



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Escuela de Graduados
Programa de Magister en Ciencias con Mención en Química

**CORRELACIÓN ENTRE MÉTODOS
ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y ELECTROQUÍMICOS PARA
LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN FRUTOS SILVESTRES.**

Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Químicas

POR: Felipe Aravena Sanhueza

Profesores Guías: Dr. Carlos Peña Farfal

Dra. Mónica Pérez Rivera

Concepción, Chile 2020



DERECHOS DE AUTOR

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Pérez Rivera y al Dr. Carlos Peña Farfal por permitirme ser parte del Laboratorio de Polimeros electroquimicos, por su apoyo, compromiso y contribución en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Gracia Blanch Manzano por su cordial recibimiento en el Laboratorio Tecnologías Innovadoras para el Estudio de Compuestos Bioactivos en Alimentos (ENANTIOMET), por el apoyo y contribución al conocimiento en el área de los alimentos de origen natural.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacias de la Universidad de Concepción en particular al Dr. Mario Aranda por permitir desarrollar experimentos fundamentales en este trabajo.

Agradezco a Stefania Aguayo Cruces, Katherine Valdebenito y Lorena Leiton, por su apoyo y buena disposición respecto a la asitencia técnica al momento de realizar los objetivos de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por el apoyo económico entregado durante la realización del Magister.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRAC	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Electroquímica Analítica.....	3
1.2 Antioxidantes	4
1.3 Mecanismos de acción antioxidantes y Capacidad /Actividad Antioxidante	7
1.3.2 Mecanismo SET (single electron transfer)	9
1.3.3 Mecanismos Mixtos HAT/SET	10
1.4 <i>Greigia sphalacelata</i>	12
1.5 <i>Ribes grossularia</i>	13
1.6 <i>Smilax Aspera</i>	14
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS DE TRABAJO	15
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	16
4.1 MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS.....	16
4.1.1 Muestras.....	16
4.1.2 Ensayo DPPH	16
4.1.3 Ensayo ORAC.....	16
4.1.4 Ensayo DPV (Voltamperometría diferencial de pulsos).....	17
4.2 METODOLOGÍA	18
4.2.1 Extracción alcohólica de <i>Greigia sphacelata</i> , <i>Ribes grossularia</i> y <i>Smilax aspera</i>	18
4.2.2 Determinación de la capacidad/actividad antioxidante.....	19

4.2.2.1	Ensayo DPPH.....	19
4.2.2.2	Ensayo ORAC.....	20
4.2.3	Método electroquímico.....	21
4.2.3.1	Acondicionamiento del electrodo de trabajo.....	21
4.2.3.2	Optimización de técnica voltamperométrica (DPV).	21
4.2.4	Curvas de Calibrado	23
4.2.4.1	Curva de calibración ensayo DPPH	23
4.2.4.2	Curva de calibración ORAC.....	23
4.2.4.3	Curva de calibración voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)	24
4.2.5	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV)	25
4.2.6	Parametros analiticos	26
4.2.6.1	Límite de detección y Cuantificación.....	26
4.2.6.2	Repetibilidad.....	27
4.2.6.3	Reproducibilidad	27
4.2.6.4	Estudio correlación de ensayos ORAC, DPPH y Voltamperometría	28
5.	RESUTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1	Ensayo DPPH	29
5.2	Ensayo Voltamperométrico	32
5.3	Correlación DPPH-CV	37
5.3.1	Correlación DPPH-CV Trolox.....	38
5.3.2	Correlación DPPH-CV Ácido Gálico	40
5.3.3	Correlación DPPH-CV Ácido ascórbico	41
5.4	Determinación capacidad antioxidante ensayo ORAC	44
5.5	Ensayo voltamperométrico DPV	45
5.6	Correlación ORAC-DPV extractos	48

5.6.1 Correlación ORAC- DPV <i>Ribes grossularia</i> (Grosella espinosa)	48
5.6.2 Correlación ORAC- DPV <i>Smilax aspera</i> (Zarzaparrilla)	51
5.6.3 Correlación ORAC-DPV <i>Greigia Sphacelata</i> (Chupón)	54
5.7 Repetibilidad	57
5.8 Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)	59
5.8.1 HPLC extracto <i>Smilax Aspera</i>	59
5.8.2 HPLC extracto <i>Ribes grossularia</i>	62
5.8.3 HPLC extracto <i>Greigia sphacelata</i>	63
6. CONCLUSIÓN	66
7. PROYECCIONES	69
8. REFERENCIAS	70



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla n°1: Principales radicales libre y especies reactivas generadas en nuestro organismo	5
Tabla n°2: alicuotas de estandar trolox y buffer para concentraciones en curva de calibrado ensayo ORAC.	23
Tabla n°3: Porcentaje de inhición IC distintas concentraciones estándar trolox	29
Tabla n°4: Porcentaje de inhición IC distintas concentraciones estándar Ácido Gálico.....	29
Tabla n°5: Porcentaje de inhición IC distintas concentraciones estándar Ácido Gálico.....	30
Tabla n°6: Porcentaje de inhición IC₅₀ extracto <i>Smilax aspera</i>.....	30
Tabla n°7: Porcentaje de inhición IC₅₀ extracto <i>Ribes grossularia</i>.	31
Tabla n°8: Porcentaje de inhición IC₅₀ extracto <i>Greigia sphacelata</i>. ...	31
Tabla n°9: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con porcentaje de inhibición (ensayo DPPH) estandar Trolox.....	38
Tabla n°10: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con %Inhibición (ensayo DPPH) estandar ácido gálico.....	40
Tabla n°11: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con %Inhibición (ensayo DPPH) estandar ácido ascórbico.....	41
Tabla n°12: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de <i>Ribes grossularia</i>..	48
Tabla n°13: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de <i>Smilax aspera</i>.	51

Tabla n°14: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de *Greiga Sphacelata*.54

Tabla n°15: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Ribes Grosularia* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.57

Tabla n°16: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Smilax aspera* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.....57

Tabla n°17: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Greigia Sphacelata* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.....58



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura n°1: Estructura de a) ácido lipoico, b) Ubiquinol, c) Melatonina	6
Figura n°2: Estructura general de a) Flavonoides, b) Estilbenos, c) ácido cinámico, d) ácido benzoico.....	7
Figura n°3: a) Greigia Sphacelata b) Fruto (conocido como chupón) c) Ubicación geográfica de <i>Greigia sphacelata</i>, <i>G.landbeckii</i>, <i>G.pearcei</i>....	12
Figura n°4: Grosella espinosa (<i>Ribes grossularia</i>)	13
Figura n°5: Zarparrilla (<i>Smilax aspera</i>).....	14
Figura n°6: esquema de extracción metanólicas frutos liofilizados.	18
Figura n°7: a) Estructura radical DPPH, b) Representación colorimétrica estabilización radical DPPH.....	19
Figura n°8: Diagramas de perturbación (izquierda) y patrones de respuesta obtenida (derecha).	21
Figura n°9: Voltamperometría cíclica estandar de trolox concentración 3mM.	32
Figura n°10: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar trolox 3mM.	33
Figura n°11: Gráfica Carga en función de la concentración estandar trolox 3mM.	33
Figura n°12: Voltamperometría cíclica estandar de ácido gálico concentración 3mM.....	34
Figura n°13: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar ácido gálico 3mM.....	34
Figura n°14: Gráfica Carga en función de la concentración estandar ácido gálico 3mM.....	35
Figura n°15: Voltamperometría cíclica estandar de ácido ascórbico concentración 3mM.....	35

Figura n°16: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar ácido ascórbico 3mM.....	36
Figura n°17: Gráfica Carga en función de la concentración estandar ácido ascórbico 3mM.....	36
Figura n°18: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar Trolox	38
Figura n°19: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar Trolox.	39
Figura n°20: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido gálico.....	40
Figura n°21: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido gálico.....	41
Figura n°22: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido ascórbico.....	42
Figura n°23: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido ascórbico.....	42
Figura n°24: Curva de calibrado ensayo ORAC estandar trolox 1nM (absorbancia en función del tiempo).	44
Figura n°25: Curva de calibrado ensayo ORAC estandar trolox 1mM.	44
Figura n°26: Voltamperometría diferencial de pulsos (DPV), curva de calibrado estandar de trolox.	45
Figura n°27: Curva de calibrado ensayo DPV estandar trolox 1mM (carga en función de la concentración).....	46
Figura n°28: Correlación área bajo la curva - carga coulombica estandar trolox 1mM ensayos ORAC-DPV.....	47
Figura n°29: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC extracto <i>Ribes grossularia</i> (Grosella Espinosa).....	48
Figura n°30: DVP alicuotas de extracto Metanólico <i>Ribes grossularia</i> (Grosella Espinosa).....	49

Figura n°31: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de <i>Ribes grossularia</i> (Grosella Espinosa).....	49
Figura n°32: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de <i>Ribes grossularia</i> (Grosella Espinosa).....	50
Figura n°33: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC extracto <i>Smilax aspera</i> (Zarzaparrilla)	51
Figura n°34: DVP alicuotas de extracto Metanólico <i>Smilax aspera</i>.....	52
Figura n°35: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de <i>Smilax aspera</i> (Zarzaparrilla).....	52
Figura n°36: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de <i>Smilax aspera</i> (Zarzaparrilla)	53
Figura n°37:: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC <i>Greiga Sphacelata</i>. (Chupón).	54
Figura n°38: DVP alicuotas de extracto Metanólico <i>Greiga Sphacelata</i>. (Chupón).	55
Figura n°39: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de <i>Greiga Sphacelata</i>. (Chupón).	55
Figura n°40: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de <i>Greiga Sphacelata</i>. (Chupón).	56
Figura n°41: Cromatograma HPLC extracto <i>Smilax aspera</i> a 320 nm.	59
Figura n°42: Cromatograma HPLC Ácido clorogénico (tentativo) extracto <i>Smilax aspera</i> a 320 nm.....	59
Figura n°43: Cromatograma HPLC extracto <i>Smilax aspera</i> a 348 nm.	60
Figura n°44: Cromatograma HPLC Quercetin-3-glucósido (tentativo) extracto <i>Smilax aspera</i> a 348 nm.....	60

Figura n°45: Cromatograma HPLC extracto <i>Smilax aspera</i> a 520 nm.	61
Figura n°46: Cromatograma HPLC cianidin-3-O-glucosido (tentativo) extracto <i>Smilax aspera</i> a 520 nm.	61
Figura n°47: Cromatograma HPLC extracto <i>Ribes grossularia</i> a 320 nm	62
Figura n°48: Cromatograma HPLC Ácido Clorogénico (tentativo) extracto <i>Ribes grossularia</i> a 320 nm.	62
Figura n°49: Cromatograma HPLC Ácido Transferúlico (tentativo) extracto <i>Ribes grossularia</i> a 320 nm.	63
Figura n°50: Cromatograma HPLC extracto <i>Gregia Spahacelata</i> a 320 nm	63
Figura n°51: Cromatograma HPLC Ácido Clorogénico (tentativo) extracto <i>Gregia Spahacelata</i> a 320 nm.	64
Figura n°52: Cromatograma HPLC Ácido Cafeico (tentativo) extracto <i>Gregia Spahacelata</i> a 320 nm.	64
Figura n°53: Cromatograma HPLC extracto <i>Gregia Spahacelata</i> a 348 nm	65
Figura n°54: Cromatograma HPLC Quercetin-3-glucósido (tentativo) extracto <i>Gregia Spahacelata</i> a 320 nm.	65

ABREBIATURAS

CV	Voltamperometría cíclica.
DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos.
LOD	límite de detección.
LOQ	límite de cuantificación.
CV'	coeficiente de variación
ORAC	<i>(capacidad de absorción de radicales de oxígeno)</i>
DPPH	radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
mg	Miligramos
mL	Militros
mM	Milimolar
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar



RESUMEN

En las últimas dos décadas, con el desarrollo de la tecnología, se ha potenciado con mucha fuerza el área de investigación en Electroquímica Analítica, en especial las técnicas electroanalíticas, técnicas de gran alcance a nivel industrial, por sus bajos costos de operación e instrumentación. Las técnicas electroanalíticas poseen la ventaja de ser altamente selectivas, sensibles, exactas y precisas, como también rápidas en sus velocidades de barrido y con una reducción significativa en reactivos y muestras. Entre las técnicas más utilizadas encontramos la voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría diferencial de impulso (DPV), la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y la detección amperométrica (AD). El presente proyecto de tesis tiene como fin la determinación de la capacidad antioxidante de tres frutos, Chupones (*Greigia Sphacelata*), Grosella Espinosa (*Ribes Grossularia*) y Zarzaparrilla (*Smilax Aspera*). Las determinaciones se realizarán mediante técnicas convencionales como ORAC (*capacidad de absorción de radicales de oxígeno*) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que utilizan como técnica primordial las técnicas espectrofotométricas. El proyecto también propone como objetivo principal en determinar la capacidad antioxidante de los frutos mediante el desarrollo de una metodología en base a técnicas voltamperométricas. Estudio que se realizara mediante medidas de potencial versus corriente ya que los compuestos antioxidantes son compuestos electroactivos.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que dos de los frutos presentan un alta capacidad antioxidante (*Smilax Aspera* y *Ribes Grossularia*) y uno con una capacidad antioxidante baja (*Gregia Sphacelata*) mediante el estudio ORAC, con respecto a la técnica voltamperométrica empleada, la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) mediante el establecimiento de curvas de calibrado y el estudio de los extractos de los frutos, presenta bajos límites de detección y cuantificación, al igual que presenta una alta correlación con el ensayo los ensayos ORAC.

ABSTRAC

In the last two decades, with the development of technology, the research area in Analytical Electrochemistry has been strongly boosted, especially the electroanalytical techniques, techniques of great scope at industrial level, due to their low operating and instrumentation costs. The electroanalytical techniques have the advantage of being highly selective, sensitive, accurate and precise, as well as fast in their sweep speeds and with a significant reduction in reagents and samples. Among the most used techniques we find cyclic voltammetry (CV), differential impulse voltammetry (DPV), square wave voltammetry (SWV) and amperometric detection (AD). The present thesis project aims to determine the antioxidant capacity of three fruits, Suckers (*Greigia Sphacelata*), Gooseberry (*Ribes Grossularia*) and Sarsaparilla (*Smilax Aspera*). The determinations will be carried out by conventional techniques such as ORAC (oxygen radical absorbing capacity) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) which use spectrophotometric techniques as the main technique. The project also proposes as a main objective to determine the antioxidant capacity of the fruits through the development of a methodology based on voltammetric techniques. This study will be carried out by measuring potential versus current, since antioxidant compounds are electroactive compounds.

The results obtained in this work showed that two of the fruits present a high antioxidant capacity (*Smilax Aspera* and *Ribes Grossularia*) and one with a low antioxidant capacity (*Gregia Sphacelata*) by means of the ORAC study, with respect to the voltammetric technique used, the differential pulse voltammetry (DPV) by means of the establishment of calibration curves and the study of the fruit extracts, presents low limits of detection and quantification, as well as presents a high correlation with the ORAC

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Electroquímica Analítica

La química electroanalítica es un área de la química basada en el estudio de las interacciones química y eléctrica que presentan los analitos de interés y que se ven relacionadas con magnitudes eléctricas como la corriente, el potencial o la carga. Las técnicas electroanalíticas por lo general son menos utilizadas que las técnicas espectroscópicas o cromatográficas, no por que impliquen una mayor complejidad desde el punto de vista de la teoría electroquímica, sino porque ha existido menor desarrollo en la instrumentación. Otra causa por la que no se utilice demasiado estas técnicas, es porque ofrecen menores posibilidades de automatización frente a otras técnicas analíticas.

Los procesos electroquímicos se llevan a cabo en la interfase electrodo-disolución haciendo los métodos electroquímicos altamente sensibles, selectivos y específicos hacia especies electroactivas. Por ejemplo, la determinación electroanalítica cuantitativa de Ce^{3+} y Ce^{4+} , tiene clara ventaja sobre la mayoría de las técnicas espectroquímicas que informan sobre la cantidad o concentración total de Cerio¹. Las técnicas electroanalíticas ofrecen información sobre la actividad de un determinado analito, en vez de concentración, lo cual es una herramienta útil en ciertas oportunidades. Por otro lado, las técnicas electroanalíticas poseen instrumentación de bajo costo y una amplia gama de electrodos que permiten ensayos en una gran diversidad de matrices.

El término voltamperometría describe a una clase de técnicas electroanalíticas, que es utilizada para la medición de corriente-potencial obtenida en un determinado electrodo. La Polarografía es un caso especial de voltametría y se refiere a la medición de corriente-potencial adquirida

utilizando un electrodo de mercurio con un flujo constante de gota de mercurio². El químico checo Jaroslav Heyrovský, introdujo por primera vez la Polarografía en 1922 por la que años más tarde ganara el Premio Nobel de Química en 1959, siendo el único químico analítico en la historia en ganar tal reconocimiento³. Esta técnica hoy se encuentra en desuso debido al uso de mercurio y las implicancias medioambientales que conlleva.

La Voltamperometría se basa en la medida de la corriente electródica que surge en una celda de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y el electrodo auxiliar. Esta relación podría explicarse cuando el potencial (E) se aplica al electrodo de trabajo y la corriente resultante fluye a través de la celda electroquímica, la cual es registrada⁴. El potencial aplicado al electrodo de trabajo sirve como fuerza para la reacción de transferencia electrónica; controla el parámetro que hace que las especies químicas presentes en la solución sean electrolizadas (reducidas u oxidadas) en la superficie del electrodo.

1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que desde el punto de vista redox se comportan como reductores. Se ha evidenciado en los últimos 30 años que la ingesta de alimentos como frutas, verduras y bebidas de origen vegetal tienen efectos positivos para la prevención de diversos tipos de enfermedades gracias a la presencia de compuestos antioxidantes.

Estas sustancias previenen la oxidación que sufre a diario el organismo, principalmente por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroperóxido que se generan a través de la reducción parcial de oxígeno molecular como subproductos de numerosas vías metabólicas, lo que ocurre principalmente en las mitocondrias⁵.

Los compuestos antioxidantes previenen la oxidación derivada de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el anión peroxinitrito, producido a través de la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2)⁶. Finalmente, también previenen la acción oxidativa de los radicales libres, átomos, moléculas o iones derivados de oxígeno o nitrógeno que tenga un electrón desapareado y que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Estos últimos son muy reactivos⁷, e inician reacciones en cadena que dañan componentes celulares, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros⁸, por lo que pueden ser causa de diversas enfermedades como algunos tipos de cáncer, enfermedades degenerativas y enfermedades cardiovasculares^{9,10}.

En base a esto se define a los antioxidantes como sustancias naturales o sintéticas que pueden prevenir o retrasar el daño celular oxidativo causado por oxidantes fisiológicos que tienen potenciales de reducción positivos entre las que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), de nitrógeno (RNS) y los radicales libres¹¹, mediante la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón”

Radicales Libres	Especies reactivas no radicales
Superóxido O ₂ •	Peróxido de Hidrogeno H ₂ O ₂
Hidroxilo HO•	Hidroperóxidos ROOH
Alcoxi RO•	Hipoclorito ClO ⁻
Peroxi ROO•	Oxígeno singlete ¹ O ₂
Carbonato CO ₃ •-	Ozono O ₃
Óxido nítrico NO•	Peroxinitrito ONOO ⁻
Dióxido nítrico NO ₂ •	

Tabla n°1: Principales radicales libre y especies reactivas generadas en nuestro organismo¹²

Las sustancias antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos:

- Antioxidantes biosintetizados por el organismo.
- Antioxidantes que ingresan por el consumo de alimentos.

Los antioxidantes biosintetizados por el organismo pueden ser enzimáticos y no enzimáticos, o endógenos y exógenos respectivamente, dentro de los antioxidantes enzimáticos encontramos a superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peróxidasa, a la tioredoxina reductasa y al glutatión reductasa. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el glutatión, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, ácido dihidro-lipóico, metalotioneínas, ubiquinol (o Co-enzima Q) y melatonina¹³.

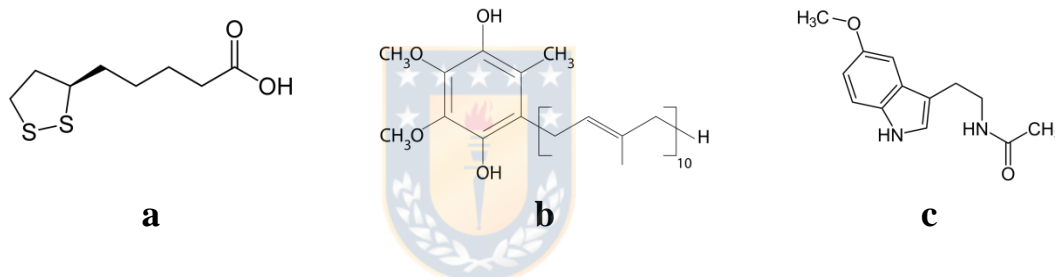


Figura n°1: Estructura de a) ácido lipoico, b) Ubiquinol, c) Melatonina

Las frutas y verduras poseen diversos tipos de antioxidantes naturales que ingresan al organismo de los seres vivos mediante la ingesta de estos, antioxidantes como las Vitaminas A, C y E, los carotenoides que dan el pigmento a frutas y verduras (β -caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno), fitoquímicos como polifenoles (Flavonoides, Estilbenos, ácidos cinámicos, ácidos benzoicos), terpenoides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, sustancias como fitoesterógenos, fitoesteroles y fitatos, cada uno con propiedades levemente distintas^{13,14,15}.

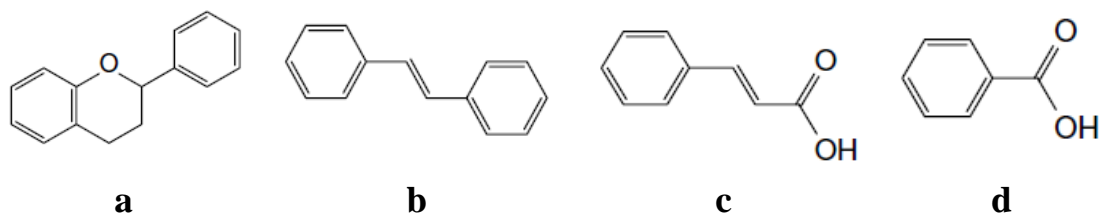


Figura n°2: Estructura general de a) Flavonoides, b) Estilbenos, c) ácido cinámico, d) ácido benzoico.

1.3 Mecanismos de acción antioxidantes y Capacidad /Actividad Antioxidante

A lo largo de los años se han propuesto diversos mecanismos y clasificaciones de acción de los antioxidantes y a partir de ello se han propuesto ensayos para poder determinar la capacidad o actividad antioxidante de muchos alimentos o bebidas de origen vegetal. Se ha definido a la capacidad o actividad antioxidante como la "Capacidad que presentan sustancias para inhibir la degradación oxidativa gracias a su capacidad de reaccionar con especies reactivas (ROS, RNS) o radicales libres".

Los principales mecanismos de acción antioxidante se clasifican en mecanismos basados por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), por transferencia de electrones (SET) y mecanismos mixtos (HAT/SET)¹⁶. Esencialmente antioxidantes no enzimáticos, endógenos o ingeridos a través de la dieta se guían por estos mecanismo de acción, provocando al compuesto antioxidante convertirse en un radical libre y oxidándose posteriormente a una forma que es de muy baja reactividad hacia su entorno.



RL•= radical libre

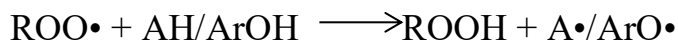
AOX-H= Antioxidante

RLH= radical estabilizado por transferencia de átomo de hidrógeno

AOX•= radical antioxidante

1.3.1 Mecanismo HAT (hydrogen atom transfer)

Como ejemplo de mecanismo de acción antioxidante HAT se presenta la reacción entre un fenol (ArOH) y un radical peroxilo (ROO•):



AH= biomolécula a proteger

Como se aprecia en el ejemplo el radical peroxilo se estabilizó mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno proveniente del compuesto antioxidante (fenol =ArOH), el cual protege a la biomolécula (lípidos, proteínas, AND) que puede sufrir la oxidación en su ausencia¹⁷.

Los ensayos basados en HAT normalmente utilizan una sonda fluorescente que reacciona con la sustancia antioxidante, determinando su capacidad a partir de la cinética de la competencia, midiendo la curva de descomposición de la sonda en ausencia y presencia de la sustancia antioxidante, integrando el área bajo la curva.

Los ensayos basados en este tipo de mecanismo son:

- *Ensayo TRAP (Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales)*, que se basa en la capacidad de los antioxidantes para inhibir la reacción de radicales peroxilo y una sonda objetivo (O₂ originalmente) en el proceso de peroxidación inducida por la descomposición térmica de ABAP (2,2'-azobis(2amidinopropano)).¹⁶
- *Ensayo TOCS (Capacidad de captación de oxígeno total)*, que mide la disminución de la producción del gas etileno causada por la inhibición de la hidrólisis térmica de ABAP por KMBA (sal sódica ceto-g-(metiltio) butírico) en presencia de compuestos antioxidantes, monitoreado por cromatografía de gases headspace (GC-HS)¹⁸.

- *Ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)*, que mide la disminución de la desintegración de la fluoresceína causada por los antioxidantes^{18,19}.
- *Ensayo Blanqueo de Crocina*, se basa en la reacción competitiva entre un antioxidante y crocina, un derivado de carotenoide natural.¹⁶

1.3.2 Mecanismo SET (single electron transfer)

Este mecanismo involucra que la sustancia antioxidante transfiera un electrón para estabilizar al radical libre (pareamiento del radical libre). En este caso los ensayos que se aplican para determinar la capacidad antioxidante mediante este mecanismo son relativamente más lentos que por el mecanismo HAT, ya que son dependiente de solventes y del pH, representándose este mecanismo en el siguiente ejemplo:



Los principales ensayos que se rigen mediante este mecanismo actualmente son:

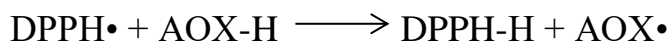
- *Ensayo FRAP (Potencial antioxidante reductora férrica)*, el cual se basa en la reducción de del complejo ferro-tripiridiltriazina tridentada (Fe^{III} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{II}) por la acción de antioxidantes, dando un color azul intenso con un máximo de absorción de 593 nm.^{16,20}

- *Ensayo CUPRAC (capacidad antioxidante reductora de cúprico)*, que mide la absorbancia del cromóforo CUPRAC (quelato de Cu (I)-neocuproína (Nc)) que se produce de la reacción redox de los antioxidantes con el reactivo CUPRAC (bis(neocuproína) cobre (II))¹⁶.
- *Ensayo Folin-Ciocalteu*, basado en la oxidación de los compuestos fenólicos, por la acción del polianión molibdotungstosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm^{16,21}.

1.3.3 Mecanismos Mixtos HAT/SET

También se encuentran Mecanismos mixtos para ciertos antioxidantes, sobre todo antioxidantes no fenólicos que pueden estabilizar radicales libres mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno o mediante la transferencia de un electrón, desarrollándose ensayos para determinar la capacidad antioxidante de diversas matrices como:

- *Ensayo DPPH*, la sustancia antioxidante estabiliza al radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) el cual cambia de un violeta originalmente a un color amarillo pálido, medición que se realiza en un espectrofotómetro a una absorbancia de 517 nm²².



- *Ensayo ABTS/TEAC*, mide la capacidad antioxidante (expresado en equivalentes de trolox) de una sustancia mediante la estabilización del catión radical ABTS•+ ((ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) de color azul/verde con un máximo de absorción de 734 nm que se decolora en presencia de la sustancia antioxidante^{16,23,24}.



- Ensayo DMPD, similar al ensayo DPPH, el catión radical DMPD•+ (N, N-dimetil-p-fenilendiamina) de color púrpura que muestra un máximo de absorbancia a 553 nm se estabiliza mediante transferencia de hidrógeno o electrón causando una rápida decoloración de la solución²⁵.



En los últimos años se han desarrollado ensayos para determinar la capacidad antioxidante en diversas matrices, preferencialmente en frutas, verduras y bebidas de origen natural, mediante técnicas o métodos electroquímicos como los ensayos basados en voltamperometría cíclica (CV), diferencial de pulsos (DPV) y de onda cuadrada (SWV). Los antioxidantes son electroquímicamente activos (mecanismo SET), pudiendo utilizarse una diversa gama de electrodos (Carbono vitrificado, Oro, Platino) y materiales para modificar la superficie de estos, principalmente enzimas y nanopartículas de Oro. Estos ensayos han recibido un mayor interés debido a su rápida capacidad de detección, sensibilidad y rentabilidad económica en comparación a ensayos pares.

1.4 Greigia sphalacelata

El genero *Greigia* perteneciente a la familia de las *Bromeliaceae* es reconocido por la especie Chilena *Greigia sphacelata* comúnmente conocido como Chupón o Quiscal. Actualmente se reconocen 32 especies de *Greigia* las que crecen en hábitats húmedos, al pie de árboles nativos (bosque andino), al fondo de quebradas en países como Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, América central y el sur de México.

Chile presenta cuatro especies endémicas, tres se encuentran desde el norte sur del país comenzando en la región del Maule hacia el sur, especies *Greigia sphacelata*, *G. landbeckii*, y *G. pearcei*, y la *Greigia berteroi* la cual es endémica de la Isla Robinson Crusoe²⁶.

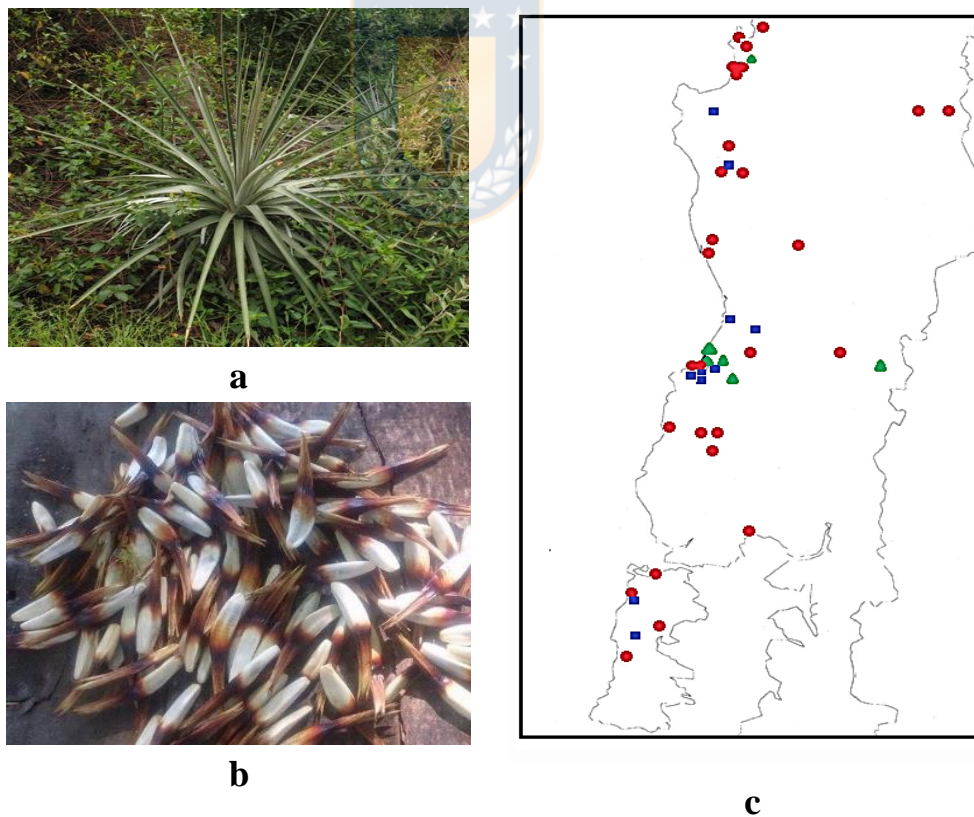


Figura n°3: a) *Greigia Sphacelata* b) Fruto (conocido como chupón) c) Ubicación geográfica de *Greigia sphacelata* (●), *G. landbeckii* (■), *G. pearcei* (▲).

Greigia sphacelata puede llegar a medir hasta 5 metros de altura y genera un pequeño fruto, una baya alargada comestible que presenta una pulpa muy dulce y jugosa de color blanco lechoso, sobre la cual se han realizado pocas investigaciones hasta la fecha (tres publicaciones científicas, última el año 2007). Sobre este fruto se ha informado que presenta diversos tipos de antioxidantes principalmente polifenoles, flavanonas (5,7,3'-trihidroxi-6,4,5'-trimetoxiflavanona y 5,3'-dihidroxi-6,7,4,5'-tetrametoxiflavanona)²⁷

1.5 Ribes grossularia

La *Ribes grossularia* o *Ribes uva-crispa* más conocida como grosella espinosa es un fruto originario de la mayoría de las parte de la Europa montañosa y en el rango del monte Atlas en el norte de África²⁸. Cultivada principalmente en Inglaterra, Francia y Alemania, su fruto, una baya con una piel espinosa o vellosa que puede ser de color blanco, amarillo, roja o verde, dependiendo de su grado de maduración, encontrándose mayormente de color verde. La Grosella espinosa es consumida generalmente como jugos, postres y mermeladas²⁹, presentando altos contenidos de vitamina A, carotenoides, flavonoides y potasio, otorgando grandes beneficios a la salud principalmente a la vista y los huesos.



Figura n°4: Grosella espinosa (*Ribes grossularia*)

1.6 Smilax Aspera

La zarzaparrilla (*Smilax aspera*) es una planta trepadora perenne altamente resistente, perteneciente a la familia *Liliaceae* y originaria de la región mediterránea, pero es común encontrarla en bosques y matorrales en países de América. Es un arbusto con una altura de aproximadamente 2 metros, una planta muy popular, con abundantes beneficios para la salud. Tanto sus raíces, hojas y fruto (una baya de color rojo de 2 a 4 mm) son comestibles, y es muy utilizada en la fabricación de mermeladas y bebidas. Esta planta ofrece múltiples beneficios gracias a sus propiedades diuréticas, diaforéticas, estimulante y tónicas, también es utilizada para el tratamiento de la diabetes y el reumatismo³⁰. Estos beneficios son proporcionados por la presencia de saponinas esteroideas, una alta cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides como el trans-resveratrol, taninos, antocianinas y carotenoides los cuales han sido temas de investigación en los últimos años^{31,32}.



Figura n°5: Zarzaparrilla (*Smilax aspera*).

2. HIPÓTESIS

El ensayo de capacidad antioxidante mediante el método voltamperométrico presentará una alta correlación con los ensayos ORAC y DPPH en la determinación de capacidad antioxidante, pudiendo sustituir a las técnicas convencionales a nivel de *screening* o cribado.

Los extractos de los frutos a estudiar (*Greigia sphacelata*, *Ribes grossularia*, *Smilax aspera*) presentarán una alta capacidad antioxidante mediante los ensayos ORAC, DPPH y la técnica voltamperométrica a emplear.

3. OBJETIVOS DE TRABAJO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología mediante técnicas voltamperométricas para la determinación de capacidad antioxidante total de los frutos Chupones, grosellas y zarza parrilla.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar Capacidad Antioxidante total de los extractos mediante técnicas tradicionales (ORAC, DPPH).
- Optimizar la técnica voltamperométrica (CV, DPV, SWV) más adecuada para las determinaciones.
- Determinar capacidad Antioxidante de las muestras (frutos), mediante voltamperometría y sus parámetros analíticos: límite de detección, cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad.
- Estudiar correlación entre ensayos ORAC, DPPH y Voltamperometría.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos e instrumentos.

4.1.1 Muestras

Los frutos silvestres estudiados son: *Greigia sphacelata* conocida (Chupón o Quiscal), fruto obtenido de forma comercial, en ferias de la ciudad de Temuco, region de la Araucanía. *Ribes grossularia* (Grosella espinosa) y *Smilax aspera* comúnmente conocida como (Zarzaparrilla), obtenidos gentileza de viveros el *Verdín* en la ciudad de Punta Arenas, Región de Magallanes.



4.1.2 Ensayo DPPH

- DPPH concentración $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹
- Metanol 70% v/v
- Espectrofotometro Rayleigh UV-2601

4.1.3 Ensayo ORAC

- Agua desionizada ultrapura 18,2 MΩ·cm.
- Buffer A: Na₂HPO₄ 1,065g en 100mL de agua ultra pura.
- Buffer B: NaH₂PO₄ x H₂O 1,035 en 100mL de agua ultra pura.
- RPG (64µm): pesar 4mg y disolver en 10mL de buffer.
- AAPH (120mM): pesar 163mg y disolver en 1mL de buffer.
- Trolox (1Mm): pesar 6,25mg y disolver en 25mL de buffer.
- Placa costar 96 pocillos
- multilector de microplacas (Epoch-2, Biotek).

Preparación de reactivos:

Solución de tampón fosfato (75mm, pH 7,4):

Buffer A: Na_2HPO_4 1,065g en 100mL de agua ultra pura.

Buffer B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1,035 en 100mL de agua ultra pura.

Ajustar Buffer A a pH 7,4 con buffer B.

RPG (64 μm): pesar 4mg y disolver en 10mL de buffer. De esta solución de 1mM, se saca una alícuota de 300 μL y suspender en 1700 μL de buffer. (Concentración final en la placa de 5 μm)

AAPH (120mM): pesar 163mg y disolver en 1mL de buffer. De esta solución sacar una alícuota de 400 μL y suspender en 1600 μL de buffer, para obtener una solución AAPH de 120 mM. Se tomaron alícuotas de 21 μl y agregar a cada pocillo (250 μl de volumen final) para obtener una concentración final de AAPH de 10 mM.

4.1.4 Ensayo DPV (Voltamperometría diferencial de pulsos)

- Potenciostato Dropsens equipado con el software Dropview 200-
- Electrodo indicador de carbono vitrificado (GCE), CHI 104.
- Electrodo de referencia Ag/AgCl, CHI 111.
- Electrodo auxiliar alambre de platino.
- Celda de vidrio: longitud 4 cm, diametro 2,5 cm, volumen 20 mL.
- Micropolish[®] C 1,0 micrómetros alfa alumina.
- Micropolish[®] A 0,3 micrómetros alfa alumina.
- Micropolish[®] B 0,05 micrómetros gamma alumina.
- Buffer fosfato pH 7,4.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Extracción alcohólica de *Greigia sphacelata*, *Ribes grossularia* y *Smilax aspera*

Se realizaron extracciones metanólicas al 70 % (v/v, pH 2,0) de las muestras liofilizadas de *Greigia Sphacelata*, *Ribes Grossularia* y *Smilax Aspera* para obtener los compuestos antioxidantes. Se pesan dos gramos del liofilizado y se disuelve en 10 mL de la solución alcohólica en agitación durante dos horas a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo esta mezcla es filtrada al vacío obteniendo el extracto.

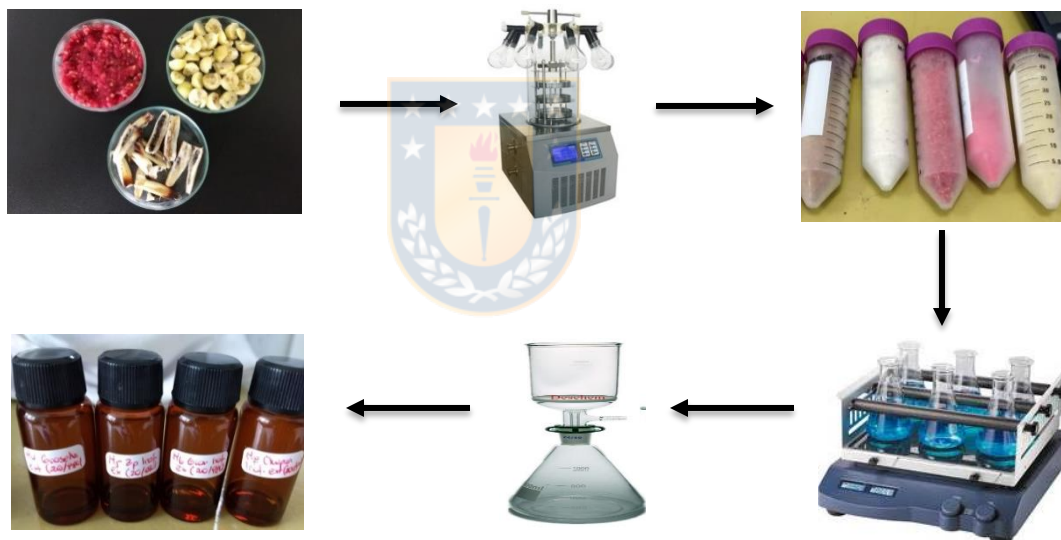


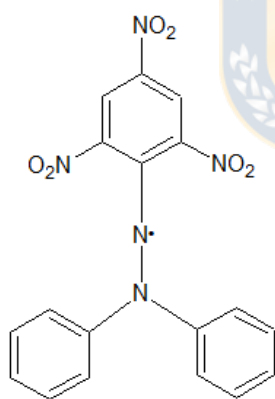
Figura n°6: esquema de extracción metanólica frutos liofilizados.

4.2.2 Determinación de la capacidad/actividad antioxidante.

4.2.2.1 Ensayo DPPH

Es un método simple que ha sido aceptado como un método oficial para determinar capacidad antioxidante de alimentos y bebidas. El nombre de este ensayo se debe al reactivo utilizado para realizar la determinación de capacidad antioxidante, el radical DPPH, (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), un radical orgánico estable por resonancia que presenta un color violeta.

El ensayo mide la capacidad antioxidante mediante la estabilización del radical DPPH mediante la transferencia de átomo de hidrógeno o un electrón (HAT/SET), causando un cambio de color a amarillo pálido, cuya medición se realiza espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm^{22,35,36}.



a



b

Figura n°7: a) Estructura radical DPPH, b) Representación colorimétrica estabilización radical DPPH.

Los resultados se expresan en la concentración necesaria de antioxidante para estabilizar el 50 % del radical DPPH (IC₅₀) también con estándares de referencia como ácido ascórbico, gálico o trolox, aunque también han surgido otros parámetros de evaluación como la eficiencia anti-radicalaria basada en la cinética de la reacción.

4.2.2.2 Ensayo ORAC

Es uno de los ensayos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante, es un método que se ha automatizado para un alto rendimiento, además de ser un método con una alta sensibilidad y es adaptable para diversas matrices de muestras además de alimentos, entra ellas plasma, tejidos, etc.^{18,19} Este método mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente después de mezclarse con un iniciador de radicales libres, el cual inicialmente utilizo AAPH (2,2´azobis(2-metilpropinamida)diclorhidrato) como generador de radicales libres y β -ficoeritrina como molécula objetivo (target molecule) molécula fluorescente que en los últimos años ha sido reemplazado por fluoresceína^{16,19,34}.

El principio de este método es relativamente sencillo, la intensidad de la molécula objetivo disminuye a medida que aumenta la degradación oxidativa, sin embargo cuando la molécula objetivo y iniciador de radicales libres se mezclan con un compuesto antioxidante, este puede proteger a la molécula fluorescente y la intensidad de la fluoresceína se mantiene estable a lo largo del tiempo.

El índice ORAC se evalúa desde el área bajo la curva de los perfiles cinéticos de la molécula objetivo, y por lo general utiliza ácido gálico o trolox (un análogo hidrosoluble de la vitamina E) como estándar de referencia, así el valor ORAC se expresa en equivalentes de Trolox¹⁶.

En los últimos años se han realizado variaciones alternativas al ensayo ORAC, utilizando rojo pirogalol (PGR) como molécula objetivo en lugar de fluoresceína¹⁹.

4.2.3 Método electroquímico

4.2.3.1 Acondicionamiento del electrodo de trabajo

Antes de utilizar el electrodo de trabajo se debe realizar la limpieza de éste para eliminar residuos que puedan estar adheridos en su superficie. Para esto se pulió la superficie del electrodo de carbono vitrificado sucesivamente con alúmina de 1.0, 0.3 y 0.05 μm sobre un paño Microcloth durante un minuto, con cada tipo de alúmina. Luego se enjuagó el electrodo con agua ultrapura, posteriormente se sumergió el electrodo en agua milliQ y en un baño de ultrasonido durante un minuto para eliminar las partículas de alúmina adheridas. Finalmente, se enjuagó el electrodo con agua ultrapura y se dejó secar en corriente de aire.

4.2.3.2 Optimización de técnica voltamperométrica (DPV).

La voltamperometria diferencial de pulso, el potencial es fijo y es superpuesto a cambiar lentamente la base potencial. La corriente se mide en puntos de remolque; antes de aplicación del impulso, y al final del pulso³⁷. La primera corriente se resta de la segunda, y la diferencia de corriente “I” se representa gráficamente frente el potencial aplicado.

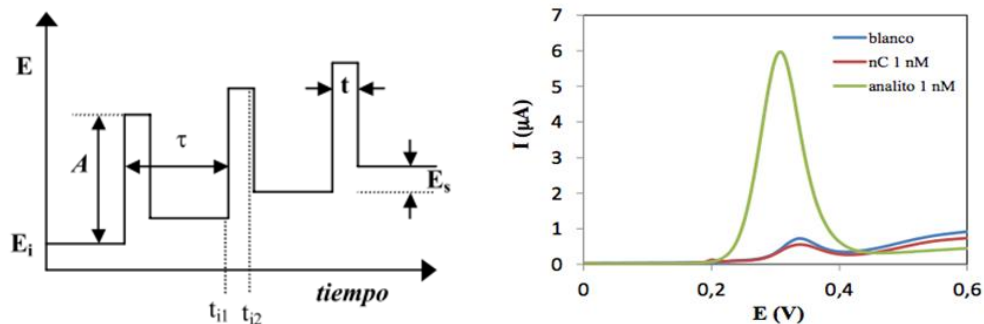


Figura n°8: Diagramas de perturbación (izquierda) y patrones de respuesta obtenida (derecha).

En voltamperometría diferencial de impulsos son cuatro los parámetros esenciales para obtener un buen análisis, con señales claras y bien definidas. Los parámetros que se optimizaron en la técnica electroanalítica son: rapidez de barrido (S_{rate}), Potencial de pulso (E_{puls}), potencial de incremento (E_{step}) y tiempo de pulso (t_{puls}).

Se realizó este estudio para determinar los parámetros de trabajo óptimo. En una celda electroquímica se depositaron 10 mL de regulador fosfato 0,1 mol/L, pH = 7,4 y se sumergieron el sensor, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar, luego se realizó voltamperometría diferencial de impulsos en el rango de potencial definido para la aparición de los analitos entre 0,0 y 1,4 V.

Los parámetros que se establecieron para estudiar son:

- S_{rate} : 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,100; 0,250 (V/s)
- E_{puls} : 0,010; 0,050; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 (V)
- E_{step} : 0,005; 0,010 ; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250 (V)
- T_{puls} : 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40 (ms)

Para realizar la voltamperometría diferencial de impulsos se esperó a que se estabilizara la corriente base y se agregó una alícuota de 100 μ L del estandar trolox $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (estudios por separado), y se repitió cada análisis para cada punto y así obtener los resultados óptimos para cada parámetro.

4.2.4 Curvas de Calibrado

4.2.4.1 Curva de calibración ensayo DPPH

Se realizo la curva de calibrado con el estandar trolox de concentración $3,0 \times 10^{-3}$ mol/L, en la cuales se añadieron a 5 matraces de 10 mL alicuotas de 50, 100, 150, 200, 250 μ L del estandar respectivamente completando con metanol al 70% tal como se representa en la siguiente imagen (x), luego se tomaron alicuotas de 1 mL de cada concentración preparada añadiendo 3mL del readical DPPH de concentración 4 mM competandose con metanol en un matraz de 10 mL dejandose 30 minutos en oscuridad (imagen y), una vez transcurrido los 30 min, se procede a leer en espectrofotometro a una longitud de onda de 517 nm, registrando la absorbancia primero del control (DPPH concentración $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L), continuando con las cocentraciones del estandar preparado, determinando en que concentración se encuentra el indice IC_{50} .³⁸

4.2.4.2 Curva de calibración ORAC

Diferentes concentraciones de Trolox se utilizan para hacer una curva estándar, y las muestras de ensayo se comparan con esto.

Concentración trolox μ mol L ⁻¹	μ L trolox	μ L buffer
50	50	950
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	600

Tabla n°2: alicuotas de estandar trolox y buffer para concentraciones en curva de calibrado ensayo ORAC.

La mezcla de reacción (volumen final 250 μL), contiene 194 μL de buffer fosfato, 20 μL de RPG y 15 μL de muestra diluida (1:20 v/v). El blanco se compone de 209 μL del buffer fosfato con 20 μL de RPG y el control de la reacción de 230 μL del buffer fosfato con 20 μL de RPG. La microplaca se incubó durante 30 minutos a 37°C y luego se añade una solución de AAPH (21 μL) a todos los pocillos, excepto al control de la reacción. Luego se midió la absorbancia de las mezclas a 540nm cada un minuto, por una hora y media en un multilector de microplacas (Epoch-2, Biotek). El área bajo la curva (AUC) de estos datos cinéticos fue evaluado por su integración hasta un tiempo tal que (A/A0) alcanzó un valor de 0,2. El resultado se expresó como milimoles litro de trolox equivalentes (ET) por gramo de muestra.³⁹

4.2.4.3 Curva de calibración voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)

Optimizadas las condiciones de trabajo del método voltamperométrico, se procedió a realizar la curva de calibración con el estandar trolox de concentración 1 mM. La celda electroquímica se compone de buffer fosfato pH 7,4 para obtener la línea base y posteriormente se añaden alícuotas de 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 μL respectivamente del estandar trolox, cada punto se realiza por separado completando a 10 mL con fosfato, llegando a intervalos de concentraciones de 50 μM hasta 600 μM . Para procesar los datos se debe calcular la diferencia de corriente o carga que se obtiene luego de agregar una alícuota del patrón y la corriente de base, a esta diferencia de corrientes o carga. Posteriormente se graficó I (μA) ó (μC) versus concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

De esta manera se relacionó el aumento de la Carga coulombica con el aumento de la concentración del analito en la celda electroquímica.

4.2.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV)

La preparación de las muestras, los liofilizados de zarzaparrilla, grosella espinosa y chupón se extrajeron tres veces un peso de 2 g en 10 mL de metanol/agua (80:20 v/v) a temperatura ambiente en un mezclador durante 5 minutos (ultraturax) y se centrifugaron a 2500 rpm, los tres extractos se combinaron y se secaron al vacío usando un rotavapor. Las muestras se redisolviéron a una concentración final de 30 mg mL⁻¹ para la identificación de los compuestos antioxidantes por HPLC con detección UV visible.⁴⁰

En los ensayos mediante HPLC se estudio una amplia gama de estandares, se estudio en un barrido de longitud de onda (240-580 nm) los estandares a una concentración final de 1 mg mL⁻¹ de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido transferúlico, quercetin, mirtillin, kuromarin, oenin, quecetin 3-O-glucósido, naringenin, cianidin-3-O-glucosido.

Luego se inyectaron 20 µL de los extractos de los frutos para comparar en base a los tiempos de retención los estandares de manera tentativa que puedan estar en la matriz de cada fruto.

La separación se realizó en una columna ODS de fase inversa C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., tamaño de partícula de 5 µm; ACE, Madrid, España). La elución se realizó utilizando los disolventes A (agua que contiene 1 ml de ácido fórmico L-1) y B (acetonitrilo) a un caudal constante de 1 mL / min-1. Se aplicó un gradiente lineal a partir de la composición de eluyente inicial A / B 95: 5 (v / v) hasta A / B 75:25 (v / v) durante los primeros 18 min y luego hasta A / B 70:30 (v / v) en 6 min. Posteriormente, la composición se modificó a A / B 25:75 (v / v) en 10 minutos, luego a A / B 75:25 (v / v) y finalmente a 100% A. Esta composición final se mantuvo durante 5 minutos a Garantizar el lavado de los equipos.³⁸

4.2.6 Parametros analíticos

4.2.6.1 Límite de detección y Cuantificación.

El límite de detección (LOD) se define habitualmente como la cantidad de concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente el LOD sería la concentración mínima obtenida de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir de una muestra sin analito presente. Mientras que el límite de cuantificación (LOQ) es la menor cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente en una muestra con un nivel de precisión y exactitud adecuado¹.

Si bien esta definición es norma hoy en día sobre todo para análisis de trazas, preparar un blanco con el resultado que arroja el límite de detección no siempre es fiable. Por ende en este proyecto determinamos el límite de detección mediante parámetros quimiométricos los cuales se asocian a lo planteado por la IUPAC, el cual el límite se obtendrá mediante la curva de calibrado realizada empleando las siguientes variables.²⁸

$$\begin{aligned}LOD &= 3SD_B + S_B \\LOQ &= 10SD_B + S_B\end{aligned}$$

SD_B se estima del error típico dividido por la pendiente asociado a la curva de calibrado, y S_B asociado al coeficiente de posición dividido por la pendiente,

$$\begin{aligned}LOD &= \frac{3S_x}{b} + \frac{a}{b} \\LOQ &= \frac{10S_{x/y}}{b} + \frac{a}{b}\end{aligned}$$

Con un S_0 igual.

$$S_0 = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

$S_{y/x}$: es la desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado.

b : es la pendiente de la recta de calibrado.

N : es el número de patrones de calibrado.

X_i : es cada una de las concentraciones de los patrones de calibrado.

\bar{X} : es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado.

4.2.6.2 Repetibilidad

La repetibilidad indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo, obtenidos bajo las mismas condiciones de operación, es decir, utilizando el mismo método, el mismo equipo y realizadas por el mismo operador en un intervalo corto de tiempo³⁹. Para el estudio de repetibilidad se realizaron cinco determinaciones de capacidad antioxidante mediante el método voltamperométrico en el mismo día en las mismas condiciones experimentales y se evaluara a partir de su coeficiente de variación.

4.2.6.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad es la variación causada por el sistema de medición. Es la variación que se observa cuando *diferentes operadores* miden la misma parte muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones. Para llevar a cabo el estudio se realizará cinco determinaciones de capacidad antioxidante, en distintos días, con un operador diferente y se evaluara a partir de su coeficiente de variación.

4.2.6.4 Estudio correlación de ensayos ORAC, DPPH y Voltamperometría

Las determinaciones de capacidad antioxidante través de los ensayos se realizaran por triplicado, el análisis de correlación entre los ensayos convencionales y el ensayo desarrollado se llevara a cabo utilizando la correlación de Pearson a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.³³

La correlación de Pearson mide la fuerza o grado de asociación entre dos variables aleatorias cuantitativas que poseen una distribución normal bivariada conjunta⁴⁰, definiéndose:

$$\rho = \frac{COV(x, y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

COV (x,y): covarianza de x e y

σ_x : desviación estándar de variable x

σ_y : desviación estándar de variable y

$$-1 \leq \rho \leq 1$$

Estadísticamente se puede expresar:

$$\gamma = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2][\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2]}}$$

$\gamma = 1$, correlación positiva perfecta.

$\gamma = 0$, correlación nula.

$\gamma = -1$, correlación negativa perfecta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayo DPPH

5.1.2 DPPH estandares.

Los primeros estudios realizados en este proyecto de investigación se enfocaron en la determinación de la capacidad antioxidante de estandares reportados en literatura como estandares con alta capacidad antioxidante. Los estandares estudiados fueron Trolox, ácido gálico y ácido ascórbico mediante el ensayo DPPH, los cuales presentan los siguientes resultados.

Muestra	Concentración (mol L ⁻¹)	Absorbancia	% Inh
Control	1,00E-04	0,308	
1	1,50E-05	0,264	14,3
2	3,00E-05	0,237	23,1
3	4,50E-05	0,216	29,9
4	6,00E-05	0,182	40,9
5	7,50E-05	0,149	51,6

Tabla n°3: Porcentaje de inhibición IC₅₀ distintas concentraciones estándar trolox

Muestra	Concentración (mol L ⁻¹)	Absorbancia	% Inh
Control	1,00E-04	0,308	
1	3,75E-05	0,233	24,4
2	7,50E-05	0,211	31,5
3	1,50E-05	0,177	42,5
4	3,00E-05	0,153	50,3
5	4,50E-05	0,074	76,0

Tabla n°4: Porcentaje de inhibición IC₅₀ distintas concentraciones estándar Ácido Gálico.

Muestra	Concentración (mol L ⁻¹)	Absorbancia	% Inh
Control	1,00E-04	0,297	
1	3,00E-05	0,245	17,5
2	4,50E-05	0,222	25,3
3	6,00E-05	0,201	32,3
4	7,50E-05	0,167	43,8
5	9,00E-05	0,146	50,8
6	1,05E-04	0,121	59,3

Tabla n°5: Porcentaje de inhibición IC₅₀ distintas concentraciones estándar Ácido Gálico.

Como se puede apreciar en los resultados otorgados por el ensayo DPPH, los estándares que presentan mejores capacidad o actividad antioxidante son el estándar trolox y ácido gálico (IC₅₀), ambos estándares cumplen con las condiciones para ser utilizados en el ensayo DPPH.

5.1.3 DPPH extractos frutos.

Luego se realizo el ensayo DPPH de los extractos de los frutos a estudiar *Gregia sphacelta*, *Ribes grossularia* y *Smilax aspera*.

Muestra	Absorbancia	% Inh
Control	0,514	
1	0,428	16,7
2	0,369	28,2
3	0,321	37,5
4	0,282	45,1
5	0,237	53,8

Tabla n°6: Porcentaje de inhibición IC₅₀ extracto *Smilax aspera*.

Muestra	Absorbancia	% Inh
Control	0,330	
1	0,270	18,3
2	0,239	27,7
3	0,202	38,8
4	0,174	47,4
5	0,150	54,7

Tabla n°7: Porcentaje de inhibición IC₅₀ extracto *Ribes grossularia*.

Muestra	Absorbancia	% Inh
Control	0,330	
1	0,320	3,1
2	0,315	4,5
3	0,308	6,5
4	0,300	9,0
5	0,291	11,9

Tabla n°8: Porcentaje de inhibición IC₅₀ extracto *Greigia sphacelata*.

Como se pueda apreciar en los ensayos DPPH con los frutos, tanto la Smilax aspera y ribes grossularia logran inhibir el 50% del radical DPPH, lo cual es una gran señal, indicando que estos compuestos presentan una elevada capacidad antioxidante, en cambio para Greigia sphacelata los resultados de capacidad antioxidante son muy bajos (11,9% de inhibición del radical DPPH).

5.2 Ensayo Voltamperométrico

Como primer ensayo voltamperométrico se empleó la voltamperometría cíclica (CV), debido que dentro de las técnicas voltamperométricas es la técnica más sencilla con fines más cualitativos que cuantitativos, con pocos parámetros a optimizar como el potencial de barrido y la velocidad de barrido. Utilizando la voltamperometría cíclica se estudiaron los estándares de trolox, ácido gálico y ácido ascórbico, analizando su linealidad y correlación tanto en corriente y carga en función de la concentración.

5.2.1 CV estándar Trolox

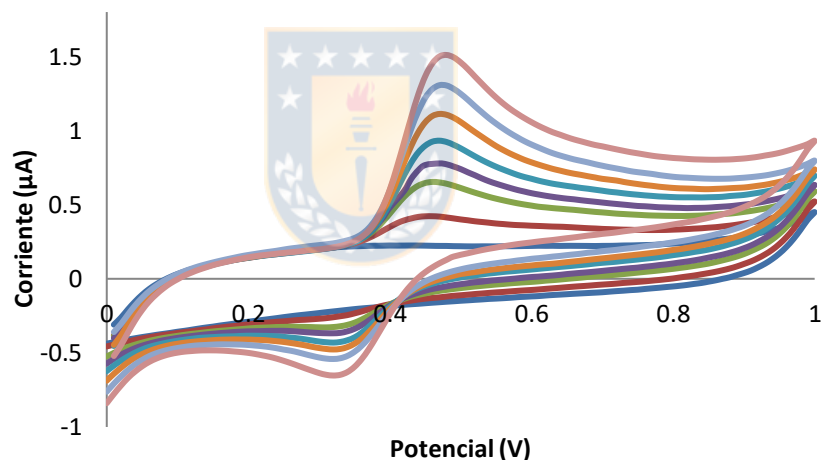


Figura n°9: Voltamperometría cíclica estándar de trolox concentración 3mM.

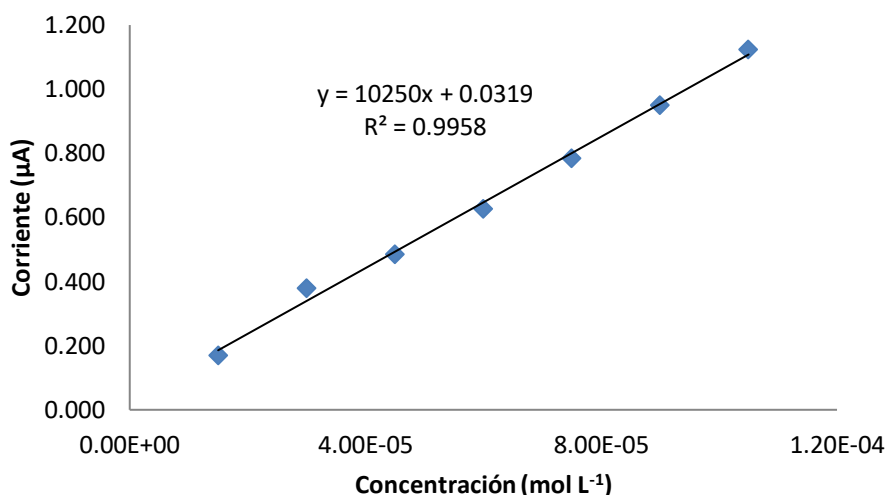


Figura n°10: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar trolox 3mM.

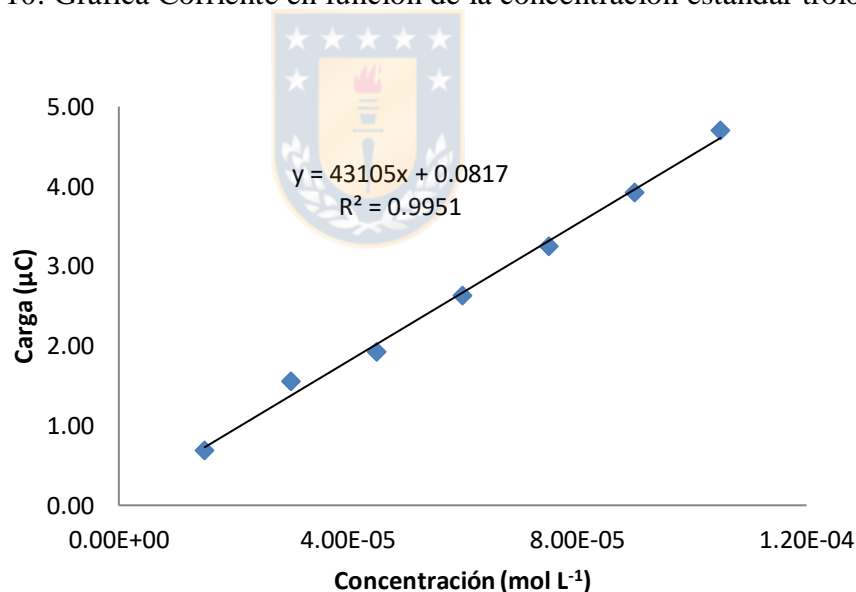


Figura n°11: Gráfica Carga en función de la concentración estandar trolox 3mM.

Realizada la voltamperometría cíclica para el estandar de trolox en las condiciones establecidas, se aprecia que este presenta un potencial de oxidación de 0.46 V (v/s Ag/AgCl). Ahora correlacionando tanto la intensidad como la carga en función de la concentración se visualizada una excelente linealidad $R^2=0,9958$ y $R^2=0,9951$ respectivamente.

5.2.2 CV estandar ácido gálico

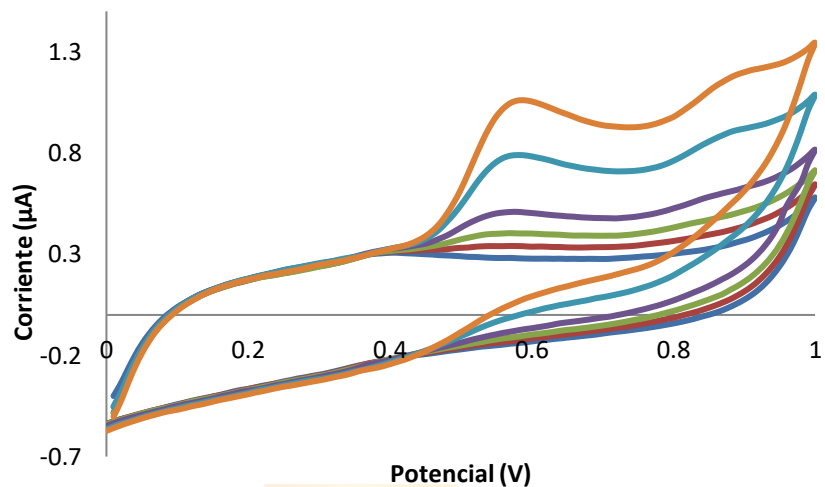


Figura n°12: Voltamperometría cíclica estandar de ácido gálico concentración 3mM.

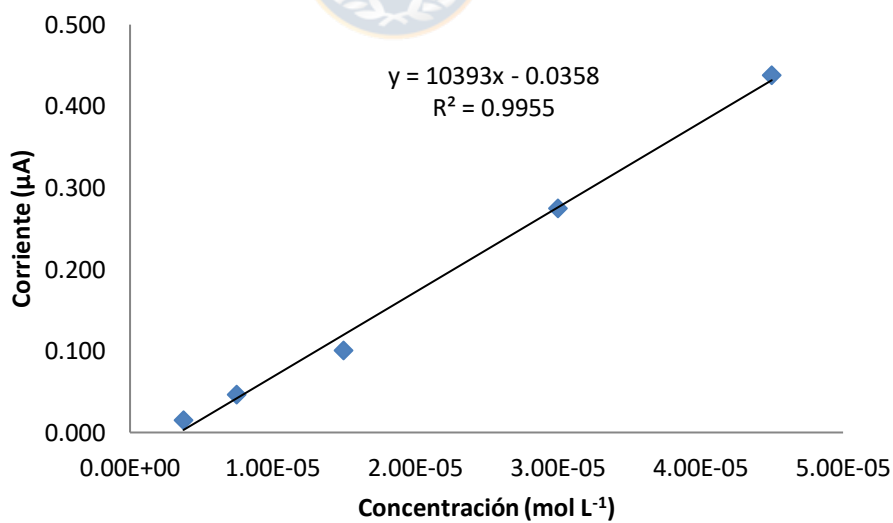


Figura n°13: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar ácido gálico 3mM.

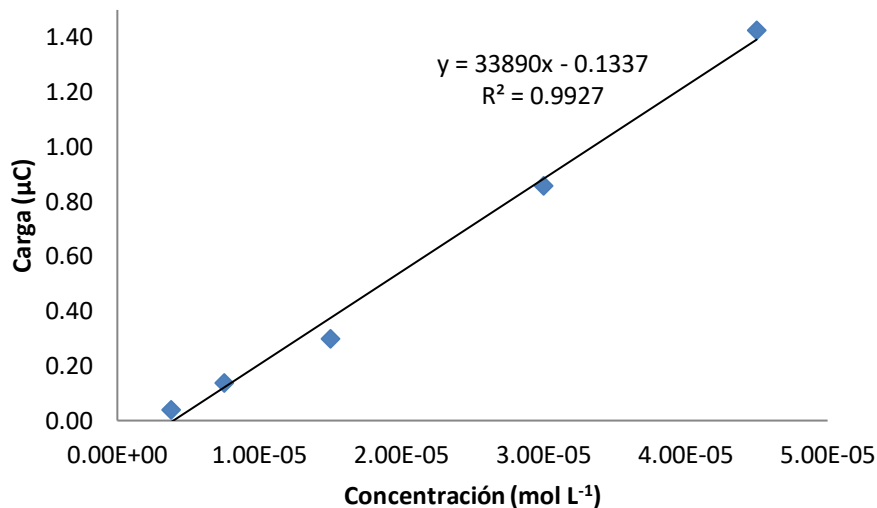


Figura n°14: Gráfica Carga en función de la concentración estandar ácido gálico 3mM.

Analizando la CV del ácido gálico se puede apreciar un potencial de 0.58 V (v/s Ag/AgCl) el cual a medida que va aumentando la concentración del estandar se nota con mayor claridad un segundo proceso de oxidación en un potencial de 0.88 V, presentando una buena linealidad de intensidad y carga en función de la concentración.

5.2.3 CV estandar ácido ascórbico

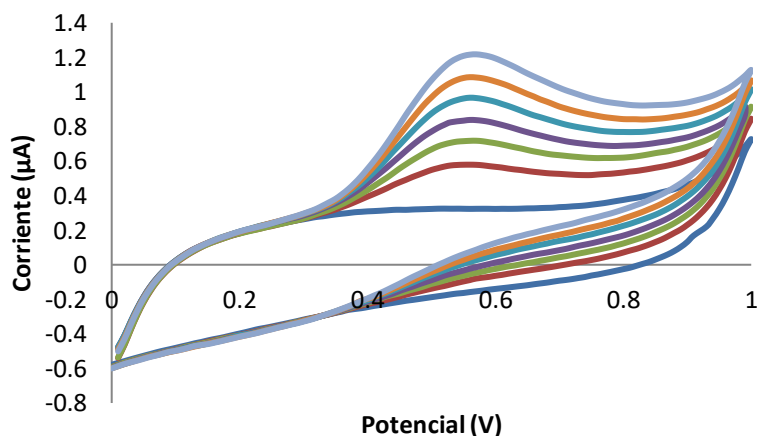


Figura n°15: Voltamperometría cíclica estandar de ácido ascórbico concentración 3mM.

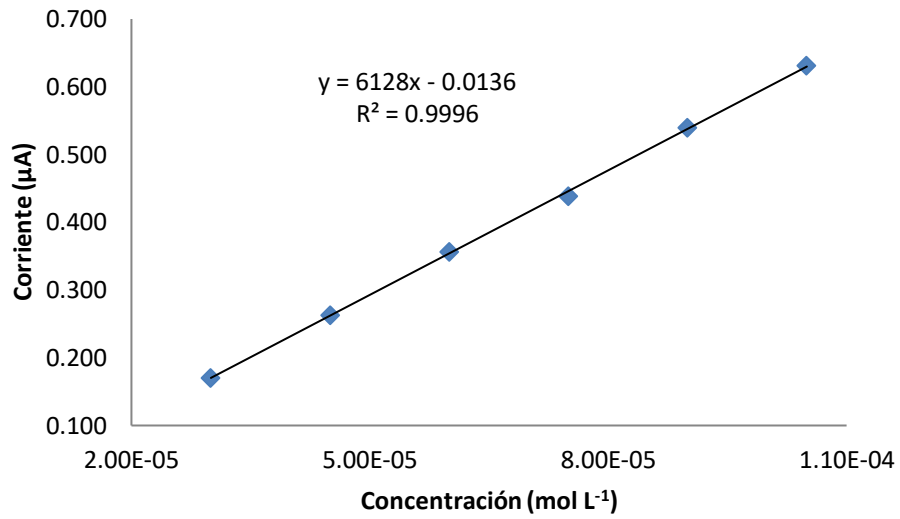


Figura n°16: Gráfica Corriente en función de la concentración estandar ácido ascórbico

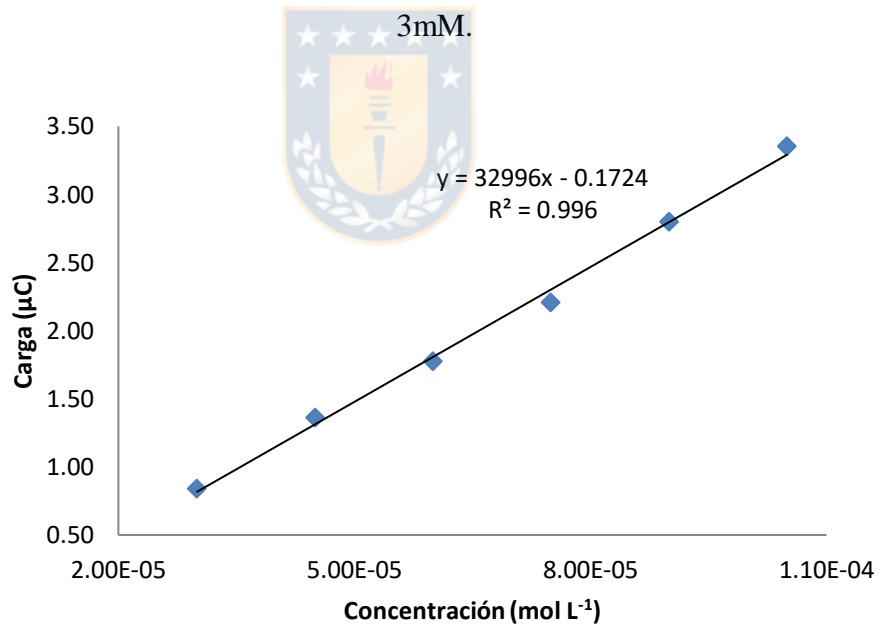


Figura n°17: Gráfica Carga en función de la concentración estandar ácido ascórbico 3mM.

Con respecto al ácido ascórbico se aprecia un definido peak de oxidación con un potencial de 0.57V (v/s Ag/AgCl), al igual que sus estándares estudiados presenta una buena linealidad en relación a intensidad-Carga en función de la concentración.

En resumen, realizada las voltamperometría cíclica se puede apreciar que los estándares presentan una buena correlación entre corriente-concentración, carga-concentración, destacandose principalmente el estandar de trolox y ácido ascórbico, ambos estandarés presentan señales definidas de oxidación sobresaliendo el estandar trolox con un potencial de oxidación mas bajo, caracteristicas propicias para ser utilizado como unico estandar de referencia los estudios de capacidad antioxidante.

Luego se procedió a estudiar la correlación entre los dos métodos desarrollados hasta el momento (DPPH-CV), se estudio la correlación entre la medida de capacidad antioxidante entre el porcentaje de inhibición del radical DPPH (IC_{50}) y corriente o carga determinada por la técnica voltamperométrica.

5.3 Correlación DPPH-CV

Luego se procedió a estudiar la correlación entre los dos métodos desarrollados hasta el momento (DPPH-CV), se estudio la correlación entre la medida de capacidad antioxidante entre el porcentaje de inhibición del radical DPPH (IC_{50}) y corriente o carga determinada por la técnica voltamperométrica.

5.3.1 Correlación DPPH-CV Trolox

Corriente (μA)	Carga (μC)	% Inh
0,171	0,689	14,3
0,380	1,553	23,1
0,487	1,928	29,9
0,627	2,629	40,9
0,786	3,249	51,6
0,952	3,928	57,5
1,125	4,700	70,5

Tabla n°9: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con porcentaje de inhibición (ensayo DPPH) estandar Trolox.

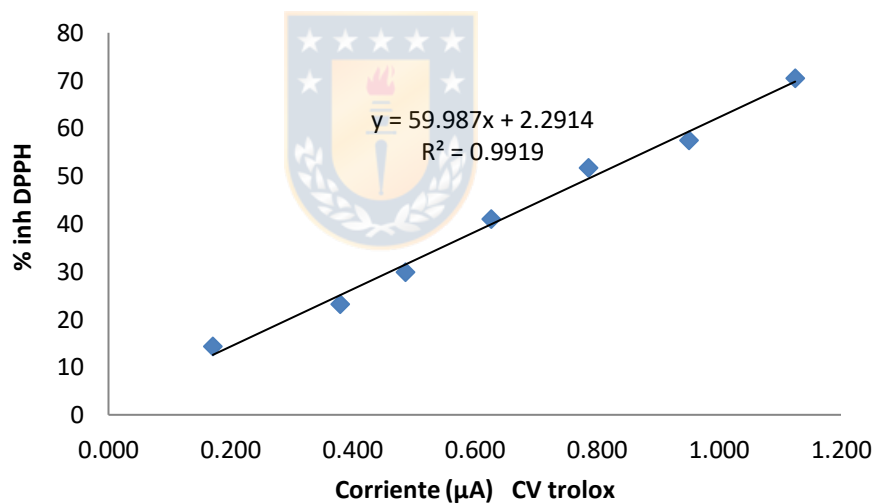


Figura n°18: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar Trolox.

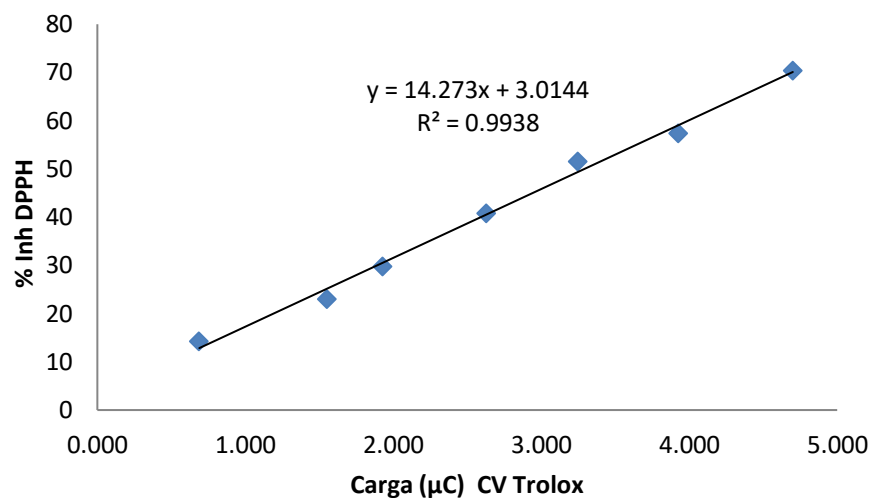


Figura n°19: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar Trolox.

Para los puntos estudiados tanto voltamperometría cíclica como en el ensayo DPPH se aprecia que presenta buena correlación lineal, en particular la relación entre el porcentaje de inhibición del radical (DPPH) con la carga (ensayo CV).

5.3.2 Correlación DPPH-CV Ácido Gálico

Corriente (μA)	Carga (μC)	% Inh
0,015	0,040	24,4
0,046	0,139	31,5
0,100	0,300	42,5
0,274	0,858	50,3
0,438	1,426	76,0

Tabla n°10: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con %Inhibición (ensayo DPPH) estandar ácido gálico.

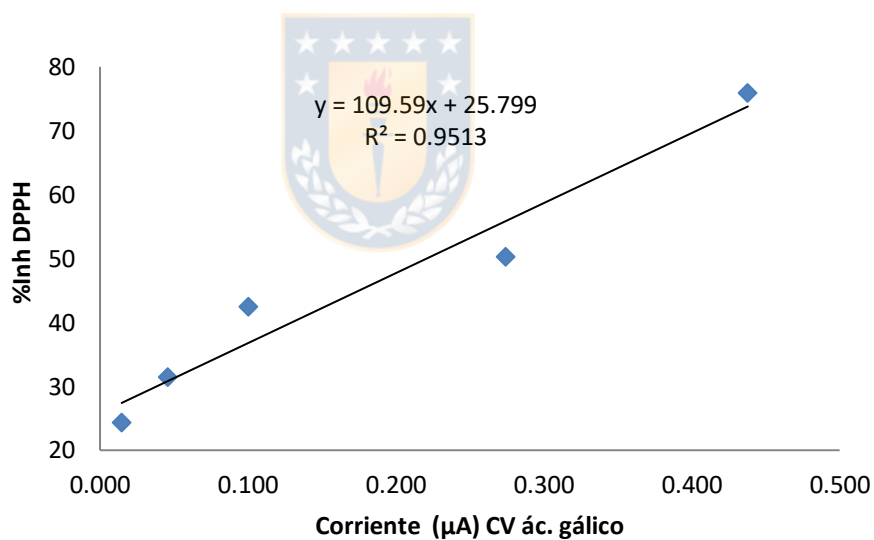


Figura n°20: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido gálico.

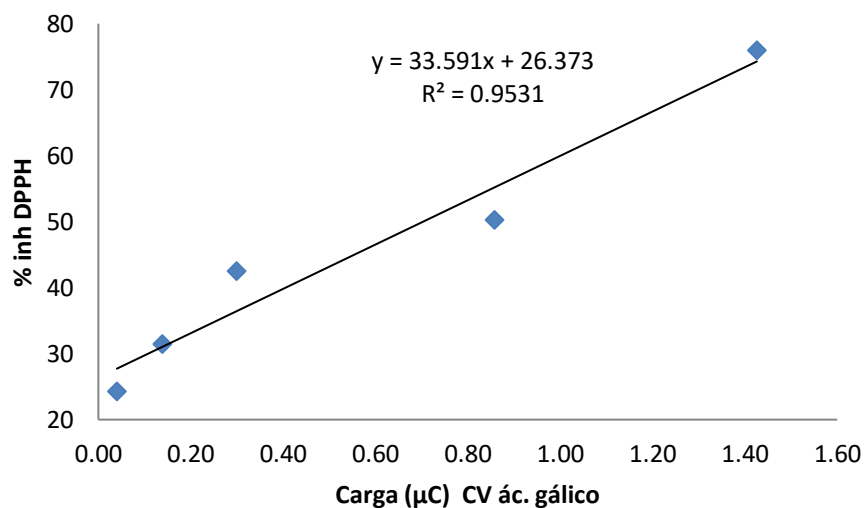


Figura n°21: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estandar ácido gálico.

Para ácido gálico si bien los puntos no fueron los mismo que para el analisis del estandar trolox, este presenta una correlación mas baja entre los ensayos DPPH-CV.

5.3.3 Correlación DPPH-CV Ácido ascórbico

Corriente (µA)	Carga (µC)	% Inh
0,170	0,839	17,5
0,263	1,360	25,3
0,357	1,772	32,3
0,439	2,206	43,8
0,540	2,798	50,8
0,631	3,354	59,3

Tabla n°11: Datos de corriente y carga (CV) y su relación con %Inhibición (ensayo DPPH) estandar ácido ascórbico.

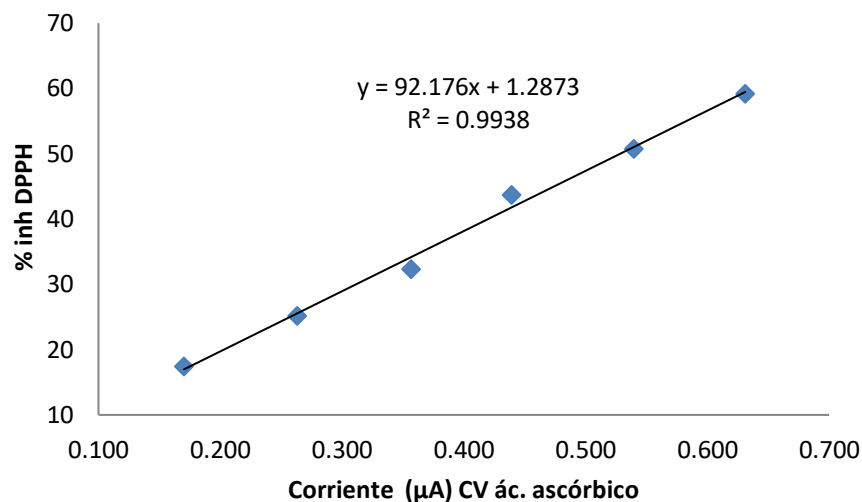


Figura n°22: Gráfica correlación corriente (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estándar ácido ascórbico.

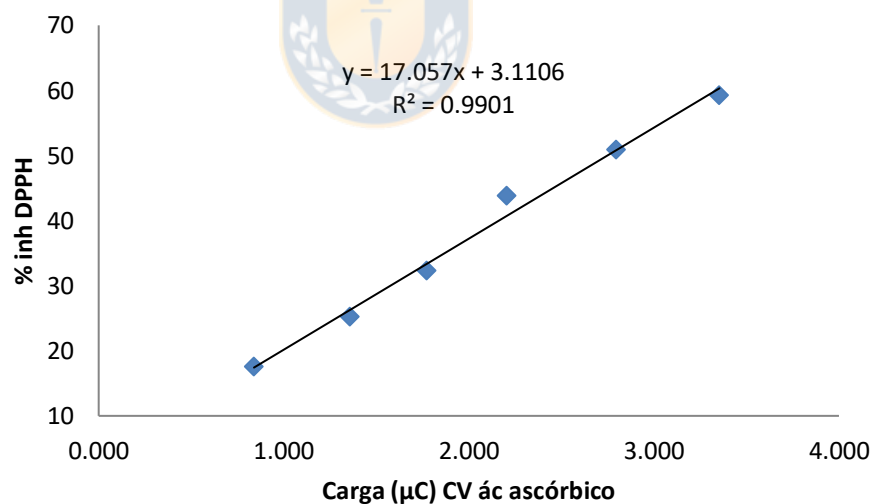


Figura n°23: Gráfica correlación carga (CV) y porcentaje de inhibición radical DPPH estándar ácido ascórbico.

Con respecto al estandar de ácido ascórbico al igual que el estandar de trolox, este presenta una buena correlación entre los ensayos (tanto en intensidad como en carga).

En general y confirmando solo lo que nos muestra el ensayo de de voltamperometría cíclica los estandares de trolox y ácido ascórbico nos presentan una buena señal con respecto a la correlación entre los ensayos DPPH-CV, en este caso nos inclinaremos por el estandar de trolox para realizar los análisis debido a su bajo potencial de oxidación (0.460 V v/s Ag/AgCl).

Los resultados obtenidos entre el ensayo DPPH y la técnica voltamperométrica nos dan indicios de que se podría lograr una buena correlación utilizado un ensayo voltamperométrico mas sensible, por lo cual realizaremos los estudios de correlación entre los ensayos de capacidad antioxidante, ensayo ORAC con ensayos de voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), destacando que no se han encontrado estudios de determinación de capacidad antioxidante por esta técnica electroanalítica.



5.4 Determinación capacidad antioxidante ensayo ORAC

Se realizó la curva de calibrado del estándar de referencia trolox para la determinación de la capacidad antioxidante en las muestras, la curva de calibrado presento una buena linealidad ($R^2= 0,9942$), presentando límites de detección y cuantificación de $43,8 \mu\text{molL}^{-1}$ y $120 \mu\text{molL}^{-1}$, respectivamente.

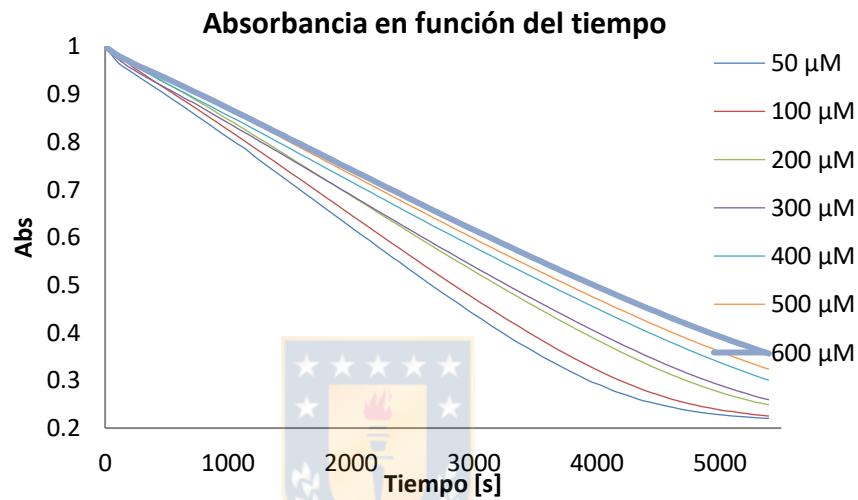


Figura n°24: Curva de calibrado ensayo ORAC estandar trolox 1nM (absorbancia en función del tiempo).

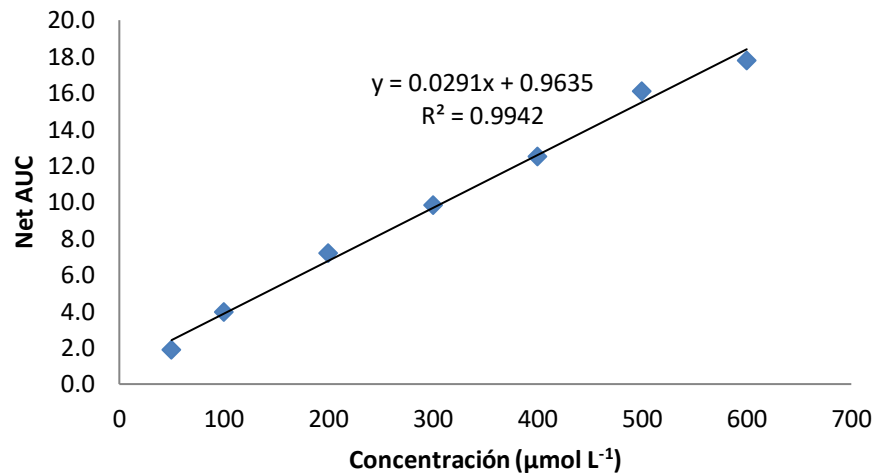


Figura n°25: Curva de calibrado ensayo ORAC estandar trolox 1mM.

Una vez obtenida la curva de calibrado se procedió a determinar la capacidad antioxidante de los frutos, presentando concentraciones de 5734 μmolL^{-1} eq Trolox para *Greigia sphacelata*, 17338 μmolL^{-1} eq de Trolox para *Ribes grossularia*, y 24892 μmolL^{-1} eq de Trolox en *Smilax aspera*.

5.5 Ensayo voltamperométrico DPV

Una vez obtenido los valores de capacidad antioxidante, continuamos con el estudio mediante las técnicas voltamperométricas, estudiando el estándar de trolox, la voltamperometría diferencial de pulsos presento buenas señales analíticas, la cual se seleccionó y optimizo para realizar los ensayos, con electrolito soporte tampón fosfato a pH=7,4, con Srate: 0,05 (V/s), Epuls: 0,100 (V), Estep: 0,010 (V), Tpuls: 35 (ms).

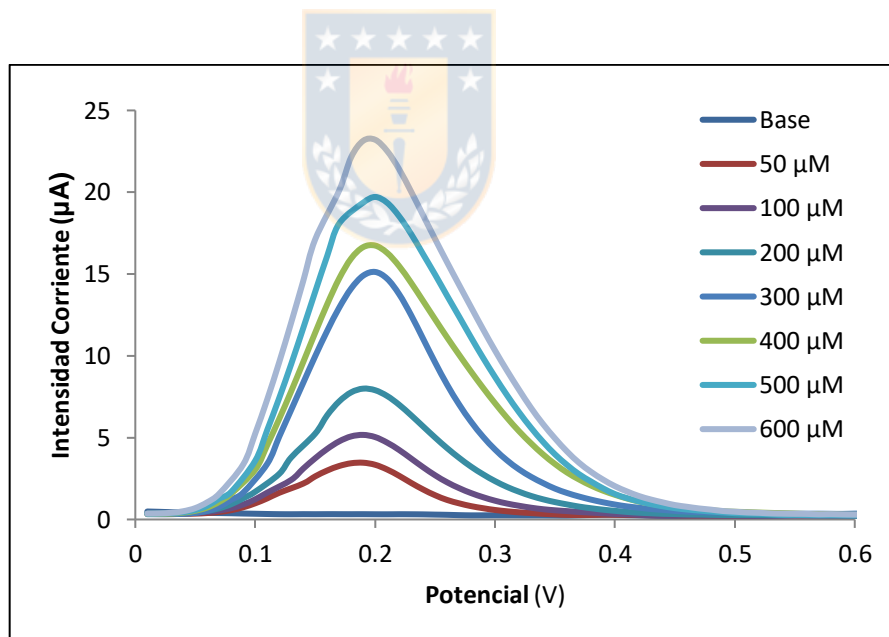


Figura n°26: Voltamperometría diferencial de pulsos (DPV), curva de calibrado estandar de trolox.

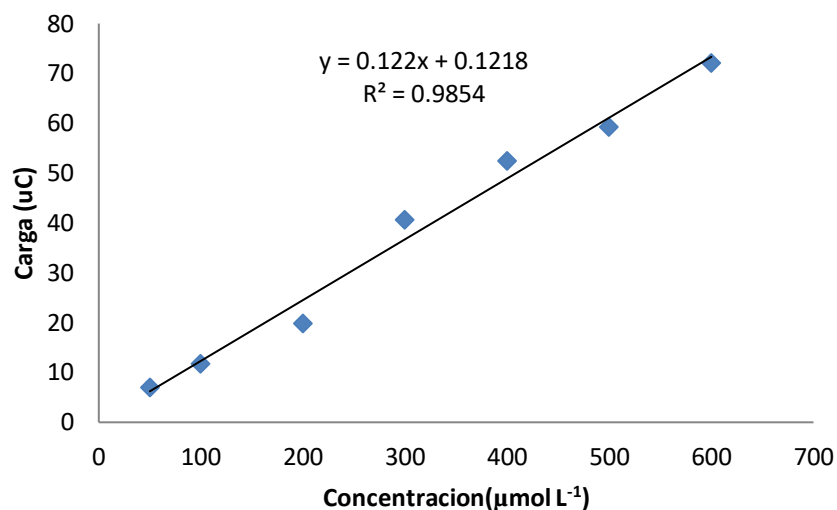


Figura n°27: Curva de calibrado ensayo DPV estándar trolox 1mM (carga en función de la concentración).

Con estas condiciones el estándar presenta buenas señales, presentando el estándar de trolox señal analítica a un potencial de 200 mV vs Ag/AgCl aproximadamente, Luego se realizó la curva del estándar mediante la relación de la carga en función de la concentración, que presenta una buena linealidad ($R^2 = 0,9854$), con límites de detección y cuantificación de $46,5 \mu\text{molL}^{-1}$ y $155 \mu\text{molL}^{-1}$ respectivamente.

Una vez obtenidas las curvas de calibrado de ORAC y DPV se estudió la correlación entre ambas, la cual presenta una buena correlación lineal con un valor de $\gamma = 0,989$.

Realizando el ensayo de capacidad antioxidante mediante DPV y aplicando sus factores de dilución respectivos los extractos de los frutos presentan concentraciones de $742 \mu\text{molL}^{-1}$ *Greigia sphacelata*, $2293 \mu\text{molL}^{-1}$ *Ribes grossularia* y $4153 \mu\text{molL}^{-1}$ *Smilax aspera*.

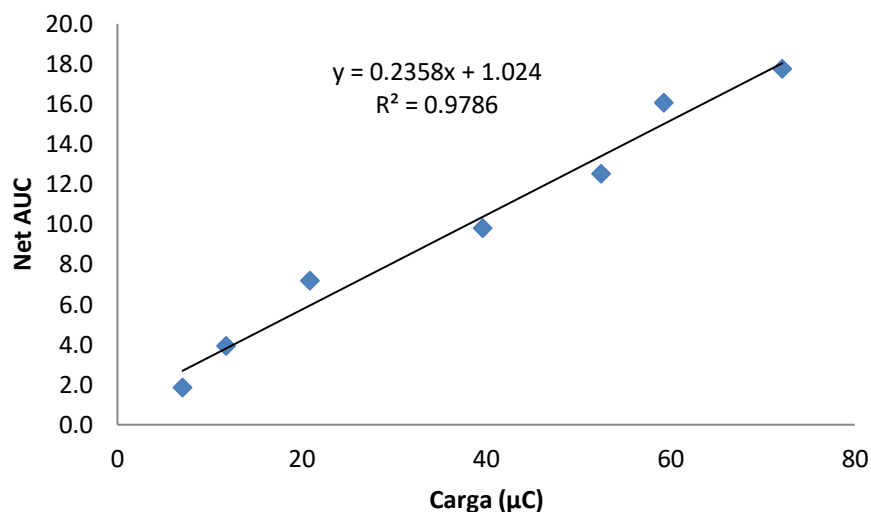


Figura n°28: Correlación área bajo la curva - carga coulombica estandar trolox 1mM ensayos ORAC-DPV.

Luego se procedió a estudiar la correlación de distintas alícuotas de los frutos y analizar su capacidad antioxidante mediante ORAC y DPV, en este caso se presenta la correlación del área bajo la curva de ORAC y Carga por DPV, y correlación de las concentraciones en equivalentes de trolox del enayo ORAC y DPV.

5.6 Correlación ORAC-DPV extractos

5.6.1 Correlación ORAC- DPV *Ribes grossularia* (Grosella espinosa)

NET AUC	Carga	Concentración NET AUC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración carga ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
5,56	4,40	153,4	35,1
15,1	6,75	417,5	54,3
19,1	9,71	530,2	78,6
24,9	11,6	693,5	94,4
28,8	14,6	801,9	118,9

Tabla n°12: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de *Ribes grossularia*.

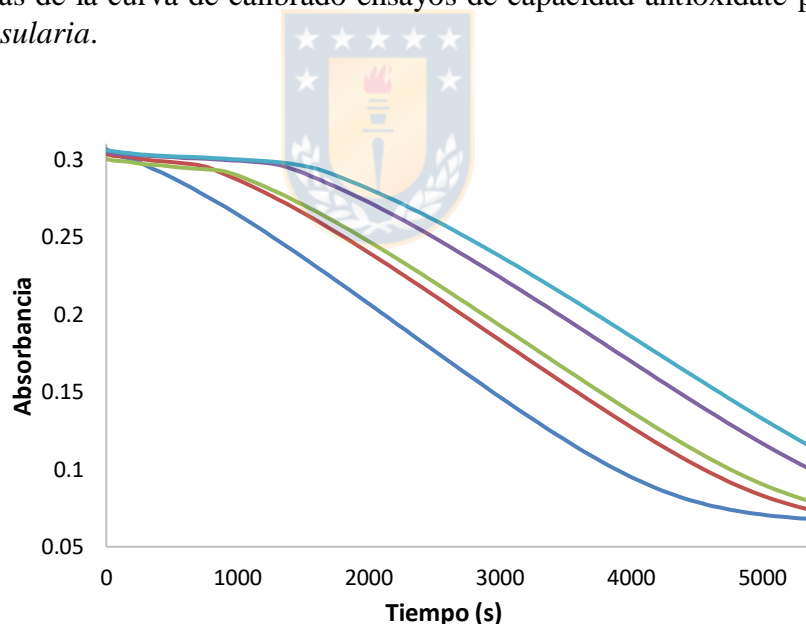


Figura n°29: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC extracto *Ribes grossularia* (Grosella Espinosa)

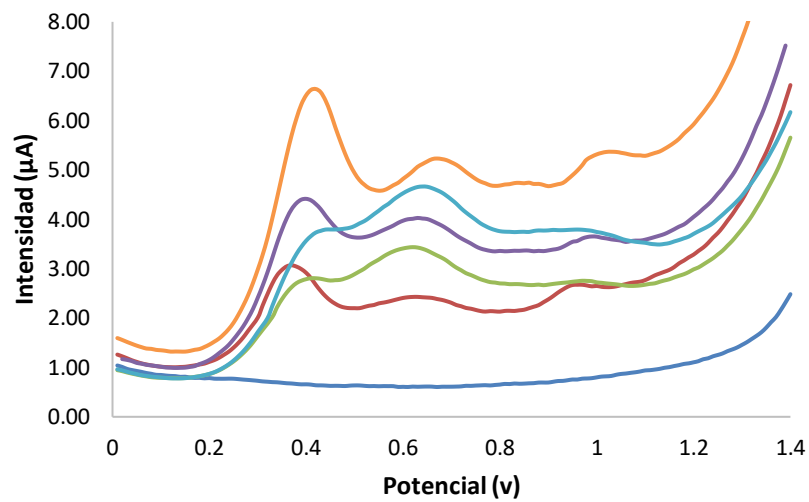


Figura n°30: DVP alicuotas de extracto Metanólico *Ribes grossularia* (Grosella Espinosa)

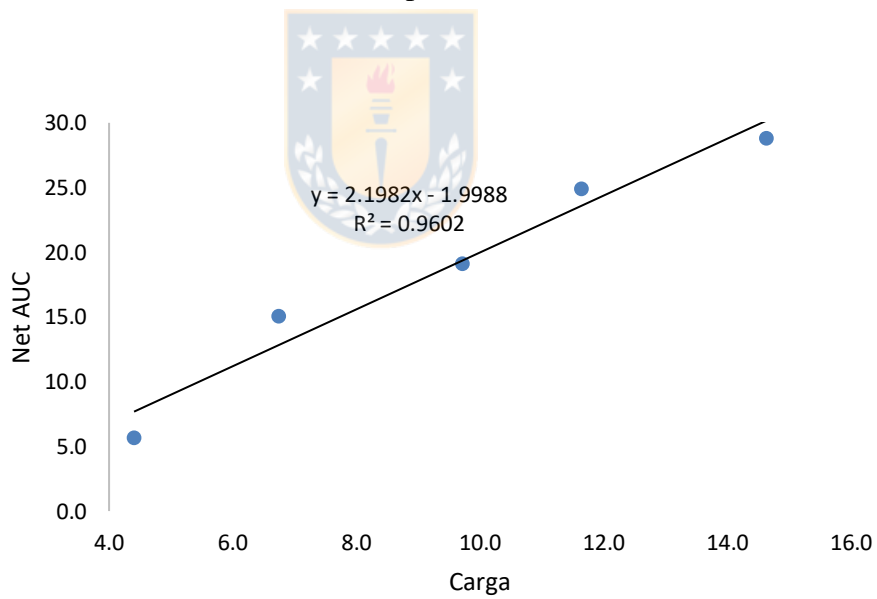


Figura n°31: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de *Ribes grossularia* (Grosella Espinosa)

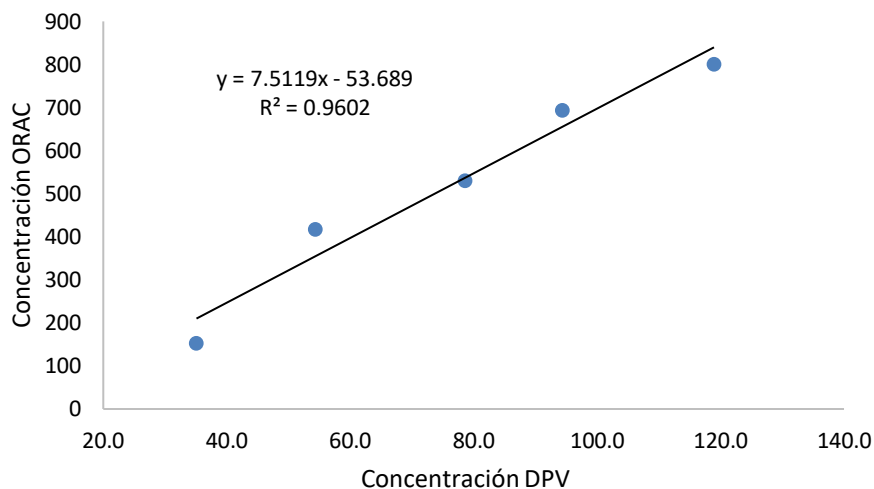


Figura n°32: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de *Ribes grossularia* (Grosella Espinosa)

En el ensayo ORAC aplicado al extracto de *Ribes grossularia* (figura 29) se puede apreciar un aumento del área bajo la curva (net AUC) de la disminución de la absorbancia en función del tiempo con una relación lineal en el estudio de las alícuotas añadidas para la determinación de la capacidad antioxidante.

Con respecto a la voltamperometría diferencial de pulsos aplicada al extracto de *Ribes grossularia* (figura 30) nos muestra diversos peak de oxidación, podemos apreciar dos peak notorios en un rango de 0,370- 0,420 V y 0,620- 0,680 V donde se aprecia un aumento lineal en relación carga-concentración.

Ambos en ensayos realizados, con las mismas alícuotas representadas del extracto (mismo factor de dilución), nos presentan una correlación (γ) de 0,980 en el estudio de la relación del área bajo la curva (netAUC) y la carga coulombica, y su respectiva expresión en las concentraciones interpoladas de la curva de calibrado obtenidas en equivalentes de trolox (μmolL^{-1} ep trolox).

5.6.2 Correlación ORAC- DPV *Smilax aspera* (Zarzaparrilla)

NET AUC	Carga	Concentración NET AUC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración carga ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
3,32	3,30	68,5	21,7
10,6	7,72	262,6	58,2
19,5	10,7	497,9	83,1
23,3	13,4	598,6	105,2
28,5	13,4	738,2	105,3
34,3	15,7	892,3	123,7

Tabla n°13: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de *Smilax aspera*.

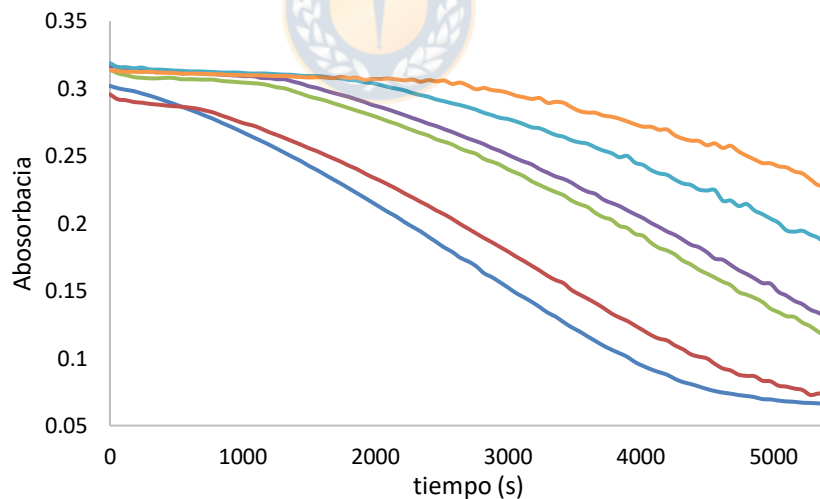


Figura n°33: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC extracto *Smilax aspera* (Zarzaparrilla)

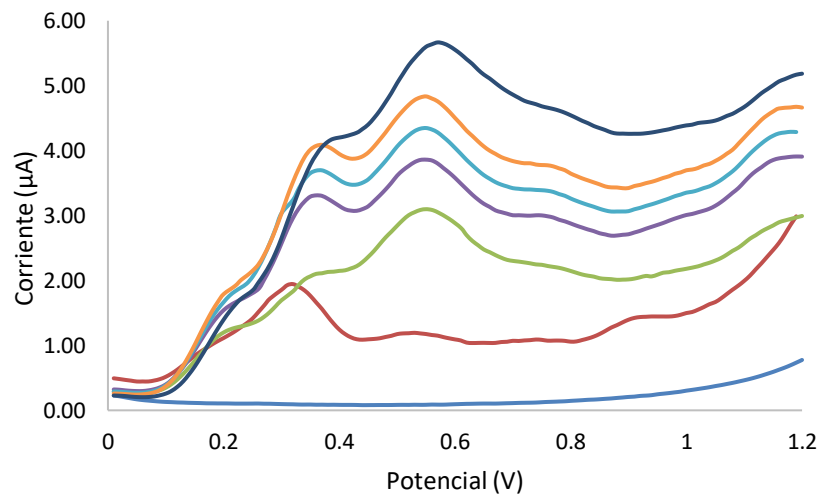


Figura n°34: DVP alicuotas de extracto Metanólico *Smilax aspera*.

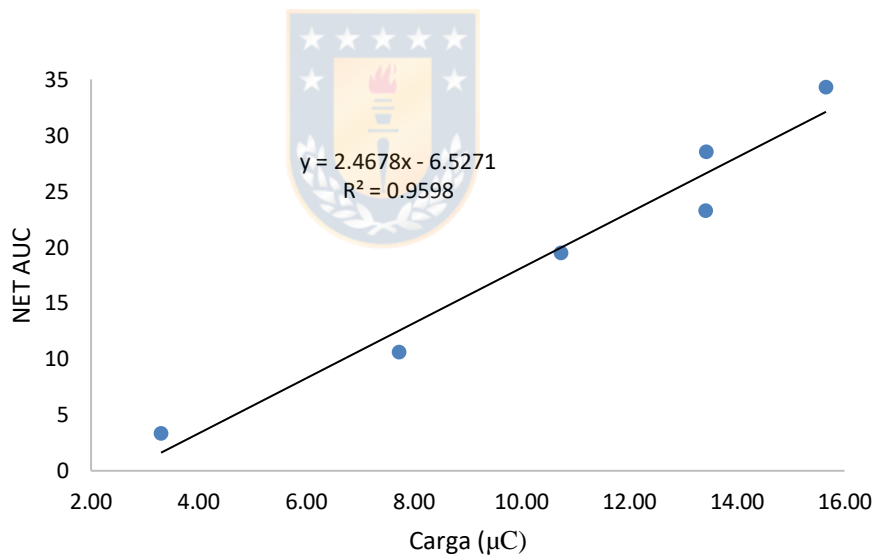


Figura n°35: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de *Smilax aspera* (Zarzaparrilla)

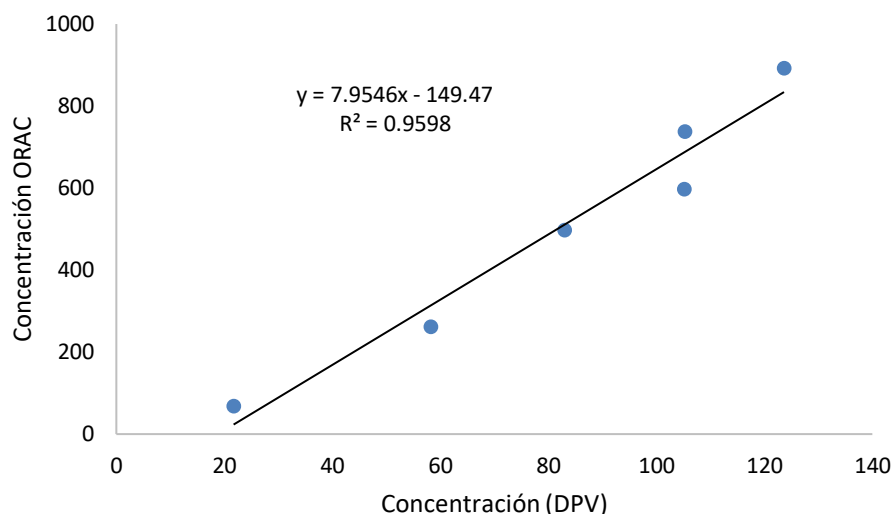


Figura n°36: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de *Smilax aspera* (Zarzaparrilla)

El ensayo ORAC del extracto de *Smilax aspera* (figura n°33) se aprecia un aumento lineal del área bajo la curva con respecto al aumento de la alicuota del extracto en función del tiempo. En relación a la voltamperometría diferencial de pulsos (figura n°34) esta nos presenta dos peak uno mas apreciable que el otro, con potenciales de oxidación de 0,370 V y 0,550 V.

En el estudio de la correlación de área bajo la curva (net AUC) y la carga coulombica en ambos ensayos (ORAC y DPV respectivamente) , con su expresión de las concentraciones obtenidas mediante la interpolación de la curva de calibrado del estandar trolox (μmolL^{-1} eq trolox) de los ensayos correspondientes se aprecia en las figuras x y x una correlación (γ) de 0,980.

5.6.3 Correlación ORAC-DPV *Greigia Sphacelata* (Chupón)

NET AUC	Carga	Concentración NET AUC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentración carga ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
4,14	6,03	32,9	140,7
4,88	7,58	39,0	222,0
6,58	10,0	52,9	348,9
7,59	11,5	61,2	429,3
8,28	13,2	66,8	516,5
10,8	14,2	87,5	569,5

Tabla n°14: Datos obtenidos, valores netos de área bajo la curva (NET AUC, ensayo ORAC), de carga coulombica (ensayo DPV) y sus respectivas concentraciones extrapoladas de la curva de calibrado ensayos de capacidad antioxidate para extracto de *Greigia Sphacelata*.

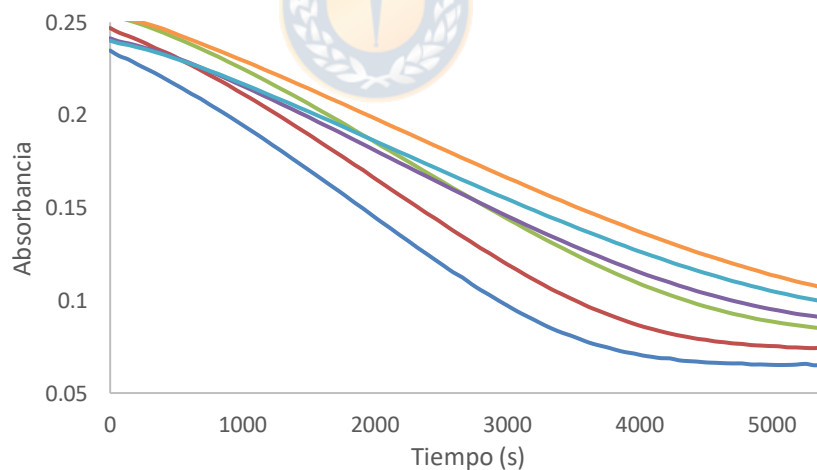


Figura n°37:: Absorbancia en función del tiempo ensayo ORAC *Greigia Sphacelata*. (Chupón).

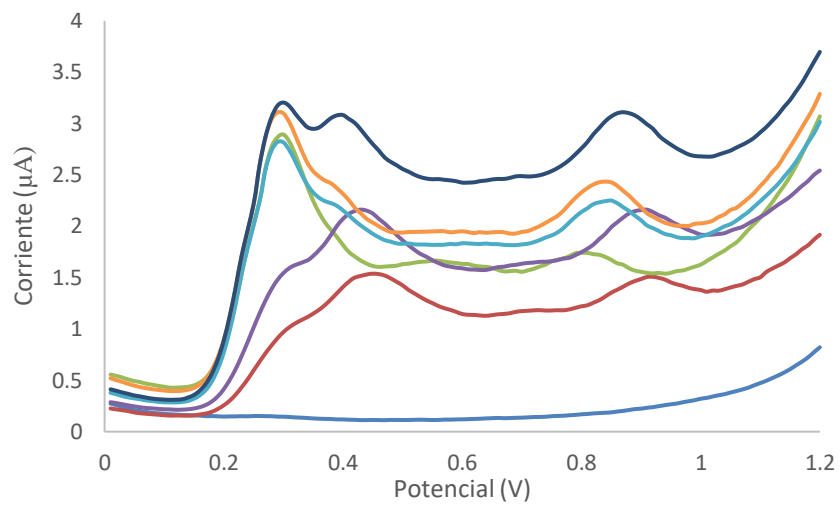


Figura n°38: DVP alicuotas de extracto Metanólico *Greiga Sphacelata*. (Chupón).

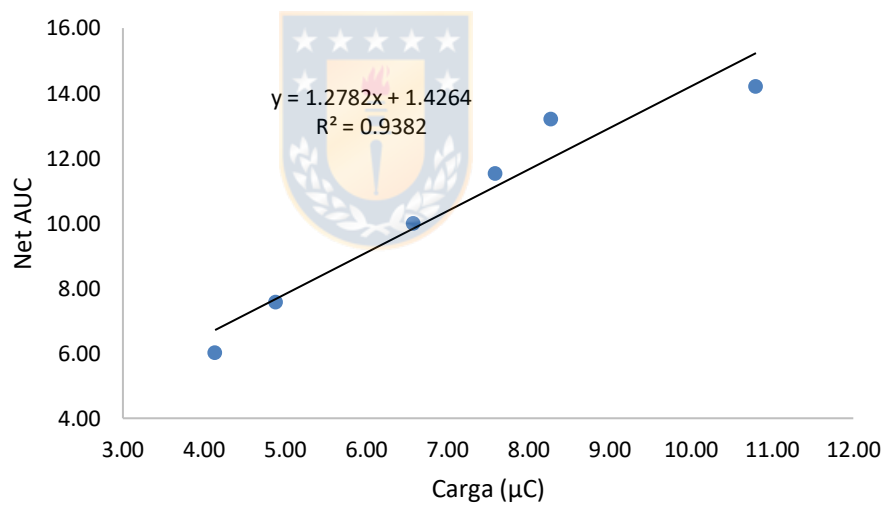


Figura n°39: Correlación valor neto área bajo la curva (ORAC)-carga coulombica (DPV) en estudio de extracto de *Greiga Sphacelata*. (Chupón).

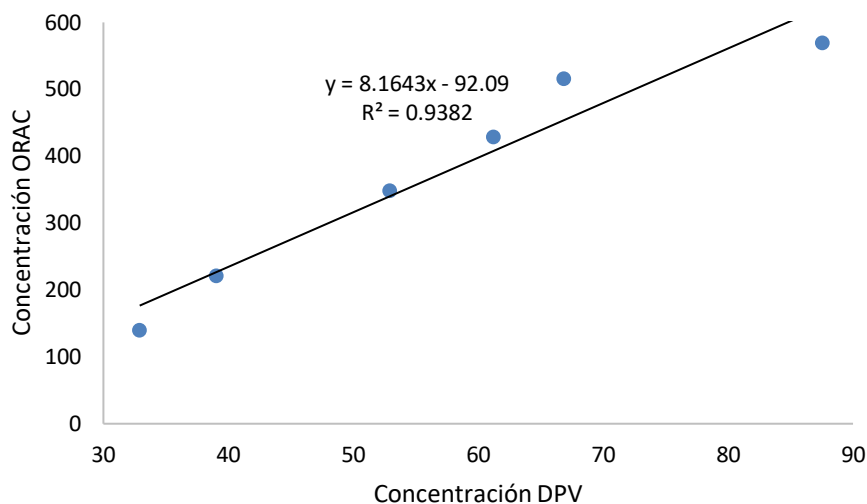


Figura n°40: Correlación concentración (ORAC)-concentración (DPV) en estudio de extracto de *Greigia Sphacelata*. (Chupón).

El ensayo ORAC del extracto *Greigia sphacelta* (figura n°37) se aprecia un aumento lineal del área bajo la curva con respecto al aumento de la alicuota del extracto en función del tiempo en la mayoría de ellas. En el caso de la voltamperometría diferencial de pulsos (figura n°38) esta nos presenta diversos peaks de oxidación a medida que aumenta la alicuota del extracto añadida, con peaks de oxidación en 0,270 V, 0,430 V y 0,880 V aproximadamente.

En el estudio de la correlación de área bajo la curva (net AUC) y la carga coulombica en ambos ensayos (ORAC y DPV respectivamente), con su expresión de las concentraciones obtenidas mediante la interpolación de la curva de calibrado del estándar trolox (μmolL^{-1} eq trolox) de los ensayos correspondientes se aprecia en las figuras 39 y 40 una correlación (γ) de 0,969.

5.7 Repetibilidad

Se calculó la repetibilidad del método electroanalítico de acuerdo al procedimiento descrito en IV.12.3. Los resultados obtenidos fueron los tabulados en tabla 4 y tabla 5.

Determinación	Concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	78,6
2	80,5
3	79,3
4	79,8
5	76,9
Promedio	79,0
s	1,37
CV'	1,73%

Tabla n°15: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Ribes Grosularia* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.

Determinación	Concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	57,8
2	58,9
3	60,6
4	59,9
5	60,3
Promedio	59,5
s	1,15
CV'	1,93%

Tabla n°16: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Smilax aspera* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.

Determinación	Concentración ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	237
2	243
3	239
4	235
5	241
Promedio	239
s	3,16
CV'	1,32%

Tabla n°17: Resultados del estudio de repetibilidad determinación capacidad antioxidante de *Greigia Sphacelata* con electrodo Glassy carbon vs Ag/AgCl.

En base a los resultados expuestos se determinó que el sensor desarrollado presenta una buena repetibilidad, puesto que el coeficiente de variación obtenido al utilizar el sensor en ambas determinaciones fue inferior al 10%.

5.8 Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

Como objetivos anexos a la investigación principal, se realizaron análisis mediante Cromatografía líquida de alta resolución a los extractos de los frutos, análisis cualitativos por el momento, análisis enfocados a atribuir los valores determinados de capacidad antioxidante a compuestos o sustancias en específico.

5.8.1 HPLC extracto *Smilax Aspera*

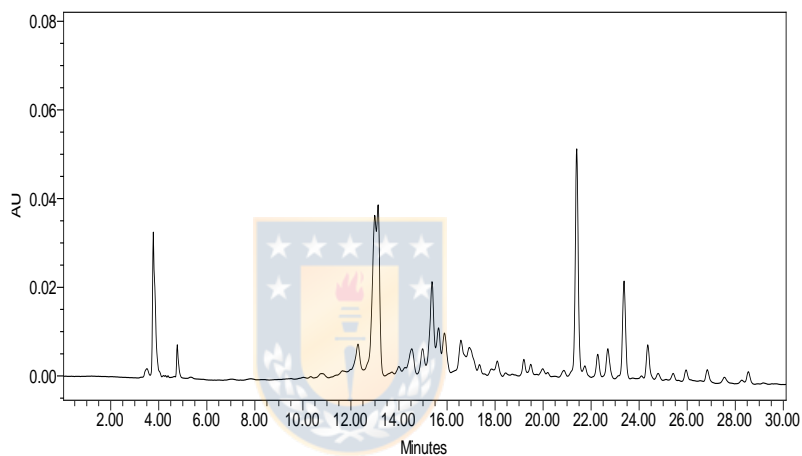


Figura n°41: Cromatograma HPLC extracto *Smilax aspera* a 320 nm.

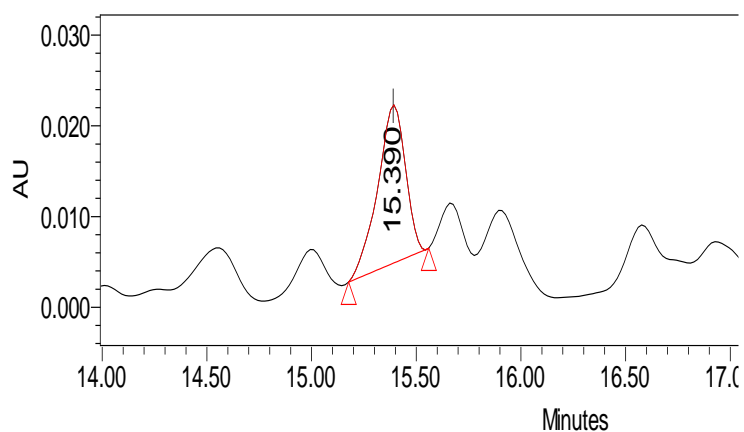


Figura n°42: Cromatograma HPLC Ácido clorogénico (tentativo) extracto *Smilax aspera* a 320 nm.

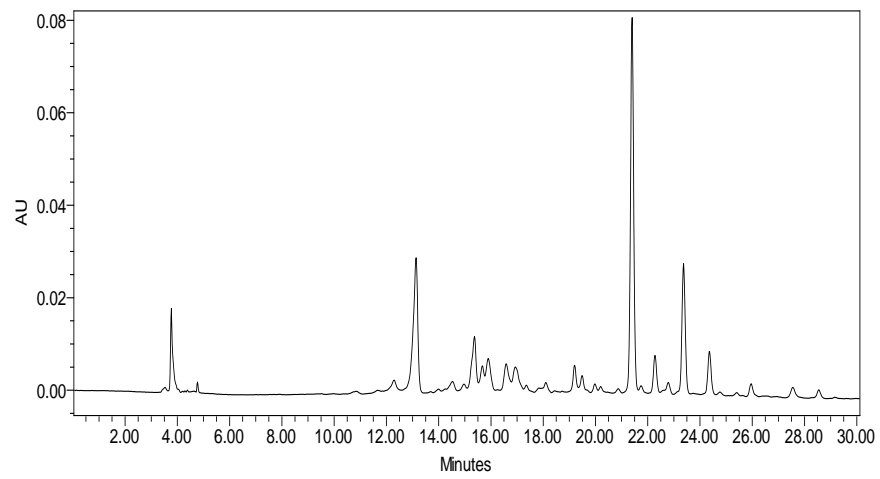


Figura n°43: Cromatograma HPLC extracto *Smilax aspera* a 348 nm.

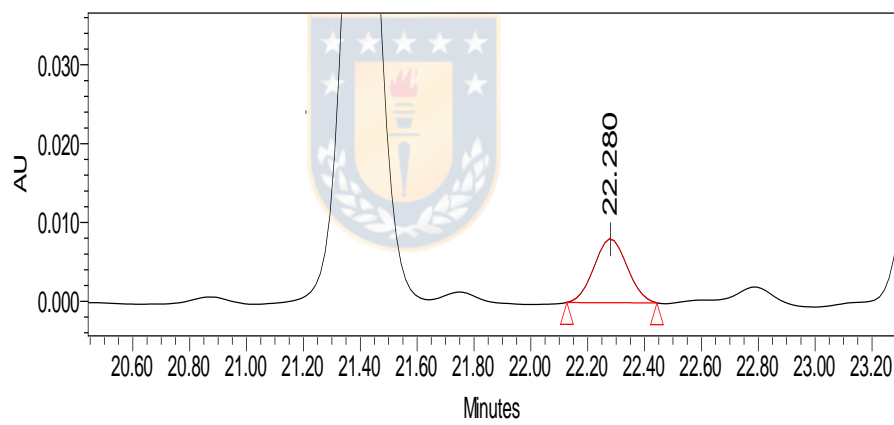


Figura n°44: Cromatograma HPLC Quercetin-3-glucósido (tentativo) extracto *Smilax aspera* a 348 nm.

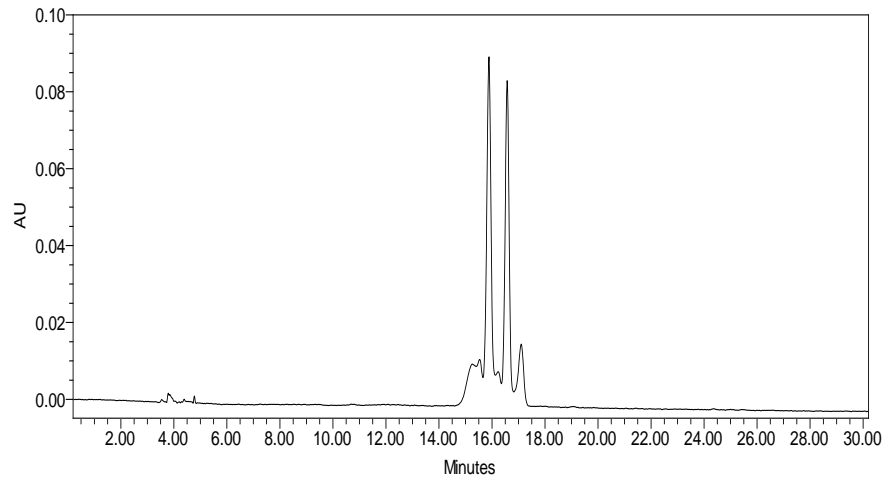


Figura n°45: Cromatograma HPLC extracto *Smilax aspera* a 520 nm.

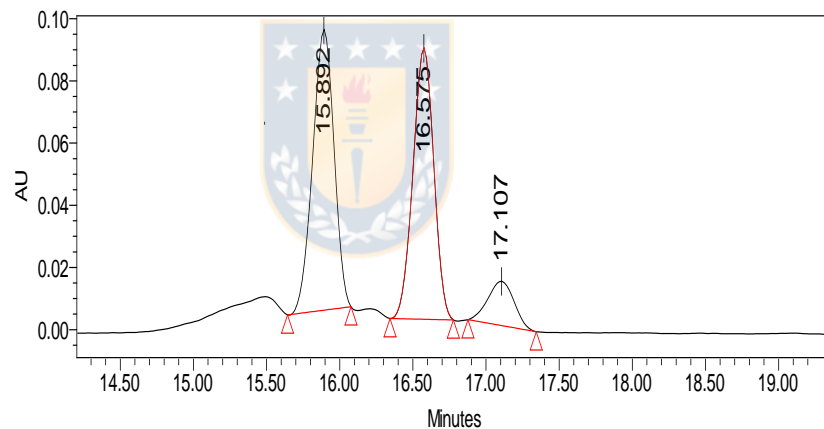


Figura n°46: Cromatograma HPLC cianidin-3-O-glucosido (tentativo) extracto *Smilax aspera* a 520 nm.

El estudio realizado a los frutos y una alta gama de estándares nos dan como compuestos fenólicos tentativos para la zarzaparrilla al ácido clorogénico con un tiempo de retención de 15.39 minutos a una longitud de onda de 320 nm, a Quercetin-3-glucósido ($t_r = 22.28$ min) a 348 nm y de cianidin-3-o-glucósido ($t_r = 16.6$ min) y otras dos antocianidinas a 520 nm.

5.8.2 HPLC extracto *Ribes grossularia*

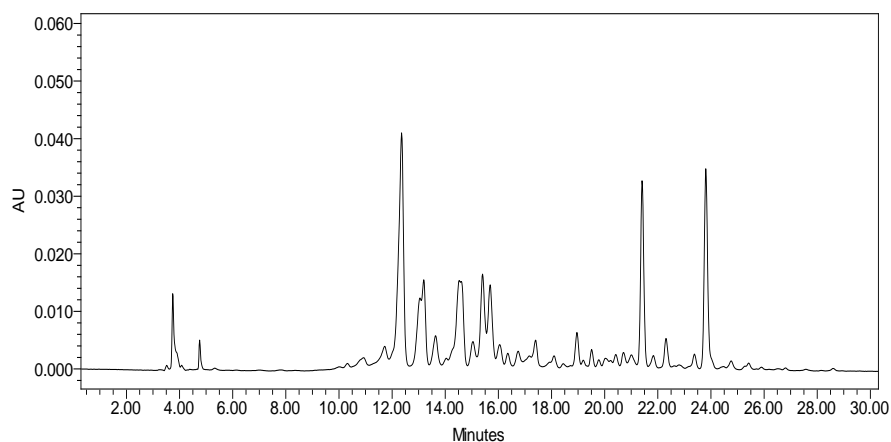


Figura n°47: Cromatograma HPLC extracto *Ribes grossularia* a 320 nm.

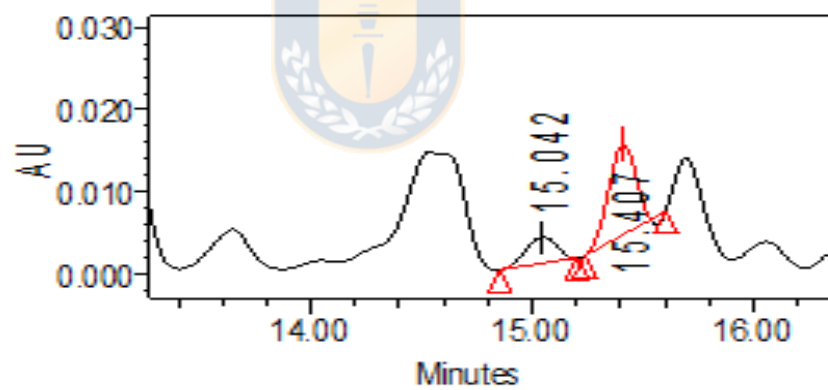


Figura n°48: Cromatograma HPLC Ácido Clorogénico (tentativo) extracto *Ribes grossularia* a 320 nm.

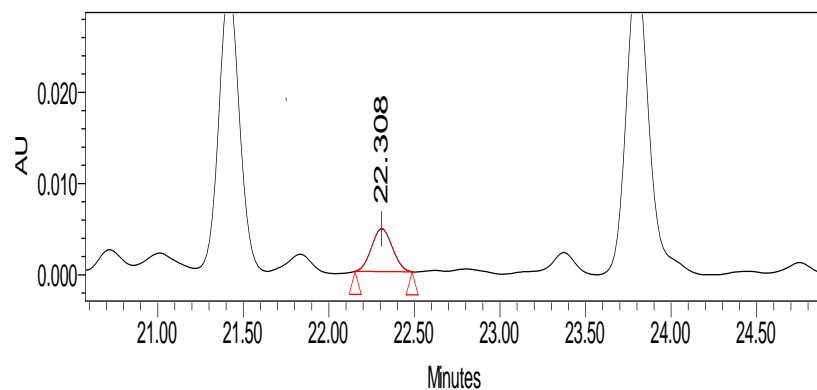


Figura n°49: Cromatograma HPLC Ácido Transferílico (tentativo) extracto *Ribes grossularia* a 320 nm.

Para grosella espinosa se propone de manera tentativa al ácido clorogénico y ácido transferílico con un tiempo de retención de 15.47 y 22.32 minutos respectivamente a una longitud de onda de 320 nm.

5.8.3 HPLC extracto *Greigia sphacelata*

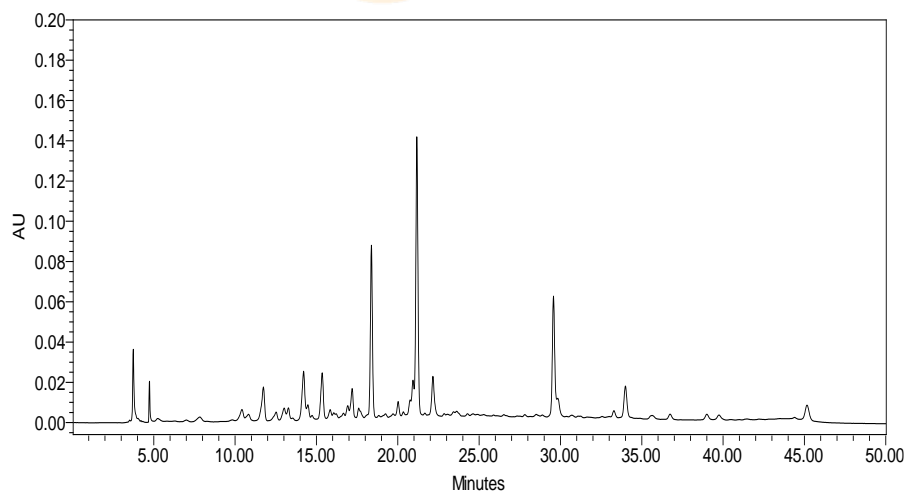


Figura n°50: Cromatograma HPLC extracto *Greigia Spahacelata* a 320 nm

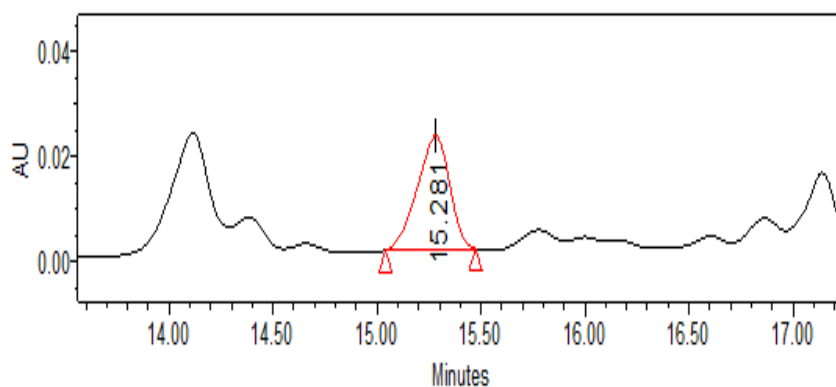


Figura n°51: Cromatograma HPLC Ácido Clorogénico (tentativo) extracto *Gregia Spahacelata* a 320 nm.

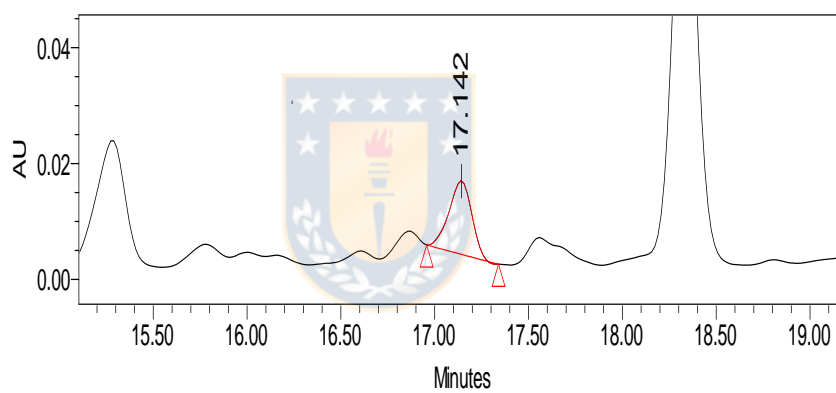


Figura n°52: Cromatograma HPLC Ácido Cafeico (tentativo) extracto *Gregia Spahacelata* a 320 nm.

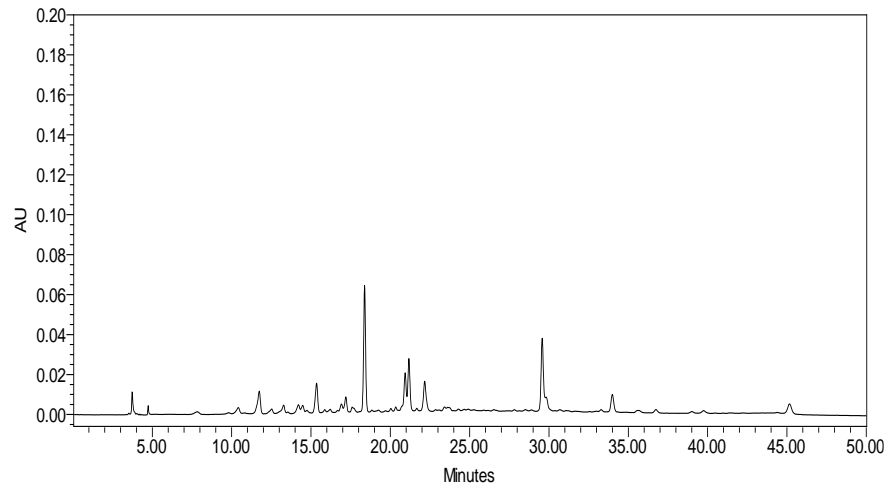


Figura n°53: Cromatograma HPLC extracto *Gregia Spahacelata* a 348 nm

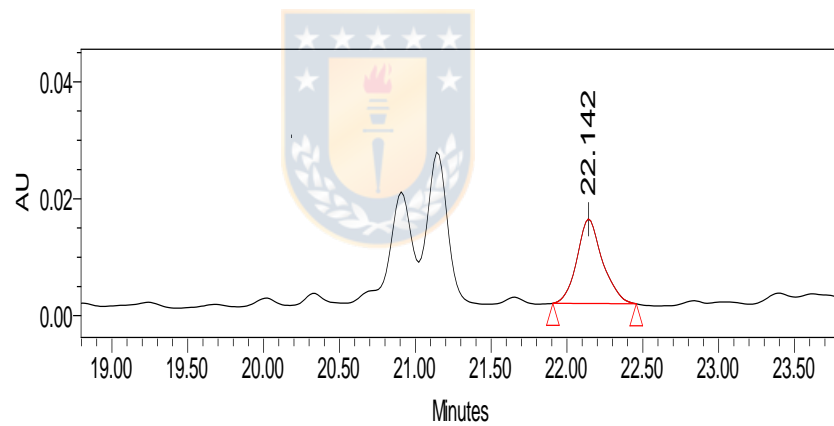


Figura n°54: Cromatograma HPLC Quercetin-3-glucósido (tentativo) extracto *Gregia Spahacelata* a 320 nm.

Y por último para el chupón se proponen tentativamente los compuestos fenólicos, ácido clorogénico y ácido cafeico a una longitud de onda de 320 nm ($t_r = 1.28$ min, $t_r = 17.14$ min respectivamente) y Quercetin-3-glucósido a 348 nm ($t_r = 22.14$)

6. CONCLUSIÓN

1. Los ensayos espectrofotométricos para la determinación de capacidad antioxidante presentan buenas resoluciones para los extractos de los frutos.
2. La determinación de capacidad antioxidante mediante ensayos DPPH y ORAC muestran una elevada capacidad antioxidante para *Smilax Aspera* y *Ribes Grossularia*. El ensayo ORAC para los frutos mencionados presentan concentraciones en equivalentes del estandar trolox de 17338 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 24892 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *Ribes Grossularia* y *Smilax Aspera* respectivamente.
3. *Gregia Sphacelata* presenta un baja capacidad antioxidante con una concentración de 5734 $\mu\text{mol L}^{-1}$ equivalentes de trolox (ORAC).
4. El ensayo voltamperométrico (DPV) presenta una buena linealidad, y correlación con el ensayo ORAC ($\gamma = 0,989$).
5. La voltamperometria diferencial de pulsos presenta bajos limites de detección y cuantificación para estandar trolox con valores de 46,5 y 155 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente.
6. La determinación de capacidad antioxidante mediante DPV presenta concentraciones mas bajas que para la determinación por ensayo ORAC, estableciendo concentraciones de 742 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (eq. Trolox) para *Gregia Sphacelata*, 2293 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (eq. Trolox) para *Ribes Grossularia* y de 4153 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (eq. Trolox) para *Smilax Aspera* .
7. El estudio de correlación γ ORAC-DPV en este caso para los extractos de los frutos, estos presentan correlaciones γ de 0,980 para *Ribes Grossularia* y *Smilax Aspera*, 0,969 para para *Gregia Sphacelata*,

correlaciones levemente bajas en comparación a las obtenidas a la correlación ORAC-DPV del estándar trolox.

8. Los análisis realizados por HPLC nos propone tentivamente los compuesto de ácido clorogénico, ácido trasferúlico para *Ribes Grossularia*, en el caso *Gregia Sphacelata* ácido clorogénico, ácido cafeico y Quercetin-3-glucósido, por último para de *Smilax Aspera* ácido clorogénico, Quercetin-3-glucósido y Cianidin-3-O-glucósido, en particular este último compuesto presenta una elevada intensidad en su señal por lo cual se atribuye que este compuesto junto con otras antocianidinas son responsables del valor elevado de capacidad antioxidante para *Smilax Aspera*.

Como discusión final podemos decir que los resultados obtenidos con respecto a las correlaciones de los ensayo espectrofotométricos y electroquímicos en la determinación de la capacidad antioxidante (ORAC-DPV) estos presentan correlaciones altas en el estudio de los extractos, obteniendo correlaciones similares en cada determinación, sin embargo estos son menores al obtenido con el estándar trolox.

Se puede destacar que realizar las determinaciones de capacidad antioxidante mediante voltamperometría diferencial de pulsos y obtener buenos resultados es un gran comienzo ya que gran parte de los trabajos electroquímicos en la determinación de capacidad antioxidante se realiza mediante voltamperometría cíclica, los resultados obtenidos por técnicas electroquímicas y espectrofotométricas en particular nos proporcionan información promedio, estos ensayos dependen de muchos factores, de la optimización y obtención de extractos puros de las matrices (el cual no fue el caso, no era el propósito del trabajo), del grado de madurez de los frutos, de la exposición a agentes radicalarios ambientales, radiación UV, etc.

Los ensayos voltamperométricos, en particular DPV pueden ser potenciados mucho mas aún en la determinación de la capacidad antioxidante, este trabajo abre la puerta a potenciar esta técnica realizando ensayos con distintos electrodos de trabajo (Oro, Platino, pasta de carbono) modificar los electrodos de trabajo (nanoparticulas de oro, nanotubos de carbono funcionalizados, entre otros), y acoplar esta técnica en conjunto con analisis por cromatografía para atribuir de manera directa la capacidad antioxidante a sustancias en especifico presentes en la matriz estudiada.



7. PROYECCIONES

Determinar cualitativa y cuantitativamente compuestos en matriz de los frutos (HPLC.MS)

Estudio de Correlación Técnica Voltamperométrica (DPV) con fotoluminiscencia (FOTOCHEM).



8. REFERENCIAS

- [1] Skoog, Douglas A, Holler, F James, Nieman, Timothy A, & Gómez, María del Carmen Martín (2001). Principios de análisis instrumental.
- [2] Heyrovský, J, & Shikata, M. (1925). Researches with the dropping mercury cathode: Part II. The Polarograph. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, 44(6), 496-498.
- [3] J. Heyrovsky, *Chem. List*, 16 (1922) 259.
- [4] Samuel P. Kounaves, Voltammetric Techniques, in: Frank A. Settle (Ed.), "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", Prentice-Hall, New Jersey, (1997).
- [5] Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: a radical role in development?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 130-143.
- [6] Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J., & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity*, 76(3), 986-993.
- [7] Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172.
- [8] Jones, Dean P, & Go, Y-M. (2010). Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(s2), 116-125.
- [9] Schroeter, Hagen, Heiss, Christian, Balzer, Jan, Kleinbongard, Petra, Keen, Carl L, Hollenberg, Norman K, . . Kelm, Malte. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1024-1029.
- [10] Perez-Vizcaino, Francisco, Duarte, Juan, Jimenez, Rosario, Santos-Buelga, Celestino, & Osuna, Antonio. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1), 67-75.
- [11] Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification,

- physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027.
- [12] Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica*, 28(3), 89-101.
- [13] Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- [14] Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*, 18(50).
- [15] Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current pharmaceutical design*, 15(26), 3063-3073.
- [16] Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (Eds.). (2017). *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons.
- [17] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., ... & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- [18] Armstrong, D. (Ed.). (2010). *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Humana*.
- [19] Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of functional foods*, 18, 797-810.
- [20] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [21] Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de

- Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.
- [22] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [23] Du, G., Li, M., Ma, F., & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
- [24] Solís-Oba, M., Bárzana, E., García-Garibay, M., & Viniegra-González, G. (2007). El ABTS•+ agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Revista mexicana de ingeniería química*, 6(3), 275-281.
- [25] Beltran, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velasquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2009). Ascorbic acid, phenolic content and antioxidant capacity red, cherry, yellow and white types of pitahaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43, 153-162.
- [26] Will, B., & Zizka, G. (1999). A review of the genus *Greigia* Regel (Bromeliaceae) in Chile. *Harvard Papers in Botany*, 225-239.
- [27] Flagg, M. L., Wächter, G. A., Davis, A. L., Montenegro, G., & Timmermann, B. N. (2000). Two novel flavanones from *Greigia sphacelata*. *Journal of natural products*, 63(12), 1689-1691.
- [28] Bajaj, Y. P. S. (1988). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 6 Crops II*. Berlín, Alemania: Springer-Verlag.
- [29] Hempfling, K., Fastowski, O., Kopp, M., Pour Nikfardjam, M., & Engel, K. H. (2013). Analysis and sensory evaluation of gooseberry (*Ribes uva crispa* L.) volatiles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(26), 6240-6249.
- [30] Longo, L., & Vasapollo, G. (2006). Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry*, 94(2), 226-231.
- [31] Delgado-Pelayo, R., & Hornero-Méndez, D. (2012). Identification and quantitative analysis of carotenoids and their esters from sarsaparilla

- (*Smilax aspera* L.) berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(33), 8225-8232.
- [32] Ivanova, A., Mikhova, B., Batsalova, T., Dzhambazov, B., & Kostova, I. (2011). New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. *Fitoterapia*, 82(2), 282-287.
- [33] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- [34] Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- [35] Szabo, M. R., Idrıoiu, C., Chambre, D., & Lupea, A. X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61(3), 214-216.
- [36] Wang, Joseph. (2006). *Analytical electrochemistry*: John Wiley & Sons.
- [37] Osteryoung, Janet G, & Osteryoung, Robert A. (1985). Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57(1), 101A-110A.
- [38] Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydrate polymers*, 96(2), 586-592.
- [39] Ortiz, R., Antilén, M., Speisky, H., Aliaga, M. E., López-Alarcón, C., & Baugh, S. (2012). Application of a microplate-based ORAC-pyrogallol red assay for the estimation of antioxidant capacity: first action 2012.03. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1558-1561.
- [40] Flores, G., & Ruiz del Castillo, M. L. (2016). Accumulation of anthocyanins and flavonols in black currants (*Ribes nigrum* L.) by pre-harvest methyl jasmonate treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 4026-4031.