelaron cualitativamente una marcada presencia de carotenoides, fenoles, taninos, carbohidratos y flavonoides según un estudio realizado por (Albys, Yilan, Aleman, & Cuypers, 2018), , así mismo (Kaunda & Zhang, 2019) menciona en su estudio realizado a un número significativo de especies pertenecientes al género *Solanum*, reporta la identificación de saponinas esteroides, alcaloides esteroides, terpenos, flavonoides, compuestos fenólicos entre otros compuestos presentes en *Solanum lycopersicum L* donde la especie silvestre de tomate *Solanum pimpinellifolium*, es bastante cercana por su genética y características agronómicas de gran importancia sobre todo en resistencia a enfermedades. Cabe mencionar que estudios relacionados al estudio fitoquímico para *Solanum pimpinellifolium* no han sido reportados.

3.17 Determinación de proteínas (Ensayo de Biuret)

En la determinación de proteínas por el sistema cualitativo de presencia/ ausencia aplicada a los extractos se indica de izquierda a derecha la posición de los tubos como se describen en la figura 4, el resultado de presencia/ ausencia para proteínas en el extracto etanólico (EtOH) es negativo como se muestra en la figura A, para el extracto etanólico-acuoso (EtOH-H₂O), el resultado es el mismo, donde se visualizó una nula presencia de proteínas por el método de Biuret como se indica en la figura B, donde los enlaces peptídicos no generaron el cambio de color de azul a morado, que es el color que se genera para interpretar un resultado como positivo. El ensayo de Biuret es específico para proteínas, pero con poca sensibilidad, lo que depende mucho de que tan concentrada se encuentre la muestra.

Figura 4

Determinación de proteínas mediante ensayo de Biuret.



Nota A): Extracto etanólico (Sp EtOH) **1:** Reactivo de Biuret; **2:** control positivo del ensayo; **3:** extracto etanólico diluido en agua; **3.1:** Extracto etanólico con el reactivo de análisis; **B):** extracto etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) **4:** Extracto etanólico-acuoso diluido en agua; **4.1:** Extracto etanólico-acuoso con el reactivo de análisis.

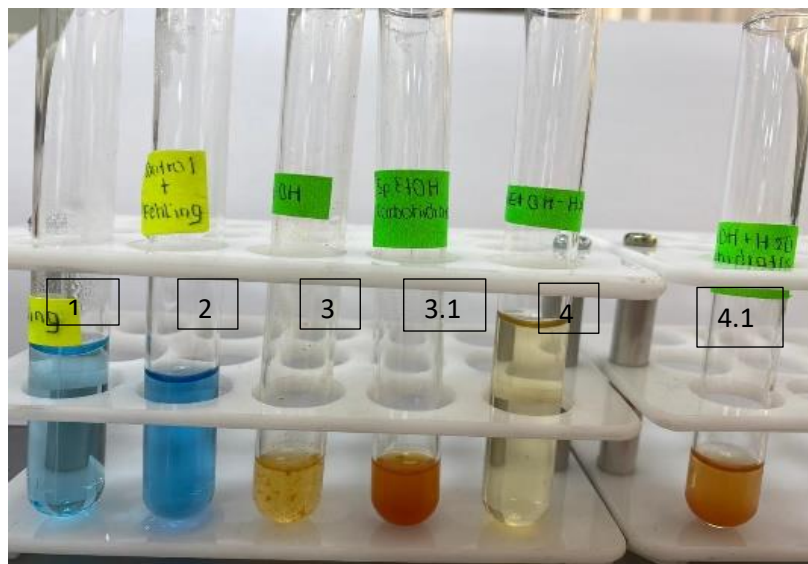
3.18 Determinación de carbohidratos (Ensayo de Fehling)

En la determinación de Carbohidratos mediante el sistema cualitativo de presencia /ausencia aplicada a los extractos indica que existe una alta presencia de los mismos figura 5, puesto que el método de Fehling según (Miranda M, 2000), se interpreta como positivo cuando la solución trabajada se colorea de una tonalidad rojiza o también se interpreta como positivo si se visualiza o llega a aparecer un precipitado rojo por ende en los tubos 3.1 y 4.1 de la figura (A), (Uchuypoma, 2010) menciona que este ensayo de Fehling se realiza para la determinación de azúcares reductores, demostrando la presencia de glucosa o bien de sus derivados como sacarosa o fructosa, cabe mencionar que mediante este ensayo es fácil detectar la presencia de azúcares reductores aun cuando la cantidad ocupada haya sido poca.

Figura 5

Determinación de carbohidratos mediante ensayo de Fehling.

A



B



Nota A) extractos: etanólico (Sp EtOH) y etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) de *Solanum pimpinellifolium*: **1:** Reactivo de Fehling **2:** Control positivo del ensayo azucres no reductores **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) mas el reactivo de Fehling, **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) más el reactivo de Fehling, **B):** Control positivo para azucres reductores.

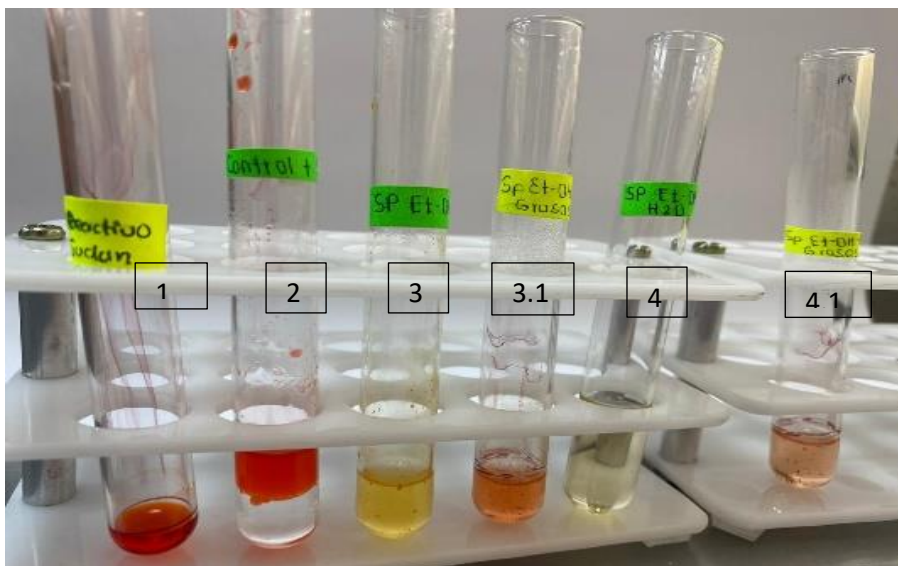
3.19 Determinación de grasas (Ensayo de Sudan)

En la figura 6 se muestran de izquierda a derecha los tubos de trabajo utilizados donde el tubo número 2 ejemplifica un resultado positivo para una prueba de lípidos en donde el reactivo formó gotas dispersas, sobre la capa de agua (Miranda M, 2000), como se observa en los tubos 3.1 y 4.1 el reactivo Sudan III reaccionó con los lípidos presentes, formó unas pequeñas gotas dispersas, evidenciando ligeramente la presencia de lípidos, el resto de la solución vertida en el tubo se coloreó completamente, evidenciando así la leve presencia de lípidos en las muestras .

Figura 6

Determinación de grasas mediante el ensayo de Sudan.

A



Nota A) Extractos etanólico (Sp EtOH) y etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) de *Solanum pimpinellifolium*: **1:** Reactivo de Sudan, **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) más el reactivo de Sudan, **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) más el reactivo de Sudan.

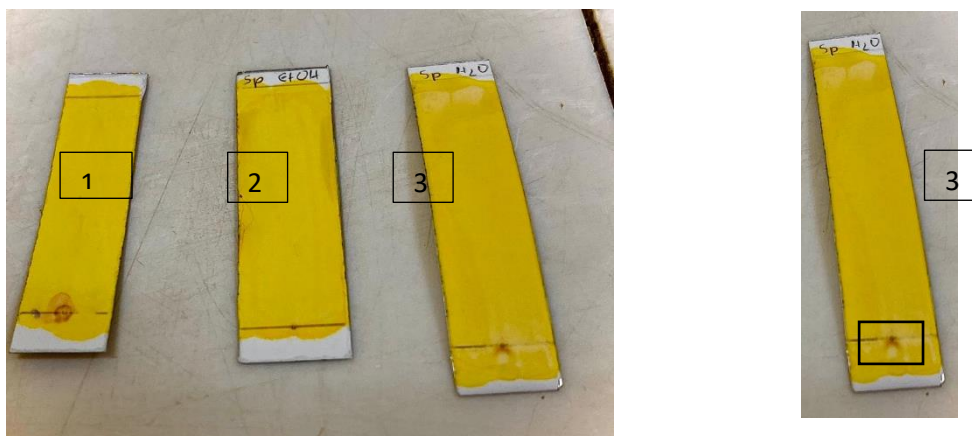
3.20 Determinación de alcaloides (Ensayo de Dragendroff)

Para la determinación de alcaloides mediante el ensayo de Dragendroff se visualiza de izquierda a derecha tres placas TLC, en donde la TLC correspondiente al extracto EtOH se puede visualizar la falta de tonalidad anaranjada correspondiente a un resultado positivo, por ende para este extracto se reporta ausencia de alcaloides, para la placa TLC correspondiente al extracto EtOH-H₂O, se visualizó un color naranja que tiñe el reactivo de Dragendroff, evidenciando así un resultado positivo ante la ligera presencia de alcaloides como se muestran en la figura 7.

Figura 7

Determinación de alcaloides mediante el ensayo de Dragendroff.

A



Nota A) Extractos etanólico (Sp EtOH) y etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) de *Solanum pimpinellifolium*: **1:** Control positivo del reactivo de Dragendroff, **2:** TLC directa, correspondiente al extracto etanólico (EtOH), corrido en etanol, **3:** TLC inversa, correspondiente al extracto etanólico acuoso (EtOH-H₂O) corrida en agua.

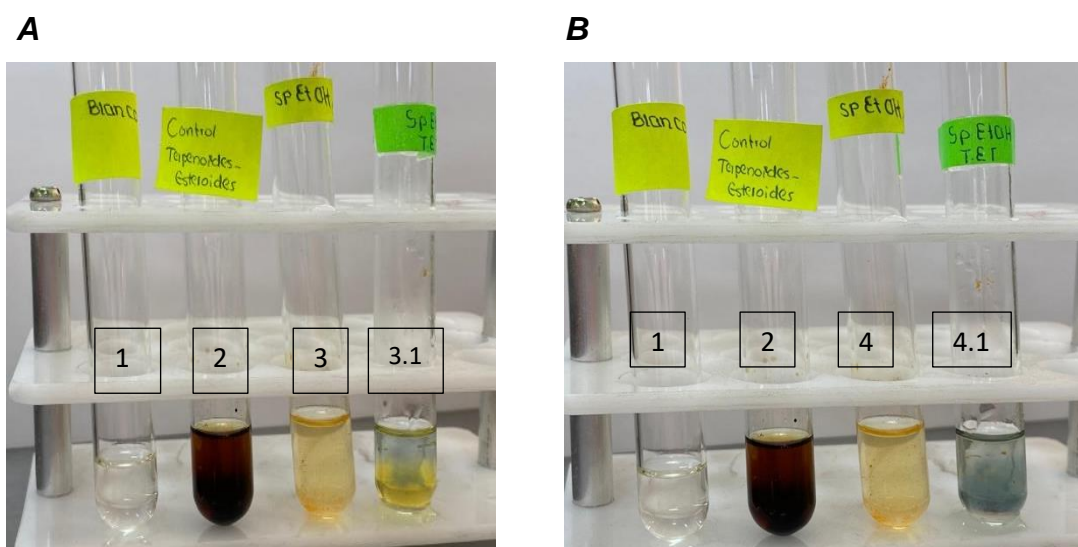
3.21 Determinación de Terpenos- Esteroides (Ensayo de Libermann – Burchard)

En cuanto a la determinación de terpenos-esteroides según el ensayo de Libermann-Burchard en la figura 8 podemos visualizar en la imagen A, correspondiente al extracto de EtOH un cambio de coloración en el tubo número 3.1 mismo que según literatura (Miranda M, 2000), indica tres resultados positivos posibles de coloraciones tras la reacción, evidenciando un resultado positivo en este caso que es la coloración azul-verde tras los primeros instantes de espera que puede deberse a la presencia de estructuras esferoidales que producen dicho cambio de color, por otro lado en la imagen B, el tubo número cuatro presentó una ausencia para la presencia de terpenos-esteroides, tras no evidenciarse una

coloración esperada tras varios minutos después de la reacción, después de un tiempo muy prolongado de espera se visualizó una tonalidad azul lo cual según (Bermejo & Cintra, 2014), las coloraciones pueden variar en estos ensayos debido a la presencia de interferencias tales como carotenoides, xantofilas o esteroides saturados que pueden estar presentes.

Figura 8

Determinación de Terpenos- Esteroides mediante el ensayo de Libermann – Burchard.



Nota. A): Extracto etanólico (Sp EtOH) **1:** Reactivo de Libermann – Burchard, **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) más el reactivo de Libermann – Burchard, **B):** extracto etanólico-acuoso (Sp EtOH-H₂O) **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) más el reactivo de Libermann – Burchard.

3.22 Determinación de Flavonoides (Ensayo de Shinoda)

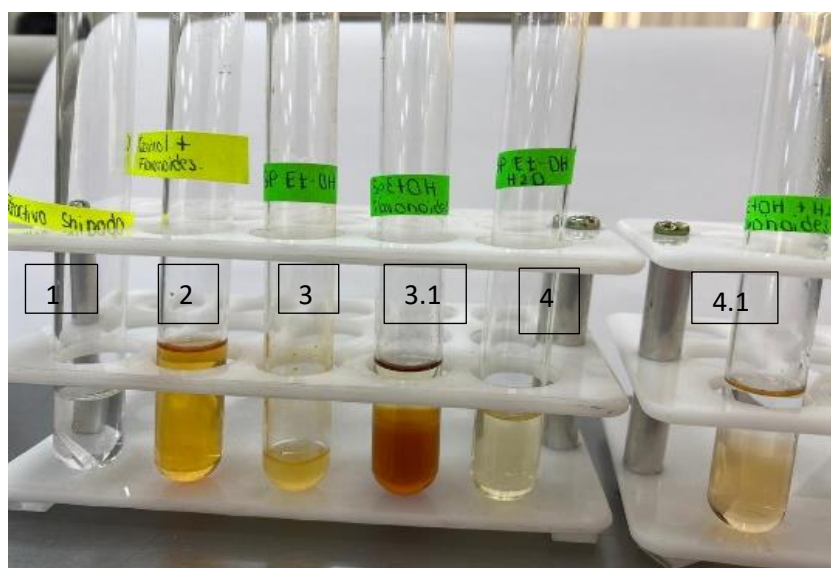
Para la determinación de flavonoides por el ensayo de Shinoda en la figura 9 podemos observar de izquierda a derecha como se indica en la descripción el posicionamiento de los tubos y lo que contienen cada uno, el ensayo de Shinoda reporta un resultado positivo cuando la muestra tras la mezcla con el alcohol amílico, presenta una coloración amarillo, naranja

carmelita o coloración roja, evidenciando bajo bibliográfica para el tubo número 3.1 correspondiente al extracto de EtOH, una alta presencia de flavonoides, pues se evidencia claramente el cambio de color y la separación de fases, por otro lado al tubo número 4.1 correspondiente al extracto EtOH-H₂O se visualizó un ligero cambio en la tonalidad del contenido del tubo, dicho cambio de igual manera corresponde a un color naranja característico del ensayo, reportando así un resultado positivo para una leve presencia de flavonoides.

Figura 9.

Determinación de Flavonoides mediante el ensayo de Shinoda.

A



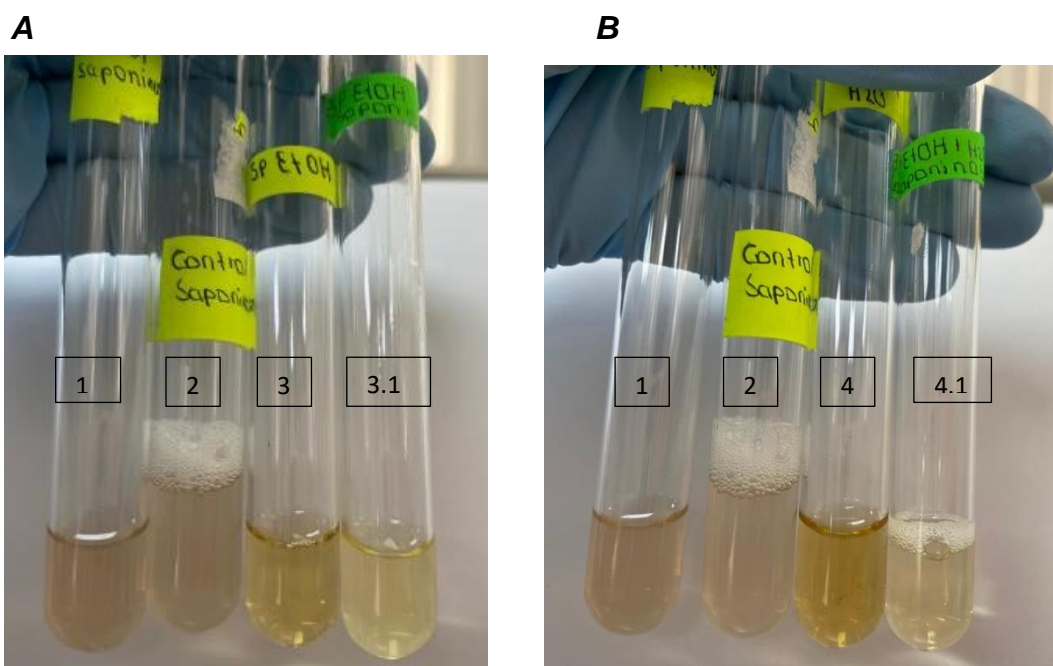
Nota. A): Extractos: etanólico (Sp EtOH) y etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) de *Solanum pimpinellifolium* **1:** Reactivo de Shinoda, **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) más el reactivo de Shinoda, **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) más el reactivo de Shinoda.

3.23 Determinación de Saponinas (Ensayo de espuma)

En cuanto a la determinación de saponinas mediante la aplicación del ensayo de espuma en la figura 10 se puede visualizar dos imágenes indicando el orden correspondiente que se describe al final de cada una de ellas, A correspondiente al extracto de EtOH evidencia en el tubo número 3.1, una ausencia de saponinas, en la imagen B correspondiente al extracto EtOH-H₂O el tubo número 4.1 evidencia la presencia de saponinas, el cual en comparación con su control positivo, el tubo número 2, tienen una muy cercana similitud, basándonos en los resultados que se deben obtener tras la realización de los procesos, siguiendo las pautas de (Miranda M, 2000).

Figura 10

Determinación de Saponinas mediante el ensayo de espuma



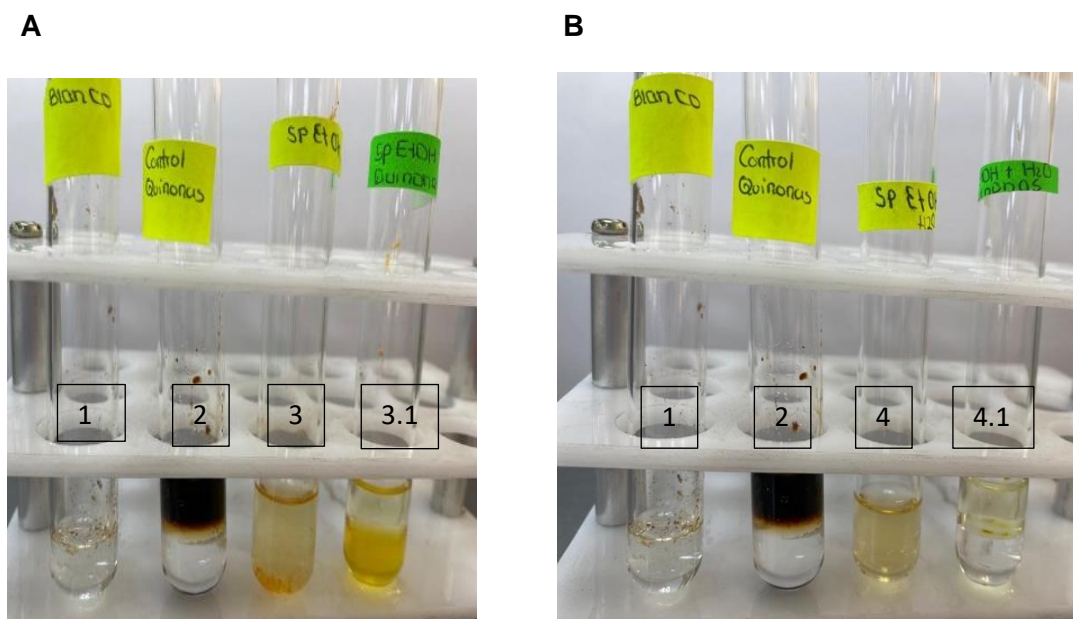
Nota. **A):** Extracto: etanólico (Sp EtOH) **1:** Filtrado del control que es papa, **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) tras el proceso de agitación correspondiente a saponinas, **B)** Extracto etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) tras el proceso de agitación correspondiente a saponinas.

3.24 Determinación de Quinonas (Ensayo de Borntragen)

Para el ensayo de quinonas por el ensayo de Borntragen, en la figura 11 se visualizan dos imágenes que corresponden a los ensayos de cada extracto, A corresponde al extracto de EtOH, en donde él tubo 3.1 presenta un cambio en la tonalidad evidenciando así un resultado positivo para la presencia de quinonas, en donde según bibliografía de (Miranda M, 2000) nos indica que un ligero cambio de tonalidad a rosado o rojo correspondiente a la concentración de quinonas presentes en la muestra, la tonalidad se puede ubicar en la parte superior o inferior del tubo, en cuanto a la figura B se evidencia la separación de fases se visualiza un ligero cambio de color en la parte superior de la muestra del tubo número 4.1 que pone en manifiesto la presencia de quinonas para el extracto de EtOH-H₂O.

Figura 11

Determinación de Quinonas mediante el ensayo de Borntragen.



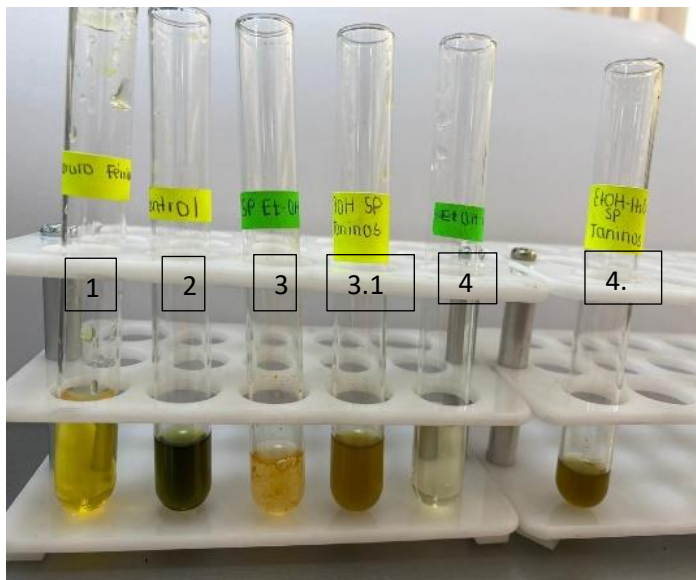
Nota. **A):** Extractos: etanólico (Sp EtOH) **1:** Hidróxido de Sodio, **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) diluido en cloroformo más hidróxido de sodio al 5%, **B)** Extracto etanólico- acuoso (Sp EtOH-H₂O) **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O diluido en cloroformo más hidróxido de sodio al 5%.

3.25 Determinación de Taninos (Ensayo de cloruro férrico)

En cuanto a la determinación de taninos por la aplicación del ensayo de cloruro férrico para este ensayo se interpretó como resultado positivo el cambio de coloración que según literatura (Miranda M, 2000) puede ser de tres tipos rojo vino, verde intenso o azul, siendo así, el tubo número 3.1 correspondiente al extracto de EtOH, presenta una tonalidad verdosa, evidenciando una leve presencia de taninos, de la misma manera para el tubo número 4.1 correspondiente al extracto EtOH-H₂O se visualizó esta leve presencia de taninos sustentada por su cambio de color a verde.

Figura 12

Determinación de Taninos mediante el ensayo de cloruro férrico.

A

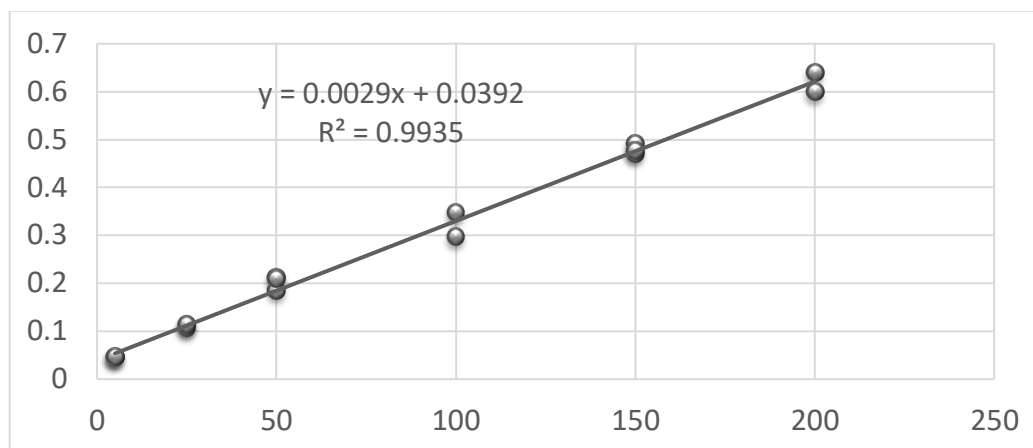
Nota. A): extracto: etanólico (Sp EtOH) **1:** Reactivo de Cloruro-Férrico **2:** Control positivo del ensayo **3:** Extracto de (EtOH) diluido en agua destilada **3.1:** Extracto de (EtOH) más el reactivo de Cloruro-Férrico, **B)** extracto etanólico-acuoso (Sp EtOH-H₂O) **4:** Extracto (EtOH-H₂O) diluido en agua destilada, **4.1:** Extracto (EtOH-H₂O) más el reactivo de Cloruro-Férrico.

3.26 Determinación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)

Los resultados de cuantificación de fenoles totales se expresan en mg/Eq de ácido gálico/100 g de fruto, para lo cual se utilizó una curva de calibración del ácido gálico usado como patrón de referencia, como se indica en la figura 13. Se observa que de los tres extractos utilizados para la determinación de fenoles totales los extractos de etanol-agua y agua de *S. pimpinellifolium* L. presentaron una cantidad mayor de fenoles totales (3.53 ± 0.12 y mg/Eq de ácido gálico/100 g).

Figura 13

Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

**Tabla 3**

Contenido de fenoles totales en los frutos de *Solanum pimpinellifolium*.

Extracto	mg GAE/g de muestra de extracto	mg GAE/g de tomate fresco
EtOH	3.22 ± 0.61	0.12 ± 0.62
EtOH-H ₂ O	3.53 ± 3.54	0.11 ± 2.21
H ₂ O	4.20 ± 10.25	0.01 ± 9.84

GAE: Equivalente de Ácido gálico

En algunos estudios para frutos de *Solanum lycopersicum L.* los extractos acuosos, de etanol y cloroformo: metanol 2:1 evidenciaron un alto contenido de polifenoles, pero los extractos acuosos presentaron un contenido mayor de compuestos fenólicos

correspondientes a $120,976 \pm 16.5$ y 151.623 ± 31.81 por gramos de materia seca, estos resultados habrían sido ligeramente superiores a otros datos reportados en otras investigaciones para *S. lycopersicum* L. (Albys, Yilan, Gómez, & Cuypers, 2016). En otro estudio para *S. lycopersicum* L. los valores obtenidos de compuestos fenólicos fueron de 31.8 mg GAE/100 g de materia fresca, evidenciando así que los tomates cultivados bajo condiciones de huertos familiares poseen una composición química mucho mejor a pesar de que están condicionados por una serie de factores que pueden generar diferencias entre muestras de tomates como: grado de madurez, condiciones del cultivo entre otras. (Ramos, Contreras, & Carranza, 2017).

Los valores identificados en estos estudios están por encima de los determinados para los extractos de *Solanum pimpinellifolium* L., los extractos que mayor contenido de compuestos fenólicos presentan son: el extracto de etanol-agua con 3.53 ± 3.53 por mg GAE/g extracto y el extracto acuoso con 4.20 ± 10.25 por mg GAE/g extracto, *Solanum lycopersicum* L. presenta compuestos fenólicos bastante solubles en agua y obtenidos con distintos solventes condición que puede facilitar la extracción de este tipo de metabolitos.

Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que la presencia de fenoles totales en *Solanum lycopersicum* L es significativa, como a su vez *Solanum pimpinellifolium* L. una especie silvestre, pariente de *Solanum lycopersicum* L. evidencia de la misma manera la presencia de compuestos fenólicos, ya que son un grupo muy diverso de moléculas, que están relacionados con las interacciones planta herbívoro, resistencia a plagas, infección por patógenos y estrés abiótico (luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes, condiciones de crecimiento y radiación) (Yábar et al., 2019) lo que permiten tener una idea más cercana del por qué de esta relación, los compuestos fenólicos en frutas rebelan una gran importancia, debido a su comportamiento antioxidante beneficios biológicos para el ser humano ya que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares como también degenerativas, además de otras funciones como antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos (Peñarrieta et al., 2014).

3.27 Determinación de la actividad antioxidante

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH, se han expresado en equivalentes a Trolox (TEAC)/ g de muestra, como se muestra en la tabla 4, que evidencian una mayor la capacidad antioxidante presente en los extractos de etanol y etanol agua de *S. pimpinellifolium*.

Tabla 4

Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante en los frutos de Solanum pimpinellifolium.

Muestra	ABTS TEAC*	DPPH TEAC*
EtOH	2.48 ± 0.43	3.66± 6.00
EtOH-H₂O	2.55 ± 2.19	2.07 ± 2.30
H₂O	0.11 ± 3.01	No presenta actividad

TEAC: Concentración de antioxidante equivalente a Trolox

La actividad antioxidante de los frutos de *Solanum pimpinellifolium* se muestra en la tabla 5 para los extractos de EtOH y EtOH-H₂O en el ensayo de DPPH con un valor de IC₅₀

Tabla 5.

Valor de IC_{50} para los extractos de EtOH y EtOH-H₂O del ensayo DPPH de los frutos de *Solanum pimpinellifolium*.

Muestra	IC_{50} mg extracto/mg de	AAI
	DPPH	
EtOH	7.8 ± 0.1	2.15 ± 0.1
EtOH-H ₂ O	12 ± 0.1	1.38 ± 0.1

IC: Coeficiente de Inhibición del 50% de la muestra

AAI: índice de actividad antioxidante

(Melgoza et al., 2019) a variedades de tomate pertenecientes a la especie *S. lycopersicum* al cual *S. pimpinellifolium* se encuentra relacionado, un resultado de 1.273 mg equivalentes a Trolox (TEAC)/ g de muestra y para una variedad de tomate cherry convencional un valor de 0.836 mg equivalentes a Trolox (TEAC)/ g de muestra, valores que comparados con *S. pimpinellifolium* evidencian una alta capacidad antioxidante de los extractos EtOH y EtOH-H₂O.

El índice de actividad antioxidante (AAI) para extractos de plantas permite estandarizar resultados obtenidos por ensayos de DPPH, el cual fue implementado en un estudio realizado por (Scherer & Godoy, 2009) tras la obtención de los valores de IC_{50} , los valores correspondientes a un AAI <0.5 representa poca actividad antioxidantes, valores entre 0.5 y 1.0 moderada actividad antioxidante, fuerte actividad antioxidante cuando el valor de

AAI se encuentra entre 1.0 y 2.0 y una muy fuerte actividad antioxidante cuando el valor es > 2.0.

El extracto de EtOH de *S. pimpinellifolium* con un valor medio de AAI de 2.15 y el extracto de EtOH-H₂O de *S. pimpinellifolium* con un valor de 1.38 evidencian una fuerte actividad antioxidante.

Los radicales libres inducen daños oxidativos a biomoléculas, causando envejecimiento prematuro, cáncer y otras enfermedades, se conoce también que los radicales libres son los responsables de los olores y sabores rancios en los alimentos, factores que disminuyen su calidad nutricional, se ha reportado la actividad antioxidante de extractos de plantas y su relación con el contenido de compuestos fenólicos, demostrando una elevada correlación entre ambos, por esta razón el interés del consumo e implementación de productos naturales o extractos de frutos y hierbas de especies con estas características por distintas industrias alimentarias (Scherer & Godoy, 2009).

Conclusiones

El extracto con mayor rendimiento de la especie *Solanum pimpinellifolium* L. fue el extracto etanólico con 23% mientras que el de menor rendimiento fue el extracto acuoso con 1.0 %.

Para los extractos de etanol (EtOH) y etanol-agua (EtOH-H₂O) *Solanum pimpinellifolium* el tamizaje fitoquímico evidencio una alta presencia de carbohidratos, flavonoides y taninos.

El extracto de EtOH-H₂O y H₂O de *Solanum pimpinellifolium* presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos presentes.

Existe una alta capacidad antioxidante de los extractos etanol (EtOH) y etanol-agua (EtOH-H₂O), lo cual mantiene relación con los ensayos antes realizados para ambos extractos ya que dicha capacidad antioxidante se da por la presencia de compuestos como carotenoides, flavonoides, taninos, tocoferoles etc., presentes en las muestras.

Recomendaciones

La especie *Solanum pimpinellifolium* L. posee una cercana relación con la especie *Solanum lycopersicum* para el mantenimiento de la especie por lo que se recomienda seguir con el estudio de la misma y del extracto de etanol, etanol-agua y agua.

Utilizar métodos de determinación de metabolitos más selectivos para la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* L. y sus parientes, en futuros proyectos para ampliar la información en el aspecto nutricional y sus características antioxidantes.

Referencias

- Acosta, P. (2015). Especies silvestres para hibridar y mejorar la calidad del tomate de mesa. *Perspectivas de Investigacion*, 5.
- al., F. e. (2001). *Solanacea*. Obtenido de <http://www.solanaceaesource.org/>
- Albys, E., Yilan, F., Aleman, E., & Cuypers, A. (2018). *Determinación fitoquímica de frutos de Solanum lycopersicum L. Irrigados con agua tratada con campo magnético estático*. Santiago de Cuba: Revista Cubana de química.
- Albys, E., Yilan, F., Gómez, L., & Cuypers, A. (2016). CONTENIDO DE POLIFENOLES EN *Solanum lycopersicum L. BAJO LA ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO*. *Cultivos Tropicales*, 142-147.
- Balseca, R. (2017). *Screening fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de: Catharanthus Roseus (l.) G. Don, Justicia Pectoralis Jacq. y Scoparia Dulcis L.* Quito: FIGEMPA.
- Bermejo, A. P., & Cintra, L. y. (2014). Determination of parameters chemist - physical of the dyes to 20 obtained% of the leaves, shafts and fruits of *Melia azedarach L* (Pursiana). *Ciencias Básica Biomédicas*, 670-680.
- Ceballos, N., & Vallejo, F. &. (2012). *Evaluación del contenido de antioxidantes en introducciones de tomate tipo cereza (Solanum spp.)*. Palmira, Colombia: Scielo.
- Chang Kee, J. A. (2016). "Caracterización de seis poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* de las regiones Piura y Lima respecto de su resistencia a *Phytophthora infestans*". Lima.
- Charanjit Kaur, S. W. (2013). Calidad funcional y composición antioxidante de cultivares seleccionados de tomate (*Solanum lycopersicon L*) cultivados en el norte de la India. *LWT - Food Science and Technology*, 139-145.
- Corrales, L., & Muñoz, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *NOVA- Publicacion científica en Ciencias Biomédicas*, 135-250.
- Coy, C., Parra, J., & Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e. *REVISTA ELEMENTOS*, 32-39.

- Dascón, A. (2018). *Evaluación de cinco variedades de tomate (Solanum lycopersicum L.) obtenidas usando germoplasma nativo ecuatoriano frente a dos tratamientos de control de plagas en la provincia de Loja*. Cuenca.
- Estrada, R., Medina, T., & Roldán, A. (2006). Manual para caracterización in Situ de cultivos nativos; Conceptos y procedimientos. *Ministerio de agricultura Lima*, 167.
- Ferrer-Dubois, A. E., Fung-Boix, Y., Isaac-Alemán, E., & Beenaerts, N. &. (2018). Phytochemical determination of Solanum lycopersicum L. fruits irrigated with water treated with static magnetic field. *Revista Cubana de Química*, 232-242.
- Flores, L., Ortiz, R., García, J., Molina, J., & Sargerman, D. &. (2017). TOMATO WILD RELATIVES AS A SOURCE OF GERMPLASM FOR BREEDING OF THE SPECIES. *Fiotec.Mex*, 83-91.
- Gamarra, S. (2013). *Ensayo de Biuret*.
- Gimeno, E. (2004). *Compuestos fenólicos*. OFFARM.
- Guamán, A. (2010). "Aislamiento de Alcaloides de 5 Especies Alucinógenas de la Familia Lycopodiaceae Usadas en Medicina Ancestral por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la Etnia Saraguro – Ecuador". Loja: UTPL.
- Gurbuz, N., Neslihan, T., Ulger, M., Frary, A., & Dofanlar, S. (2020). Exploring wild alleles from Solanum pimpinellifolium with the potential to improve tomato flavor compounds. *ELSIEVER*.
- Harborne. (1986). *The flavonoids*. London: Chapman y Hall Ed.
- Kaunda, J. S., & Zhang, Y. J. (2019). The Genus Solanum: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. *Natural Products and Bioprospecting volume* , pages77–137.
- Kuskoski, E., & al., M. e. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 726-732.
- Lodoño, J. (2011). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Itagui: Artes y Letras S.A.S.
- Lopez, U., Aguirre, C., Raya, J. C., Ramirez, J. G., Vargas, A., & Hernández, A. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of gelatin-based films containing oily tomato extract (Solanum lycopersicum L.). *CyTA - Journal of Food*, 142-150.

- Martínez, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 5-18.
- Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. .. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 1-10.
- Nuez, F. (2001). El cultivo del tomate. *Mundi prensa*, 793.
- Palomo, I., Moore, R., Carrasco, G., Villalobos, P., & Guamán, L. (2010). El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: Antecedentes epidermiológicos y de mecanismos de acción. *IDESIA (Chile)*, 121-129.
- Peñarrieta, M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD. *Bolivian Journal of Chemistry* , 68-81.
- Peralta, S. K. (2003). Taxonomía de tomates en las Islas Galápagos: especies nativas e introducidas de *Solanum* sección *Lycopersicon* (Solanaceae). *Darwin, SC, S.*
- R. Slimestad, M. V. (2009). Revisión de flavonoides y otros fenólicos de frutos de diferentes cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista de la Ciencia de la Alimentación y la Agricultura*, 1255-1270.
- Ramos, E., Castañeda, B., & Ibañez, L. (2008). Evaluacion de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista de la Academia Peruana de Salud*, 42-46.
- Ramos, L., Contreras, C., & Carranza, J. &. (2017). CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO EN LICOPENO Y FENOLES TOTALES EN TOMATE DE HUERTO FAMILIAR. *Ciencia UANL*.
- Ríos, J. M. (2013). Deteccion de alcaloides en semillas de plantas herbáceas nativas. *Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales (IANIGLA)*,, 51-56.
- Robinson, B. (1902). Flora of the Galapagos Islands. . 78-270.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: Quebecor-Impreandes p.
- Sotero, V., Silva, L., García, D., & Imán, S. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.). *Sociedad Química éru*, 293-299.

Thaipong, U. B.-Z. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 669-675.

Tropicos.org. (2017). *Database of Missouri Botanical Garden*. Tropicos.org.

Uchuypoma, E. (2010). *Carbohidratos, glúcidos o azúcares*. UNALM.