

**ESTUDIO DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA
DE PLÁTANO HARTÓN PARA SU USO COMO ANTIOXIDANTES NATURALES
EN EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA**

JENNIFER PILAR ROJAS LLANES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ESTUDIO DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA
DE PLÁTANO HARTÓN PARA SU USO COMO ANTIOXIDANTES NATURALES
EN EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA**

JENNIFER PILAR ROJAS LLANES
Química, Magíster en Química

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctora en Química**

Directores:
ELENA E. STASHENKO, Química, *Ph.D.*
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ MORALES, Químico, *Ph.D.*

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOMOLÉCULAS
CENTRO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS
CENTRO DE EXCELENCIA CENIVAM**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por acompañarme en todo momento.

A la Santísima Virgen María, a Santa Rita de Casia, a San Judas Tadeo y a mi Ángel de la Guarda, por interceder en toda ocasión.

A Pilar, mami, hermana, amiga, por darme a conocer el verdadero amor humano.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo René Martínez Morales, por su ayuda en esta etapa de mi formación académica.

A los evaluadores, Dra. Geovanna Tafurt García, Dr. Luis Enrique Cuca Suárez, Dr. Rodrigo Torres Sáez y Dr. John Jairo Castillo León, por sus observaciones y comentarios.

A las personas que me permitieron entrar a sus fincas a recolectar el material vegetal, y a las que me ayudaron a cosechar.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	32
1. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO TOTAL DE COMPUESTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA	35
1.1 MARCO TEÓRICO	36
1.1.1 Compuestos fenólicos	36
1.1.2 Antioxidantes	43
1.1.3 Determinación de la capacidad antioxidante	43
1.1.3.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	44
1.1.3.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	45
1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	46
1.2.1 Material vegetal	46
1.2.2 Reactivos	46
1.2.3 Diseños de experimentos	47
1.2.3.1 Selección de factores y niveles	47
1.2.3.2 Análisis estadístico de datos	47
1.2.3.3 Confirmación de los puntos predichos como óptimos	48
1.2.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos	48
1.2.5 Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas	49
1.2.6 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	50
1.2.7 Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno	51

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
1.3.1 Selección de factores y niveles para los diseños de experimentos	52
1.3.2 Diseños de experimentos	55
1.3.3 Correlaciones entre las variables de respuesta analizadas	65
1.3.4 Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla con la de sustancias de referencia	68
1.4 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	69
2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC Y ABTS⁺) DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN	71
2.1 MARCO TEÓRICO	72
2.1.1 Mora de Castilla	72
2.1.2 Plátano Hartón	74
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	77
2.2.1 Material vegetal	77
2.2.2 Reactivos	78
2.2.3 Extracción sólido-líquido	79
2.2.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos	79
2.2.5 Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas	79
2.2.6 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	79
2.2.7 Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno	80
2.2.8 Extracción en fase sólida	80
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
2.3.1 Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos sólido-líquido de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón	81

2.3.2 Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida	87
3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN, CONTRA LA OXIDACIÓN LIPÍDICA DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA SOMETIDAS A RADIACIÓN UV	90
3.1 MARCO TEÓRICO	91
3.1.1 Autooxidación lipídica	91
3.1.2 Antioxidantes	96
3.1.2.1 Clasificación de antioxidantes	96
3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	101
3.2.1 Reactivos	101
3.2.2 Extractos	101
3.2.3 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de soya utilizado	101
3.2.4 Preparación de emulsiones	103
3.2.5 Inducción del deterioro oxidativo	104
3.2.6 Monitoreo del derivado hidrazónico del hexanal	105
3.2.7 Determinación del efecto protector	105
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
3.3.1 Composición en ácidos grasos del aceite de soya utilizado	106
3.3.2 Efecto protector de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón en emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación UVA-Vis	106
3.4 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	112

4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN, MEDIANTE EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS⁺• ACOPLADO A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	113
4.1 MARCO TEÓRICO	115
4.1.1 Determinación por HPLC de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ •	115
4.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	122
4.2.1 Reactivos	122
4.2.2 Desarrollo de un método por HPLC para la determinación de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ •	122
4.2.2.1 Equipos	122
4.2.2.2 Condiciones del método cromatográfico acoplado al derivatizador	123
4.2.2.3 Condiciones del método en el derivatizador acoplado al HPLC	126
4.2.2.4 Determinación de parámetros cromatográficos de eficiencia	127
4.2.2.5 Determinación de figuras analíticas de mérito	128
4.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS ⁺ •, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón	132
4.2.4 Hidrólisis ácida de compuestos fenólicos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón y su análisis por HPLC-ABTS ⁺ •	133
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
4.3.1 Desarrollo de un método por HPLC para la determinación de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ •	134
4.3.1.1 Condiciones del método cromatográfico acoplado al derivatizador	134
4.3.1.2 Condiciones del método en el derivatizador acoplado al HPLC	134
4.3.1.3 Parámetros cromatográficos de eficiencia	138

4.3.1.4 Figuras analíticas de mérito	143
4.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS ⁺ , de compuestos presentes en extractos sólido-líquido de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón	153
4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS ⁺ , de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida	159
4.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS ⁺ , de compuestos presentes en extractos hidrolizados de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón	164
5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	176
5.1 MARCO TEÓRICO	177
5.1.1 MS como un detector de LC	177
5.1.2 Fuentes de ionización	178
5.1.3 Los mecanismos de ESI-MS	179
5.1.4 Separación de masas	180
5.1.5 Tecnología del reflectrón	182
5.1.6 Determinación de compuestos en extractos de mora y de cáscara de plátano mediante LC-MS	183
5.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	185
5.2.1 Reactivos	185
5.2.2 Preparación de muestras	186
5.2.3 Análisis cromatográfico	186
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	188
5.3.1 Efectos de los voltajes del capilar y del fragmentador sobre las áreas de la cianidina-3-glucósido, la cianidina y la dopamina	188

5.3.2 Caracterización de extractos de mora de Castilla por LC-ESI ⁺ -TOF-MS	190
5.3.3 Caracterización de extractos de cáscara de plátano Hartón por LC-ESI ⁺ -TOF-MS	194
6. CONCLUSIONES	200
BIBLIOGRAFÍA	204
ANEXOS	224

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos y ejemplos característicos en diversas fuentes.	37
Tabla 2. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de acetona.	57
Tabla 3. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de etanol.	58
Tabla 4. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de metanol.	59
Tabla 5. Coeficientes de correlación de las variables de respuesta analizadas en los diseños de experimentos con los tres disolventes.	65
Tabla 6. Coeficientes de correlación del contenido de antocianinas monoméricas con los otros observables en los diseños de experimentos con cada disolvente.	67

Tabla 7. Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla con la de sustancias de referencia.	68
Tabla 8. Resultados obtenidos en el análisis de extractos de mora de Castilla procedente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander.	82
Tabla 9. Resultados obtenidos en el análisis de extractos de cáscara de plátano Hartón procedente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander.	83
Tabla 10. Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos acetónicos de mora fresca de Castilla y de cáscara fresca de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.	88
Tabla 11. Velocidad relativa de oxidación de ácidos grasos a 25°C.	94
Tabla 12. Valores de energía necesarios para la disociación de un átomo de hidrógeno de grupos existentes en ácidos grasos.	94
Tabla 13. Compuestos carbonílicos volátiles (µg/g) formados por autooxidación de ácidos grasos insaturados.	97
Tabla 14. Antioxidantes primarios usados comúnmente en alimentos.	100
Tabla 15. Composición de ácidos grasos en el aceite de soya utilizado.	107

Tabla 16. Efecto protector de extractos de mora de Castilla, de cáscara de plátano Hartón y de antioxidantes comerciales, medido en la oxidación lipídica de emulsiones de aceite en agua.	108
Tabla 17. Condiciones experimentales empleadas en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ^{•+} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia.	119
Tabla 18. Parámetros cromatográficos para el análisis por HPLC de antocianinas y antocianidinas.	125
Tabla 19. Parámetros cromatográficos para el análisis por HPLC de compuestos fenólicos.	135
Tabla 20. Absorbancias, a 734 nm, de diferentes concentraciones de catión-radical ABTS ^{•+} en solución acuosa.	137
Tabla 21. Parámetros operacionales en el derivatizador acoplado al HPLC.	137
Tabla 22. Tiempos de retención de los compuestos fenólicos analizados por HPLC con derivatizador.	139
Tabla 23. Parámetros de eficiencia de la separación por HPLC-DAD a $\lambda=270$ nm.	141
Tabla 24. Parámetros de eficiencia de la separación por HPLC-MWD a $\lambda=734$ nm.	142

Tabla 25. Repetibilidad de tiempos de retención (t_R) y áreas de los compuestos analizados por HPLC, antes de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	144
Tabla 26. Repetibilidad de tiempos de retención relativos (t_{RR}) y áreas relativas (A_R) de los compuestos analizados por HPLC, después de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	145
Tabla 27. Reproducibilidad de tiempos de retención (t_R) y áreas de los compuestos analizados por HPLC, antes de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	146
Tabla 28. Reproducibilidad de tiempos de retención relativos (t_{RR}) y áreas relativas (A_R) de los compuestos analizados por HPLC, después de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	147
Tabla 29. Linealidad y sensibilidad del método para la determinación por HPLC de compuestos fenólicos, antes de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	149
Tabla 30. Linealidad y sensibilidad del método para la determinación por HPLC de compuestos fenólicos, después de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} , $\lambda=734$ nm.	150
Tabla 31. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos fenólicos antes de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	151
Tabla 32. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos fenólicos después de su reacción con el catión-radical ABTS ^{•+} .	152

Tabla 33. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos sólido-líquido de mora de Castilla.	155
Tabla 34. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón.	158
Tabla 35. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de mora de Castilla, después de su extracción en fase sólida.	161
Tabla 36. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.	163
Tabla 37. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos hidrolizados de mora de Castilla.	169
Tabla 38. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón.	173
Tabla 39. Capacidad antioxidante de los compuestos identificados en los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.	174
Tabla 40. Masas exactas de los compuestos identificados por LC-ESI ⁺ -TOF-MS en extractos de mora de Castilla.	195
Tabla 41. Masas exactas de los compuestos protonados, MH ⁺ , identificados por LC-ESI ⁺ -TOF-MS en extractos de cáscara de plátano Hartón.	200

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Clasificación estructural de las antocianidinas más comunes en la naturaleza.	41
Figura 2. Estructuras de los antioxidantes sintéticos más usados.	44
Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla obtenidos con diferentes disolventes, durante 6 min.	53
Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de acetona (25%, v/v) durante diferentes tiempos de aislamiento con (●) y sin (○) ultrasonido.	56
Figura 5. Gráficas de contorno para el efecto del porcentaje de disolvente en agua y del tiempo de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla.	60
Figura 6. Gráficas de contorno para el efecto del porcentaje de disolvente en agua y del tiempo de extracción sobre el contenido de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante (ABTS ^{••}) de extractos de mora de Castilla.	61

Figura 7. Número de publicaciones sobre antioxidantes en mora, en función del tiempo.	74
Figura 8. Número de publicaciones sobre antioxidantes en plátano, en función del tiempo.	76
Figura 9. Estructuras de resonancia de radicales fenoxilo originados a partir de antioxidantes fenólicos.	99
Figura 10. Reactor UVA-Vis utilizado en la inducción de la oxidación lipídica de las emulsiones.	104
Figura 11. Pico cromatográfico del hexanal, medido como su derivado hidrazónico, generado en emulsiones de aceite en agua sometidas a radiación UVA-Vis, en presencia de antioxidantes comerciales, extractos de cáscara de plátano Hartón y de mora de Castilla, adicionados en las concentraciones con las que presentaron los efectos protectores más altos.	109
Figura 12. Número de publicaciones sobre HPLC-ABTS en línea, en función del tiempo.	115
Figura 13. Sistema HPLC en línea con el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ .	116
Figura 14. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent Technologies</i> 1260 acoplado al derivatizador <i>Pickering Pinnacle PCX</i> .	124
Figura 15. Derivatizador <i>Pickering Pinnacle PCX</i> .	124

Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC 140
con derivatizador, de una mezcla de patrones antes (DAD, $\lambda=270$ nm)
y después (MWD, $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical ABTS⁺.

Figura 17. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC 154
con derivatizador, de extractos sólido-líquido de mora de Castilla
cosechada en la finca Rosas Rojas.

Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC 157
con derivatizador, de extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón
cosechado en la finca El Prado.

Figura 19. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC 160
con derivatizador, de extractos de mora de Castilla cosechada en la finca
Rosas Rojas, después de su extracción en fase sólida.

Figura 20. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC 162
con derivatizador, de extractos de cáscara de plátano Hartón cosechado
en la finca El Prado, después de su extracción en fase sólida.

Figura 21. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD 165
a $\lambda=515$ nm, de extractos de mora de Castilla: A. antes y B. después
de su hidrólisis ácida.

Figura 22. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD 167
a $\lambda=270$ nm, de extractos de mora de Castilla: A. antes y B. después
de su hidrólisis ácida.

Figura 23. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos hidrolizados de mora de Castilla.	168
Figura 24. Estructuras de las leucoantocianidinas, posibles precursoras de las antocianidinas encontradas en los extractos hidrolizados de cáscara de plátano.	170
Figura 25. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=515$ nm, de extractos de cáscara de plátano Hartón: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida.	170
Figura 26. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=270$ nm, de extractos de cáscara de plátano Hartón: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida.	171
Figura 27. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón.	172
Figura 28. Representación del proceso ESI.	179
Figura 29. Fuente de ionización por <i>electrospray</i> e interfaz al espectrómetro de masas.	181
Figura 30. Representación de un analizador de tiempo de vuelo que implica el uso de un reflectrón.	183
Figura 31. Número de publicaciones sobre el uso de HPLC-ESI-MS en extractos de mora, en función del tiempo.	184

Figura 32. Equipo LC-ESI-TOF-MS utilizado.	187
Figura 33. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion M^+ ($C_{21}H_{21}O_{11}$, m/z 449,1084) de la cianidina-3-glucósido, obtenidas por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.	189
Figura 34. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion M^+ ($C_{15}H_{11}O_6$, m/z 287,0556) de la cianidina, obtenidas por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.	189
Figura 35. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion MH^+ ($C_8H_{12}NO_2$, m/z 154,0863) de la dopamina, obtenidas por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.	190
Figura 36. Corrientes iónicas extraídas, por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, de moléculas cargadas o protonadas presentes en extractos de mora de Castilla.	191
Figura 37. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla.	192
Figura 38. Corrientes iónicas extraídas, por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, de moléculas protonadas presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón.	196
Figura 39. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón.	197

LISTA DE ESQUEMAS

	pág.
Esquema 1. Reacción entre compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.	40
Esquema 2. Estructuras moleculares de las antocianidinas bajo diferentes condiciones de pH.	42
Esquema 3. Reducción del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por sustancias antioxidantes.	45
Esquema 4. Reacción de radicales peroxilo con sustancias antioxidantes.	45
Esquema 5. Posibles reacciones en el proceso de autooxidación lipídica.	92
Esquema 6. Posibles reacciones para la descomposición de hidroperóxidos.	93
Esquema 7. Autooxidación del ácido linoleico.	95
Esquema 8. Generación del hexanal durante la escisión β del 13-hidroperóxido del ácido linoleico.	96
Esquema 9. Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios.	98

Esquema 10. Estructuras de antocianinas y antocianidinas encontradas en los extractos de mora de Castilla antes y después de su hidrólisis ácida, respectivamente. 166

Esquema 11. Estructura del ácido elágico, obtenido por hidrólisis ácida de un elagitanino. 167

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-ECD, en los cuales se observa la generación del derivado hidrazónico del hexanal en emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación UVA-Vis.	225
Anexo B. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de mora de Castilla cosechada en la finca La Estancia.	226
Anexo C. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca Guatiguará.	227
Anexo D. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de mora de Castilla cosechada en la finca La Estancia, después de su extracción en fase sólida.	228
Anexo E. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca Guatiguará, después de su extracción en fase sólida.	229
Anexo F. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, del blanco del procedimiento de extracción en fase sólida.	230

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAPH	<i>2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i> (Hidrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano))
ABC	Área bajo la curva
ABTS	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ABTS ^{•+}	Catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza)
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionización química a presión atmosférica)
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (Ionización a presión atmosférica)
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i> (Fotoionización a presión atmosférica)
A _R	Área relativa
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (Mezcla de 2- <i>terc</i> -butil-4-hidroxianisol y 3- <i>terc</i> -butil-4-hidroxianisol)
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
CA	California
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
COL	Colombiano
CROM-MASS	Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas
CV	Coeficiente de variación
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)

d_f	Espesor de la fase estacionaria (μm)
D.I.	Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm)
DPPH [•]	<i>2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical</i> (Radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo)
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
EE.UU.	Estados Unidos
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electronic Ionization</i> (Ionización electrónica)
EIC	<i>Extracted Ion Current</i> (Corriente iónica extraída)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización para la Alimentación y la Agricultura)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-ECD	Cromatografía de gases con detector de captura de electrones
GC-FID	Cromatografía líquida con detector de ionización en llama
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Prácticas de Laboratorio)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRS	<i>High Resolution Screening</i> (Tamizaje de alta resolución)
HSCCC	<i>High Speed Counter Current Chromatography</i> (Cromatografía en contra corriente de alta velocidad)
HSD	<i>Honestly Significant Difference</i> (Diferencia honestamente significativa)
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> (Es decir)
<i>Inc.</i>	<i>Incorporated</i> (Sociedad Anónima)
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
L	Longitud de la columna cromatográfica (m o cm)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación)
MA	Massachusetts
MO	<i>Missouri</i> (Misuri)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MWD	<i>Multiple Wavelength Detector</i> (Detector de longitud de onda múltiple)
<i>m/z</i>	Relación masa:carga
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Buffer fosfato salino)
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detector de arreglo de fotodiodos)
PDMS/DVB	<i>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene</i> [Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno]
PFPH	<i>Pentafluorophenylhydrazine</i> (Pentaflúorfenilhidracina)
PG	<i>Propyl Gallate</i> (Galato de propilo)
psi	<i>Pounds-force per square inch</i> (Libra-fuerza por pulgada cuadrada)
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> (Fluoruro de polivinilideno)
R	Coeficiente de correlación
R ²	Coeficiente de determinación
R•	Radical alquílico

RMSE	<i>Root Mean Square Error</i> (Raíz cuadrada del error cuadrático medio)
RO•	Radical alcoxilo
ROO•	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecilsulfato de sodio)
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
St.	<i>Saint</i> (San)
TBHQ	<i>tert-Butylhydroquinone</i> (terc-Butilhidroquinona)
TEAC	<i>Trolox[®] Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox [®])
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente Iónica Total)
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
t_R	Tiempo de retención
t_{RR}	Tiempo de retención relativo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A, 320-380 nm
UV-Vis	Ultravioleta-visible

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN PARA SU USO COMO ANTIOXIDANTES NATURALES EN EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA^{*}

AUTORA: Jennifer Pilar Rojas Llanes^{**}

PALABRAS CLAVE: Mora, cáscara de plátano, antioxidantes, ORAC, ABTS⁺, oxidación lipídica, HPLC-ABTS⁺, LC-MS.

DESCRIPCIÓN:

Se determinó la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón por distintos métodos, a saber: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ e inhibición de la oxidación lipídica de emulsiones de aceite en agua y, en cada caso, se comparó con la del BHT y la del α -tocoferol, antioxidantes comerciales utilizados en las industrias de alimentos y cosméticos. Se desarrolló un método por HPLC-DAD acoplado con el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, para identificar los compuestos que le confirieron capacidad antioxidante a los extractos. Se analizaron los extractos por LC-MS.

Los extractos obtenidos a partir de material vegetal fresco presentaron valores de contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante, más altos que los extractos conseguidos con material vegetal liofilizado. Los extractos de mora y de cáscara de plátano protegieron las emulsiones de aceite en agua, contra la oxidación lipídica inducida por radiación UV-Vis, en porcentajes más altos (55% y 36,8%, respectivamente) que el BHT y el α -tocoferol (25,6% y 23,2%, respectivamente).

Mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ acoplado a HPLC-DAD, en los extractos de mora, se identificaron la cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido. En los extractos hidrolizados de mora, se determinaron la cianidina, pelargonidina y el ácido elágico, este último fue uno de los compuestos que presentó la contribución más alta a la capacidad antioxidante de estos extractos. La dopamina fue el compuesto que aportó en mayor medida a la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de plátano, después de la hidrólisis de estos extractos, se identificaron la quercetina y el kaempferol. Mediante LC-MS, en los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, se confirmó la identificación de los compuestos determinados por HPLC-DAD y se identificaron otros analitos.

^{*}Tesis Doctoral.

^{**}Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química. Directores: Profesora Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D.* Profesor Jairo René Martínez Morales, Químico, *Ph.D.*

ABSTRACT

TITLE: Study of Andean blackberry and plantain peel extracts for their use as natural antioxidants in oil in water emulsions^{*}

AUTHOR: Jennifer Pilar Rojas Llanes^{**}

KEYWORDS: Blackberry, plantain peel, antioxidants, ORAC, ABTS⁺, lipidic oxidation, HPLC-ABTS⁺, LC-MS.

DESCRIPTION:

Antioxidant capacity of Andean blackberry and plantain peel extracts was determined by various methods, namely: oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ABTS⁺ radical cation decoloration assay and lipidic oxidation inhibition in oil in water emulsions, and, in each case, it was compared with that of BHT and α -tocopherol, commercial antioxidants used in food and cosmetic industries. A method by HPLC-DAD coupled with ABTS⁺ radical cation decoloration assay was development to identify compounds which conferred antioxidant capacity to the extracts. The extracts were analyzed by LC-MS.

The extracts obtained from fresh plant material showed the content phenolic compounds, monomeric anthocyanins, and antioxidant capacity values higher than those obtained from lyophilized plant material. Blackberry and plantain peel extracts protected oil in water emulsions, against lipidic oxidation induced by UV-Vis radiation, in higher percentages (55% and 36.8%, respectively) than BHT and α -tocopherol (25.6% and 23.2%, respectively).

By ABTS⁺ radical cation decoloration assay coupled to HPLC-DAD, in blackberry extracts, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-glucoside were identified. In hydrolysed extracts of blackberry, cyanidin, pelargonidin and ellagic acid were determined; the latter was one of the compounds that afforded the highest contribution to the antioxidant capacity of these extracts. Dopamine was the compound that contributed in the greatest measure to the antioxidant capacity of plantain peel extracts, after hydrolysis of these extracts, quercetin and kaempferol were identified. By LC-MS, in Andean blackberry and plantain peel extracts, the identification of compounds determined by HPLC-DAD was confirmed and other analytes were identified.

^{*} Doctoral Thesis.

^{**} Sciences Faculty. Chemistry School. Doctorate in Chemistry. Directors: Professor Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D. Professor Jairo René Martínez Morales, Chemist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de antioxidantes naturales, para su uso en las industrias de alimentos y cosméticos, ha incrementado debido a que la seguridad de los antioxidantes sintéticos, tales como el 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) y el 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), ha sido cuestionada por sus posibles efectos negativos sobre la salud de los consumidores (Zeliger, 2007; Brewer, 2011; Fan y Eskin, 2015).

En esta búsqueda, se ha encontrado que la capacidad antioxidante de los extractos de mora de Castilla es mayor que la de otras frutas tales como el mango, maracuyá, lulo, granadilla, fresa, zapote, chirimoya, ciruela y guayaba (Vasco y col., 2008). También, se ha determinado que la capacidad antioxidante de la dopamina, componente de la cáscara y la pulpa de banano, es mayor que la del BHT (Kanazawa y Sakakibara, 2000), antioxidante comercial ampliamente utilizado. Se ha encontrado, que los extractos de cáscara de banano poseen capacidad antioxidante más alta que los extractos de la pulpa (Someya y col., 2002) y, que los extractos de cáscara de plátano son mejores antioxidantes que los de cáscara de banano (Olalekan y Ayodeji, 2010).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta la disponibilidad de mora y de plátano en el territorio colombiano, en esta investigación, se evaluó la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón por tres métodos, a saber: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés); decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y capacidad para inhibir la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación ultravioleta-visible. En cada ensayo, los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos se compararon con la del BHT. Además, se determinó el contenido de compuestos fenólicos y de antocianinas monoméricas en los extractos de mora

y de cáscara de plátano y, se desarrolló un método para la determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Finalmente, los extractos de mora y de cáscara de plátano se caracterización por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

El presente documento se divide en cinco capítulos. El **Capítulo 1**, contiene la determinación de las condiciones de extracción con disolventes con las que se obtuvieron los resultados de capacidad antioxidante (ORAC y ABTS^{•+}) más altos, en extractos de mora de Castilla liofilizada, mediante la realización de tres diseños de experimentos, con soluciones de acetona, etanol y metanol, en diferentes concentraciones en agua y con distintos tiempos de extracción asistida con ultrasonido. Este capítulo también incluye la evaluación del efecto de las variables de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y de antocianinas monoméricas totales, en los extractos de mora, y la correlación de estos resultados con los de capacidad antioxidante (ORAC y ABTS^{•+}).

En el **Capítulo 2**, se encuentra la determinación del contenido total de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante (ORAC y ABTS^{•+}) de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón. Se analizaron dos muestras de cada material vegetal, procedentes de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander. Cada muestra se analizó en estado fresco y liofilizado. Los extractos se obtuvieron con las soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol y durante el tiempo de extracción con los que se lograron los resultados de capacidad antioxidante más altos en el **Capítulo 1**. Los extractos de mora y de cáscara de plátano, que presentaron los valores de capacidad antioxidante más altos, se sometieron a extracción en fase sólida, para su limpieza y concentración, y se les hicieron, nuevamente, las determinaciones del contenido

total de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante (ORAC y ABTS^{••}).

En el **Capítulo 3**, se describe la evaluación de la capacidad de los extractos de mora de Castilla, y de cáscara de plátano Hartón, para inhibir el deterioro oxidativo de emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación ultravioleta-visible. Se utilizaron los extractos con los que se alcanzaron los resultados más altos en el **Capítulo 2**.

En el **Capítulo 4**, se presenta el desarrollo de un método para la determinación de la capacidad antioxidante, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{••} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y se analizan los extractos de mora y de cáscara de plátano, antes y después de su extracción en fase sólida y después de su hidrólisis ácida.

En el **Capítulo 5**, se encuentra el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, de los extractos de mora y de cáscara de plátano, para confirmar la identificación de analitos realizada por HPLC en el **Capítulo 4** y, para determinar otros compuestos en los extractos.

Se espera que los resultados obtenidos sean de interés para especialistas en las áreas de fitoquímica, química de alimentos, química analítica, y para todas las personas implicadas en el estudio de la capacidad antioxidante de sustancias de origen natural o sintético.

1. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO TOTAL DE COMPUESTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA

La mora (familia *Rosaceae*, género *Rubus*) es una fruta distribuida a nivel mundial. Se cosechan tanto especies nativas como cultivares mejorados (Finn y Clark, 2001). La mora andina, o mora de Castilla (*R. glaucus* Benth), es originaria de las zonas tropicales de América, principalmente, Colombia y Ecuador (Arozarena y col., 2012), y se distingue por su color rojo oscuro y sabor (Acosta-Montoya y col., 2010; Schreckinger y col., 2010).

Se ha determinado la capacidad antioxidante de la mora de Castilla (Vasco y col., 2008; Garzón y col., 2009) y se ha encontrado que es mayor que la de otras frutas tales como el mango, maracuyá, lulo, granadilla, fresa, zapote, chirimoya, ciruela y guayaba (Vasco y col., 2008). Esto se atribuye a su contenido de compuestos fenólicos (Vasco y col., 2008; Garzón y col., 2009).

El método más común para aislar sustancias fenólicas es la extracción con disolventes, que puede facilitarse con ultrasonido para aumentar el contenido de analitos extraídos. Varios factores tales como el tipo y la concentración de disolvente, y el tiempo de extracción, contribuyen a la eficiencia de la técnica y, de esta manera, a la bioactividad de los extractos (Aybastier y col., 2013).

En este capítulo, se determinaron las condiciones de tipo y concentración de disolvente en agua, y de tiempo de extracción asistida con ultrasonido, con las que se obtuvieron los valores de capacidad antioxidante más altos en extractos de mora de Castilla. También, se correlacionaron los resultados de capacidad antioxidante con los de contenido total de compuestos fenólicos y de antocianinas monoméricas y, se compararon los valores de capacidad antioxidante de los

extractos de mora con los de antioxidantes de referencia, el 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) y el α -tocoferol.

Se hicieron tres diseños de experimentos de dos factores con tres niveles cada uno. Las variables fueron la concentración de acetona, etanol o metanol en agua y el tiempo de extracción asistida con ultrasonido. Los observables-respuesta fueron el contenido total de compuestos fenólicos, el contenido total de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante, determinada mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y el método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés). Se calculó el coeficiente de correlación entre los observables-respuesta y, se compararon los valores de capacidad antioxidante de los extractos de mora con los del BHT y del α -tocoferol.

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se definen como sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo como sustituyente(s). Sin embargo, esta definición incluye compuestos como la estrona, una hormona sexual femenina, que pertenece a la familia de los terpenoides. Por esta razón, se prefiere una definición con base en el origen metabólico, de manera que los compuestos fenólicos se consideran sustancias derivadas de las rutas del shikimato y de los fenilpropanoides (Robards y col., 1999; Ndhlala y col., 2012). Estos compuestos, distribuidos ampliamente en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras conocidas (Stalikas, 2007), comprenden desde moléculas sencillas, tales como el catecol, hasta sustancias altamente polimerizadas como los taninos y ligninas (**Tabla 1**) (Robards y col., 1999; Stalikas, 2007; Dai y Mumper, 2010).

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos y ejemplos característicos en diversas fuentes*.

Esqueleto	Clasificación	Fuentes	Ejemplos
C ₆	Fenoles simples	Manzana, uva, plátano	Catecol, hidroquinona, resorcinol, dopamina
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	Manzana, durazno	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gálico
C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos	Arándano, pera	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
C ₆ -C ₃	Ácidos cinámicos	Mango, ciruela, uva	Ácido cafeico y ácido ferúlico
	Cumarinas	Zanahoria, cilantro	Umbeliferona
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Nuez	Juglona
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Mangostán	Mangiferina
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Uva	Resveratrol
	Antraquinonas	Ruibarbo	Emodina
C ₆ -C ₃ -C ₆ Flavonoides	Flavonas	Naranja, mandarina. Limón, perejil	Sinensetina, nobiletina, tangeretina. Diosmina, luteolina
	Flavonoles	Manzana, pera	Quercetina, kaempferol
	Flavanonoles	Uva	Glicósidos de dihidroquercetina y dihidrokaempferol
	Flavanonas	Cítricos, tomate, fresa	Hesperitina, naringenina, hesperidina, narirutina, naringina

Tabla 1. (Continuación)

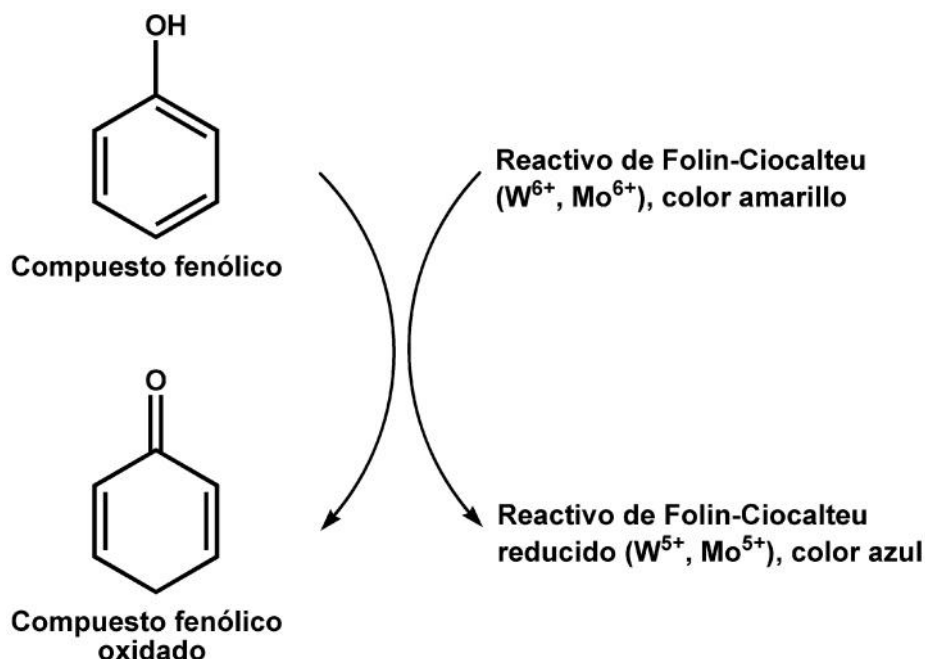
Esqueleto	Clasificación	Fuentes	Ejemplos
C ₆ -C ₃ -C ₆ Flavonoides	Antocianinas	Mora, pera, manzana, cereza	Glicósidos de cianidina
		Naranja dulce	Glicósidos de pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina
		Uva	Glicósidos de cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina, malvidina, incluyendo formas aciladas
		Ciruela	Glicósidos de cianidina, peonidina
	Flavanoles	Manzana, melocotón	Catequina, epicatequina
		Uva	Catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina
	Chalconas	Manzana	Derivados de floretina, especialmente floridzina
		Tomate	Chalconaringenina
	Lignanós	Semilla de sésamo	Pinoresinol
	Ligninas	Bagazo de caña	Lignina
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Madroño	Amentoflavona
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos	Mora	Elagitaninos

*Tomada de: Robards y col., 1999, con algunas modificaciones.

La extracción con disolventes es el método más utilizado para obtener compuestos fenólicos a partir de diferentes matrices. Los medios extractantes más usados son soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol (Kähkönen y col., 2001). Los disolventes orgánicos pueden removerse del extracto por rotoevaporación y el agua por liofilización. Varios factores contribuyen a la eficiencia de la técnica y, de esta manera, a la bioactividad de los extractos (Aybastier y col., 2013).

Uno de los inconvenientes de la extracción con disolventes es el tiempo requerido (Aybastier y col., 2013), motivo por el cual la extracción puede facilitarse por ultrasonido (Khan y col., 2010), radiación microondas (Moreira y col., 2012) y métodos enzimáticos (Li y col., 2006). El ultrasonido, es una tecnología económica y sencilla que aumenta el contenido de compuestos fenólicos extraídos, con temperaturas más bajas y tiempos más cortos que los requeridos en la extracción convencional con disolventes (Salisová y col., 1997; Romdhane y Gourdon, 2002; Li y col., 2005; Xia y col., 2006; Ma y col., 2009; Paniwnyk y col., 2009; Khan y col., 2010; Bhat y col., 2011). Las microcorrientes fluídicas que genera resultan en una mayor penetración del solvente en el material vegetal (Toma y col., 2001).

El contenido total de compuestos fenólicos se determina mediante el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (1927), en el cual se utiliza como reactivo una mezcla amarilla de ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico, que en medio básico se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, lo que produce óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) (**Esquema 1**). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 750 nm y la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico/g de muestra, previa realización de una curva de calibración con ácido gálico.



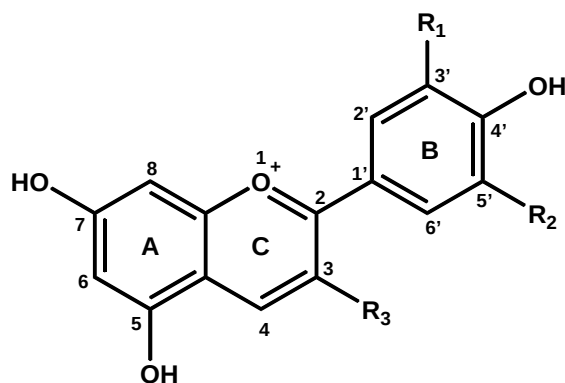
Esquema 1. Reacción entre compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos están implicados en sistemas de defensa contra la radiación ultravioleta (Shahidi y Naczk, 2004) o agresión por patógenos, parásitos y predadores (Beckman, 2000). Ellos están presentes en ciertos órganos de algunas plantas y son constituyentes de varios alimentos (frutas, verduras, cereales, legumbres, chocolate, etc.) y bebidas vegetales (té, café, cerveza, vino, etc.), además, son parcialmente responsables de las propiedades organolépticas de las plantas. Por ejemplo, las antocianinas confieren los colores naranja, rojo, azul y púrpura a frutas y verduras tales como manzanas, uvas, remolachas, cebollas y moras (Shahidi y Naczk, 2004; Dai y Mumper, 2010).

La palabra antocianina proviene de los términos griegos *anthos*: flor y *kyanos*: azul oscuro. Su estructura se basa en un esqueleto de 15 átomos de carbono que consiste de un anillo cromano que se enlaza con un segundo anillo aromático en la posición 2 (**Figura 1**). Se han identificado, aproximadamente, 400 antocianinas (Mazza, 2007). Las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, sus

estructuras contienen una o más moléculas de azúcar enlazadas a diferentes posiciones hidroxiladas de las antocianidinas, que en este caso son las agliconas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

Las seis antocianidinas más abundantes en las plantas se clasifican de acuerdo con el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo sobre el núcleo flavano y se conocen como pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (**Figura 1**) (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002; Mazza, 2007).

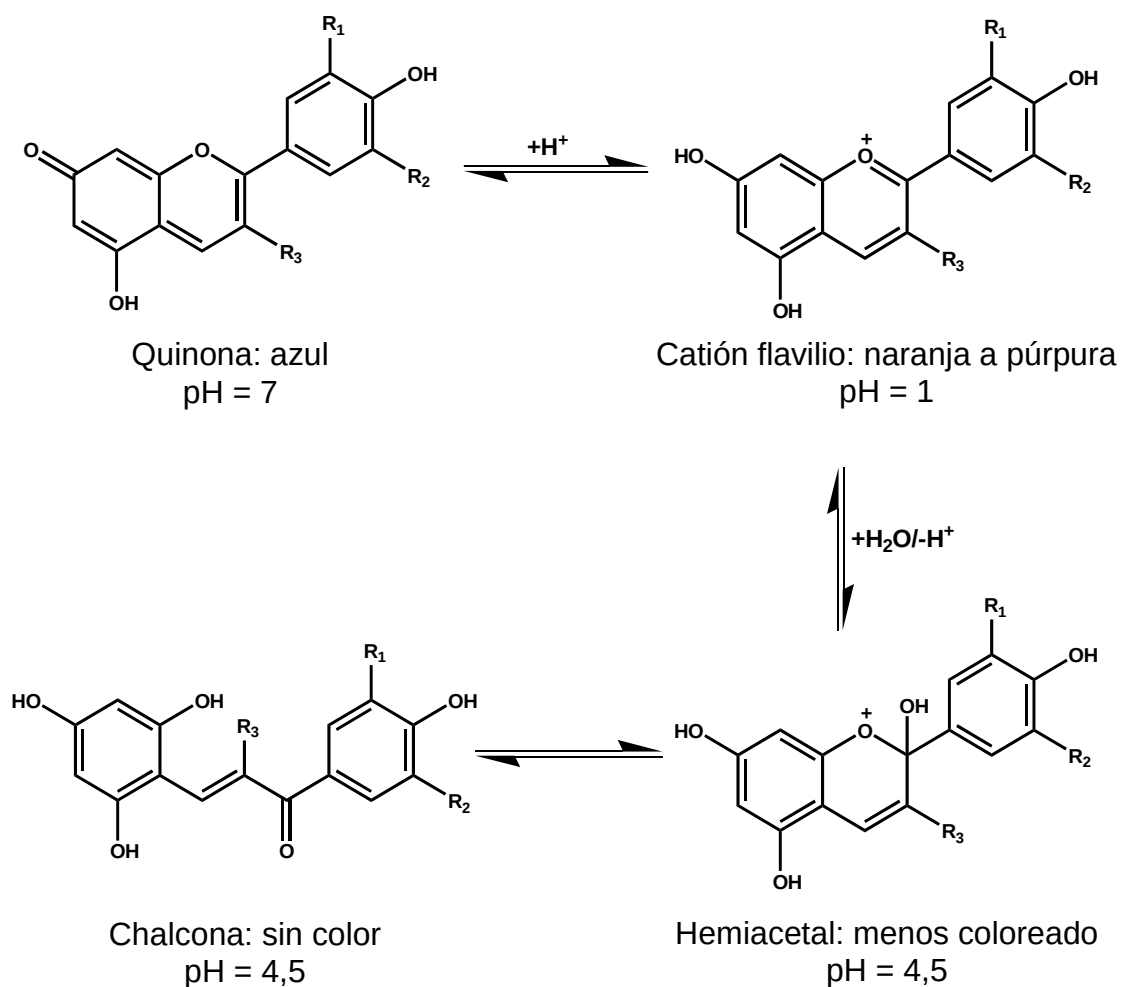


Patrón de sustitución			
	R ₁	R ₂	R ₃
Delfinidina	OH	OH	OH
Cianidina	OH	H	OH
Petunidina	OCH ₃	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	OH
Pelargonidina	H	H	OH

Figura 1. Clasificación estructural de las antocianidinas más comunes en la naturaleza. Fuente: Mazza, 2007.

El contenido total de antocianinas monoméricas, se determina mediante el método diferencial de pH. Este ensayo se basa en las transformaciones estructurales reversibles que presentan las antocianinas con cambios del pH, manifestadas por

diferencias en sus espectros de absorbancia. El catión oxonio coloreado predomina a pH 1,0 y el hemiacetal, menos coloreado, se forma a pH 4,5 (**Esquema 2**). Este método permite medir, de manera rápida, las antocianinas monoméricas totales, incluso, en la presencia de pigmentos polimerizados degradados y de otros compuestos interferentes (Giusti y Wroslad, 2001).



Esquema 2. Estructuras moleculares de las antocianidinas bajo diferentes condiciones de pH. Fuente: Coultate, 1984.

Las antocianinas, así como otros compuestos fenólicos, llaman la atención, cada vez más, debido a sus propiedades antioxidantes y a sus efectos en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Dai y Mumper, 2010).

1.1.2 Antioxidantes

Un antioxidante se define, de forma general, como “cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, inhibe o previene la oxidación de este sustrato” (Halliwell, 1990). El término “sustrato oxidable” incluye moléculas de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Halliwell, 1990). De igual modo, desde el punto de vista biológico, un antioxidante se define como “aquel compuesto que protege a los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” (Krinsky, 1992).

Según su origen, los antioxidantes se clasifican en naturales y sintéticos. El término “natural”, generalmente, se refiere a sustancias que pueden ser extraídas de plantas o tejidos animales. La mayoría de los antioxidantes naturales son derivados fenólicos, tales como cumarinas, flavonoides y ácidos fenólicos. Sin embargo, a los carotenoides y terpenoides también se les ha determinado capacidad antioxidante (Valenzuela y Nieto, 1996). Los antioxidantes sintéticos se utilizan ampliamente en productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios. El galato de propilo, la mezcla de 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol y 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), el 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) y la *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) son los más usados (**Figura 2**) (Valenzuela y Nieto, 1996).

1.1.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determina mediante diversos métodos, los resultados pueden variar considerablemente en función del procedimiento

empleado y de las condiciones en las que se lleva a cabo el ensayo, de manera que se recomienda evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia, empleando diferentes metodologías (Zulueta y col., 2009).

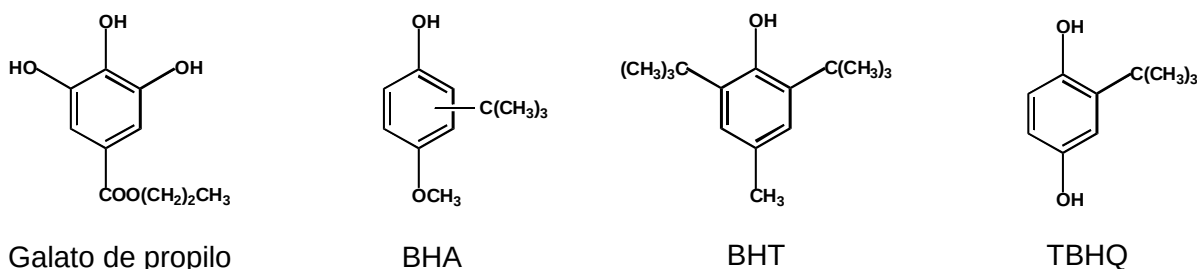


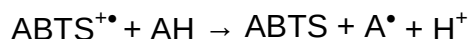
Figura 2. Estructuras de los antioxidantes sintéticos más usados.

Los procedimientos para medir la capacidad antioxidante, *in vitro*, se clasifican, de acuerdo con las reacciones química implicadas, en dos grupos generales: (1) métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno, tales como el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), en los que, en la mayoría de los casos, el antioxidante y un sustrato compiten por radicales peroxilo, y (2) métodos basados en la transferencia de electrones, tales como el ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, en los que se mide la capacidad de una sustancia para atrapar un radical, que cambia de color cuando se reduce (Huang y col., 2005).

1.1.3.1 Ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

Este ensayo se basa en la disminución de la absorbancia de la disolución azul-verdosa del catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico ($\text{ABTS}^{+\bullet}$), determinada espectrofotométricamente a $\lambda=734$ nm, debido a la reducción del catión-radical por los compuestos, donadores de electrones, presentes en las muestras analizadas (**Esquema 3**). Según la metodología desarrollada por Re y col. (1999), el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, se obtiene mediante la

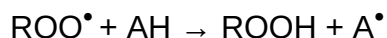
reacción del ABTS con persulfato de potasio. Los resultados de este ensayo se expresan en unidades TEAC, capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E.



Esquema 3. Reducción del catión-radical ABTS⁺ por sustancias antioxidantes (AH).

1.1.3.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

El método ORAC, de acuerdo con la metodología desarrollada por Ou y col. (2001), se basa en la medición de la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína, después de reaccionar con los radicales generados por el clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano) (AAPH). Los antioxidantes protegen las moléculas de fluoresceína, debido a que son ellos los que les transfieren átomos de hidrógeno a los radicales peroxilo presentes en el medio (**Esquema 4**). Cuanta más capacidad antioxidante tiene una sustancia, más se conserva la emisión de luz de la fluoresceína. La capacidad antioxidante se mide a partir de la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de fluorescencia de cada muestra y el ABC del blanco. El área neta obtenida se utiliza para calcular los $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de muestra, previa realización de una curva de calibración con Trolox[®].



Esquema 4. Reacción de radicales peroxilo (ROO[•]) con sustancias antioxidantes (AH).

El Trolox[®] se usa para expresar los resultados tanto en el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ como en el procedimiento ORAC, debido a que puede

experimental reacciones de transferencia de electrones y de transferencia de hidrógeno (Davies y col., 1988).

1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.2.1 Material vegetal

La mora de Castilla (2,5 kg), adquirida en la Central de Abastos de Bucaramanga-Colombia, se licuó, se secó en un liofilizador de bandejas *VirTis AdVantage Plus*, suministrado por *SP Scientific* (Gardiner, New York, EE.UU.) y se almacenó a temperatura ambiente (24°C), bajo ausencia de luz, hasta su extracción con disolventes. El índice de madurez de la mora utilizada, determinado según la Norma Técnica Colombiana 4106 (1997), fue 2,2; valor que representa un grado de maduración 4, en una escala de 0-6.

1.2.2 Reactivos

Se utilizaron acetona (99,9%), etanol (99,9%), metanol (99,9%), ácido clorhídrico (37%), ácido acético (99,9%), acetato de sodio (99%), cloruro de potasio (99,5%), hidróxido de sodio (99%), bifosfato de potasio (99%), persulfato de potasio (97%), y reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). La fluoresceína [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)] (99%), el clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano) (AAPH, 97%), el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, 98%), el Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97%), el ácido gálico (99%), el BHT (99%) y el α -tocoferol (96%), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (*St. Louis*, MO, EE.UU.). Se usó agua Tipo I producida por un equipo purificador *Synergy UV*, proveído por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

1.2.3 Diseños de experimentos

1.2.3.1 Selección de factores y niveles

Se evaluaron los efectos de agua, acetona, etanol y metanol, y de soluciones acuosas de estos disolventes orgánicos (25, 50 y 75%, v/v), sobre el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla. Para esto, se pesó mora liofilizada (0,5 g), se adicionó el disolvente a evaluar (10 mL), y se dispuso la suspensión en un baño de ultrasonido *Elmasonic* S15H, proporcionado por Elma (Singen, Alemania), de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia ultrasónica efectiva, durante 2 min. Se separó el residuo por filtración (papel filtro *Whatman* No. 1) y se extrajo dos veces más (en total 30 mL de disolvente y 6 min de extracción). Se utilizaron los disolventes con los cuales se lograron los mejores resultados en el análisis anterior, para obtener extractos a 3, 30, 60, 90, 120 y 150 min, con y sin ultrasonido. Los extractos se almacenaron, a 4°C, bajo ausencia de luz, hasta la determinación del contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante.

1.2.3.2 Análisis estadístico de datos

Todos los experimentos se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como el valor medio $\pm$ la desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de los resultados y se determinaron sus diferencias honestamente significativas (HSD, por sus siglas en inglés), mediante la prueba de Tukey, a un nivel de confianza del 95%.

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se escogieron los factores y niveles para la realización de los diseños de experimentos. Las variables de respuesta fueron el contenido total de compuestos fenólicos, el contenido total de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante,

determinada mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y el método ORAC. Se realizó el ANOVA de los resultados obtenidos con los diseños experimentales y, mediante regresión lineal múltiple, se formularon modelos polinómicos para predecir las variables de respuesta. Se compararon los errores de predicción obtenidos con seis polinomios de primer y segundo orden y se escogió el polinomio que proporcionó el mejor ajuste, de acuerdo con la determinación de la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) y del coeficiente de determinación (R^2). Se realizó validación cruzada mediante la aleatorización reiterativa de la distribución de los datos entre los conjuntos de calibración y de validación, para determinar los coeficientes de las ecuaciones de los modelos. Se elaboraron gráficas de contorno con los modelos obtenidos, mediante el uso del *software STATISTICA, Release 8*.

1.2.3.3 Confirmación de los puntos predichos como óptimos

Se hicieron extracciones, por triplicado, bajo las condiciones predichas como óptimas, según las gráficas de contorno de los modelos, y se procedió a determinar cada una de las variables de respuesta.

1.2.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos, utilizando el reactivo de Folin y Ciocalteu, y un método estandarizado en nuestro Centro de Investigación, CENIVAM, con base en el procedimiento publicado por Magalhaes y col. (2006). Se utilizó un lector de placas *Modulus® II*, suministrado por *Turner Biosystems Inc.* (Sunnyvale, California, EE.UU.), que opera en la región visible del espectro electromagnético, equipado con placas de poliestireno de 96 pozos. Se prepararon una solución del reactivo de Folin-Ciocalteu (2N) en agua tipo I, (1:4 v/v), y una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,35M. Los extractos se diluyeron en agua (10x). En cada pozo de la placa, se depositaron muestra diluida (50 μ L), solución

del reactivo de Folin-Ciocalteu (50 µL) y solución de hidróxido de sodio (100 µL). La absorbancia se midió a $\lambda=750$ nm, a 25°C. El equipo leyó la placa de 96 pozos cada 2 min durante 30 min. Se graficó la absorbancia *versus* el tiempo en el que se hizo cada lectura. El valor utilizado, para el análisis de resultados, fue aquel en el que la absorbancia alcanzó su estado estacionario. Para realizar la curva de calibración, se usó ácido gálico como sustancia patrón. La concentración de compuestos fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de mora seca (mg AG/g PS). Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar.

1.2.5 Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

Las antocianinas monoméricas totales se determinaron mediante el método diferencial de pH (Giusti y Wroslad, 2001). Se utilizaron dos soluciones: ácido clorhídrico/ cloruro de potasio a pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/ acetato de sodio a pH 4,5 (0,4 M). Se tomó extracto (0,4 mL, para conseguir una absorbancia en el rango de 0,100-1,000 a $\lambda=515$ nm), se añadió solución de cada valor de pH (3,6 mL), por separado, y se midió la absorbancia, frente a un blanco, a $\lambda=515$ y 700 nm en un espectrofotómetro UV-VIS *Lambda Bio 10* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). La absorbancia final se calculó mediante la **Ecuación 1.1**.

$$A = (A_{515 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{515 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad \text{(Ecuación 1.1)}$$

La concentración de antocianinas en los extractos se determinó utilizando la **Ecuación 1.2**.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{(\epsilon \times l)} \quad \text{(Ecuación 1.2)}$$

Donde:

A = Absorbancia;
PM = Peso molecular (449,2 g/mol);
FD = Factor de dilución;
 ϵ = Absortividad molar (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹);
l = Longitud atravesada por la luz en el medio (1 cm).

El PM y la ϵ en la **Ecuación 1.2** corresponden a los de la cianidina-3-glucósido. Los resultados se expresaron como mg de cianidina-3-glucósido/g de mora seca (mg cianidina-3-glucósido/g PS).

1.2.6 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

La capacidad antioxidante de los extractos mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Re y col. (1999), con algunas modificaciones. Se utilizó el lector de placas *Modulus*[®] II. Para la obtención del catión-radical, se preparó una solución de ABTS (7 mM) en *buffer* acetato (20 mM, pH 4,5) y se agregó persulfato de potasio (2,45 mM). La mezcla se dispuso en el baño de ultrasonido durante 30 min y se almacenó en la oscuridad a 4°C durante 24 h, tiempo después del cual se obtuvo el catión-radical ABTS^{•+} estable. Posteriormente, se tomó catión-radical (900 µL), se diluyó en *buffer* acetato hasta obtener una solución de absorbancia 0,71 ($\pm$ 0,02) a λ =750 nm, y se almacenó a 4°C durante 30 min, antes de su uso.

Los extractos se diluyeron (10x), en *buffer* acetato (20 mM, pH 4,5). En cada pozo de la placa se adicionaron la muestra diluida (10 µL) y la solución del catión-radical (200 µL). Las medidas de absorbancia se realizaron durante 60 min, tiempo después del cual se determinó el porcentaje de inhibición, mediante la **Ecuación 1.3**.

$$\% \text{Inhibición} = [(Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{muestra}}) / Abs_{\text{blanco}}] * 100 \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Donde:

Abs_{blanco} = Absorbancia del blanco (mezcla de 200 μL de solución de catión-radical y 10 μL de *buffer* acetato);

Abs_{muestra} = Absorbancia de la muestra.

Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de mora seca ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g PS}$), previa realización de una curva de calibración con Trolox[®]. Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar.

Para la determinación de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS⁺⁺, presentada por el BHT y el α -tocoferol, se pesó cada sustancia (1 mg), se disolvió en etanol (1 mL), se hicieron diluciones en *buffer* acetato y se llevó a cabo el mismo procedimiento empleado con los extractos.

1.2.7 Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno

Se determinó la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), utilizando el método de Ou y col. (2001), con algunas modificaciones. Los extractos se diluyeron (50x) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4), en cada pozo de la placa se depositaron extracto diluido (25 μL) y solución de fluoresceína (150 μL , $8,16 \times 10^{-5}$ mM, en *buffer* fosfato), se incubaron a 37°C, durante 20 min, y se agregó la solución de AAPH (25 μL , 153 mM, en *buffer* fosfato). La fluorescencia se midió con longitudes de onda de excitación de $\lambda=490$ nm y de emisión de $\lambda=510$ nm, durante 90 min, a 37°C. Para realizar los blancos, la muestra (25 μL) se reemplazó por *buffer* fosfato. La capacidad antioxidante se determinó a partir de la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de fluorescencia, de cada muestra, y

el ABC del blanco. Para calcular los $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de mora seca ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g PS}$), previa realización de una curva de calibración con Trolox[®], se utilizó el área neta obtenida. Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar.

Para la determinación de la capacidad antioxidante, mediante el ensayo ORAC, del BHT y del α -tocoferol, se pesó cada una de las sustancias (1 mg), se disolvió en metanol (1 mL), se hicieron diluciones en *buffer* fosfato y se continuó con la metodología utilizada para los extractos.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Selección de factores y niveles para los diseños de experimentos

La **Figura 3** ilustra los resultados de contenido de compuestos fenólicos y capacidad de absorción de radicales oxígeno de extractos de mora de Castilla obtenidos en la primera serie de experimentos, en los que se varió el disolvente y se utilizó el mismo tiempo de extracción (6 min). Los extractos adquiridos con soluciones acuosas de acetona al 25% (v/v) presentaron el contenido de compuestos fenólicos y el valor de capacidad antioxidante más altos. Entre las soluciones acuosas de etanol y metanol no se observaron diferencias significativas y, con estos disolventes, los mejores resultados se lograron con soluciones al 50%. Los resultados más bajos se obtuvieron, cuando se utilizaron los disolventes al 100%.

En la **Figura 3**, se observa que con los disolventes puros, el contenido de compuestos fenólicos más bajo se obtuvo con la acetona. Esto puede deberse a que las sustancias fenólicas presentes en la mora de Castilla son, principalmente, elagitaninos y antocianinas (Mertz y col., 2007; Vasco y col., 2008; Garzón y col., 2009; Osorio y col., 2010), compuestos cuyas estructuras los hacen

preferiblemente extraíbles por disolventes polares próticos, mediante la formación de enlaces de hidrógeno (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002; Markom y col., 2007). La eficiencia más alta obtenida cuando la extracción se realizó con metanol (100%), en comparación con la del etanol (100%), puede atribuirse a que el metanol contiene un fragmento alifático más pequeño que el del etanol y, de esta manera, se enlaza con los compuestos fenólicos más fácilmente (Galanakis y col., 2011).

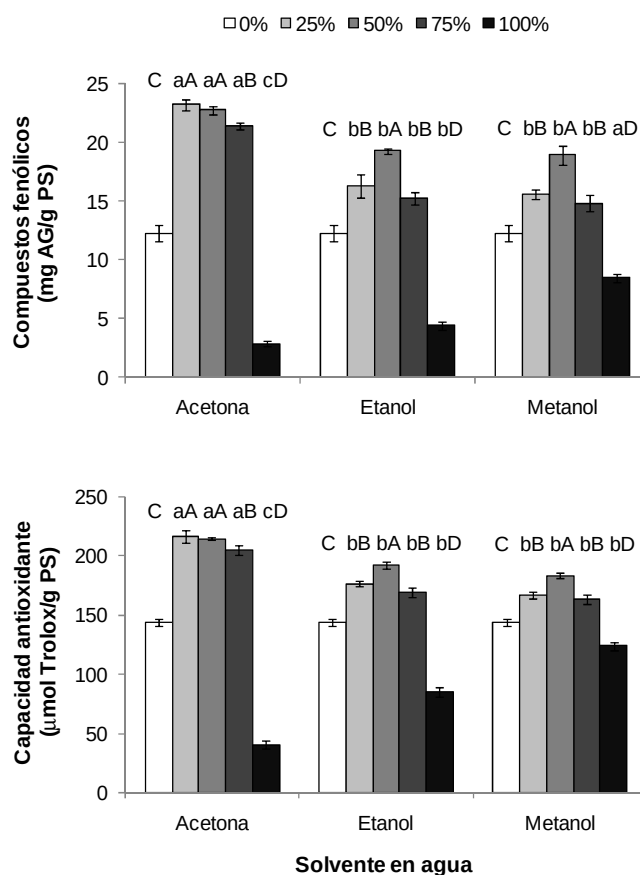


Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla obtenidos con diferentes disolventes, durante 6 min. Cada extracción se hizo por triplicado. Distintas letras, minúsculas o mayúsculas, indican diferencias significativas ($p < 0,050$), según la prueba de Tukey, entre los disolventes de extracción o entre los porcentajes de cada disolvente en agua, respectivamente.

Los extractos obtenidos con mezclas disolvente orgánico-agua mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos que los presentados por los extractos adquiridos con agua o con los disolventes orgánicos al 100%. Esto puede atribuirse a varios factores, el principal de ellos es la estructura molecular de los analitos, que contiene fragmentos polares y no polares, cuya proporción los hace selectivamente extraíbles por determinada mezcla de disolventes (Barwick, 1997). Es por esto que los extractos obtenidos con las soluciones acuosas de metanol, a pesar de ser soluciones extractantes más polares, de acuerdo con el índice de polaridad de Snyder (Markom y col., 2007), que las soluciones acuosas de etanol y acetona, presentaron contenidos de compuestos fenólicos iguales a los logrados con las soluciones acuosas de etanol, e inferiores a los conseguidos con las soluciones acuosas de acetona (**Figura 3**).

Otros factores que pueden contribuir al mayor contenido de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos con las soluciones acuosas de los disolventes orgánicos, son, por un lado, que el agua hincha el material vegetal, y le permite a los disolventes penetrar más fácilmente en la matriz sólida, lo que aumenta la extractabilidad (Genterbach, 2002) y, de otra parte, que los disolventes orgánicos inactivan la polifenoloxidasas, enzima que oxida los compuestos fenólicos (González-Montelongo y col., 2010).

Con base en los resultados obtenidos (**Figura 3**), se utilizaron soluciones acuosas de acetona al 25% (v/v), y de etanol y metanol al 50%, para evaluar el efecto del tiempo de extracción, con y sin ultrasonido, sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla. En todos los ensayos, se obtuvieron mejores resultados cuando las extracciones se hicieron con ultrasonido, debido a que las ondas ultrasónicas pueden producir ruptura celular y reducción del tamaño de partícula, lo que permite mayor área de contacto entre las fases sólida y líquida y, de esta manera, un mejor acceso del disolvente a los compuestos de interés (Huang y col., 2009). El uso de ultrasonido

se ha incrementado porque mediante su empleo se han logrado mejores resultados, en comparación con otras técnicas tales como calentamiento, radiación de microondas, métodos enzimáticos (Huang y col., 2009), extracción Soxhlet, agitación orbital, agitación magnética, o agitación en vórtice (Luthria y col., 2007).

Se ha encontrado que la eficiencia de extracción con ultrasonido, incrementa con el tiempo de procesamiento (Fernandes y Rodrigues, 2012). En la **Figura 4**, se observa que el contenido de compuestos fenólicos aumentó hasta los 90 min de extracción y, a partir de ese momento, no se observaron diferencias significativas.

1.3.2 Diseños de experimentos

Con el propósito de evaluar, simultáneamente, el efecto del porcentaje de disolvente en agua y del tiempo de extracción asistida con ultrasonido, sobre el contenido total de compuestos fenólicos, el contenido total de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante (ORAC y ABTS⁺) de los extractos de mora, se hicieron diseños de experimentos (factoriales, 3^2) con soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol. Los niveles se escogieron de acuerdo con los resultados mostrados en las **Figuras 3 y 4**. En el caso de la acetona, los niveles, -1, 0 y 1, para el porcentaje de disolvente en agua fueron 10, 25 y 40% (v/v). En los casos del etanol y metanol, estos niveles fueron 25, 50 y 75% (v/v). Los niveles para el tiempo de extracción fueron 30, 60 y 90 min, con los tres disolventes.

En las **Tablas 2-4**, se incluyen los modelos polinómicos que presentaron el error de predicción más bajo (menor RMSE, mayor R^2) para las variables de respuesta en extractos de mora de Castilla adquiridos con soluciones acuosas de acetona (**Tabla 2**), etanol (**Tabla 3**) y metanol (**Tabla 4**). En todos los casos, el polinomio de segundo orden respecto a A (porcentaje de solvente en agua) y a B (tiempo de

extracción asistida con ultrasonido) proporcionó el mejor ajuste. También, se presenta en las **Tablas 2-4** el valor óptimo proyectado según las gráficas de contorno (**Figuras 5 y 6**) para cada uno de estos observables, junto con el valor experimental hallado para las condiciones predichas como óptimas.

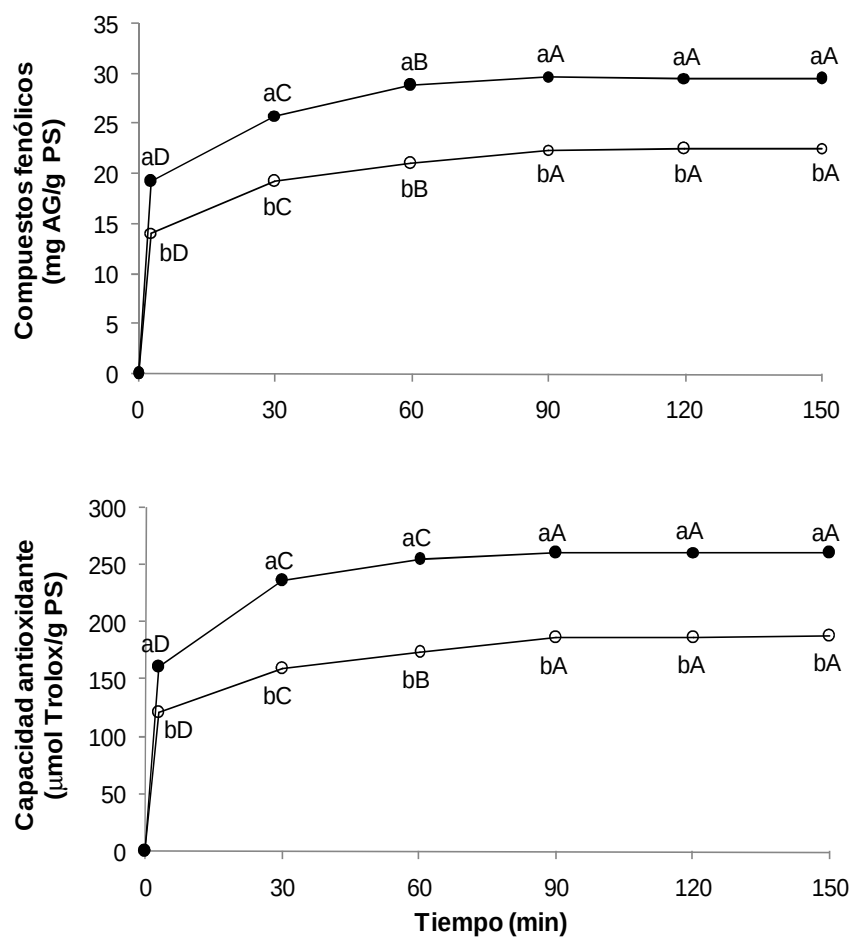


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de acetona (25%, v/v) durante diferentes tiempos de aislamiento con (●) y sin (○) ultrasonido. Distintas letras minúsculas representan diferencias significativas ($p < 0,050$), según el ANOVA, entre los tratamientos con y sin ultrasonido. Distintas letras mayúsculas representan diferencias significativas ($p < 0,050$), según la prueba de Tukey, entre los tiempos de extracción.

Tabla 2. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de acetona.

A: Acetona en agua, % (nivel)	B: Tiempo de ultrasonido, min (nivel)	Contenido de compuestos fenólicos, mg AG/g PS*	Antocianinas monoméricas, mg cianidina-3-glucósido/g PS*	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*	ABTS ⁺⁺ , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*
25 (0)	60 (0)	28,4 $\pm$ 0,6	4,15 $\pm$ 0,02	237 $\pm$ 7	297 $\pm$ 4
25 (0)	60 (0)	27,4 $\pm$ 0,1	4,52 $\pm$ 0,01	245 $\pm$ 4	304 $\pm$ 3
25 (0)	60 (0)	26,1 $\pm$ 0,1	4,20 $\pm$ 0,01	252 $\pm$ 3	296 $\pm$ 2
40 (1)	60 (0)	26,6 $\pm$ 0,3	3,91 $\pm$ 0,01	237 $\pm$ 3	290 $\pm$ 2
40 (1)	90 (1)	27,4 $\pm$ 0,1	4,32 $\pm$ 0,02	250 $\pm$ 5	300 $\pm$ 5
10 (-1)	30 (-1)	19 $\pm$ 1	3,09 $\pm$ 0,04	179 $\pm$ 1	181 $\pm$ 3
40 (1)	30 (-1)	24,7 $\pm$ 0,1	3,43 $\pm$ 0,02	221 $\pm$ 3	262 $\pm$ 3
25 (0)	90 (1)	29,4 $\pm$ 0,6	4,55 $\pm$ 0,03	259 $\pm$ 1	314 $\pm$ 1
10 (-1)	60 (0)	20,2 $\pm$ 0,2	3,56 $\pm$ 0,02	194 $\pm$ 3	209 $\pm$ 2
25 (0)	30 (-1)	25,46 $\pm$ 0,07	4,06 $\pm$ 0,02	229 $\pm$ 7	278 $\pm$ 4
10 (-1)	90 (1)	20,3 $\pm$ 0,1	3,85 $\pm$ 0,01	206 $\pm$ 4	219 $\pm$ 1
Compuestos fenólicos = 6,1 + 1,2A + 0,08B - 0,02A ² - 0,0002B ² R ² = 0,97; RMSE = 0,60 Condiciones óptimas predichas: A = 31; B = 100 Valor óptimo predicho = 30 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 30 $\pm$ 1			Antocianinas monoméricas = 1,4773 + 0,1491A + 0,0157B - 0,0027A ² - 0,00004B ² ; R ² = 0,94; RMSE = 0,11 Condiciones óptimas predichas: A = 28; B = 100 Valor óptimo predicho = 4,71 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 4,74 $\pm$ 0,02		
ORAC = 95,67 + 7,42A + 0,76B - 0,12A ² - 0,0024B ² R ² = 0,99; RMSE = 0,36 Condiciones óptimas predichas: A = 31; B = 100 Valor óptimo predicho = 262 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 273 $\pm$ 6			ABTS ⁺⁺ = 21,9 + 14,6A + 1,5B - 0,238A ² - 0,0076B ² R ² = 0,99; RMSE = 3,25 Condiciones óptimas predichas: A = 31; B = 99 Valor óptimo predicho = 312 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 294 $\pm$ 18		

*Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora.

Tabla 3. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de etanol.

A: Etanol en agua, % (nivel)	B: Tiempo de ultrasonido, min (nivel)	Contenido de compuestos fenólicos, mg AG/g PS*	Antocianinas monoméricas, mg cianidina-3-glucósido/g PS*	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*	ABTS ⁺⁺ , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*
50 (0)	60 (0)	23,0 $\pm$ 0,4	4,83 $\pm$ 0,02	227 $\pm$ 1	267 $\pm$ 5
50 (0)	60 (0)	25,0 $\pm$ 0,2	4,93 $\pm$ 0,01	228 $\pm$ 2	267,4 $\pm$ 0,2
50 (0)	60 (0)	23,2 $\pm$ 0,1	5,11 $\pm$ 0,02	231 $\pm$ 1	271 $\pm$ 2
75 (1)	60 (0)	20,6 $\pm$ 0,1	5,48 $\pm$ 0,01	203 $\pm$ 1	229 $\pm$ 3
75 (1)	90 (1)	21,3 $\pm$ 0,4	5,09 $\pm$ 0,01	225 $\pm$ 4	244 $\pm$ 2
25 (-1)	30 (-1)	20,1 $\pm$ 0,3	4,21 $\pm$ 0,02	202 $\pm$ 5	211 $\pm$ 1
75 (1)	30 (-1)	19,1 $\pm$ 0,2	4,16 $\pm$ 0,02	194 $\pm$ 3	200 $\pm$ 2
50 (0)	90 (1)	25,4 $\pm$ 0,2	5,54 $\pm$ 0,03	245 $\pm$ 4	285 $\pm$ 2
25 (-1)	60 (0)	22,7 $\pm$ 0,2	4,71 $\pm$ 0,01	216 $\pm$ 2	238 $\pm$ 3
50 (0)	30 (-1)	21,11 $\pm$ 0,01	4,54 $\pm$ 0,01	215,3 $\pm$ 0,3	244 $\pm$ 2
25 (-1)	90 (1)	23,5 $\pm$ 0,3	5,16 $\pm$ 0,03	233 $\pm$ 3	253 $\pm$ 1
Compuestos fenólicos = 12,704 + 0,262A + 0,113B - 0,00300A ² - 0,000472B ² ; R ² = 0,98; RMSE = 0,041 Condiciones óptimas predichas: A = 44; B = 100 Valor óptimo predicho = 26 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 24,8 $\pm$ 0,3			Antocianinas monoméricas = 2,965 + 0,057A + 0,005B - 0,0006A ² + 0,00009B ² ; R ² = 0,98; RMSE = 0,15 Condiciones óptimas predichas: A = 47; B = 100 Valor óptimo predicho = 5,72 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 6,04 $\pm$ 0,01		
ORAC = 148,407 + 2,595A + 0,163B - 0,0279A ² + 0,00281B ² R ² = 0,99; RMSE = 0,23 Condiciones óptimas predichas: A = 47; B = 100 Valor óptimo predicho = 253 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 254 $\pm$ 2			ABTS ⁺⁺ = 70,88 + 5,50A + 1,45B - 0,057A ² - 0,0061B ² R ² = 0,99; RMSE = 2,34 Condiciones óptimas predichas: A = 48; B = 100 Valor óptimo predicho = 288 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 272 $\pm$ 9		

*Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora.

Tabla 4. Efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de metanol.

A: Metanol en agua, % (nivel)	B: Tiempo de ultrasonido, min (nivel)	Contenido de compuestos fenólicos, mg AG/g PS*	Antocianinas monoméricas, mg cianidina-3-glucósido/g PS*	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*	ABTS ^{**} , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS*
50 (0)	60 (0)	23,1 $\pm$ 0,7	4,48 $\pm$ 0,02	218 $\pm$ 3	255 $\pm$ 2
50 (0)	60 (0)	22,0 $\pm$ 0,9	4,66 $\pm$ 0,03	218 $\pm$ 5	267 $\pm$ 4
50 (0)	60 (0)	24,1 $\pm$ 0,2	4,78 $\pm$ 0,03	221 $\pm$ 2	250 $\pm$ 3
75 (1)	60 (0)	20,9 $\pm$ 0,4	4,12 $\pm$ 0,01	199 $\pm$ 3	246 $\pm$ 3
75 (1)	90 (1)	23,1 $\pm$ 0,1	4,53 $\pm$ 0,02	224 $\pm$ 6	257 $\pm$ 2
25 (-1)	30 (-1)	18,0 $\pm$ 0,1	3,26 $\pm$ 0,02	181 $\pm$ 2	193 $\pm$ 2
75 (1)	30 (-1)	18,7 $\pm$ 0,2	3,63 $\pm$ 0,01	182 $\pm$ 2	211 $\pm$ 3
50 (0)	90 (1)	25,6 $\pm$ 0,2	5,08 $\pm$ 0,02	239 $\pm$ 2	274 $\pm$ 4
25 (-1)	60 (0)	20,5 $\pm$ 0,2	3,83 $\pm$ 0,03	197 $\pm$ 6	223 $\pm$ 3
50 (0)	30 (-1)	22,0 $\pm$ 0,2	3,94 $\pm$ 0,02	199 $\pm$ 5	226 $\pm$ 3
25 (-1)	90 (1)	22,4 $\pm$ 0,3	4,26 $\pm$ 0,03	218 $\pm$ 3	239 $\pm$ 3
Compuestos fenólicos = 8,034 + 0,456A + 0,0346B - 0,00442A ² + 0,000320B ² ; R ² = 0,94; RMSE = 0,094 Condiciones óptimas predichas: A = 52; B = 100 Valor óptimo predicho = 25 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 24,5 $\pm$ 0,5			Antocianinas monoméricas = 0,4911 + 0,1038A + 0,0292B - 0,00098A ² - 0,0001B ² ; R ² = 0,98; RMSE = 0,08 Condiciones óptimas predichas: A = 53; B = 100 Valor óptimo predicho = 5,16 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 5,35 $\pm$ 0,05		
ORAC = 100,982 + 3,169A + 0,509B - 0,0311A ² + 0,00143B ² R ² = 0,96; RMSE = 0,65 Condiciones óptimas predichas: A = 51; B = 100 Valor óptimo predicho = 247 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 242 $\pm$ 2			ABTS ^{**} = 68,27 + 4,07A + 1,82B - 0,037A ² - 0,0087B ² R ² = 0,96; RMSE = 4,66 Condiciones óptimas predichas: A = 54; B = 100 Valor óptimo predicho = 275 Valor experimental en las condiciones óptimas* = 260 $\pm$ 8		

*Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora.

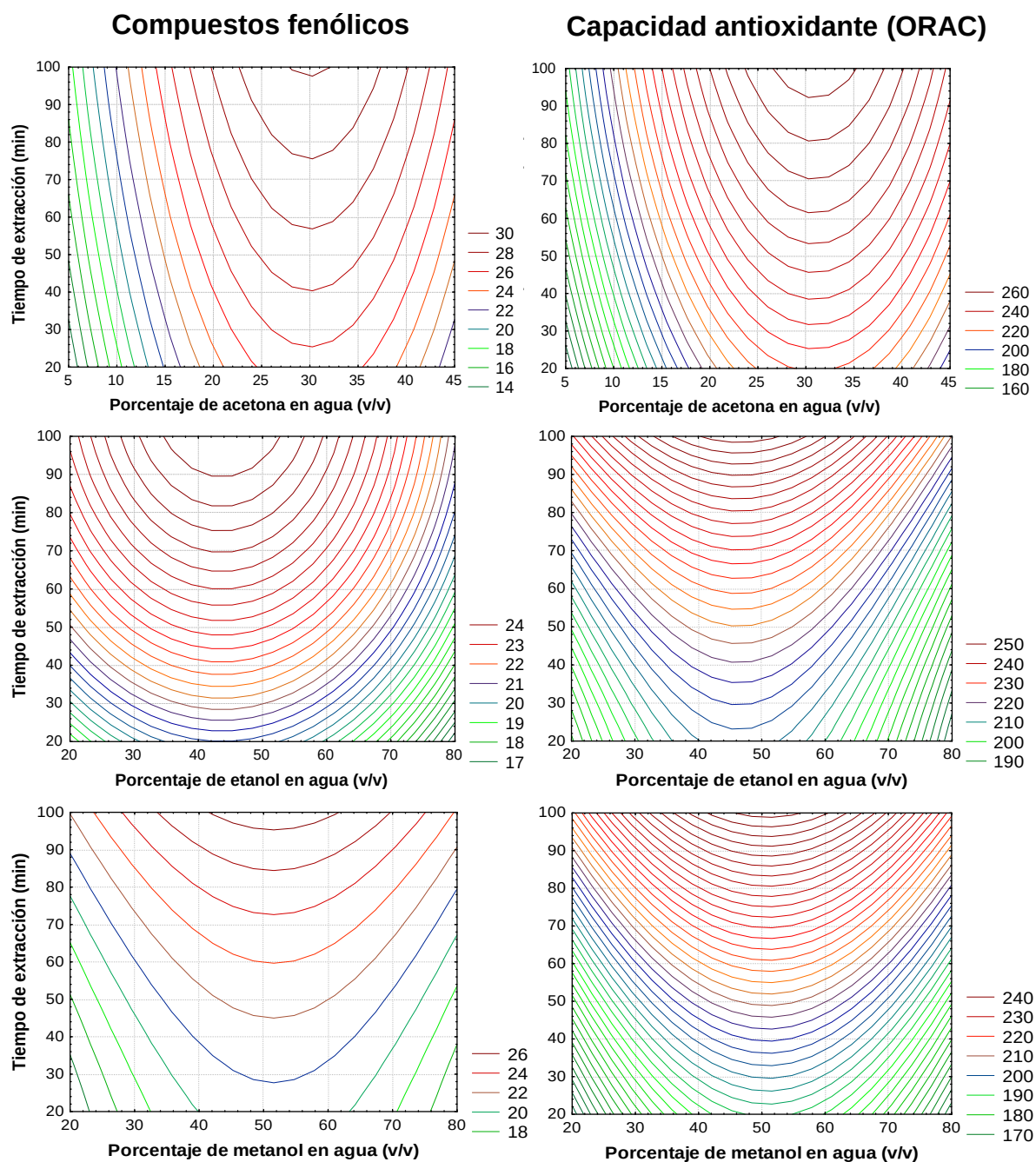


Figura 5. Gráficas de contorno para el efecto del porcentaje de solvente en agua y del tiempo de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (ORAC) de extractos de mora de Castilla.

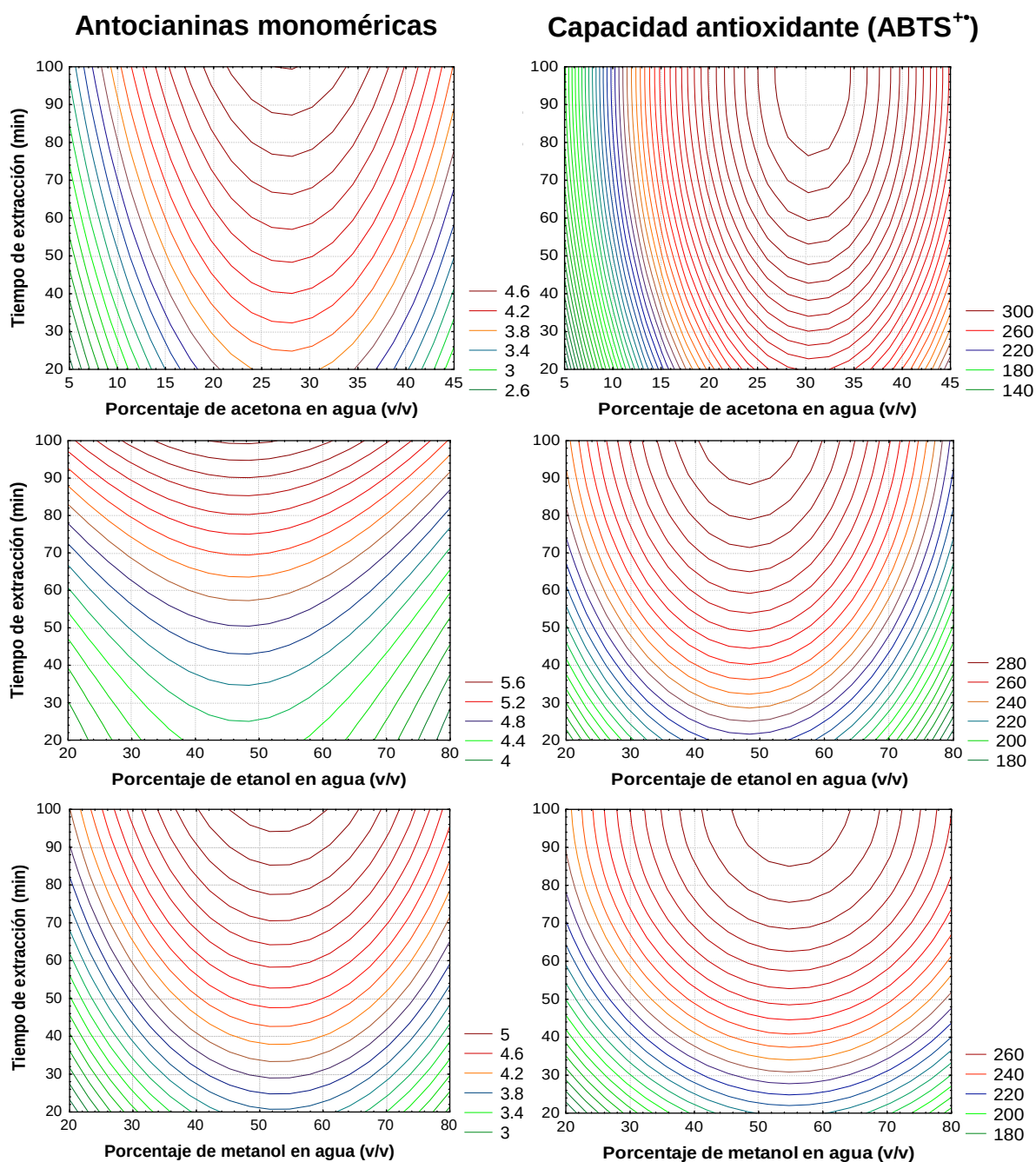


Figura 6. Gráficas de contorno para el efecto del porcentaje de solvente en agua y del tiempo de extracción sobre el contenido de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante (ABTS⁺•) de extractos de mora de Castilla.

Los resultados más altos de contenido total de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante, tanto ORAC como ABTS⁺; se obtuvieron con soluciones acuosas de acetona al 31% (v/v), seguidos de los logrados con soluciones acuosas de etanol al 46% y de metanol al 52%, durante 100 min de extracción asistida con ultrasonido.

Respecto al contenido total de antocianinas monoméricas, los resultados más altos, a diferencia de lo observado con las otras variables, se consiguieron con soluciones acuosas de etanol al 47% (v/v), seguidos de los obtenidos con soluciones acuosas de metanol al 53% y, por último, con las soluciones acuosas de acetona al 28% (v/v). Es decir, los extractos de mora contienen analitos fenólicos, diferentes de las antocianinas, que son preferiblemente extraíbles por la solución acuosa de acetona al 31% (v/v) y son los que más contribuyen a la capacidad antioxidante de los extractos.

En las **Figuras 5 y 6**, se observa que los 12 modelos matemáticos obtenidos, predicen que los mejores resultados se logran, si la extracción se hace con ultrasonido durante 100 min. Este tiempo es notoriamente inferior al empleado por otros autores (Connor y col., 2005; Pantelidis y col., 2007; Garzón y col., 2009), quienes llevaron a cabo la extracción durante 24, 48 y 72 h, sin el uso de ultrasonido, y obtuvieron contenidos de compuestos fenólicos similares a los de este trabajo.

Huang y col. (2012), determinaron el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS⁺, de mora sin espinas (*Rubus laciniatus* cv. Hull), cultivada en Nanjing, China, y obtuvieron 5,58 mg AG/g PS y 114,8 µmol Trolox[®]/g PS, respectivamente. Estos resultados son menores que los obtenidos en nuestro estudio, posiblemente, debido a que ellos utilizaron como disolvente una solución acuosa de metanol al 80% (v/v), a 28°C, durante 24 h. En el presente trabajo, cuando se usaron soluciones acuosas de metanol al 75%, se

obtuvieron valores de las variables de respuesta estudiadas menores (**Figura 3**). Las diferencias en los resultados también pueden deberse a que en este trabajo se estudió una variedad nativa, mientras que Huang y col. (2012), analizaron un cultivar mejorado.

Patras y col. (2009), determinaron el contenido de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de mora cultivada en Dublín, Irlanda (*Rubus fruticosus* cv, *Loughness*) y obtuvieron 1694 ± 3 mg AG/100 g PS. Este resultado se encuentra por debajo del rango de valores hallado en nuestros experimentos con metanol (1800-2560 mg AG/100 g PS) (**Tabla 4**), posiblemente, debido a que los autores mencionados hicieron la extracción con metanol al 100%, durante 36 min. En la **Figura 3**, se observa que, cuando se utilizaron los disolventes puros, se obtuvieron resultados menores que los logrados con soluciones acuosas de los mismos. Además, en la **Figura 4**, se aprecia que el contenido de compuestos fenólicos aumentó con el tiempo de extracción, hasta los 90 min. Las diferencias también pueden deberse a las especies de mora analizadas.

Pantelidis y col. (2007), determinaron el contenido de compuestos fenólicos en extractos, de cultivares mejorados de mora cosechada en Tesalónica, Grecia (*Rubus fruticosus*), obtenidos con soluciones acuosas de metanol al 50% (v/v), y encontraron valores de 1703 ± 71 ; 2061 ± 148 ; 2008 ± 99 y 2349 ± 153 mg AG/100 g PS, para las variedades *Choctaw*, *Thornless Evergreen*, *Chester Thornless* y *Hull Thornless*, respectivamente. Estos resultados, excepto el correspondiente al de la mora *Choctaw*, se hallan dentro del rango de valores obtenido en nuestra investigación, para la extracción con metanol (**Tabla 4**). Sin embargo, el mayor tiempo evaluado en este trabajo fue de 100 min, mientras que en el trabajo de Pantelidis y col. (2007), la extracción duró 72 h, sin usar ultrasonido.

Wada y Ou (2002), analizaron mora (*Rubus laciniatus*) cultivada en Oregon, Estados Unidos, y el contenido de antocianinas determinado, 5,69 mg de cianidina-3-glucósido/g PS, fue muy similar al encontrado en el presente trabajo, bajo las condiciones predichas como óptimas en el diseño de experimentos con etanol (**Tabla 3**).

Wang y Lin (2000), determinaron el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de variedades de mora (*Rubus* sp.) sin espinas, *Chester Thornless*, *Hull Thornless* y *Triple Crown Thornless*, cultivadas en Maryland, Estados Unidos. Respecto al contenido de compuestos fenólicos, obtuvieron valores de 1214 ± 12 - 2310 ± 19 mg AG/100 g PS; y, en cuanto a la capacidad antioxidante, determinada por el método ORAC, publicaron valores de 87 ± 7 - 204 ± 10 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS, que son menores que los hallados en nuestra investigación, posiblemente, debido a las diferencias en las condiciones de extracción, y a las variedades de mora analizadas. Se ha encontrado, que los cultivares mejorados de mora, presentan valores más bajos de las variables evaluadas, respecto a los obtenidos con las especies nativas (Reyes-Carmona y col., 2005; Tavares y col., 2013).

García-Alonso y col. (2004), determinaron la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS⁺•, en extractos de mora comercializada en Salamanca, España, y obtuvieron 192 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS; este valor es menor que el obtenido en nuestro trabajo. La diferencia puede deberse a que los autores utilizaron como disolvente de extracción metanol al 100% y nosotros encontramos que, bajo esas condiciones, los valores de capacidad antioxidante son menores (**Figura 3**). Además, en este trabajo, la extracción fue realizada con ultrasonido.

1.3.3 Correlaciones entre las variables de respuesta analizadas

El interés en la extracción de compuestos fenólicos y de antocianinas, radica en su potencial capacidad antioxidante (Rice-Evans y col., 1996). En este estudio, los extractos de mora de Castilla, presentaron habilidad para neutralizar los radicales peroxilo generados durante el desarrollo del ensayo ORAC, y para atrapar el catión-radical ABTS^{•+}, pero, esta capacidad, al igual que el contenido de compuestos fenólicos, dependió de las condiciones de extracción (**Figuras 3-6, Tablas 2-4**). En la **Tabla 5**, se muestra qué tanto se correlacionaron los resultados obtenidos en los diseños de experimentos con los tres disolventes (**Tablas 2-4**).

Tabla 5. Coeficientes de correlación de las variables de respuesta analizadas en los diseños de experimentos con los tres disolventes.

Observable	Antocianinas monoméricas	ABTS ^{•+}	ORAC
Compuestos fenólicos	0,40	0,94	0,92
Antocianinas monoméricas	-	0,51	0,62
ABTS ^{•+}	-	-	0,95

Se encontraron correlaciones directas entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de mora y sus valores de capacidad antioxidante, es decir, un aumento del contenido de compuestos fenólicos en los extractos estuvo acompañado por un incremento de su capacidad antioxidante, determinada por cualquiera de los dos métodos.

Dai y col. (2009), obtuvieron un coeficiente de correlación (R), entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de mora y los resultados obtenidos

mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, de 0,98. Deighton y col. (2000) encontraron un coeficiente de correlación, entre estas dos variables, de 0,67, aunque este valor es menor, los autores mencionan que el jugo con el contenido de compuestos fenólicos más bajo presentó la capacidad antioxidante más baja, y que el jugo, con el mayor contenido de compuestos fenólicos, presentó la capacidad antioxidante más alta.

Otros autores, Wada y Ou, 2002; Moyer y col., 2002; Reyes-Carmona y col., 2005, también han encontrado correlaciones lineales positivas entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de mora y los resultados del ensayo ORAC, con valores de R de 0,95; 0,92 y 0,83, respectivamente.

La correlación entre los resultados del contenido de antocianinas, obtenidos en los tres diseños de experimentos, y las otras variables analizadas, no fue alta (**Tabla 5**). En las **Tablas 2-4**, se observa que, aunque con los extractos acetónicos se consiguieron los resultados de contenido de compuestos fenólicos, y de capacidad antioxidante, más altos, los extractos etanólicos presentaron el mayor contenido de antocianinas, seguidos de los metanólicos. Esto puede deberse a las diferencias de solubilidad de los analitos presentes en la mora, que los hace preferiblemente extraíbles por determinada mezcla de disolventes (Markom y col., 2007).

La determinación del coeficiente de correlación entre el contenido de antocianinas y los resultados de los otros observables, en el diseño de experimentos con cada disolvente, sí muestra correlaciones positivas (**Tabla 6**). Es decir, a medida que aumentó el contenido de antocianinas en los extractos obtenidos con soluciones acuosas de acetona, también aumentó el contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante; estos resultados también se obtuvieron con los extractos etanólicos y metanólicos.

Moyer y col. (2002), analizaron 37 especies de mora cultivada en Oregon, Estados Unidos. Ellos obtuvieron extractos con soluciones acuosas de acetona (70%, v/v) y encontraron correlaciones positivas entre el contenido de antocianinas y de compuestos fenólicos ($R=0,83$), y entre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante, ORAC, ($R=0,90$) de los extractos. Estos resultados son bastante similares a los obtenidos en nuestro estudio, cuando se usaron soluciones acuosas de acetona como disolvente de extracción (**Tabla 6**).

Tabla 6. Coeficientes de correlación del contenido de antocianinas monoméricas con los otros observables en los diseños de experimentos con cada disolvente.

Disolvente	Compuestos fenólicos	ABTS ⁺ •	ORAC
Acetona	0,82	0,87	0,89
Etanol	0,85	0,89	0,97
Metanol	0,95	0,96	0,96

Reyes-Carmona y col. (2005), analizaron 11 especies de mora cosechada en Oregon, Estados Unidos, y encontraron un coeficiente de correlación, entre el contenido de antocianinas y de compuestos fenólicos de 0,92, y entre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante, ORAC, de 0,88.

La alta correlación ($R=0,95$) entre los resultados de capacidad antioxidante, obtenidos por los métodos ORAC y ABTS⁺• (**Tabla 5**), sugiere que los extractos de mora contienen especies antirradicalarias activas tanto por transferencia de átomos de hidrógeno, como por transferencia de electrones.

1.3.4 Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla con la de sustancias de referencia

Los extractos de mora de Castilla, obtenidos experimentalmente bajo las condiciones reportadas como óptimas en las **Tablas 2-4**, presentaron valores de capacidad de absorción de radicales de oxígeno ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto seco) más altos que los del BHT y del α -tocoferol, antioxidantes comerciales utilizados ampliamente en las industrias de alimentos y cosméticos (**Tabla 7**).

La capacidad de los extractos para decolorar el catión-radical ABTS^{•+} fue mayor que la del α -tocoferol, pero menor que la del BHT. Esto indica la necesidad de evaluar otras variables en la extracción, por ejemplo, obtener extractos a partir de mora fresca o, concentrar los analitos presentes en los extractos por medio de técnicas tales como extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), con el propósito de lograr extractos con capacidad antioxidante más alta que la del BHT.

Tabla 7. Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla con la de sustancias de referencia.

Extracto de mora o sustancia de referencia	ORAC	ABTS ^{•+}
Acetónico (31%) ^a	955 ± 7 ^b	1030 ± 12
Etanólico (46%) ^a	898 ± 5 ^b	962 ± 9
Metanólico (52%) ^a	859 ± 6 ^b	922 ± 4
BHT	664 ± 8 ^c	1680 ± 20
α -Tocoferol	560 ± 7 ^c	770 ± 16

^aPorcentaje (v/v) de disolvente orgánico, en agua, utilizado para la extracción.

^bValor expresado como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto seco. Promedio ± desviación estándar ($n=3$).

^cValor expresado como $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ sustancia. Promedio ± desviación estándar ($n=3$).

Los resultados presentados en este capítulo permiten enunciar las siguientes conclusiones:

Los extractos de mora de Castilla liofilizada presentaron los contenidos de compuestos fenólicos y los valores de capacidad antioxidante, ORAC y ABTS⁺, más altos, cuando las extracciones se realizaron con soluciones acuosas de acetona al 31% (v/v), seguidos de los obtenidos con soluciones acuosas de etanol al 46% (v/v) y de metanol al 52% (v/v), durante 100 min de extracción realizada con ultrasonido.

Los extractos de mora conseguidos con soluciones acuosas de etanol, presentaron los contenidos de antocianinas monoméricas más altos, seguidos de los obtenidos con soluciones acuosas de metanol y acetona.

Los extractos de mora de Castilla, obtenidos bajo las condiciones de extracción predichas como óptimas, presentaron valores de capacidad de absorción de radicales de oxígeno más altos que los del BHT y del α -tocoferol, antioxidantes utilizados en las industrias de alimentos y cosméticos. Estos extractos también presentaron valores de capacidad de decoloración del catión-radical ABTS⁺ más altos que el del α -tocoferol.

1.4 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Resultados parciales presentados en este capítulo se divulgaron de la siguiente manera:

Ponencia.

Jennifer Pilar Rojas Llanes; Jairo René Martínez Morales; Elena E. Stashenko.
“Determinación de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante de

extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth), obtenidos mediante diferentes condiciones". VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica. La Habana, Cuba, 9-12 de octubre de 2012.

Artículo.

Jennifer Pilar Rojas-Llanes, Jairo René Martínez, Elena E. Stashenko. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Vitae*. 2014; 21(3): 218-227.

2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC Y ABTS⁺⁺) DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN

La mora es un frutal andino con importancia actual creciente en Colombia. El área de siembra nacional se estima en 11.673 ha, con una producción de 94.303 t de fruta fresca (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012). Se cultiva principalmente la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), especie que, en Santander, se siembra en Piedecuesta, Santa Bárbara, Suratá, Zapatoca, Matanza, San Joaquín, Charta, Tona y Bolívar (Asociación Hortofrutícola de Colombia, 2008).

De otra parte, el cultivo de plátano (familia *Musaceae*, género *Musa*) ha sido un sector tradicional de economía campesina en Colombia, de alta dispersión geográfica y de gran importancia socioeconómica desde el punto de vista de seguridad alimentaria y de generación de empleo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

En Colombia, el cultivo de plátano ha registrado índices de crecimiento significativos en los últimos años, con 350.000 ha cultivadas. Se cosechan cinco variedades de plátano: Dominico, Dominico Hartón, Hartón, Cachaco o Popocho y Pelipita, y predomina la variedad Hartón, que en Santander, se cultiva en Sabana de Torres, Rionegro, El Playón, Cimitarra, Puerto Parra y Barrancabermeja (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

El principal subproducto del plátano es la cáscara, que representa aproximadamente el 30% del peso de la fruta, y podría constituir una fuente interesante de compuestos antioxidantes, como es el caso de las cáscaras de

banano, cuyos extractos han mostrado capacidad para neutralizar radicales libres (González-Montelongo y col., 2010).

En este capítulo, se presentan los resultados del contenido total de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas, capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y capacidad de decoloración del catión-radical ABTS⁺, en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, frescas y liofilizadas. Con el propósito de tener una visión más amplia de los resultados, el material vegetal, tanto la mora como el plátano, se recolectó en dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander. Los extractos se obtuvieron bajo las condiciones encontradas como óptimas en los diseños de experimentos presentados en el **Capítulo 1**.

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Mora de Castilla

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), descubierta por el botánico alemán Karl Theodor Hartweg y descrita por el botánico británico Georgius Benthham (Benthham, 1839), llamada *Rubus* del latín rojo y *glaucus* del latín blanquecino, debido al color del envés de sus hojas, es nativa de las zonas altas tropicales de América, principalmente, Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador (Arozarena y col., 2012; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006). El nombre mora de Castilla se originó en la época colonial, entre familias nobles que creían que la mora procedía de Castilla, España.

La mora de Castilla es una planta de vegetación perenne, de porte arbustivo semierecto, conformada por varios tallos que pueden crecer hasta 3 m, con un diámetro entre 1 y 2 cm, con espinas curvas de 2 a 3 mm de largo. Las hojas

tienen tres foliolos, ovoides, de 2 a 6,5 cm de largo. La fruta es una polidrupa esférica o elipsoidal de tamaño variable, 1,5 a 2,5 cm en su diámetro más ancho, de color verde cuando se está formando, pasando por un color rojo hasta morado oscuro cuando se madura (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006).

El cultivo de mora constituye, en varias regiones de Colombia, una de las principales fuentes de ingreso, generación de empleo y oferta de alimento y agroindustria (Barrero, 2009).

En 2011, en Colombia, se cosecharon 94.303 t de mora de Castilla, cultivada en 11.673 ha, los cultivos se concentraron en los departamentos de Cundinamarca, Santander, Antioquia, Boyacá y Huila, los cuales participaron con el 24,2; 19,5; 14,3; 9,9 y 7,2% de la producción nacional total, respectivamente (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012). Para el 2020, se espera producir 104.265 t y un aumento de 10.000 ha cultivadas con esta especie (Plan Frutícola Nacional de Colombia, 2006; Barrero, 2009).

La mora se comercializa en fresco y también se procesa en jugos, conservas, helados, yogures, mermeladas y jaleas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006).

La mora de Castilla se caracteriza por su capacidad antioxidante, atribuida a su contenido de compuestos fenólicos (Vasco y col., 2008). Los resultados de una búsqueda cuantitativa sobre antioxidantes en mora, indican que desde 1998 hasta la fecha, se han publicado 328 artículos sobre el tema. El 2014 fue el año con el mayor número de dichas publicaciones (49) y en lo que va corrido de 2015, se han publicado 25 artículos al respecto (**Figura 7**).

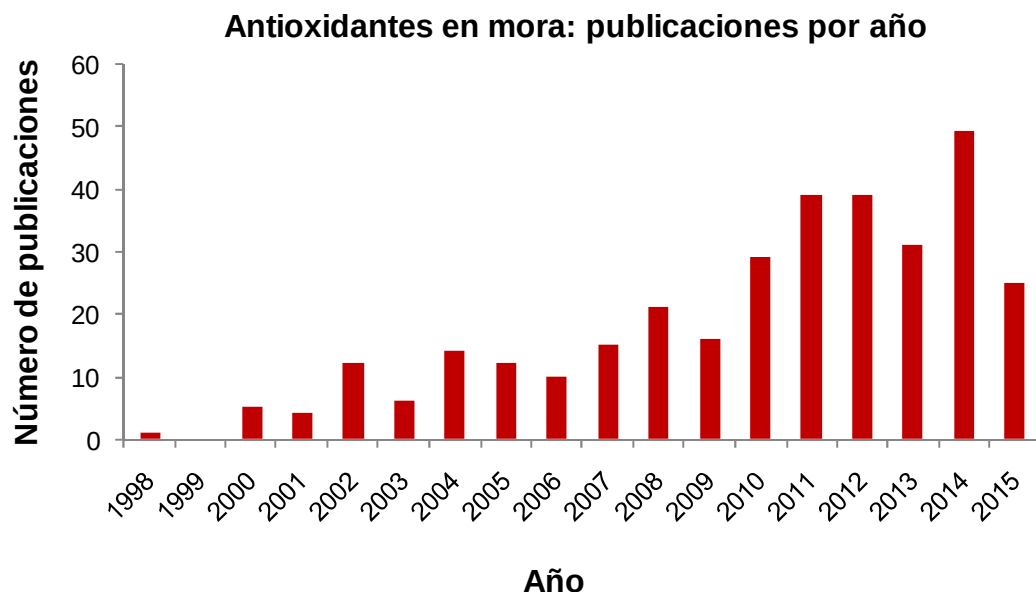


Figura 7. Número de publicaciones sobre antioxidantes en mora, en función del tiempo. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1998 - 2015. Fecha de consulta: 19 de julio de 2015 Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Blackberry antioxidants")*.

2.1.2 Plátano Hartón

El plátano (familia *Musaceae*, género *Musa*) es una fruta tropical originaria del suroeste asiático, se introdujo en América en el año 1516 (Benavides y col., 2010). Karl Linnaeus, el padre de la nomenclatura botánica moderna, distinguió la especie *Musa paradisiaca* Linn, que corresponde al plátano para cocción, de la especie *Musa sapientum* Linn o banano (Valmayor y col., 2000).

El plátano es una hierba perenne que alcanza de 3,5 a 7,5 m o más de altura; el tallo consiste en una columna formada por los pecíolos de las hojas, las cuales están dispuestas en forma de espiral y tienen el ápice agudo; miden de 2 a 4 m de largo y hasta 50 cm de ancho. El verdadero tallo es un rizoma grande, almidonoso y subterráneo. Las flores de color amarillo nacen en una inflorescencia axilar. El

fruto es una baya falsa que carece de semillas. Los frutos se agrupan en racimos llamados mano (Benavides y col., 2010).

Actualmente, en Colombia se producen 2,7 millones t anuales de plátano, cultivado en 350.000 ha, que posicionan al país como el tercer productor mundial de esta fruta después de Uganda y Ruanda. Se estima que el mercado industrial absorbe alrededor de 12 mil t, que se destinan principalmente a la preparación de *snacks*, harinas y alimentos concentrados para consumo animal (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

En el país, se cultivan y cosechan cinco variedades de plátano: Dominico, Dominico Hartón, Hartón, Cachaco o Popocho y Pelipita, y predomina la variedad Hartón, que es de mayor aceptación en los mercados nacional e internacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

La producción de las especies Hartón y Dominico Hartón en las zonas cálidas del país, facilita el desprendimiento de la cáscara, lo que hace que estas variedades tengan mayor potencial para el procesamiento (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

La cáscara representa aproximadamente el 30% del peso del plátano. Este órgano posee mayores contenidos de fibra y minerales que la pulpa. Se considera un producto de desecho agroindustrial y se utiliza, generalmente, como fertilizante y suplemento de comida animal (Dávila y col., 2014), pero, se le podría dar un valor agregado, debido a que se ha encontrado que los extractos de cáscara de plátano presentan capacidad antioxidante (Olalekan y Ayodeji, 2010).

El estudio cuantitativo sobre antioxidantes en plátano, indicó que el interés en este tema surgió en el año 1995 y, hasta la fecha, se han publicado 57 artículos al respecto. El 2013 y el 2014 fueron los años con el mayor número de dichas

publicaciones (8) y en lo que va corrido de 2015, se han publicado 7 artículos más sobre el tema (**Figura 8**).

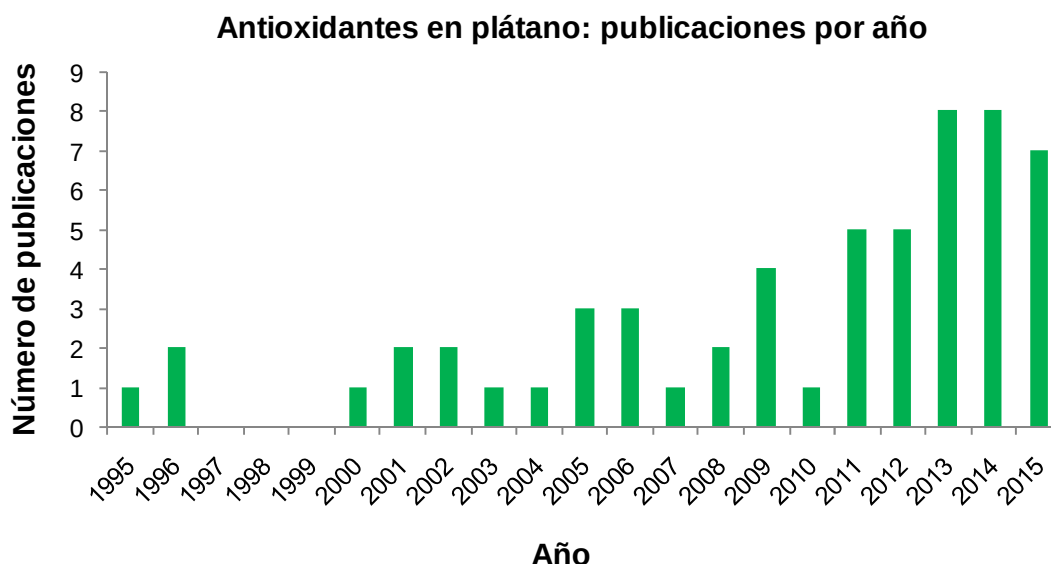


Figura 8. Número de publicaciones sobre antioxidantes en plátano, en función del tiempo. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1995 - 2015. Fecha de consulta: 19 de julio de 2015. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("Plantain antioxidants")*.

Sin embargo, en la mayoría de publicaciones sobre antioxidantes en plátano, utilizan la pulpa. El estudio cuantitativo empleando la ecuación de búsqueda "*plantain peel antioxidants*", mostró siete artículos científicos sobre el tema. Olalekan y Ayodeji (2010), encontraron que los extractos de cáscara de plátano presentaron capacidad antioxidante más alta que los extractos de cáscara de banano y que el ácido cítrico.

En el caso del banano (*Musa acuminata*), se han analizado las pulpas, las cáscaras y las brácteas. Se ha encontrado que las cáscaras de banano son una fuente potencial de compuestos bioactivos, con un amplio rango de propiedades medicinales, en particular, con actividad como secuestradores de radicales libres (González-Montelongo y col., 2010; Baskar y col., 2011; Singhal y Ratra, 2013).

En el presente trabajo, se utilizaron cáscaras de plátano teniendo en cuenta, que en los extractos de cáscara de banano se ha encontrado mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante más alta que en los de las pulpas (Kanazawa y Sakakibara, 2000; Someya y col., 2002; Fatemeh y col., 2012) y, que los extractos de cáscara de plátano han presentado capacidad antioxidante más alta que los de las cáscaras de banano (Olalekan y Ayodeji, 2010). Se utilizaron cáscaras de plátano verde porque se ha obtenido mayor contenido de compuestos fenólicos en los extractos de cáscara de banano verde que en los de banano maduro (Fatemeh y col., 2012).

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Material vegetal

Se utilizó mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y plátano Hartón (*Musa x paradisiaca* L.), cada uno, proveniente de dos fincas de Santander. Se tomaron muestras de hojas, flores y frutos y se enviaron al Herbario Nacional Colombiano para la confirmación de la identificación taxonómica de las especies analizadas.

La mora de Castilla se recolectó en la finca La Estancia, vereda El Aburrido del municipio de Bucaramanga, Santander, (No. COL 580109) y en la finca Rosas Rojas, vereda Cristales del municipio de Piedecuesta, Santander (No. COL 581251). En cada una de las fincas, se adquirieron 2,5 kg de mora, tomadas de diferentes arbustos.

La mora se licuó, una fracción de este material vegetal fresco se extrajo con disolventes, la otra fracción se secó en un liofilizador de bandejas *VirTis AdVantage Plus*, suministrado por *SP Scientific* (Gardiner, New York, EE.UU.) y se almacenó a temperatura ambiente (24°C), bajo ausencia de luz, hasta su

extracción con disolventes. El índice de madurez de la mora utilizada, determinado según la Norma Técnica Colombiana 4106 (1997), fue 2,2; valor que representa un grado de maduración 4, en una escala de 0-6.

El plátano se recolectó en la finca El Prado, vereda El Aburrido del municipio de Bucaramanga (No. COL 581250) y en La Granja Guatiguará, vereda Guatiguará del municipio de Piedecuesta, Santander (No. COL 580468). En cada una de las fincas se adquirieron 7 kg de plátano tomados de diferentes plantas.

El plátano se peló, las cáscaras se pasaron por una picadora *Black & Decker* FP1550S (Maryland, EE.UU.), una fracción de este material vegetal fresco se extrajo con disolventes, la otra fracción se secó en el liofilizador de bandejas y se almacenó a temperatura ambiente (24°C), en ausencia de luz, hasta su extracción con disolventes. Se utilizó plátano verde, etapa de maduración 1 de acuerdo con la escala de color descrita por Dadzie y Orchard (1997).

2.2.2 Reactivos

Se utilizaron acetona (99,9%), etanol (99,9%), metanol (99,9%), ácido clorhídrico (37%), ácido acético (99,9%), acetato de sodio (99%), cloruro de potasio (99,5%), hidróxido de sodio (99%), bifosfato de potasio (99%), persulfato de potasio (97%), y reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). La fluoresceína [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)] (99%), el clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano) (AAPH, 97%), el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, 98%), el Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97%), el ácido gálico (99%), el BHT (99%) y el α -tocoferol (96%), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (*St. Louis*, MO, EE.UU.). Se usó agua Tipo I producida por un equipo purificador *Synergy UV*, proveído por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

2.2.3 Extracción sólido-líquido

Para la obtención de extractos se usó la mora licuada (4 g), la cáscara de plátano picada (3 g) o el material vegetal liofilizado (0,5 g). Se utilizaron las mejores condiciones de extracción encontradas para cada disolvente (**Capítulo 1**), a saber, extracción asistida con ultrasonido durante 100 min (divididos en tres extracciones) con soluciones acuosas de acetona (31%, v/v), etanol (46%, v/v) o metanol (52%, v/v) (10 mL x 3 veces). Los extractos se rotoevaporaron para eliminar los disolventes orgánicos y se liofilizaron para remover el agua.

2.2.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

Se pesó cada extracto (5 mg), se disolvió en agua Tipo I (5 mL), se hicieron diluciones en agua y se siguió el procedimiento descrito en la **Sección 1.2.4**. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de extracto seco (mg AG/g ES) y se reportaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$).

2.2.5 Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

Se pesaron los extractos (10 mg), se disolvieron en agua Tipo I (1 mL) y se llevó a cabo la metodología mencionada en la **Sección 1.2.5**. La concentración de este observable se expresó como mg de cianidina-3-glucósido/g de extracto seco. Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se reportaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar.

2.2.6 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

Se pesó cada extracto (5 mg), se disolvió en agua Tipo I (1 mL), se hicieron diluciones en *buffer* acetato (20 mM, pH 4,5) y se continuó con el protocolo descrito en la **Sección 1.2.6**. Los resultados se expresaron como $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$

extracto seco ($\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ ES) y se reportaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$).

2.2.7 Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno

Se pesaron los extractos (1 mg), se disolvieron en agua Tipo I (1 mL), se diluyeron en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) y se procedió de la manera mencionada en la **Sección 1.2.7**. Los resultados se expresaron como $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto seco ($\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ ES) y se reportaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$).

2.2.8 Extracción en fase sólida

Se siguió el procedimiento de Rodriguez-Saona y Wrolstad (2001), con algunas modificaciones. Se usó un colector para extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) proporcionado por J.T. Baker Inc. (Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.), operado con una bomba de vacío suministrada por *Vacuubrand* (Wertheim, Alemania). Se utilizaron cartuchos, *HF-Bond Elut-C18*, con 500 mg de sorbente, proveídos por *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, EE.UU.). Para el acondicionamiento de los cartuchos, se les pasaron 2 mL de etanol grado reactivo, y para remover el etanol remanente, se hicieron pasar 3 mL de agua Tipo I. Sobre los extractos acetónicos secos obtenidos como se indica en la **Sección 2.2.3**, se agregaron 2 mL de agua Tipo I y se hicieron pasar por el cartucho, que, posteriormente, se lavó con 4 mL de agua para eluir los compuestos no adsorbidos, tales como azúcares y ácidos orgánicos. Después de esto, los compuestos fenólicos se eluyeron con 3 mL de etanol y, el disolvente orgánico se removió con nitrógeno gaseoso para obtener extractos secos.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos sólido-líquido de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

En las **Tablas 8 y 9** se reportan el contenido de compuestos fenólicos, de antocianinas monoméricas y la capacidad antioxidante (ORAC y ABTS⁺), de los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón. Las extracciones se hicieron a partir de material vegetal fresco y liofilizado, procedente de fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander.

Los extractos de mora de Castilla, fresca y liofilizada, presentaron contenidos de compuestos fenólicos y valores de capacidad antioxidante más altos que los extractos de cáscara de plátano Hartón. Esto puede deberse a que la dopamina, principal componente de la cáscara de plátano, al cual se le atribuye su capacidad antioxidante (González-Montelongo y col., 2010), es fácilmente degradada por la polifenoloxidasas, razón por la cual, las cáscaras se pardean durante su manipulación (Mayer, 2006). Además, los extractos de mora contienen antocianinas, mientras que en los extractos de cáscara de plátano, estos compuestos no se detectaron (**Tablas 8 y 9**).

Las comparaciones entre los extractos obtenidos a partir de material vegetal recolectado en la misma finca, y en el mismo estado, fresco o liofilizado, indican que los extractos acetónicos de mora y de cáscara de plátano, presentaron los valores de contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante más altos que los de los extractos conseguidos con soluciones acuosas de etanol y metanol. Estos hallazgos confirman los resultados presentados en el **Capítulo 1** y, establecen que también se cumplen con los extractos obtenidos a partir de mora fresca y con los extractos de cáscara de plátano Hartón.

Tabla 8. Resultados obtenidos en el análisis de extractos de mora de Castilla procedente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander.

Finca	Estado	Solución extractante ^c	Compuestos fenólicos, mg AG/g ES ^d	Antocianinas monoméricas, mg cianidina/g ES ^d	ORAC, μmol Trolox [®] /g ES ^d	ABTS ⁺⁺ , μmol Trolox [®] /g ES ^d
Rosas Rojas ^a	Fresca	Acetona	170 ± 2	27,1 ± 0,5	1560 ± 13	1670 ± 9
		Etanol	157,8 ± 0,2	30,9 ± 0,2	1464 ± 9	1550 ± 12
		Metanol	151,4 ± 0,7	28,9 ± 0,4	1420 ± 11	1498 ± 20
	Liofilizada	Acetona	120,7 ± 0,6	19,2 ± 0,2	1102 ± 8	1180 ± 13
		Etanol	111,8 ± 0,4	21,7 ± 0,3	1025 ± 5	1096 ± 5
		Metanol	107,7 ± 0,3	20,5 ± 0,1	995 ± 7	1065 ± 11
La Estancia ^b	Fresca	Acetona	145 ± 1	22,8 ± 0,2	1325 ± 6	1420 ± 19
		Etanol	134,2 ± 0,2	25,4 ± 0,4	1230 ± 17	1320 ± 15
		Metanol	129,5 ± 0,5	23,8 ± 0,3	1190 ± 10	1273 ± 7
	Liofilizada	Acetona	103,3 ± 0,4	15,6 ± 0,4	941 ± 8	1013 ± 6
		Etanol	96,0 ± 0,8	18,0 ± 0,2	879 ± 9	941 ± 8
		Metanol	92,8 ± 0,3	16,9 ± 0,1	848 ± 8	919 ± 5
				BHT	650 ± 12	1680 ± 20
				α-Tocoferol	570 ± 10	770 ± 16

^aVereda Cristales, municipio de Piedecuesta. ^bVereda El Aburrido, municipio de Bucaramanga. ^cSoluciones acuosas de acetona (31%, v/v), etanol (46%) y metanol (52%). ^dPromedio ± desviación estándar (n=3). ES: Extracto seco.

Tabla 9. Resultados obtenidos en el análisis de extractos de cáscara de plátano Hartón procedente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander.

Finca	Estado	Solución extractante ^c	Compuestos fenólicos, mg AG/g ES ^d	ORAC, μmol Trolox [®] /g ES ^d	ABTS ⁺⁺ , μmol Trolox [®] /g ES ^d
El Prado ^a	Fresca	Acetona	90,3 ± 0,3	824 ± 6	894 ± 7
		Etanol	86,0 ± 0,1	756 ± 9	850 ± 12
		Metanol	82,3 ± 0,2	730 ± 11	814 ± 9
	Liofilizada	Acetona	53,4 ± 0,5	500 ± 17	520 ± 13
		Etanol	50,4 ± 0,2	460 ± 12	492 ± 8
		Metanol	48,2 ± 0,1	441 ± 7	471 ± 3
Guatiguará ^b	Fresca	Acetona	75,4 ± 0,7	674 ± 6	718 ± 7
		Etanol	72,2 ± 0,9	620 ± 12	680 ± 12
		Metanol	68,4 ± 0,2	600 ± 11	650 ± 13
	Liofilizada	Acetona	44,5 ± 0,9	390 ± 13	419 ± 7
		Etanol	42,5 ± 0,7	360 ± 12	400 ± 10
		Metanol	40,2 ± 0,4	350 ± 10	376 ± 6
BHT			650 ± 12	1680 ± 20	
α-Tocoferol			570 ± 10	770 ± 16	

^aVereda El Aburrido, municipio de Bucaramanga. ^bVereda Guatiguará, municipio de Piedecuesta. ^cSoluciones acuosas de acetona (31%, v/v), etanol (46%) y metanol (52%). ^dPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). ES: Extracto seco.

Además, los extractos etanólicos de mora recolectada en la misma finca, y en el mismo estado, presentaron los mayores contenidos de antocianinas monoméricas, seguidos de los extractos metanólicos y acetónicos, tal como se encontró en el **Capítulo 1** con los extractos obtenidos a partir de mora liofilizada. En ninguno de los extractos de cáscara de plátano se detectaron antocianinas monoméricas.

En todos los casos, con el material vegetal fresco se obtuvieron valores de contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante más altos que con el material vegetal liofilizado; esto puede deberse a pérdidas de compuestos durante el proceso de secado.

Los extractos obtenidos con mora fresca recolectada en la finca Rosas Rojas, presentaron valores de los observables, mencionados anteriormente, más altos que los encontrados con mora fresca procedente de la finca La Estancia. Con la mora liofilizada se observó el mismo comportamiento, posiblemente, debido a que la mora cosechada en la finca Rosas Rojas es mora de Castilla con espinas, una especie nativa, mientras que la mora recolectada en la finca La Estancia es un cultivar diferente, sin espinas. Otros autores también han reportado mejores resultados con variedades nativas (Reyes-Carmona y col., 2005; Tavares y col., 2013). Además, las diferencias pueden deberse a las condiciones de cultivo y al microambiente de las plantas.

Sin embargo, los extractos obtenidos con mora fresca cosechada en la finca La Estancia, presentaron valores de contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante más altos que los conseguidos con mora liofilizada recolectada en la finca Rosas Rojas, es decir, los valores de las variables de respuesta disminuyeron en el orden: fresca Rosas Rojas > fresca La Estancia > liofilizada Rosas Rojas > liofilizada La Estancia. Esto indica, que el estado fresco de la mora presentó más influencia sobre los observables-respuesta mencionados, que la posible variación genética de la fruta.

A pesar de las diferencias en los resultados entre las muestras de mora analizadas, se encontró que los extractos de mora, tanto fresca como liofilizada, procedente de las dos fincas, presentaron mayor capacidad atrapadora de radicales de oxígeno, que la de las sustancias de referencia evaluadas, *i.e.*, BHT y α -tocoferol (**Tabla 8**). La capacidad de los extractos para decolorar el catión-radical ABTS^{•+} fue mayor que la del α -tocoferol, pero menor que la del BHT.

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos con los extractos de mora, en el ensayo con el catión-radical ABTS^{•+}, son más altos que los reportados por Kucharska y col. (2011), quienes analizaron mora (*Rubus plicatus* W. et N.) liofilizada, cultivada en Lublin, Polonia, y obtuvieron como valor más alto para este observable $780,3 \pm 52,61 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto seco, usando acetato de etilo como disolvente de extracción. Kucharska y col. (2011), también determinaron el contenido de antocianinas monoméricas y encontraron 0,85, 9,46 y 14,35 mg cianidina-3-glucósido/g de extracto seco, haciendo la extracción con acetato de etilo, metanol y agua, respectivamente. Estos valores son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio.

Las diferencias en los resultados pueden deberse a las disimilitudes genéticas de las moras analizadas, a las condiciones de cultivo, a los disolventes de extracción empleados y a los métodos utilizados para realizar las determinaciones de las variables de respuesta (Garzón y col., 2009).

Respecto a los extractos de cáscara de plátano, aquellos conseguidos con soluciones acuosas de acetona presentaron valores de contenido de compuestos fenólicos, y de capacidad antioxidante, más altos que los obtenidos con soluciones acuosas de etanol y metanol. Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Alothman y col. (2009), quienes evaluaron el uso de agua, y de soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol como disolventes para la obtención de extractos de pulpa de banano y encontraron contenidos de compuestos fenólicos y

valores de capacidad antioxidante más altos con las soluciones acuosas de acetona.

Los extractos de cáscara fresca de plátano, procedente de la finca El Prado, presentaron contenidos de compuestos fenólicos y valores de capacidad antioxidante más altos que los conseguidos a partir de cáscara fresca proveniente de la finca Guatiguará. Con la cáscara liofilizada de plátano se observó el mismo comportamiento. Sin embargo, los extractos de cáscara fresca procedente de la finca Guatiguará, presentaron valores de contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante más altos que los obtenidos con los extractos de cáscara liofilizada de plátano recolectado en la finca El Prado (**Tabla 9**), es decir, en orden descendente, los mejores resultados se obtuvieron con cáscara de plátano, así: fresca El Prado > fresca Guatiguará > liofilizada El Prado > liofilizada Guatiguará. Esto puede deberse a que la dopamina, principal componente de la cáscara de plátano (González-Montelongo y col., 2010), se degrada durante 48 h de liofilización.

Los valores de la capacidad de atrapamiento de radicales de oxígeno encontrados con los extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos de cáscara de plátano fresca, procedente de la finca El Prado, fueron más altos que los obtenidos con los antioxidantes comerciales, BHT o α -tocoferol. Los extractos acetónicos obtenidos a partir de cáscara de plátano fresca proveniente de la finca Guatiguará, también presentaron valores de la capacidad antioxidante (ORAC) mayores que los de las sustancias de referencia; pero con los extractos etanólicos y metanólicos se obtuvieron valores menores, así como con los extractos obtenidos a partir de la cáscara de plátano liofilizada procedente de las dos fincas. Babbar y col. (2011), analizaron extractos metanólicos de cáscara liofilizada de banano y encontraron valores de capacidad antioxidante menores que los del BHT.

Respecto a la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, los extractos de cáscara de plátano presentaron valores menores que los del BHT y solo los extractos obtenidos con cáscara de plátano fresca, procedente de la finca El Prado, mostraron valores mayores que los del α -tocoferol, para este observable-respuesta.

2.3.2 Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.

Con el propósito de eliminar los azúcares y los ácidos orgánicos extraídos, y de concentrar los compuestos fenólicos, los extractos obtenidos con las soluciones acuosas de acetona, a partir de material vegetal fresco, se sometieron a extracción en fase sólida. Se utilizaron estos extractos porque con ellos se obtuvieron los valores de capacidad antioxidante más altos en los ensayos previos (**Tablas 8 y 9**).

En la **Tabla 10**, se observa que los valores de contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante, en los extractos obtenidos por SPE, fueron mayores que los encontrados en los extractos iniciales (**Tablas 8 y 9**), a tal punto que todos presentaron valores de capacidad antioxidante, ORAC y ABTS^{•+}, mayores que los de las sustancias de referencia. Estos resultados sugieren que los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, podrían constituir una alternativa a los antioxidantes comerciales, lo cual es de gran interés porque el uso del BHT se ha restringido debido a su potencial carcinogénico (Bauer y col., 2001).

Tabla 10. Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante de extractos acetónicos de mora fresca de Castilla y de cáscara fresca de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.

Extracto		Compuestos fenólicos, mg AG/g ES*	Antocianinas monoméricas, mg cianidina/g ES*	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g ES}^*$	ABTS ⁺⁺ , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g ES}^*$
Mora	Rosas Rojas	360 $\pm$ 13	56,8 $\pm$ 0,3	3300 $\pm$ 56	3490 $\pm$ 53
	La Estancia	297 $\pm$ 7	46,5 $\pm$ 0,1	2690 $\pm$ 37	2880 $\pm$ 16
Plátano	El Prado	220 $\pm$ 11	N.D.	1970 $\pm$ 42	2190 $\pm$ 28
	Guatiguará	181 $\pm$ 9	N.D.	1650 $\pm$ 46	1780 $\pm$ 21
BHT				650 $\pm$ 12	1680 $\pm$ 20
α -Tocoferol				570 $\pm$ 10	770 $\pm$ 16

*Promedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). ES: Extracto seco.

La capacidad antioxidante más alta de los extractos de mora de Castilla, respecto a la del BHT y del α -tocoferol, puede atribuirse a la presencia de antocianinas y elagitaninos en estos extractos (Wang y col., 1997; Mertz y col., 2007; Garzón y col., 2009; Acosta-Montoya y col., 2010). La mayor capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de plátano, comparada con la de los antioxidantes comerciales, se atribuye muy probablemente a la presencia de dopamina. Kanazawa y Sakakibara (2000), encontraron que este compuesto fue mejor antioxidante, mediante el ensayo de decoloración del radical DPPH[•], que el BHT y el BHA, y que flavonoides como la luteolina, quercetina y catequina, y que su capacidad para atrapar este radical fue similar a la del galato de galocatequina y del ácido ascórbico.

Los resultados mostrados en este capítulo permiten concluir que:

Los extractos de mora y de cáscara de plátano obtenidos a partir de material vegetal fresco, presentaron contenidos de compuestos fenólicos y valores de capacidad antioxidante más altos que los de los extractos adquiridos con material vegetal liofilizado.

Los extractos, obtenidos por SPE, de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, adquiridos con material vegetal fresco, procedentes, cada uno, de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander, presentaron valores de capacidad antioxidante, ORAC y ABTS^{•+}, más altos que los del BHT y del α -tocoferol, antioxidantes comerciales usados en las industrias de alimentos y cosméticos.

3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN, CONTRA LA OXIDACIÓN LIPÍDICA DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA SOMETIDAS A RADIACIÓN UV

La oxidación lipídica es uno de los factores implicados en el deterioro de los alimentos y productos cosméticos, da lugar a cambios en su color y textura, conlleva el desarrollo de olores y sabores desagradables y la formación de compuestos tóxicos tales como el 4-hidroxinonenal (Juntachote y col., 2006). Con el propósito de prevenir estas modificaciones, se usan antioxidantes sintéticos como el BHT y el BHA.

El Código Alimentario (*Codex Alimentarius*, 2014), subsidiario de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), establece dosis máximas permitidas de BHT, en el rango de 75 mg/kg de alimento, para el aceite de mantequilla (manteca) y la grasa de leche anhidra; a 400 mg/kg de alimento, para la goma de mascar y los complementos alimenticios. En el caso del BHA, las dosis máximas permitidas se encuentran en el intervalo entre 175 y 400 mg/kg y corresponden a los mismos alimentos que el BHT. En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) establece como dosis máxima permitida de BHT, o BHA, 200 mg/kg de alimento listo para el consumo (Ministerio de Salud, 1991).

En el caso de los cosméticos, se ha reportado el uso del BHT en una concentración $\leq 0,1\%$, para una emulsión facial, y del BHA, en la misma concentración, para una emulsión de manos (Carbajo y col., 2006). Sin embargo, la demanda de antioxidantes naturales se ha incrementado debido a la toxicidad

que las sustancias antioxidantes sintéticas han presentado en roedores (Branen, 1975; Ito y col., 1983).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta los resultados de capacidad antioxidante presentados por los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón (**Capítulos 1 y 2**), se evaluó el efecto protector de estos extractos en emulsiones de aceite en agua, expuestas al deterioro oxidativo mediante radiación ultravioleta A-visible (UVA-Vis); la capacidad antioxidante se comparó con la del BHT y la del α -tocoferol. El grado de protección se determinó con base en la capacidad de inhibición de la formación de hexanal, producto mayoritario de la oxidación lipídica del ácido linoleico presente en el aceite de soya con el que se prepararon las emulsiones. Se evaluaron diferentes concentraciones de cada extracto, de BHT y de α -tocoferol.

Se utilizaron los extractos obtenidos después de su limpieza y concentración por extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), ya que ellos presentaron valores de capacidad antioxidante más altos en comparación con los encontrados para los extractos no sometidos a SPE. El hexanal se extrajo mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), con derivación *in situ* sobre la fibra activada con agente derivatizante, y se determinó por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD). El efecto protector se calculó con base en el área cromatográfica del derivado hidrazónico del hexanal, con y sin antioxidante agregado.

3.1 MARCO TEÓRICO

3.1.1 Autooxidación lipídica

La autooxidación es el deterioro de ácidos grasos insaturados por medio de un mecanismo de reacción en cadena por radicales libres. Esta cadena incluye

reacciones de iniciación, propagación y terminación. En el proceso de iniciación, un átomo de hidrógeno del grupo metilénico es abstraído de la molécula lipídica insaturada para formar un radical (alquil) lipídico ($R^\bullet$) (**Esquema 5, Ecuación 3.1**). Este radical puede reaccionar con el oxígeno atmosférico (3O_2) para producir un radical peroxilo ($ROO^\bullet$) (**Ecuación 3.2**) (Wanasundara y Shahidi, 2005).



Esquema 5. Posibles reacciones en el proceso de autooxidación lipídica. “R” es un grupo alquilo de una molécula lipídica insaturada, “H” es un átomo de hidrógeno α -metilénico fácilmente abstraíble debido a la influencia de activación de el (los) doble(s) enlace(s) adyacente (s), “ $RO^\bullet$ ” es un radical alcoxilo, “ $ROO^\bullet$ ” es un radical peroxilo, “I” es un iniciador (luz, iones metálicos, fotosensibilizadores) (Wanasundara y Shahidi, 2005).

En las reacciones de propagación, el radical peroxilo reacciona con otra molécula lipídica insaturada para formar un hidroperóxido y un nuevo radical lipídico (**Ecuación 3.3**), que reaccionará con el oxígeno para producir otro radical peroxilo (**Ecuación 3.2**). Los hidroperóxidos son inestables y se pueden descomponer en radicales que aceleran las reacciones de propagación (**Ecuaciones 3.4 y 3.5**); esta descomposición puede estar catalizada por metales de valencia variable que, en cantidades traza, son difíciles de eliminar de los alimentos (**Esquema 6**) (Wanasundara y Shahidi, 2005).



Esquema 6. Posibles reacciones para la descomposición de hidroperóxidos. “Mⁿ⁺” es un ion metálico con valencia transicional.

La reacción en cadena prosigue y la terminación ocurre, solo cuando dos radicales se combinan para formar un producto no radicalario (Wanasundara y Shahidi, 2005).

La velocidad de oxidación de un sustrato lipídico depende de su composición en ácidos grasos (**Tabla 11**), cuantos más grupos alilo existan en la molécula del ácido graso más rápido transcurrirá la oxidación (Belitz y Grosch, 1997). Los radicales peroxilo, que se describen en la **Ecuación 3.2**, son relativamente poco reactivos (constante de velocidad, $k = 10\text{-}60 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$) y, por tanto, sustraen de modo selectivo el átomo de hidrógeno unido más débilmente en la molécula del ácido graso. La reacción de la **Ecuación 3.3**, es rápida, solamente cuando la energía necesaria para la sustracción de hidrógeno de la molécula de ácido graso es menor que la energía liberada en la formación del enlace hidrógeno-oxígeno del grupo hidroperóxido (376 kJ/mol) (Belitz y Grosch, 1997).

En la **Tabla 12**, se indican los valores de energía necesarios para la disociación de un átomo de hidrógeno de los grupos existentes en los ácidos grasos. Un radical peroxilo sustrae el átomo de hidrógeno con más facilidad de un grupo metileno de un sistema 1,4-pentadieno que de un grupo monoalilo, porque el radical que se forma a partir del 1,4-dieno está más estabilizado por resonancia (deslocalización de electrones por cinco átomos de carbono). Por esta razón, los ácidos grasos saturados, no se oxidan a temperatura ambiente o inferior a ésta, solo se oxidan los ácidos insaturados y, además, de modo muy selectivo por los radicales peroxilo (Belitz y Grosch, 1997).

Tabla 11. Velocidad relativa de oxidación de ácidos grasos a 25°C*.

Ácido graso	Número de grupos alilo	Velocidad relativa de oxidación
18:0	0	1
18:1 (9)	1	100
18:2 (9,12)	2	1200
18:3 (9,12,15)	3	2500

*Fuente: Belitz y Grosch, 1997.

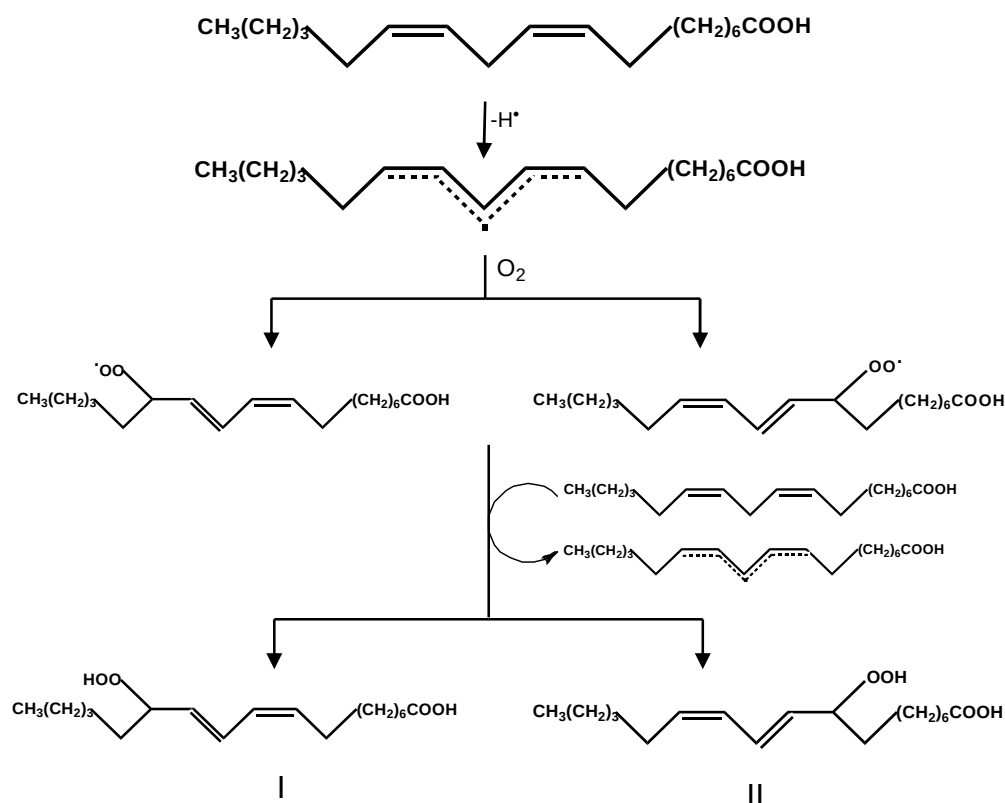
Tabla 12. Valores de energía necesarios para la disociación de un átomo de hidrógeno de grupos existentes en ácidos grasos*.

Grupo en el ácido graso	D_{R-H} (kJ/mol)
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---CH}_2 \end{array}$	422
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---CH---CH}_3 \end{array}$	410
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---CH---CH=CH---} \end{array}$	322
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---CH=CH---CH---CH=CH---} \end{array}$	272

*Fuente: Belitz y Grosch, 1997.

En el caso del ácido linoleico, mayoritario en los aceites de soya, girasol, maíz y algodón, el grupo metileno en la posición 11 está activado para la sustracción de un átomo de hidrógeno, debido a los dos dobles enlaces vecinos. El radical pentadienilo generado se estabiliza por la formación de dos hidroperóxidos en las

posiciones 9 y 13, cada uno con un sistema dieno conjugado (**Esquema 7**) (Belitz y Grosch, 1997).

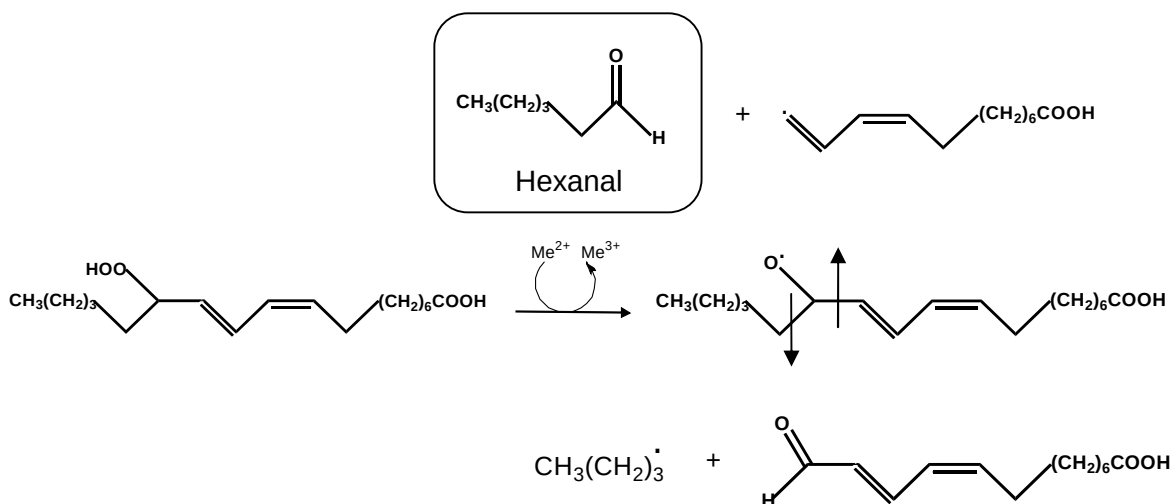


Esquema 7. Autooxidación del ácido linoleico. I. Ácido 13-hidroperoxioctadeca-9,11-dienónico. II. Ácido 9-hidroperoxioctadeca-10,12-dienónico.

Los grupos monoalílicos en el ácido linoleico (posiciones 8 y 14 en la molécula), además del grupo bis-alílico (posición 11), reaccionan y dan lugar a la formación de cuatro hidroperóxidos (8-, 10-, 12- y 14-OOH), cada uno con dos dobles enlaces aislados. La proporción de estos hidroperóxidos es alrededor del 4% del total (Belitz y Grosch, 1997).

Los hidroperóxidos, en presencia de iones o complejos de metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} , originan los radicales alcoxilo, que pueden sufrir una escisión β

y formar un aldehído (**Esquema 8**). El hexanal es el producto secundario más abundante (**Tabla 13**) formado a partir de la oxidación del ácido linoleico, por la vía de escisión β - del 13-hidroperóxido (Belitz y Grosch, 1997).



Esquema 8. Generación del hexanal durante la escisión β del 13-hidroperóxido del ácido linoleico.

3.1.2 Antioxidantes

Tal como se mencionó en el **Capítulo 1**, un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, inhibe o previene la oxidación de este sustrato”. El término “sustrato oxidable” incluye moléculas de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Halliwell, 1990).

3.1.2.1 Clasificación de antioxidantes

De acuerdo con su mecanismo de protección contra la autooxidación lipídica, los antioxidantes se clasifican en los siguientes grupos: (1) antioxidantes primarios o de rompimiento de cadena y (2) antioxidantes secundarios o preventivos.

Tabla 13. Concentración ($\mu\text{g/g}$) de compuestos carbonílicos volátiles formados por autooxidación de ácidos grasos insaturados^a.

Ácido oleico		Ácido linoleico		Ácido linolénico	
Heptanal	50	Pentano	+ ^c	Propanal ^b	
Octanal	320	Pentanal	55	Pent-1-en-3-ona	30
Nonanal	370	Hexanal	5100	(E)-But-2-enal	10
Decanal	80	Heptanal	50	(E)-Pent-2-enal	35
(E)-Dec-2-enal	70	(E)-Hept-2-enal	450	(Z)-Pent-2-enal	45
(E)-Undec-2-enal	85	Octanal	45	(E)-Hex-2-enal	10
		Oct-1-en-3-ona	2	(E)-Hex-3-enal	15
		Oct-1-en-3-hidroperóxido	+ ^c	(Z)-Hex-3-enal	90
		(Z)-Oct-2-enal	990	(E)-Hept-2-enal	5
		(E)-Oct-2-enal	420	(E,Z)-Hepta-2,4-dienal	320
		(Z)-Non-3-enal	30	(E,E)-Hepta-2,4-dienal	70
		(E)-Non-3-enal	30	(Z,Z)-Octa-2,4-dienal	20
		(Z)-Non-2-enal	+ ^c	(Z,Z)-Octa-3,5-dien-2-ona	30
		(E)-Non-2-enal	30	(Z)-Octa-1,5-dien-3-ona	+ ^c
		(Z)-Dec-2-enal	20	(Z)-Octa-1,5-dien-3-hidroperóxido	+ ^c
		(E,E)-Nona-2,4-dienal	30	(E,Z)-Nona-2,6-dienal	10
		(E,Z)-Deca-2,4-dienal	250	(E,Z,Z)-Deca-2,4,7-trienal	85
		(E,E)-Deca-2,4-dienal	150		
		(E)-4,5-Epoxi-(E)-dec-2-enal	+ ^c		

^aDe cada ácido graso, a 20°C, se autooxida 1 g hasta el consumo de 0,5 mol de oxígeno por mol de ácido graso. ^bPrincipal producto de la autooxidación. ^cDetectado, pero no cuantificado. Fuente: Belitz y Grosch, 1997.

Algunos antioxidantes exhiben más de un mecanismo de acción, de manera que se conocen como antioxidantes de función múltiple (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios también se conocen como antioxidantes Tipo 1 o antioxidantes de rompimiento de cadena. Debido a su naturaleza química, estas moléculas actúan como aceptores de radicales libres y retardan o inhiben el paso de iniciación, o interrumpen el paso de propagación, de la autooxidación (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Los antioxidantes primarios (AH) son capaces de donar un átomo de hidrógeno a los radicales lipídicos ($R^\bullet$), peroxilo ($ROO^\bullet$) y alcoxilo ($RO^\bullet$) para convertirlos en productos no radicalarios (**Esquema 9, Ecuaciones 3.8, 3.9 y 3.11**). Los radicales de los antioxidantes generados ($A^\bullet$) tienen muy baja reactividad hacia los lípidos insaturados y hacia el oxígeno; de manera que son menos susceptibles de participar en las reacciones de propagación, a menos que estén presentes en cantidades elevadas (Wanasundara y Shahidi, 2005).



Esquema 9. Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios. “AH” es una molécula de antioxidante.

La reacción de los antioxidantes con los radicales peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$) detiene la propagación en cadena, y la reacción con los radicales alcoxilo ($\text{RO}^\bullet$) disminuye la descomposición de hidroperóxidos (Wanasundara y Shahidi, 2005). De esta manera, se evita la generación de productos tales como el hexanal.

La mayoría de antioxidantes primarios son mono- o polihidroxifenoles con varias sustituciones en el anillo. La efectividad de los antioxidantes está influenciada por las propiedades químicas de los compuestos incluyendo las energías de enlace de hidrógeno, la deslocalización por resonancia y la susceptibilidad a la autooxidación. El radical antioxidante formado se estabiliza por la deslocalización de un electrón desapareado alrededor del anillo fenólico para formar un híbrido estable por resonancia (**Figura 9**) (Wanasundara y Shahidi, 2005).

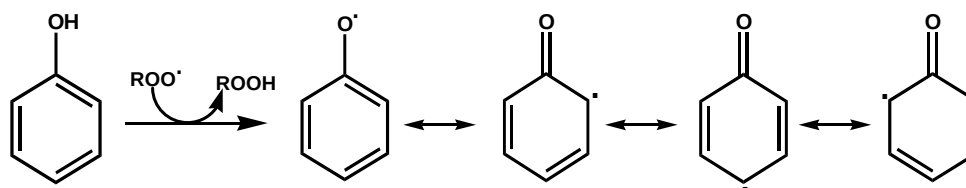


Figura 9. Estructuras de resonancia de radicales fenoxilo originados a partir de antioxidantes fenólicos.

Los radicales de antioxidantes participan en reacciones de terminación de la autooxidación, con radicales peroxilo (**Ecuación 3.10**), radicales alcoxilo (**Ecuaciones 3.12**) y radicales de antioxidantes (**Ecuación 3.13**). Los antioxidantes primarios pueden inactivar por lo menos dos radicales, uno durante la interacción con los radicales peroxilo o alcoxilo (**Ecuaciones 3.9 y 3.11**) y otro, en la reacción de terminación con otro radical peroxilo o alcoxilo (**Ecuaciones 3.10 y 3.12**) (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Varios compuestos fenólicos sintéticos, así como naturales, actúan por medio del mecanismo de antioxidantes primarios. La sustitución con un grupo(s) donador de electrones en las posiciones *orto* y/o *para* con respecto al grupo hidroxilo del fenol incrementa la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos por efecto inductivo, como en los casos del 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA) y la 2-*terc*-butil-*p*-hidroquinona (TBHQ). En la **Tabla 14**, se muestran otros antioxidantes primarios comúnmente usados en grasas y aceites y en alimentos que contienen lípidos (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Tabla 14. Antioxidantes primarios usados comúnmente en alimentos.

Naturales	Sintéticos
Carotenoides	BHA
Flavonoides	BHT
Ácidos fenólicos	Galato de propilo
Tocoferoles y tocotrienoles	<i>terc</i> -Butilhidroquinona
	Etoxiquina

Antioxidantes secundarios

Se conocen, también, como antioxidantes preventivos o antioxidantes Tipo 2. Ellos disminuyen la velocidad de las reacciones de oxidación mediante varios mecanismos. Su principal diferencia con los antioxidantes primarios es que no convierten los radicales libres en moléculas estables, sino que actúan como agentes quelantes de iones metálicos prooxidantes, proporcionan hidrógeno a los antioxidantes primarios o descomponen los hidroperóxidos a especies no radicalarias. Algunos antioxidantes secundarios son los ácidos cítrico, málico, succínico y tartárico (Wanasundara y Shahidi, 2005).

3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1 Reactivos

Se utilizó aceite de soya marca Oleo Sano, envasado y comercializado por Grasas de Colombia S.A.S. (Valle del Cauca, Colombia), adquirido en un supermercado local. En su información nutricional, se reportan 6 g de ácidos grasos Omega 6, por cada 10 mL de aceite. Se emplearon acetona (99,9%), etanol (99,9%), metanol (99,9%), dodecilsulfato de sodio (>99%) y trifluoruro de boro al 20% en metanol, proveídos por Merck (Darmstadt, Alemania). La pentaflúorfenilhidracina (97%), el hexanal (98%), el α -tocoferol (97%) y el BHT se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Se usó agua Tipo I obtenida mediante un equipo purificador *Synergy UV*, suministrado por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

3.2.2 Extractos

Se utilizaron los extractos acetónicos de mora fresca de Castilla y de cáscara fresca de plátano Hartón, obtenidos, según está descrito en las **Secciones 2.2.1, 2.2.3 y 2.2.8**. Se emplearon los extractos acetónicos aislados del material vegetal fresco, ya que presentaron valores de capacidad antioxidante más altos que los obtenidos con los otros disolventes y con el material vegetal liofilizado (**Tablas 8 y 9**). Se usaron los extractos, después de su limpieza y concentración por SPE, debido a su mayor capacidad antioxidante, comparada con la de los extractos no sometidos a SPE (**Sección 2.3.2**).

3.2.3 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de soya utilizado

Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) del aceite de soya, con base en la norma ISO 12966-2:2011 (*International Organization for Standardization*, 2011), de la siguiente manera: se introdujo aceite

de soya (60 mg) en un tubo de ensayo y se agregó solución de trifluoruro de boro en metanol (5 mL), la mezcla se sometió a calentamiento a 90°C, en baño de aceite mineral, con agitación magnética, durante 1 h. Posteriormente, la mezcla se retiró del baño, se dejó reposar durante 5 min y se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con heptano (1 mL x 3 veces) agitando en un vórtice IKA (Wilmington, NC, EE.UU.), a 1800 rpm, durante 30 s. Finalmente, se tomó el extracto orgánico (500 µL) y se aforó con heptano a 1 mL.

El análisis de los FAME se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N (Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un inyector automático HP-7683, operado en el modo *split* (51:1), a 250°C. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida DB-23 de 60 m, L x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, d_f , con fase estacionaria de 50%-cianopropil-poli(dimetilsiloxano). La temperatura del horno de la columna se programó desde 130°C (1 min), hasta 170°C @ 6,5°C/min y, posteriormente, a 215°C @ 2,8°C/min (20 min), finalmente se elevó a 230°C @ 40°C/min (3 min). Como gas de arrastre se usó helio a 1 mL/min (99,995%, Linde S.A., Bucaramanga, Colombia). Se empleó un detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés), cuya temperatura se mantuvo a 270°C. Los flujos de aire e hidrógeno para el FID fueron 300 y 30 mL/min, respectivamente, como gas auxiliar se usó nitrógeno, con un de flujo de 30 mL/min. Los datos obtenidos durante el análisis se procesaron mediante el *software* HP *ChemStation* Rev. A. 05.01 [273].

La identificación de los FAME se realizó por comparación de sus tiempos de retención (t_R), con los de una mezcla de estándares certificados analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. La cantidad relativa (%) de los FAME se determinó mediante normalización por áreas.

3.2.4 Preparación de emulsiones

Se preparó una solución acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) al 0,5% (p/v). Se pesó cada extracto (2 mg), en tubos cónicos de 1,5 mL de polipropileno (BRAND, Wertheim, Alemania), se agregó solución de SDS (50 μ L), la mezcla se agitó en vórtice, a 2500 rpm durante 1 min, para disolver los extractos. A partir de estas soluciones, se hicieron diluciones en SDS (50 μ L). En cada dilución, se agregó aceite de soya (200 μ L); la mezcla se agitó en vórtice, a 2500 rpm, durante 10 min. Las concentraciones de extracto en los 250 μ L de emulsión fueron 0,01; 0,02; 0,05 y 0,10% p/v. Este rango se determinó con base en las concentraciones máximas, de BHT y BHA en alimentos, permitidas por el INVIMA (Ministerio de Salud, 1991) y en las concentraciones de BHT y BHA utilizadas en productos cosméticos (Carbajo y col., 2006).

Para evaluar el efecto protector del BHT y del α -tocoferol, se pesó cada sustancia (2 mg) y se disolvió en aceite de soya (50 μ L), agitando en vórtice a 2500 rpm durante 1 min. A partir de estas soluciones, se hicieron diluciones en aceite de soya. Posteriormente, se agregó cada dilución (200 μ L) a la solución de SDS (50 μ L); la mezcla se agitó en vórtice a 2500 rpm, durante 10 min. Las concentraciones de BHT y de α -tocoferol, en los 250 μ L de emulsión, fueron las mismas evaluadas para los extractos.

Las emulsiones así preparadas, permanecieron estables durante el estudio. Los blancos de reacción, en todos los casos, se prepararon adicionando aceite de soya (200 μ L) a la solución de SDS (50 μ L) con posterior agitación en vórtice, a 2500 rpm, durante 10 min.

3.2.5 Inducción del deterioro oxidativo

Para inducir el deterioro oxidativo, se utilizó un reactor, diseñado en el Laboratorio (CIBIMOL) durante el trabajo de Maestría de Contreras (2002), que consta de un refrigerante y seis lámparas fluorescentes F6T5BLB, de 16*225,1 mm y 6 Watt de potencia (**Figura 10a**). Las lámparas emiten luz a 334, 365, 405 y 436 nm, aproximadamente (Tafurt, 2003), es decir, en las regiones ultravioleta-A (UVA) y visible cercano del espectro electromagnético. Los tubos cónicos, que contenían las emulsiones, se dispusieron, de forma circular, en la región intermedia entre el refrigerante y las lámparas. El reactor se conectó a un baño termostataado a 4°C (**Figura 10b**) y la irradiación se llevó a cabo durante 12 h.

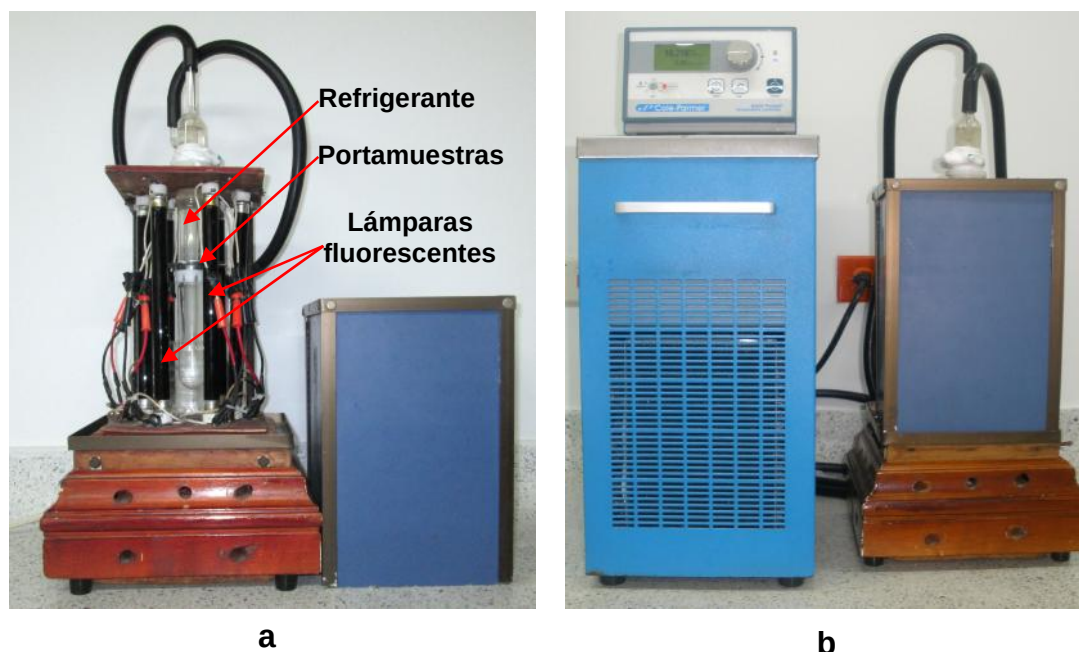


Figura 10. Reactor UVA-Vis utilizado en la inducción de la oxidación lipídica de las emulsiones. Fotografías tomadas por la autora el 3 de julio de 2013, en CENIVAM.

3.2.6 Monitoreo del derivado hidrazónico del hexanal

El hexanal, producto final mayoritario de la oxidación del ácido linoleico contenido en el aceite de soya, se extrajo, en forma de su derivado hidrazónico, mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés). Se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano:divinilbenceno (PDMS/DVB), que se expuso a los vapores de una solución de pentaflúorfenilhidracina de 500 ppm, durante 10 min. Simultáneamente, la muestra a analizar, se acondicionó a 40°C en un baño de agua. Posteriormente, la fibra activada con el agente derivatizante se expuso a los vapores de la emulsión durante 40 min, tiempo después del cual la fibra se desorbió, durante 10 min, en el puerto de inyección del cromatógrafo, a 250°C (Stashenko y col., 2000).

Se utilizó un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* HP 6890 *Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.), dotado de un microdetector de captura de electrones (μ -ECD, ^{63}Ni). Se empleó una columna HP-5, 50 m, L x 0,2 mm, D.I. x 0,33 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). Las temperaturas del inyector y detector permanecieron a 250 y 280 °C, respectivamente. La temperatura del horno de la columna se programó desde 100 °C (5 min) @ 10 °C/min hasta 250 °C (2 min). Se utilizaron helio (99,995%, Linde Colombia S.A., Bucaramanga), como gas de arrastre, con flujo en la columna de 1 mL/min (70 °C), y una mezcla de argón-metano (9:1), como gas auxiliar en el μ -ECD, con flujo de 20 mL/min (Stashenko y col., 2000).

3.2.7 Determinación del efecto protector

El efecto protector de los extractos de mora de Castilla, de cáscara de plátano Hartón y de los antioxidantes comerciales, se calculó con base en el hexanal generado, empleando la **Ecuación 3.14** (Stashenko y col., 2002).

$$AAO\% = \frac{[A_0 - A_a]}{A_0} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

Donde:

A_0 = Área del pico cromatográfico del derivado hidrazónico del hexanal en los blancos;

A_a = Área del pico cromatográfico del derivado hidrazónico del hexanal en las emulsiones con BHT, α -tocoferol o extracto añadido.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Composición en ácidos grasos del aceite de soya utilizado

El ácido graso mayoritario en el aceite de soya utilizado para preparar las emulsiones fue el ácido linoleico, seguido del ácido oleico (**Tabla 15**). El porcentaje de ácidos grasos insaturados fue de 81,2%, y de ácidos grasos saturados de 16,4%. Esto indicó que este aceite era adecuado para evaluar el efecto protector de los extractos, debido a que el contenido del ácido linoleico daría lugar a la formación de hexanal durante su oxidación inducida.

3.3.2 Efecto protector de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón en emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación UVA-Vis.

En la **Tabla 16**, se observan los resultados obtenidos en la determinación de la inhibición de la oxidación lipídica de emulsiones de aceite en agua, mediante el uso de extractos de mora de Castilla, de cáscara de plátano Hartón y de antioxidantes comerciales. En la **Figura 11**, se muestran los cambios en el pico cromatográfico del hexanal, medido en forma de su derivado hidrazónico,

generado en las emulsiones sin y con adición de antioxidantes en las concentraciones con las que presentaron los efectos protectores más altos. En el **Anexo A**, se observan perfiles cromatográficos típicos de la solución del agente derivatizante (PFPH), del aceite de soya utilizado, de emulsiones sin y con irradiación sin antioxidante agregado.

Tabla 15. Composición de ácidos grasos en el aceite de soya utilizado.

Ácido graso	Área normalizada, %*
Mirístico (C14:0)	0,098 ± 0,004
Pentadecanoico (C15:0)	0,020 ± 0,002
Palmítico (C16:0)	11,7 ± 0,4
Palmitoleico (C16:1)	0,099 ± 0,004
Heptadecanoico (C17:0)	0,094 ± 0,003
Esteárico (C18:0)	3,8 ± 0,1
Oleico (C18:1n9)	21,9 ± 0,4
Linoleico (C18:2n6)	52,7 ± 0,4
Linolénico (C18:3n3)	6,3 ± 0,1
Araquídico (C20:0)	0,31 ± 0,02
Eicosenoico (C20:1n9)	0,192 ± 0,005
Behénico (C22:0)	0,31 ± 0,02
Total	97,6 ± 0,3

*Promedio ± desviación estándar ($n=3$).

Si se comparan los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la concentración de extractos o de sustancias de referencia, se puede observar, que los extractos de mora de Castilla presentaron efectos protectores contra la oxidación lipídica más altos que los de los extractos de cáscara de plátano Hartón o que los de los antioxidantes comerciales, BHT y α -tocoferol, para todas las concentraciones evaluadas (**Tabla 16**).

Tabla 16. Efecto protector de extractos de mora de Castilla, de cáscara de plátano Hartón y de antioxidantes comerciales, medido en la oxidación lipídica de emulsiones de aceite en agua.

Extracto o sustancia de referencia		Inhibición de la producción de hexanal, %*			
		Antioxidante en la emulsión (% p/v)			
		0,01	0,02	0,05	0,10
Mora	Rosas Rojas	23,6 ± 0,5	39,1 ± 0,7	55 ± 2	48,5 ± 0,4
	La Estancia	20,8 ± 0,4	25,90 ± 0,06	43 ± 3	44,3 ± 0,3
Plátano	El Prado	8,5 ± 0,3	13,6 ± 0,4	34 ± 1	36,8 ± 0,6
	Guatiguará	6,53 ± 0,07	9,7 ± 0,3	25,3 ± 0,2	29 ± 1
BHT		16,5 ± 0,5	19,63 ± 0,02	22,6 ± 0,3	25,6 ± 0,3
α-Tocoferol		12,1 ± 0,2	18,3 ± 0,7	19,3 ± 0,5	23,2 ± 0,2

*Promedio ± desviación estándar (n=3).

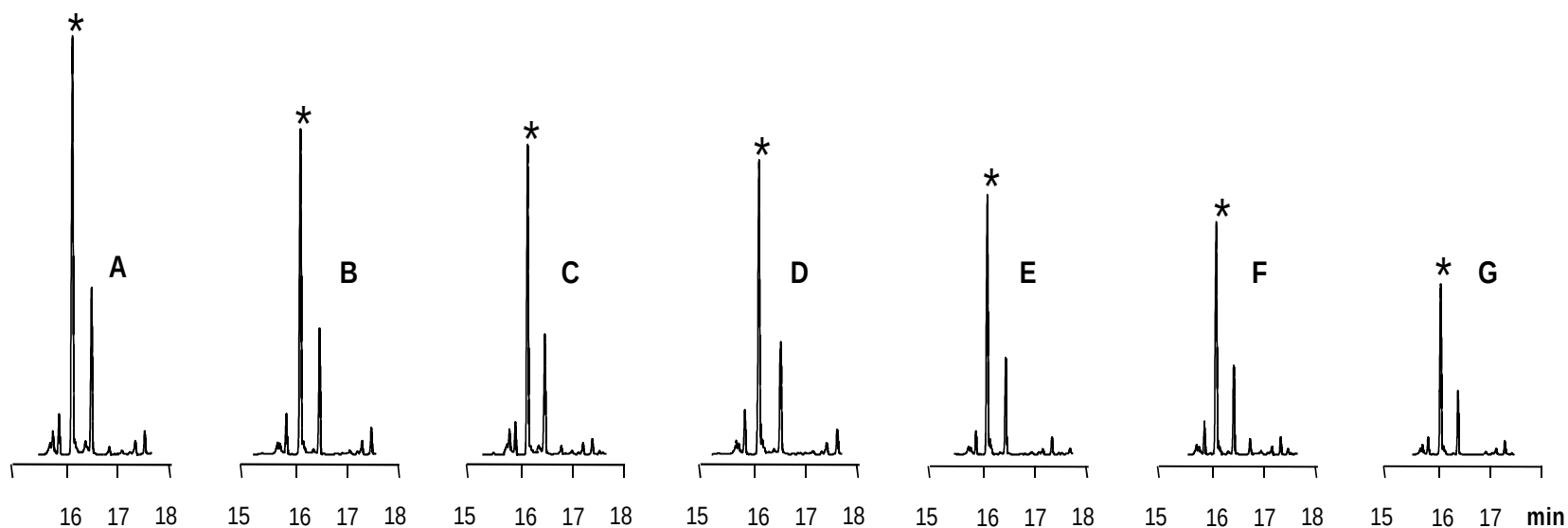


Figura 11. Pico cromatográfico del hexanal, medido como su derivado hidrazónico, generado en emulsiones de aceite en agua sometidas a radiación UVA-Vis, en presencia de antioxidantes comerciales, extractos de cáscara de plátano Hartón y de mora de Castilla, adicionados en las concentraciones con las que presentaron los efectos protectores más altos. *Derivado hidrazónico del hexanal. **A.** Emulsión sin antioxidante agregado (Blanco). Emulsión en presencia de: **B.** α -tocoferol (0,10%, p/v). **C.** BHT (0,10%, p/v). **D.** Extracto de cáscara de plátano Hartón procedente de la granja Guatiguará (0,10%, p/v). **E.** Extracto de cáscara de plátano Hartón recolectado en la finca El Prado (0,10%, p/v). **F.** Extracto de mora de Castilla procedente de la finca La Estancia (0,05%, p/v). **G.** Extracto de mora de Castilla recolectada en la finca Rosas Rojas (0,05%, p/v). Los porcentajes de protección se muestran en la **Tabla 16.**

Los porcentajes de protección más altos presentados por los extractos de mora, respecto a los observados con los extractos de cáscara de plátano, concuerdan con los resultados reportados en la **Sección 2.3.2**, donde se observa que los extractos de mora mostraron valores de capacidad antioxidante (ORAC y ABTS⁺), y de contenido de compuestos fenólicos, más altos, que los de los extractos de cáscara de plátano. Además, los extractos de mora contienen antocianinas, que también contribuyen a su capacidad antioxidante, mientras que los de cáscara de plátano, eventualmente, no poseen estos compuestos (**Tabla 10**).

Los grados de protección más altos, obtenidos con los extractos de mora, en comparación con los de los del BHT y del α -tocoferol, se deben probablemente a la presencia en los extractos de mora de elagitaninos y antocianinas (Wang y col., 1997; Mertz y col., 2007; Garzón y col., 2009; Acosta-Montoya y col., 2010), compuestos fenólicos capaces de estabilizar radicales mediante la donación de átomos de hidrógeno.

Los extractos de mora procedente de la finca Rosas Rojas presentaron efectos protectores mayores que los obtenidos con mora recolectada en la finca La Estancia, esto se debe, posiblemente, a que la mora, cosechada en la finca Rosas Rojas, es un cultivar nativo, con espinas, mientras que la adquirida en la finca La Estancia, es un cultivar sin espinas. En otros estudios, también, se han encontrado valores de capacidad antioxidante más altos con cultivares nativos (Reyes-Carmona y col., 2005; Tavares y col., 2013).

El extracto de mora, cosechada en la finca Rosas Rojas, presentó el porcentaje de inhibición más alto ($55 \pm 2\%$) para la concentración de 500 ppm (0,05%, p/v). Este grado de protección fue similar al encontrado por Zapata y col. (2014), quienes evaluaron el uso de Noxy-Nat[®], un producto comercial reportado como antioxidante natural de romero, contra el deterioro oxidativo del aceite de palma, usando los métodos del índice de peróxido y del porcentaje de compuestos

polares totales, y obtuvieron un porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica del 59%, en la concentración de 1000 ppm (0,10%, p/v).

Arrazola y col. (2013), encontraron grados de protección, contra la oxidación lipídica de la mantequilla, iguales a los del BHA, con extractos etanólicos de mango, variedad Jobo, en la concentración de 1000 ppm (0,10%, p/v).

En nuestro trabajo, los extractos de cáscara de plátano procedente de la finca El Prado, ofrecieron porcentajes de inhibición de la oxidación lipídica, más altos que los conseguidos con los extractos de cáscara de plátano recolectado en la finca Guatiguará, posiblemente, debido a su mayor contenido de compuestos fenólicos (**Tabla 10**). Los extractos de cáscara de plátano, cosechado en las dos fincas, presentaron valores de capacidad antioxidante más altos que los del BHT y del α -tocoferol, en las concentraciones de 0,05 y 0,10%, p/v (500 y 1000 ppm). Esto puede atribuirse, a la presencia de dopamina en estos extractos, según Kanazawa y Sakakibara (2000) la dopamina presentó mayor capacidad, que el BHT y el BHA, para atrapar el radical DPPH*.

Los resultados obtenidos en esta investigación, sugieren que los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, podrían utilizarse como antioxidantes naturales, alternativos a los antioxidantes comerciales, BHT y α -tocoferol. Con esto, se le daría un nuevo uso a la mora y a las cáscaras de plátano, éstas últimas consideradas productos de desecho agroindustrial.

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que:

Los extractos de mora de Castilla protegieron las emulsiones de aceite en agua, contra el deterioro oxidativo ocasionado por la radiación UVA-Vis, en mayor grado que el BHT y el α -tocoferol, en las concentraciones evaluadas en el intervalo de 0,01-0,10% (p/v).

Los extractos de cáscara de plátano Hartón presentaron mayor efecto protector, contra la oxidación lipídica, que los antioxidantes comerciales, en las concentraciones de 0,05 y 0,10% (p/v).

3.4 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Resultados parciales presentados en este capítulo se divulgaron de la siguiente manera:

Póster

Jennifer Pilar Rojas Llanes; Jairo René Martínez Morales; Elena E. Stashenko. Monitoreo del derivado hidrazónico del hexanal, por SPME-GC-ECD, en emulsiones expuestas a radiación ultravioleta con extractos de mora de Castilla agregados como posibles antioxidantes. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines -COLACRO- 2014 y 7° Congreso Colombiano de Cromatografía -COCOCRO- 2014. Cartagena de Indias, Colombia, 29 de septiembre - 3 de octubre de 2014.

4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN, MEDIANTE EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS^{••} ACOPLADO A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante utilizados en los capítulos anteriores, a saber, la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la decoloración del catión-radical ABTS^{••} y la inhibición de la oxidación lipídica, proporcionan información sobre la capacidad antioxidante total de los extractos, pero, no evalúan la capacidad antioxidante de los compuestos individuales presentes en la muestra.

La identificación de los componentes, que le confieren la capacidad antioxidante a una mezcla, según la metodología tradicional, requiere el fraccionamiento de la mezcla usando diferentes disolventes y el aislamiento de los compuestos activos, utilizando técnicas tales como cromatografía en columna de adsorción, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) preparativa o cromatografía en contra-corriente de alta velocidad (HSCCC, por sus siglas en inglés), seguido de los ensayos de actividad (Robards, 2003).

Los ensayos de fraccionamiento consumen tiempo, son laboriosos y costosos. Además, algunas veces se puede generar pérdida de actividad durante el proceso de aislamiento y purificación, debido a la dilución o a la descomposición de los analitos (Robards, 2003). Por esto, el desarrollo de un método más eficiente para la identificación de compuestos activos en mezclas complejas se hizo necesario (Shi y col., 2009).

Se han implementado ensayos de actividad poscolumna, en línea, con métodos de separación, tales como HPLC con detección de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés), para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos asociados con los picos cromatográficos. Estos métodos se conocen con el nombre de tamizaje de alta resolución (HRS, por sus siglas en inglés). En estos sistemas, los componentes de la muestra, después de ser separados e identificados por el HPLC-DAD, se mezclan con un radical, proveniente de un reservorio conectado a una segunda bomba. La mezcla pasa por una bobina de reacción y, posteriormente, por otro detector espectrofotométrico. Los antioxidantes les transfieren electrones a los radicales y son detectados como picos negativos por la disminución en la absorbancia de los radicales, debido a su reducción (Nierderländer y col., 2008; Shi y col., 2009).

En los ensayos más ampliamente usados, se utilizan el radical coloreado, relativamente estable, 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH[•]), y el catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}). El DPPH[•] absorbe en la región visible del espectro con una longitud de onda máxima de 517 nm, mientras que el ABTS^{•+} tiene tres máximos de absorción, a $\lambda = 414, 600$ y 734 nm. Se ha encontrado, que el ensayo con el ABTS^{•+} es más sensible que la reacción con el DPPH[•] (Koleva y col., 2001) y ofrece mayor estabilidad, cuando se usa el gradiente de la fase móvil (Kusznereiwicz y col., 2011).

En el presente capítulo, se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de un método para la determinación, por HPLC, de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en extractos naturales, utilizando el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, y su aplicación para el análisis de los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

4.1 MARCO TEÓRICO

4.1.1 Determinación por HPLC de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

El acoplamiento entre el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} y el HPLC, es una herramienta analítica relativamente reciente; el primer estudio se reportó en el año 2001 y, desde entonces, se han publicado 31 artículos sobre el tema. En los años 2010 y 2014, se presentó el mayor número de publicaciones (6) sobre esta técnica (**Figura 12**).

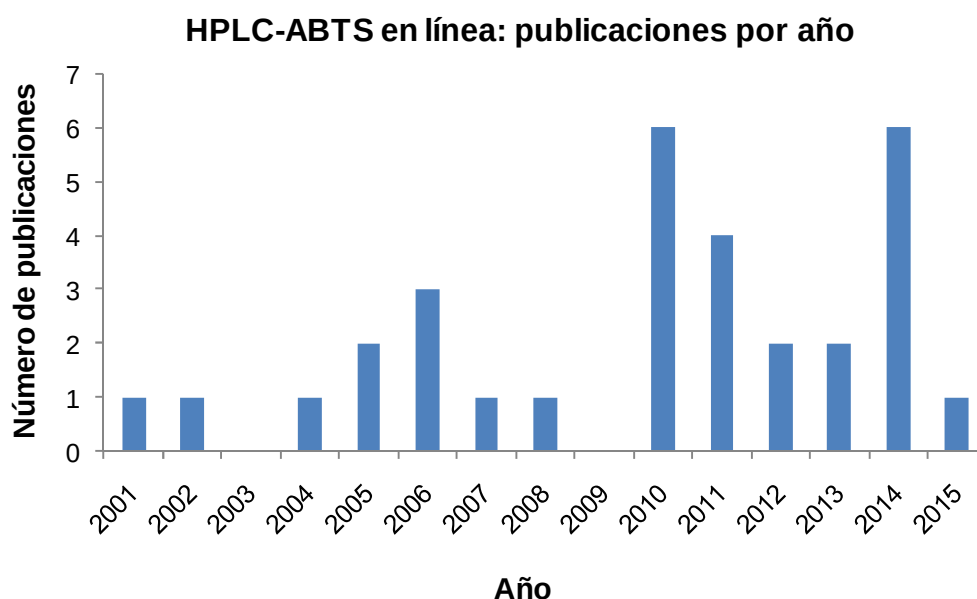


Figura 12. Número de publicaciones sobre HPLC-ABTS en línea, en función del tiempo. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 2001-2015. Fecha de consulta: 19 de julio de 2015. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("On-line HPLC-ABTS")*.

En estos sistemas, el eluato del HPLC se mezcla con la solución de catión-radical ABTS^{•+}, proveniente de un reservorio conectado a una segunda bomba. La mezcla

reacciona en una bobina y, los compuestos, capaces de donarle electrones al $\text{ABTS}^{+\bullet}$, se registran como picos “negativos”, debido a que la absorbancia del $\text{ABTS}^{+\bullet}$ disminuye como consecuencia de su neutralización (**Figura 13**).

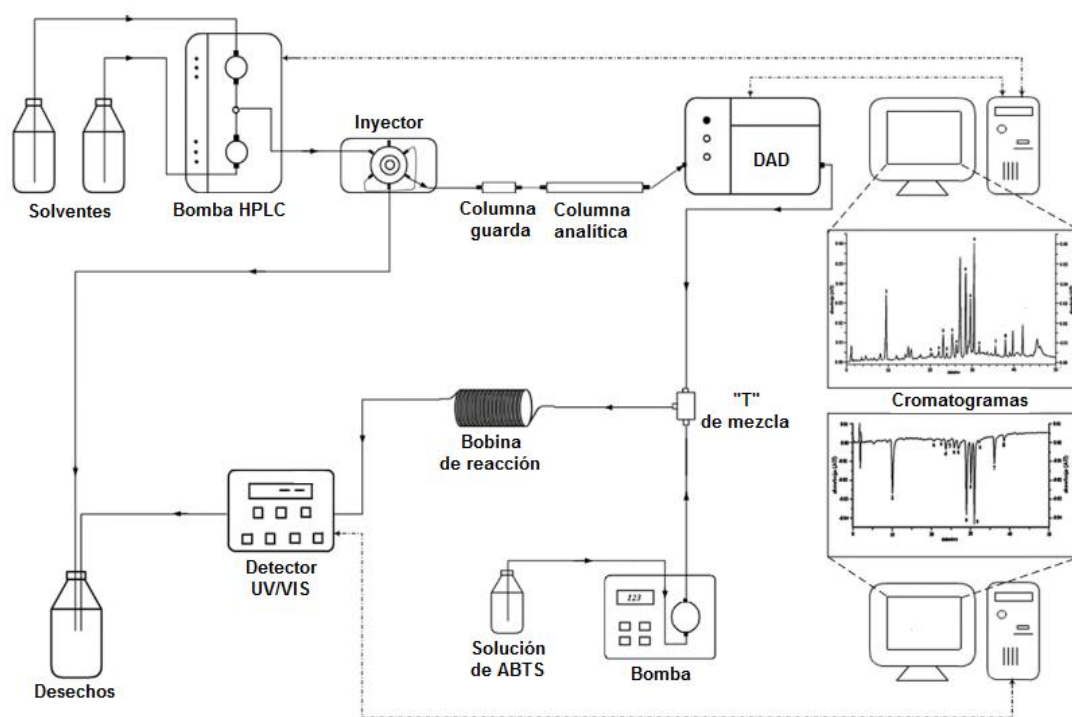


Figura 13. Sistema HPLC en línea con el ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Fuente: Raudonis y col. 2010.

Los autores difieren en la manera de preparar el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, en su concentración, y en el tiempo de reacción. Parámetros operacionales tales como la concentración de la solución de trabajo del $\text{ABTS}^{+\bullet}$ y los flujos del HPLC y de la bomba que impulsa el catión-radical, influyen directamente en la concentración de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ que reacciona con el eluato; estos flujos, junto con las dimensiones de la bobina, longitud (L) y diámetro interno (D.I.), determinan el tiempo de reacción (Raudonis y col., 2010).

Koleva y col. (2001), fueron los primeros en desarrollar un método en línea por el HPLC, para identificar los compuestos con capacidad antioxidante en mezclas complejas, usando el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Los autores disolvieron el ABTS (2,0 mM) en *buffer* fosfato salino (PBS, 8,0 mM, pH 7,4) y agregaron persulfato de potasio (300 μM) para producir el $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Con el propósito de obtener una máxima conversión de ABTS en $\text{ABTS}^{+\bullet}$, la mezcla se almacenó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 16-17 h, antes de usar. La solución de trabajo se preparó en una solución de metanol (10%, v/v) en PBS.

Koleva y col. (2001), encontraron que se podían llevar a cabo corridas isocráticas y en gradiente, con fases móviles de diferente composición (0-100% de solvente orgánico), y esto no afectaba la absorbancia del $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Estos autores operaron el HPLC a un flujo de 0,8 mL/min y usaron un flujo de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ de 0,5 mL/min. Con estos flujos, utilizaron una solución de trabajo de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ 5,5 μM , de manera que su concentración en el reactor fue 2,1 μM .

Con el propósito de proporcionar el tiempo suficiente para que todos los compuestos pudieran reaccionar con el $\text{ABTS}^{+\bullet}$, Koleva y col. (2001), fijaron 30 s para la reacción. Con base en el flujo total del sistema (1,3 mL/min), este tiempo se logró con una bobina de 13,7 m, L x 0,25 mm, D.I.

Koleva y col. (2001), determinaron figuras analíticas de mérito para el Trolox[®], eugenol, isoeugenol, ácido rosmarínico, ácido ascórbico, rutina, quercetina, glutatión, BHT y α -tocoferol y, analizaron extractos de plantas del género *Sideritis* y de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*). La capacidad antioxidante se determinó con base en una curva de calibración con Trolox[®].

Cano y col. (2002), reportaron el uso de un método cromatográfico en línea con el ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, para el análisis de compuestos

polares, e.g., el ácido ascórbico, y de antioxidantes no polares, no fenólicos, como el licopeno, en jugos cítricos y de tomate, respectivamente. Estos autores obtuvieron el $ABTS^{+\bullet}$ mediante la reacción durante 2 min, de ABTS (2,0 mM), peróxido de hidrógeno (30 μ M) y la enzima peroxidasa de rábano picante (0,25 μ M), en *buffer* fosfato de sodio (50 mM, pH 7,5). La concentración de la solución de trabajo de $ABTS^{+\bullet}$ fue 200 μ M, impulsada a un flujo de 0,3 mL/min en el caso del análisis de los compuestos polares, y a un flujo de 0,5 mL/min, para el estudio de capacidad antioxidante de los compuestos no fenólicos. El flujo del HPLC se estableció de tal manera, que el flujo total, en todos los casos, fuera de 1 mL/min. Por lo tanto, las concentraciones de $ABTS^{+\bullet}$ en el reactor fueron 60 y 100 μ M, para el análisis de los compuestos polares y no polares, respectivamente.

Cano y col. (2002), utilizaron una bobina de 2,5 m, L x 0,7 mm, D.I., de modo que el tiempo de reacción, en todos los casos, fue de 1 min. Los autores resaltaron la importancia de este tiempo para lograr la reacción completa de los antioxidantes con el $ABTS^{+\bullet}$. Los datos se utilizaron de manera cuantitativa, para determinar la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), mediante la elaboración de curvas de calibración.

En la **Tabla 17**, se mencionan las condiciones experimentales que han utilizado otros autores para determinar la capacidad antioxidante de extractos, por HPLC, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$. Además de estos trabajos, Pérez-Bonilla y col. (2006), Stalmach y col. (2006), He y col. (2011), Kim y Um, (2011) y Li y col. (2012), también han empleado esta técnica.

La búsqueda cienciométrica, en *Scopus (Elsevier)*, sobre el estudio de extractos de mora o de cáscara de plátano empleando el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ en línea con el HPLC no mostró registros.

Tabla 17. Condiciones experimentales empleadas en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia.

Autores	Extractos	Condiciones experimentales
Exarchou y col. (2006)	<i>Tilia europea</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Utrica dioica</i> y <i>Lonicera periclymenum</i>	Solución <i>stock</i> de ABTS ^{•+} : reacción de ABTS (2,0 mM) y persulfato de potasio (0,3 mM) en <i>buffer</i> fosfato salino (PBS, 8,0 mM, pH 7,4). Solución de trabajo de ABTS ^{•+} (160 µM): dilución de la solución <i>stock</i> con una mezcla de metanol y PBS (10:90, v/v). Flujos del HPLC y del ABTS ^{•+} : 0,6 mL/min. Concentración de ABTS ^{•+} en el reactor: 80 µM. Dimensiones de la bobina de reacción: 4,4 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 10 s.
Li y col. (2007)	<i>Angelica sinensis</i>	Solución <i>stock</i> de ABTS ^{•+} : mezcla de ABTS (7,0 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) en agua, durante 12 h, a 4°C, en la oscuridad. Solución de trabajo de ABTS ^{•+} : dilución de la solución <i>stock</i> en etanol hasta una absorbancia de aproximadamente 1,0 a $\lambda=750$ nm. Flujos del HPLC y del ABTS ^{•+} : 0,95 y 0,5 mL/min, respectivamente. Dimensiones de la bobina de reacción: 5 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 10 s.
He y col. (2010)	Frutos de gardenia (<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis)	Solución <i>stock</i> de ABTS ^{•+} : reacción de ABTS (2,0 mM) y persulfato de potasio (3,5 mM) en agua, durante 16 h, a temperatura ambiente, en la oscuridad. Solución de trabajo de ABTS ^{•+} : dilución de la solución <i>stock</i> en agua hasta una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$, a $\lambda=745$ nm. Flujos del HPLC y del ABTS ^{•+} : 0,8 y 0,5 mL/min, respectivamente. Dimensiones de la bobina de reacción: 15 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 34 s.

Tabla 17. (Continuación)

Autores	Extractos	Condiciones experimentales
Raudonis y col. (2010)	<i>Perilla frutescens</i> L.	Solución <i>stock</i> de ABTS⁺: mezcla de ABTS (2,0 mM) y persulfato de potasio (0,7 mM) en agua, durante 16-17 h, a temperatura ambiente. Solución de trabajo de ABTS⁺ (110 µM): dilución de la solución <i>stock</i> en agua. Flujos del HPLC y del ABTS⁺: 1 y 0,5 mL/min, respectivamente. Concentración de ABTS⁺ en el reactor: 37 µM. Dimensiones de la bobina de reacción: 15 m, L x 0,3 mm, D.I. Tiempo de reacción: 42 s. Figuras analíticas de mérito: Trolox[®], ácido rosmarínico, ácido cafeico y ácido clorogénico (cuatro compuestos).
McDermott y col. (2011)	Té verde, tomillo y jugo de arándano	Solución <i>stock</i> de ABTS⁺: reacción de ABTS (2,0 mM) y persulfato de potasio (0,3 mM) en PBS, durante 16-17 h, a temperatura ambiente. Solución de trabajo de ABTS⁺ (2,5 µM): dilución de la solución <i>stock</i> en mezcla de metanol y PBS (90:10, v/v). Flujos del HPLC y del ABTS⁺: 0,75 y 0,5 mL/min, respectivamente. Concentración de ABTS⁺ en el reactor: 1,5 µM. Dimensiones de la bobina de reacción: 15 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 44 s. Figuras analíticas de mérito: epicatequina, ácido rosmarínico, quercetina, ácido cafeico, ácido gálico y rutina (seis compuestos).
Gong y col. (2012)	Caléndula (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Solución <i>stock</i> de ABTS⁺: mezcla de ABTS (7,0 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) en agua, durante 16 h, a temperatura ambiente. Solución de trabajo de ABTS⁺: dilución de la solución <i>stock</i> en agua hasta una absorbancia de 0,70 ± 0,02, a λ=747 nm. Flujos del HPLC y de ABTS⁺: 0,7 mL/min. Dimensiones de la bobina de reacción: 15 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 44 s.

Tabla 17. (Continuación)

Autores	Extractos	Condiciones experimentales
Kolniak-Ostek y col. (2013)	Frutos y hojas de manzano (<i>Malus domestica</i> cv. Sampion)	Solución <i>stock</i> de ABTS^{•+}: reacción de ABTS (2,0 mM) y persulfato de potasio (0,7 mM) en agua, durante 16 h, en la oscuridad. Solución de trabajo de ABTS^{•+}: dilución de la solución <i>stock</i> en tres volúmenes de <i>buffer</i> fosfato de sodio, pH 8,0. Dimensiones de la bobina de reacción: 3 m, L x 0,51 mm, D.I. Tiempo de reacción: 30 s.
Xin y col. (2014)	Pimienta (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Solución <i>stock</i> de ABTS^{•+}: mezcla de ABTS (7,0 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) en agua, durante 12-16 h, a temperatura ambiente, en la oscuridad. Solución de trabajo de ABTS^{•+}: dilución de la solución <i>stock</i>, en agua, hasta una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$, a $\lambda=734$ nm. Flujos del HPLC y del ABTS^{•+}: 0,7 y 0,5 mL/min, respectivamente. Dimensiones de la bobina de reacción: 15 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 44 s.
Karaçelik y col. (2015)	<i>Viburnum opulus</i> L.	Solución de trabajo de ABTS^{•+}: reacción de ABTS (0,02 mM) y dióxido de manganeso (23 mM) en PBS, durante 10 min, a temperatura ambiente, en la oscuridad. Flujos del HPLC y del ABTS^{•+}: 0,5 y 0,8 mL/min, respectivamente. Concentración de ABTS^{•+} en el reactor: 12 μM Dimensiones de la bobina de reacción: 2,8 m, L x 0,25 mm, D.I. Tiempo de reacción: 6 s. Figuras analíticas de mérito: ácido gálico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido sirínico, epicatequina, vainillina, ácido <i>p</i>-hidroxicinámico, rutina, <i>trans</i>-resveratrol, quercetina y kaempferol (14 compuestos).

4.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Reactivos

Se utilizaron ácido acético (99,9%) y persulfato de potasio (97%), adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, 98%), Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97%), ácido gálico (99%), dopamina (99%), catequina (98%), ácido *p*-hidroxibenzoico (97%), epicatequina (97%), galato de epicatequina (98%), ácido *p*-cumárico (98%), ácido ferúlico (99%), ácido elágico (95%), quercetina (98%), naringenina (95%), kaempferol (90%), pinocembrina (95%), BHA (99%), BHT (99%) y el ácido carnósico (91%) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). La cianidina-3-glucósido (99%), cianidina-3-rutinósido (99%), pelargonidina-3-glucósido (99%), pelargonidina (99%), procianidina B1 (99%) y procianidina C1 (99%) se compraron a *PhytoLab* (Vestenbergsgreuth, Alemania). El agua Tipo I, se obtuvo mediante un equipo purificador *Synergy UV* adquirido de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

4.2.2 Desarrollo de un método por HPLC para la determinación de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

4.2.2.1 Equipos

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC), *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, EE.UU.) 1260 *Infinity*, acoplado a un derivatizador poscolumna *Pinnacle PCX*, de la casa fabricante *Pickering Laboratories* (Mountain View, CA, EE.UU.) (**Figura 14**).

El HPLC está conformado por un desgasificador de disolventes integrado en la bomba cuaternaria (G1311C), un inyector automático (G1329B), un

compartimiento termostatzado para las columnas (G1316A), un detector de arreglo de diodos (DAD, G1315D) y un detector de longitud de onda múltiple (MWD, G1365D), todos de *Agilent Technologies*.

El derivatizador consta de dos bombas de jeringa electrónicas, para flujos continuos; cada jeringa puede almacenar hasta 70 mL. Además, posee dos mezcladores, un reactor térmico de 1,4 mL (11,5 m, L x 0,4 mm, D.I.), cuya temperatura se puede ajustar de 30 a 130 °C, y un reactor a temperatura ambiente (**Figura 15**). El derivatizador cuenta con un sistema de suministro de nitrógeno, para proteger los reactivos, que pueden degradarse con el oxígeno, y con un compartimiento para una columna, cuya temperatura se puede ajustar de 30 a 75°C.

4.2.2.2 Condiciones del método cromatográfico acoplado al derivatizador

Inicialmente, en el HPLC, para la determinación simultánea de las antocianinas cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-glucósido y de la aglicona pelargonidina, en extractos de mora de Castilla, se desarrolló un método siguiendo el procedimiento de Pala y Toklucu (2011), con algunas modificaciones (**Tabla 18**).

Con el propósito de incluir en la misma corrida cromatográfica el Trolox[®], compuesto requerido para hacer la curva de calibración y determinar la capacidad antioxidante, y el BHT y el BHA, antioxidantes comerciales usados como referencia, fue necesario modificar el gradiente del método inicialmente establecido. Durante los cambios, se debía verificar la resolución de los picos cromatográficos a $\lambda=515$ nm, longitud de onda de máxima absorción de las antocianinas y antocianidinas, y a $\lambda=290$ nm, longitud de onda de máxima absorción de los otros compuestos.



Figura 14. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1260 acoplado al derivatizador *Pickering Pinnacle PCX*. Fotografía tomada por la autora el 3 de marzo de 2014, en CROM-MASS.

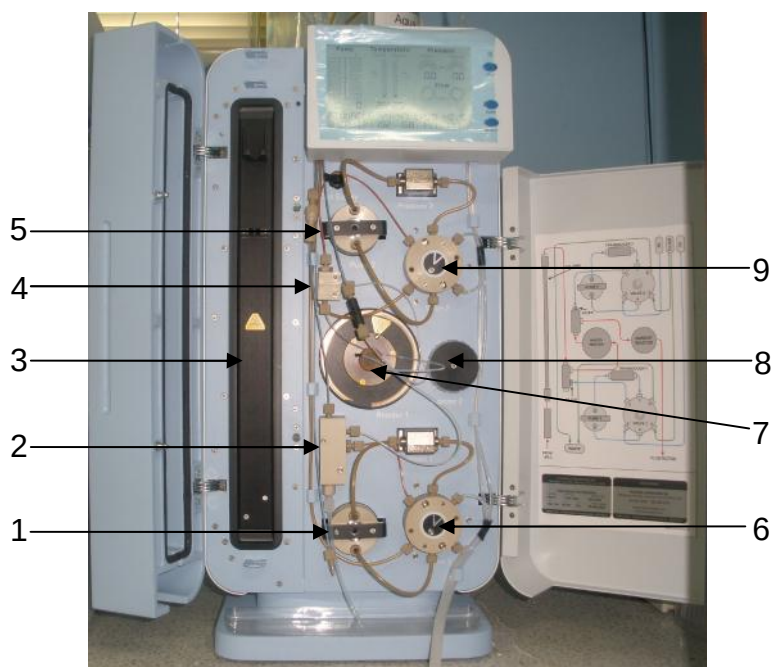


Figura 15. Derivatizador *Pickering Pinnacle PCX*. 1. Bomba 1. 2. Mezclador 1. 3. Compartimiento para una columna. 4. Mezclador 2. 5. Bomba 2. 6. Válvula 1. 7. Reactor térmico. 8. Reactor a temperatura ambiente. 9. Válvula 2. Fotografía tomada por la autora el 3 de marzo de 2014, en CROM-MASS.

Tabla 18. Parámetros cromatográficos para el análisis por HPLC de antocianinas y antocianidinas.

Parámetro	Especificaciones
Columna	<i>Gemini</i> (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) C18 (250 mm, L x 4,6 mm, D.I. x 5 µm, tamaño de partícula)
Fase móvil	A: Ácido acético (10%), ácido fosfórico (1%), acetonitrilo (5%) en agua. B: Acetonitrilo.
Gradiente de elución	0 min: 1% B, 10 min: 12% B, 10-12 min: 12% B, 13 min: 90% B, 13-18 min: 90% B, 23 min: 1% B, 25 min: 1% B.
Temperatura de la fase móvil	25°C
Flujo	1 mL/min
Longitud de onda	DAD: $\lambda=515$ nm
Volumen de inyección de muestra	20 µL

El acoplamiento del HPLC al derivatizador, demandó el monitoreo del cromatograma a $\lambda=734$ nm, longitud de onda establecida en el MWD para registrar la disminución de la absorbancia del catión-radical ABTS⁺. Lograr cromatogramas con resolución de los picos a las tres longitudes de onda, requirió hacer varias pruebas, porque la inestabilidad de la línea base, a $\lambda=734$ nm, es el principal problema en los análisis por HPLC-ABTS, encontrado previamente por Raudonis y col. (2010). Además, fue necesario establecer el tiempo de poscorrida requerido para que la línea base, a $\lambda=734$ nm, se estabilizara entre cada una de las corridas de una secuencia.

Con el fin de identificar los compuestos presentes en los extractos de mora y de cáscara de plátano, se incluyeron en el método cromatográfico la procianidina B1, procianidina C1, pinocembrina, ácido elágico, ácido gálico, naringenina, epicatequina, quercetina, ácido *p*-hidroxibenzóico, catequina, ácido *p*-cumárico, kaempferol, ácido ferúlico, ácido carnósico y dopamina. La separación de estos

compuestos se logró mediante cambios tanto en el gradiente como en la composición de la fase móvil del método cromatográfico.

4.2.2.3 Condiciones del método en el derivatizador acoplado al HPLC

En el derivatizador, inicialmente, se emplearon las condiciones establecidas por Kusznierevich y col. (2011), ya que estos autores, con un equipo igual al utilizado en el presente trabajo, excepto por el volumen del reactor, evaluaron el efecto de la concentración de ABTS^{•+} sobre el área del Trolox[®] y determinaron el efecto de la temperatura del reactor sobre las áreas de 12 compuestos fenólicos.

Con base en los resultados obtenidos por Kusznierevich y col. (2011), se preparó una solución *stock* de ABTS^{•+} (7 mM) en una solución acuosa de persulfato de potasio (2,45 mM), que se incubó en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 16 h. La solución de trabajo (2,1 mM) se obtuvo mediante dilución de la solución *stock* en metanol. El flujo del derivatizador se estableció en 0,1 mL/min, de manera que la concentración de ABTS^{•+} en el reactor fue 191 μ M. La temperatura del reactor se mantuvo a 130°C.

Con los flujos utilizados, el tiempo de reacción entre el ABTS^{•+} y el eluato fue 76 s. El tiempo de la corrida se estableció con base en el tiempo de la corrida en el HPLC, ya que debía ser igual en ambos equipos.

Debido a que las fluctuaciones en la línea base impedían la determinación correcta de áreas negativas a $\lambda=734$ nm y, por lo tanto, la cuantificación de la capacidad antioxidante, la concentración de catión-radical en el reactor se modificó. Se midieron las absorbancias de soluciones acuosas de ABTS^{•+} de diferentes concentraciones y se escogió la solución con la que se obtuvo una

absorbancia de $0,71 \pm 0,02$, tal como se hizo cuando este ensayo se realizó en el lector de placas (**Sección 1.2.6**).

También, se modificó el tiempo de reacción entre el catión-radical y el eluato, porque el establecido inicialmente era muy largo (76 s). Para esto, fue necesario cambiar el flujo en el reactor. Las modificaciones de la concentración y del flujo de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en el derivatizador, implicaron cambios en el tiempo de poscorrida del HPLC.

4.2.2.4 Determinación de parámetros cromatográficos de eficiencia

Se seleccionaron las condiciones cromatográficas con las cuales se pudieron determinar simultáneamente los compuestos mencionados en la **Sección 4.2.2.2**. Se calcularon los parámetros de eficiencia del método, a saber: factor de retención (k'), factor de selectividad (α), número de platos teóricos (N) y resolución (R_s) (**Ecuaciones 4.1-4.4**) (Meyer, 2005).

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \quad \text{(Ecuación 4.1)}$$

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{(Ecuación 4.2)}$$

$$N = \frac{5,54 t_R^2}{W_{1/2}^2} \quad \text{(Ecuación 4.3)}$$

$$R_s = \frac{1,18 (t_B - t_A)}{(W_{1/2A} + W_{1/2B})} \quad \text{(Ecuación 4.4)}$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención del pico de interés;

t_M = Tiempo muerto de la columna;

$W_{1/2}$ = Ancho del pico en la mitad de la altura;

A y B = Picos adyacentes.

4.2.2.5 Determinación de figuras analíticas de mérito

Se determinaron figuras analíticas de mérito, tales como: precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad de tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas), linealidad, sensibilidad, nivel mínimo de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y nivel mínimo de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés).

Para esto, se prepararon soluciones *stock*, de 1000 ppm, de cada compuesto en metanol grado HPLC. Las soluciones de trabajo se obtuvieron por dilución, a 1 mL, de volúmenes determinados de cada solución *stock*, para preparar soluciones de 2,5-55 ppm.

• **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas.** Se determinaron los tiempos de retención relativos (t_{RR}) y las áreas relativas (A_R) mediante las siguientes ecuaciones:

$$t_{RR} = \frac{t_{R(I)}}{t_{R(EI)}} \quad \text{(Ecuación 4.5)}$$

$$A_R = \frac{A_i}{A_{EI}} \quad \text{(Ecuación 4.6)}$$

Donde:

$t_{R(I)}$ = Tiempo de retención del pico de interés;

$t_{R(EI)}$ = Tiempo de retención del pico del estándar interno (galato de epicatequina, 10 ppm);

A_i = Área del pico de interés;

A_{EI} = Área del estándar interno (galato de epicatequina, 10 ppm).

La repetibilidad y la reproducibilidad del método se evaluaron en términos de los coeficientes de variación (CV, %) de los t_R , áreas y A_R , de cada uno de los compuestos analizados a una concentración de 20 ppm (**Ecuaciones 4.7-4.9**).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|^2} \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

$$CV, \% = \frac{\bar{x}}{S} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.9})$$

Donde:

$\bar{x}$ = Promedio de los datos;

x_i = Datos;

n = Número de datos;

S = Desviación estándar de los datos;

CV = Coeficiente de variación de los datos.

• **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad y la sensibilidad del método se evaluaron realizando curvas de calibración para los analitos. La linealidad se reportó como el coeficiente de determinación (R^2) de la curva de calibración y la sensibilidad como la pendiente de la recta a un nivel de confianza del 95%. Para una recta ajustada a la ecuación $y = A + Bx$, donde A es la ordenada al origen y B es la pendiente, los valores estimados de A y B se calcularon mediante las **Ecuaciones 4.10 y 4.11** (Miller y Miller, 2002).

$$A = \bar{y} - B\bar{x} \quad (\text{Ecuación 4.10})$$

$$B = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ecuación 4.11})$$

Donde:

x_i = Concentración de cada uno de los patrones de calibrado;

$\bar{x}$ = Promedio de las concentraciones de calibrado;

y_i = Respuesta en cada punto;

$\bar{y}$ = Promedio de las respuestas de los patrones de calibrado.

Además de los valores individuales de A y B, se calculó su incertidumbre asociada mediante las **Ecuaciones 4.12 y 4.13** (Miller y Miller, 2002).

$$S_A = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 4.12})$$

$$S_B = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 4.13})$$

Donde:

m = Número total de los puntos de las rectas de calibrado;

$S_{y/x}$ = Desvío estándar de los residuos de la regresión está dado por la **Ecuación 4.14**:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m - 2}} \quad (\text{Ecuación 4.14})$$

Donde:

y_i = Respuesta experimental de cada patrón de calibrado;

$\hat{y}_i$ = Respuesta estimada en cada punto, es decir, $\hat{y}_i = A + Bx_i$.

El coeficiente de determinación, para cada recta de calibrado, se calculó utilizando la **Ecuación 4.15**.

$$R^2 = \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Ecuación 4.15})$$

• **Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).**

Los LOD y LOQ se hallaron, según lo recomendado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) (Currie, 1995). El LOD se calculó mediante la **Ecuación 4.16**.

$$\text{LOD} = 2 \times t_{0,05,m-2} \times S_0 \quad (\text{Ecuación 4.16})$$

Donde:

t = Coeficiente de *Student* para un nivel de confianza del 95%;

m = Número total de los puntos de las rectas de calibrado;

S_0 = Desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco; está dada por la **Ecuación 4.17**.

$$S_0 = \frac{S_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 4.17})$$

Donde, n es el número de réplicas de cada punto de la recta de calibrado; m es el número total de los puntos de las rectas de calibrado; y los otros parámetros se definen en las **Ecuaciones 4.11 y 4.14**.

El LOQ se definió como:

$$LOQ = 10 S_0 \quad \text{(Ecuación 4.18)}$$

4.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS⁺, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

Se analizaron los extractos acetónicos obtenidos mediante extracción sólido-líquido (**Sección 2.2.3**), y extracción en fase sólida (**Sección 2.2.8**), de mora fresca de Castilla y de cáscara fresca de plátano Hartón, procedente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander (**Sección 2.2.1**). Los extractos se pesaron (1 mg), se disolvieron en una solución acuosa de ácido acético (10%, v/v) y se pasaron por un filtro de PVDF (0,22 µm). Estas soluciones se diluyeron según un factor determinado previamente, para no saturar el MWD a $\lambda=734$ nm. A cada muestra se agregó galato de epicatequina (10 ppm) como estándar interno. Las soluciones así preparadas se inyectaron al HPLC.

La identificación tentativa de los compuestos fenólicos presentes en los extractos se realizó por comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros UV-Vis, con los de los patrones certificados. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo con las curvas de calibración realizadas.

Para la determinación de la capacidad antioxidante se realizó una curva de calibración con Trolox[®], por el método del estándar interno (EI: galato de epicatequina, 10 ppm). La selección del estándar se hizo con base en su tiempo de retención, de manera que no coeluyera con alguno de los compuestos presentes en los extractos y que estuviera, en lo posible, en un tiempo medio entre los componentes inicial y final de los extractos. Los valores de capacidad antioxidante se expresaron como µmol Trolox[®]/g de extracto. Las determinaciones

se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio $\pm$ la desviación estándar.

4.2.4 Hidrólisis ácida de compuestos fenólicos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón y su análisis por HPLC-ABTS⁺⁺.

Los extractos obtenidos después de su concentración por SPE (**Sección 2.3.8**), se sometieron a hidrólisis ácida, según el procedimiento descrito por Giusti y Wroslstad (1996), con algunas modificaciones. Cada extracto (1 mg) se disolvió en metanol (1 mL), posteriormente, se agregó solución de HCl (12 N) en metanol (1:1, v/v) (2 mL). La mezcla se preparó en frascos ámbar de 4 mL, con tapa rosca. Las soluciones se pusieron en baño de aceite mineral durante 1 h, a 100°C. Posteriormente, se enfriaron en baño de hielo.

Los extractos hidrolizados se purificaron en cartuchos *HF-Bond Elut-C18*, con 500 mg de sorbente (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los cartuchos se acondicionaron con metanol grado HPLC (2 mL) y el metanol remanente se removió con agua Tipo I (3 mL). El extracto hidrolizado (1 mL) se retuvo en el cartucho, se pasó agua Tipo I (2 mL) para remover los azúcares, y, posteriormente, metanol grado HPLC (3 mL) para eluir las antocianidinas. Inmediatamente después de esto, los extractos se secaron con nitrógeno gaseoso, se disolvieron en solución acuosa de ácido acético (10%, v/v) y se inyectaron al HPLC, previamente se adicionó el estándar interno (galato de epicatequina, 10 ppm en el extracto).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Desarrollo de un método por HPLC para la determinación de la capacidad de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

4.3.1.1 Condiciones del método cromatográfico acoplado al derivatizador

La determinación de 22 compuestos fenólicos, con resolución sobre la línea base a $\lambda=515$ nm, longitud de onda de máxima absorción de antocianinas y antocianidinas; $\lambda=270$ nm, longitud de onda de máxima absorción de otros compuestos fenólicos y estabilidad de la línea base a $\lambda=734$ nm, longitud de onda a la que se monitorea el catión-radical ABTS^{•+}, se llevó a cabo mediante las condiciones reportadas en la **Tabla 19**.

4.3.1.2 Condiciones del método en el derivatizador acoplado al HPLC

• Preparación del catión-radical ABTS^{•+}

En la literatura, se reportan diferentes metodologías para preparar el catión-radical ABTS^{•+} (**Sección 4.1**). En este trabajo, el catión-radical se produjo por oxidación de ABTS con persulfato de potasio, en una relación molar 2,9:1. Como el ABTS y el PDS reaccionan en una relación estequiométrica 2:1 (Re y col., 1999), la oxidación del ABTS fue incompleta, esto es importante para la producción de un catión-radical estable (Cano y col., 1998), debido a que previene las posibles interacciones entre el PDS y los componentes de la muestra (Re y col., 1999) y a que evita la sobreestimación de la actividad como resultado del efecto inhibitorio, que presentan algunos compuestos sobre la formación del radical. De esta manera, se evalúa solo la capacidad para atrapar radicales (Strube y col., 1997).

Se ha encontrado, que las proporciones molares óptimas de ABTS:PDS son de 2 a 3 (Raudonis y col., 2010).

Tabla 19. Parámetros cromatográficos para el análisis por HPLC de compuestos fenólicos.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	A: Solución de ácido acético (10%) y ácido fosfórico (1%) en agua. B: Acetonitrilo.
Gradiente de elución	0 min: 2% B, 15 min: 12% B, 15-18 min: 12% B, 26 min: 40% B, 31 min: 50% B, 40 min: 90% B, 40-50 min: 90% B, 58 min: 2% B, 58-60 min: 2% B.
Tiempo de poscorrida	9 min
Temperatura	25°C
Flujo	1 mL/min
Longitudes de onda	DAD: λ =240, 270, 290, 320, 345, 365, 515 nm MWD: λ =734 nm
Volumen de inyección de muestra	20 μ L

La oxidación del ABTS por el PDS comienza una vez las dos sustancias se ponen en contacto, pero, para lograr un máximo de conversión de ABTS al ABTS⁺•, la mezcla se almacenó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 17 h antes de usar, tal como lo sugieren Koleva y col. (2001).

El disolvente en el que se diluye la solución *stock* de ABTS⁺• influye sobre la estabilidad de la solución de trabajo y, por ende, sobre la sensibilidad y la precisión del ensayo. En esta investigación, la solución de ABTS⁺• se preparó en agua porque, de esta manera, Raudonis y col. (2010), encontraron mayor estabilidad del catión-radical en comparación con el uso de *buffer* fosfato o *buffer* citrato.

• Concentración de catión-radical ABTS^{•+} en el reactor

En los trabajos, en los que han utilizado el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} acoplado al HPLC, han empleado concentraciones de catión-radical en el reactor, que varían en el intervalo de 1,5 - 263 μ M (Koleva y col., 2001; Cano y col., 2002; Exarchou y col., 2006; Raudonis y col., 2010; Kusznierevich y col., 2011; McDermott y col., 2011). Otros autores, no reportan la concentración de ABTS^{•+} en el reactor, sino que diluyen la solución *stock* hasta una absorbancia de 1,0 (Li y col., 2007) o de 0,7 (He y col., 2010; Gong y col., 2012; Kolniak-Ostek y col., 2013; Xin y col., 2014).

En el presente trabajo, se hicieron medidas de absorbancia, a $\lambda=734$ nm, de soluciones acuosas de ABTS^{•+} en diferentes concentraciones (**Tabla 20**), preparadas a partir de soluciones *stock* de ABTS^{•+}, almacenadas en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 17 h. Se escogió, para utilizar en el reactor del derivatizador, la concentración de 70 μ M, debido a que con ella se obtuvo una absorbancia de $0,71 \pm 0,02$, igual a la utilizada cuando el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} se llevó a cabo en el lector de placas. Esto, con el fin de comparar los resultados obtenidos mediante los dos procedimientos.

La absorbancia de la solución de ABTS^{•+}, a la concentración utilizada en el reactor, no varió durante 48 h.

• Parámetros en el derivatizador

En la **Tabla 21**, se reportan los parámetros empleados en el derivatizador para determinar la capacidad antioxidante por HPLC.

Tabla 20. Absorbancias, a $\lambda=734$ nm, de diferentes concentraciones de catión-radical ABTS^{•+} en solución acuosa.

Concentración ABTS ^{•+} , μM	Absorbancia, $\lambda=734$ nm*
35	0,36 $\pm$ 0,02
70	0,71 $\pm$ 0,02
105	0,94 $\pm$ 0,03
210	1,53 $\pm$ 0,05

*Promedio $\pm$ desviación estándar ($n=9$). Tres mediciones seguidas, en tres días con diferente solución *stock* de ABTS^{•+}.

Tabla 21. Parámetros operacionales en el derivatizador acoplado al HPLC.

Parámetro	Especificación
Tiempo de corrida	Igual al de la corrida del HPLC
Tiempo de equilibrio	1 min
Temperatura de la columna	30°C
Temperatura del reactor	130°C
Volumen del reactor	1,4 mL
Flujo bomba 1	0,5 mL/min
Reactivo 1	ABTS ^{•+}

El tiempo de corrida en el derivatizador debe ser igual al tiempo de la corrida en el HPLC; además, en el derivatizador se debe establecer un tiempo de equilibrio, después de cada corrida, para el llenado de la bomba con el volumen de ABTS^{•+} necesario.

Aunque esta aplicación no requiere el uso de una columna en el derivatizador, es necesario indicar un valor de temperatura para el funcionamiento del equipo; se estableció la temperatura más baja posible (30°C).

La temperatura del reactor fue 130°C, debido a que con ella, Kusznierevicz y col., (2011), obtuvieron las mayores áreas de 12 picos cromatográficos, a $\lambda=734$ nm, después de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}.

El volumen del reactor (1,4 mL) viene establecido por fábrica y depende de las dimensiones del mismo (11,5 m, L x 0,4 mm, D.I.). El flujo de la bomba se estableció en 0,5 mL/min porque, de esta manera, el tiempo de reacción entre el ABTS^{•+} y el eluato fue de 56 s. Este tiempo fue necesario para garantizar la reacción de todos los compuestos antioxidantes con el ABTS^{•+} (Cano y col., 2002).

Teniendo en cuenta los flujos del HPLC y del derivatizador empleados, se preparó una solución de trabajo de ABTS^{•+} (210 μ M), en agua Tipo I, a partir de la solución *stock* (2,0 mM); de esta manera, la concentración de catión-radical en el reactor fue de 70 μ M.

4.3.1.3 Parámetros cromatográficos de eficiencia

Con base en las condiciones establecidas en las **Secciones 4.3.1.1 y 4.3.1.2**, se inyectó una mezcla de sustancias patrón y se obtuvieron sus tiempos de retención, que aparecen en la **Tabla 22**. La diferencia en los tiempos de retención de los analitos después de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+} ($\lambda=734$ nm) respecto a sus tiempos de retención antes de esta reacción ($\lambda=270$ nm) fue alrededor de 1,2 min para la mayoría de compuestos.

En la **Figura 16**, se muestra un perfil cromatográfico típico de la mezcla de patrones certificados, reportados en la **Tabla 22**. El Trolox[®] no se incluyó en la mezcla, porque este compuesto no se encuentra de manera natural en los extractos, sino que se utiliza para realizar la curva de calibración y expresar los

Tabla 22. Tiempos de retención de los compuestos fenólicos analizados por HPLC con derivatizador.

No. de pico ^a	Compuesto	t_R ($\lambda=270$ nm), ^{b*} min	t_R ($\lambda=734$ nm), ^{c*} min	Diferencia t_R , ^d min
1	Dopamina	2,956 $\pm$ 0,003	4,199 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,04
2	Ácido gálico	3,936 $\pm$ 0,004	5,182 $\pm$ 0,004	1,246 $\pm$ 0,006
3	Procianidina B1	5,301 $\pm$ 0,008	6,550 $\pm$ 0,008	1,25 $\pm$ 0,01
4	Catequina	7,46 $\pm$ 0,01	8,695 $\pm$ 0,005	1,23 $\pm$ 0,01
5	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	9,47 $\pm$ 0,01	N.D.	N.D.
6	Procianidina C1	10,14 $\pm$ 0,04	11,37 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,04
7	Epicatequina	11,36 $\pm$ 0,02	12,61 $\pm$ 0,02	1,25 $\pm$ 0,03
8	Cianidina-3-glucósido	12,11 $\pm$ 0,07	13,35 $\pm$ 0,07	1,2 $\pm$ 0,1
9	Cianidina-3-rutinósido	13,41 $\pm$ 0,06	14,65 $\pm$ 0,06	1,24 $\pm$ 0,08
10	Pelargonidina-3-glucósido	14,55 $\pm$ 0,07	15,79 $\pm$ 0,07	1,2 $\pm$ 0,1
11	Galato de epicatequina	16,84 $\pm$ 0,04	18,12 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,06
12	Ácido <i>p</i> -cumárico	17,68 $\pm$ 0,02	N.D.	N.D.
13	Ácido ferúlico	20,30 $\pm$ 0,02	21,54 $\pm$ 0,02	1,24 $\pm$ 0,03
14	Ácido elágico	21,72 $\pm$ 0,03	22,96 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,04
15	Pelargonidina	24,19 $\pm$ 0,02	25,42 $\pm$ 0,02	1,23 $\pm$ 0,03
16	Quercetina	29,10 $\pm$ 0,01	30,33 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,01
17	Naringenina	30,19 $\pm$ 0,01	N.D.	N.D.
18	Kaempferol	31,261 $\pm$ 0,003	32,49 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,01
19	Pinocembrina	35,31 $\pm$ 0,02	N.D.	N.D.
20	BHA	36,66 $\pm$ 0,02	37,88 $\pm$ 0,02	1,22 $\pm$ 0,03
21	Ácido carnósico	41,11 $\pm$ 0,01	42,316 $\pm$ 0,005	1,21 $\pm$ 0,01
22	BHT	43,65 $\pm$ 0,01	44,86 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,01

^aEn la **Figura 16**. ^bTiempos de retención antes de su reacción con el catión-radical ABTS⁺. ^cTiempos de retención después de su reacción con el catión-radical ABTS⁺. ^dDiferencia en los tiempos de retención ($\lambda=734$ nm y $\lambda=270$ nm) *Promedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante en la concentración evaluada (20 ppm).

resultados comparativos de la capacidad antioxidante. La curva de calibración se construyó usando los mismos parámetros cromatográficos, pero en corridas diferentes a la de los extractos y a la de la mezcla de sustancias-patrón.

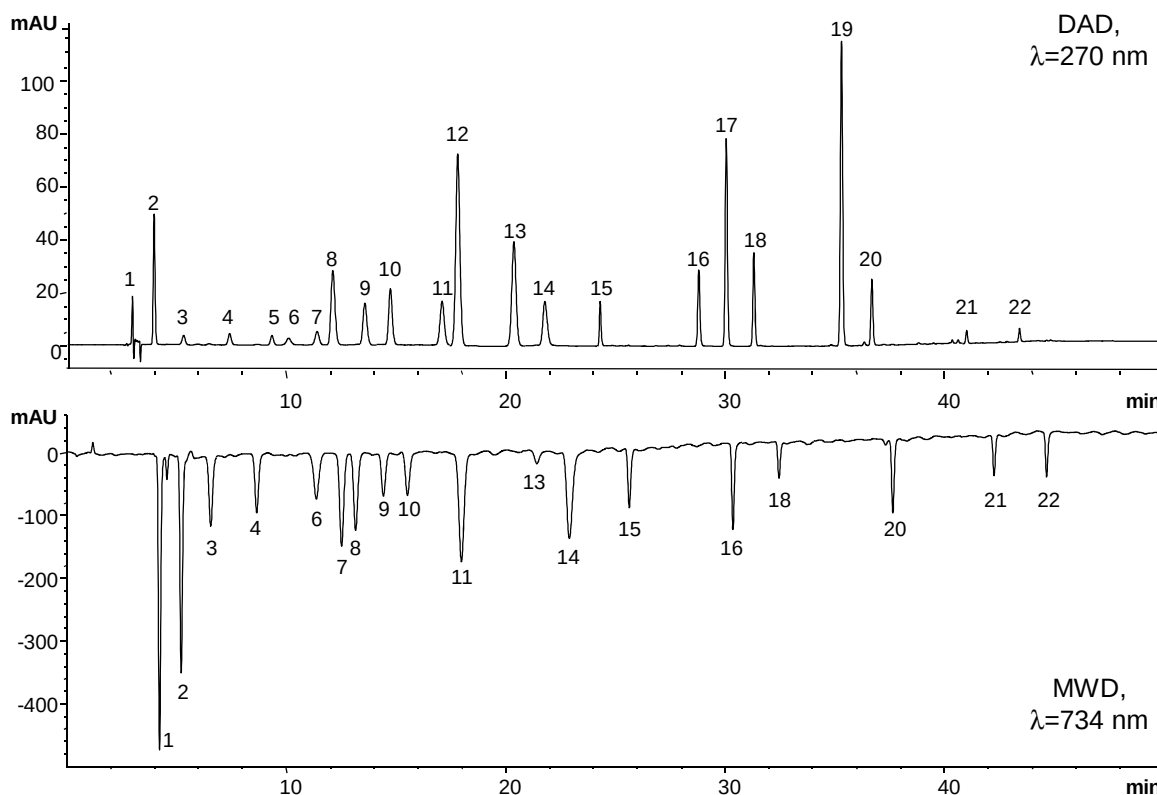


Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de una mezcla de sustancias-patrón antes (DAD, $\lambda=270$ nm) y después (MWD, $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Los números corresponden a los compuestos mencionados en la **Tabla 22**.

Se determinaron los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, a saber: resolución, número de platos teóricos, factores de selectividad, de retención y simetría (**Tablas 23 y 24**).

Tabla 23. Parámetros de eficiencia de la separación por HPLC-DAD a $\lambda=270$ nm^a.

No. de pico ^b	Resolución, R_s	Factor de retención, k'	Factor de selectividad, α	Número de platos teóricos, N	Factor de simetría
1	-	0,131 $\pm$ 0,001	-	15500 $\pm$ 600	1,27 $\pm$ 0,02
2	Rs ₂₋₁ 8,22 $\pm$ 0,03	0,506 $\pm$ 0,003	3,87 $\pm$ 0,02	11900 $\pm$ 290	0,892 $\pm$ 0,002
3	Rs ₃₋₂ 6,43 $\pm$ 0,03	1,020 $\pm$ 0,003	2,03 $\pm$ 0,01	5700 $\pm$ 93	0,89 $\pm$ 0,06
4	Rs ₄₋₃ 8,13 $\pm$ 0,04	1,844 $\pm$ 0,006	1,805 $\pm$ 0,02	14000 $\pm$ 280	0,967 $\pm$ 0,007
5	Rs ₅₋₄ 7,95 $\pm$ 0,04	2,610 $\pm$ 0,007	1,415 $\pm$ 0,001	22200 $\pm$ 350	0,942 $\pm$ 0,003
6	Rs ₆₋₅ 2,05 $\pm$ 0,07	2,87 $\pm$ 0,01	1,097 $\pm$ 0,004	10400 $\pm$ 130	0,96 $\pm$ 0,02
7	Rs ₇₋₆ 3,4 $\pm$ 0,2	3,32 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,01	23300 $\pm$ 1100	1,00 $\pm$ 0,05
8	Rs ₈₋₇ 2,6 $\pm$ 0,2	3,61 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,01	23300 $\pm$ 800	0,90 $\pm$ 0,01
9	Rs ₉₋₈ 4,09 $\pm$ 0,04	4,11 $\pm$ 0,02	1,137 $\pm$ 0,001	28000 $\pm$ 1100	0,904 $\pm$ 0,002
10	Rs ₁₀₋₉ 3,55 $\pm$ 0,05	4,54 $\pm$ 0,02	1,105 $\pm$ 0,001	33000 $\pm$ 1300	0,925 $\pm$ 0,003
11	Rs ₁₁₋₁₀ 6,8 $\pm$ 0,3	5,42 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,01	34400 $\pm$ 400	0,954 $\pm$ 0,005
12	Rs ₁₂₋₁₁ 2,4 $\pm$ 0,2	5,75 $\pm$ 0,03	1,060 $\pm$ 0,005	41900 $\pm$ 500	0,959 $\pm$ 0,005
13	Rs ₁₃₋₁₂ 7,27 $\pm$ 0,06	6,75 $\pm$ 0,02	1,173 $\pm$ 0,001	47000 $\pm$ 400	0,929 $\pm$ 0,002
14	Rs ₁₄₋₁₃ 3,8 $\pm$ 0,1	7,30 $\pm$ 0,04	1,081 $\pm$ 0,002	50600 $\pm$ 1400	0,82 $\pm$ 0,05
15	Rs ₁₅₋₁₄ 8,0 $\pm$ 0,4	8,20 $\pm$ 0,01	1,124 $\pm$ 0,007	212000 $\pm$ 11000	0,89 $\pm$ 0,04
16	Rs ₁₆₋₁₅ 27,3 $\pm$ 0,5	10,09 $\pm$ 0,01	1,230 $\pm$ 0,003	580000 $\pm$ 2000	0,89 $\pm$ 0,02
17	Rs ₁₇₋₁₆ 6,97 $\pm$ 0,03	10,50 $\pm$ 0,01	1,0412 $\pm$ 0,0001	566000 $\pm$ 13000	0,940 $\pm$ 0,004
18	Rs ₁₈₋₁₇ 6,4 $\pm$ 0,2	10,90 $\pm$ 0,01	1,038 $\pm$ 0,001	553000 $\pm$ 9000	0,909 $\pm$ 0,004
19	Rs ₁₉₋₁₈ 23,5 $\pm$ 0,3	12,45 $\pm$ 0,01	1,142 $\pm$ 0,001	619000 $\pm$ 14000	0,954 $\pm$ 0,004
20	Rs ₂₀₋₁₉ 7,77 $\pm$ 0,07	12,96 $\pm$ 0,01	1,0413 $\pm$ 0,0004	757000 $\pm$ 13000	0,92 $\pm$ 0,01
21	Rs ₂₁₋₂₀ 27,5 $\pm$ 0,3	14,653 $\pm$ 0,003	1,130 $\pm$ 0,001	1120000 $\pm$ 37000	0,97 $\pm$ 0,06
22	Rs ₂₂₋₂₁ 17,1 $\pm$ 0,2	15,688 $\pm$ 0,003	1,0663 $\pm$ 0,0003	1470000 $\pm$ 66000	0,86 $\pm$ 0,02

^aPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=6$). ^bEn la **Figura 16**.

Tabla 24. Parámetros de eficiencia de la separación por HPLC-MWD a $\lambda=734\text{ nm}^a$.

No. de pico ^b	Resolución, R_s	Factor de retención, k'	Factor de selectividad, α	Número de platos teóricos, N	Factor de simetría
1	-	$0,101 \pm 0,001$	-	5200 ± 110	$0,832 \pm 0,005$
2	$RS_{2-1} \ 3,88 \pm 0,04$	$0,359 \pm 0,002$	$3,55 \pm 0,01$	5600 ± 120	$0,835 \pm 0,004$
3	$RS_{3-2} \ 4,4 \pm 0,1$	$0,711 \pm 0,002$	$2,00 \pm 0,01$	5600 ± 480	$0,82 \pm 0,02$
4	$RS_{4-3} \ 6,6 \pm 0,1$	$1,282 \pm 0,004$	$1,15 \pm 0,01$	12600 ± 200	$0,914 \pm 0,006$
5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	$RS_{6-4} \ 7,6 \pm 0,2$	$2,00 \pm 0,01$	$1,454 \pm 0,009$	12200 ± 1100	$1,06 \pm 0,03$
7	$RS_{7-6} \ 2,96 \pm 0,08$	$2,31 \pm 0,02$	$1,152 \pm 0,002$	18600 ± 1500	$1,01 \pm 0,05$
8	$RS_{8-7} \ 2,1 \pm 0,2$	$2,50 \pm 0,01$	$1,088 \pm 0,008$	22300 ± 300	$0,86 \pm 0,03$
9	$RS_{9-8} \ 3,67 \pm 0,06$	$2,84 \pm 0,02$	$1,137 \pm 0,001$	27700 ± 1800	$0,86 \pm 0,03$
10	$RS_{10-9} \ 3,28 \pm 0,07$	$3,14 \pm 0,02$	$1,105 \pm 0,001$	34000 ± 1000	$0,88 \pm 0,04$
11	$RS_{11-10} \ 6,22 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,01$	$1,195 \pm 0,003$	31100 ± 400	$0,94 \pm 0,03$
12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	$RS_{13-11} \ 8,2 \pm 0,2$	$4,66 \pm 0,02$	$1,241 \pm 0,005$	41000 ± 3800	$0,9 \pm 0,1$
14	$RS_{14-13} \ 3,0 \pm 0,1$	$5,03 \pm 0,03$	$1,081 \pm 0,002$	30500 ± 1700	$0,79 \pm 0,03$
15	$RS_{15-14} \ 6,2 \pm 0,4$	$5,637 \pm 0,009$	$1,123 \pm 0,007$	182000 ± 39000	$0,80 \pm 0,06$
16	$RS_{16-15} \ 20,7 \pm 0,9$	$6,930 \pm 0,005$	$1,229 \pm 0,002$	257000 ± 5400	$0,85 \pm 0,02$
17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	$RS_{18-16} \ 9,3 \pm 0,2$	$7,488 \pm 0,004$	$1,080 \pm 0,001$	354000 ± 27000	$0,87 \pm 0,03$
19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	$RS_{20-18} \ 24,5 \pm 0,2$	$8,901 \pm 0,003$	$1,189 \pm 0,001$	460000 ± 27000	$0,86 \pm 0,03$
21	$RS_{21-20} \ 20,8 \pm 0,6$	$10,060 \pm 0,002$	$1,130 \pm 0,001$	686000 ± 41000	$0,90 \pm 0,07$
22	$RS_{22-21} \ 12,9 \pm 0,3$	$10,726 \pm 0,002$	$1,0662 \pm 0,0003$	864000 ± 46000	$0,85 \pm 0,01$

^aPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=6$). ^bEn la **Figura 16**. N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante en la concentración evaluada (20 ppm).

Los valores de resolución obtenidos ($R_s > 1,5$) indican que se llevó a cabo la separación de los analitos sobre la línea base. La resolución más baja a $\lambda=734$ nm, se debe a que los compuestos, que reaccionan con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, presentan picos cromatográficos más anchos que sus respectivos picos antes de reaccionar. En cromatografía líquida, para una $R_s > 1,5$ se requieren más de 2000 platos teóricos, N (Snyder y col., 1997). En este estudio, el N fue superior a 5000 para todos los compuestos; esto indica la eficacia del método para la separación de los compuestos analizados.

Los factores de retención (k'), calculados para los compuestos estudiados, se encuentran dentro del rango establecido como apropiado (0,5-20) (Snyder y col., 1997), con excepción de la dopamina, a $\lambda=270$ nm, y de la dopamina y el ácido gálico, $\lambda=734$ nm. Sin embargo, como se verá más adelante, a pesar de que los factores de retención para estos compuestos fueron menores de 0,5, sus t_R y t_{RR} mostraron repetibilidad y reproducibilidad altas.

Los factores de simetría fueron uno, o cercanos a ese valor. Esto indica que las señales cromatográficas no presentaron *tailing* o *fronting*, es decir, que los picos cromatográficos no se alejaron de su debida forma gaussiana (Snyder y col., 1997).

4.3.1.4 Figuras analíticas de mérito

- **Evaluación de la precisión del método para tiempos de retención, tiempos de retención relativos, áreas y áreas relativas de los compuestos fenólicos.**

Los resultados para la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R), tiempos de retención relativos (t_{RR}), áreas y áreas relativas (A_R) de los compuestos fenólicos, antes y después de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, se reportan en las **Tablas 25-28**.

Tabla 25. Repetibilidad de tiempos de retención (t_R) y áreas de los compuestos analizados por HPLC, antes de su reacción con el catión-radical ABTS⁺.

Compuesto	$t_R \pm S$, min ^a	CV, % ^b	Área $\pm S$, mAU ^a	CV, % ^b
Dopamina	2,958 $\pm$ 0,004	0,127	148,8 $\pm$ 0,8	1,6
Ácido gálico	3,940 $\pm$ 0,007	0,184	964,8 $\pm$ 0,3	0,03
Procianidina B1	5,305 $\pm$ 0,008	0,145	65 $\pm$ 2	3,1
Catequina	7,47 $\pm$ 0,02	0,21	139,3 $\pm$ 0,2	0,1
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	9,48 $\pm$ 0,02	0,20	1116,7 $\pm$ 0,4	0,03
Procianidina C1	10,15 $\pm$ 0,03	0,26	56 $\pm$ 1	2
Epicatequina	11,33 $\pm$ 0,03	0,27	174 $\pm$ 5	3
Cianidina-3-glucósido	12,12 $\pm$ 0,05	0,44	921 $\pm$ 10	1
Cianidina-3-rutinósido	13,42 $\pm$ 0,06	0,43	622 $\pm$ 4	0,8
Pelargonidina-3-glucósido	14,56 $\pm$ 0,06	0,43	510 $\pm$ 7	1,4
Galato de epicatequina	16,86 $\pm$ 0,06	0,35	526 $\pm$ 4	0,8
Ácido <i>p</i> -cumárico	17,73 $\pm$ 0,08	0,42	2152 $\pm$ 2	0,08
Ácido ferúlico	20,34 $\pm$ 0,07	0,33	1432 $\pm$ 1	0,05
Ácido elágico	21,8 $\pm$ 0,1	0,5	2057 $\pm$ 9	0,44
Pelargonidina	24,16 $\pm$ 0,03	0,14	645 $\pm$ 1	0,2
Quercetina	29,11 $\pm$ 0,02	0,07	802 $\pm$ 6	0,7
Naringenina	30,20 $\pm$ 0,02	0,07	1002 $\pm$ 3	0,3
Kaempferol	31,25 $\pm$ 0,02	0,06	337 $\pm$ 2	0,6
Pinocembrina	31,35 $\pm$ 0,02	0,06	1851 $\pm$ 3	0,2
BHA	36,66 $\pm$ 0,01	0,04	328 $\pm$ 3	0,8
Ácido carnósico	41,104 $\pm$ 0,008	0,019	57 $\pm$ 2	3
BHT	43,655 $\pm$ 0,007	0,016	107 $\pm$ 3	3

^aPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=6$), patrones de 20 ppm. ^bCV: Coeficiente de variación.

Los coeficientes de variación para los t_R estuvieron entre 0,016 y 1,31% y para los t_{RR} entre 0,0211 y 0,49%. Los coeficientes de variación de las áreas cromatográficas estuvieron en el intervalo de 0,01-5% y los de las A_R en el rango 0,044-0,387%. Estos resultados cumplen con las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés), que establecen coeficientes de variación máximos permisibles de 2% para los tiempos de retención y de 10% para las áreas.

Tabla 26. Repetibilidad de tiempos de retención relativos (t_{RR}) y áreas relativas (A_R) de los compuestos analizados por HPLC, después de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}.

No. pico ^a	Compuesto	$t_{RR} \pm S$, min ^b	CV, % ^c	$A_R \pm S$, mAU ^b	CV, % ^c
1	Dopamina	0,2325 $\pm$ 0,0002	0,0688	1,4379 $\pm$ 0,0003	0,0515
2	Ácido gálico	0,2869 $\pm$ 0,0002	0,0630	1,923 $\pm$ 0,004	0,207
3	Procianidina B1	0,3627 $\pm$ 0,0001	0,0319	0,769 $\pm$ 0,001	0,091
4	Catequina	0,4814 $\pm$ 0,0004	0,0902	0,8113 $\pm$ 0,0003	0,044
5	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	Procianidina C1	0,635 $\pm$ 0,001	0,177	0,555 $\pm$ 0,001	0,090
7	Epicatequina	0,7008 $\pm$ 0,0002	0,0318	1,156 $\pm$ 0,003	0,250
8	Cianidina-3-glucósido	0,734 $\pm$ 0,001	0,196	0,898 $\pm$ 0,001	0,111
9	Cianidina-3-rutinósido	0,806 $\pm$ 0,001	0,130	0,664 $\pm$ 0,001	0,128
10	Pelargonidina-3-glucósido	0,869 $\pm$ 0,001	0,105	0,3150 $\pm$ 0,0004	0,1288
11	Galato de epicatequina	E.I.	E.I.	E.I.	E.I.
12	Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	Ácido ferúlico	1,1879 $\pm$ 0,0003	0,0290	0,2395 $\pm$ 0,0001	0,059
14	Ácido elágico	1,2665 $\pm$ 0,0003	0,0211	1,182 $\pm$ 0,003	0,254
15	Pelargonidina	1,396 $\pm$ 0,001	0,099	0,405 $\pm$ 0,002	0,494
16	Quercetina	1,673 $\pm$ 0,002	0,1055	1,050 $\pm$ 0,002	0,190
17	Naringenina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	Kaempferol	1,792 $\pm$ 0,003	0,147	0,3543 $\pm$ 0,0001	0,028
19	Pinocembrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	BHA	2,089 $\pm$ 0,004	0,177	0,719 $\pm$ 0,001	0,172
21	Ácido carnósico	2,334 $\pm$ 0,003	0,120	0,2387 $\pm$ 0,0002	0,0690
22	BHT	2,474 $\pm$ 0,004	0,154	0,416 $\pm$ 0,001	0,122

^aEn la **Figura 16**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=6$), patrones de 20 ppm. ^cCV: Coeficiente de variación. N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante en la concentración evaluada (20 ppm). E.I. Estándar interno.

Tabla 27. Reproducibilidad de tiempos de retención (t_R) y áreas de los compuestos analizados por HPLC, antes de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}.

Compuesto	$t_R \pm S$, min ^a	CV, % ^b	Área $\pm S$, mAU ^a	CV, % ^b
Dopamina	2,95 $\pm$ 0,02	0,57	150 $\pm$ 1	0,5
Ácido gálico	3,965 $\pm$ 0,008	0,20	964,0 $\pm$ 0,7	0,07
Procianidina B1	5,30 $\pm$ 0,03	0,49	67 $\pm$ 2	3
Catequina	7,46 $\pm$ 0,04	0,56	140 $\pm$ 1	0,8
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	9,34 $\pm$ 0,05	0,54	1123 $\pm$ 9	0,8
Procianidina C1	10,10 $\pm$ 0,09	0,85	60 $\pm$ 3	6
Epicatequina	11,26 $\pm$ 0,08	0,75	174 $\pm$ 1	0,7
Cianidina-3-glucósido	11,96 $\pm$ 0,16	1,31	950 $\pm$ 10	1
Cianidina-3-rutinósido	13,12 $\pm$ 0,06	0,44	620 $\pm$ 5	1
Pelargonidina-3-glucósido	14,20 $\pm$ 0,06	0,43	500 $\pm$ 15	3
Galato de epicatequina	16,7 $\pm$ 0,1	0,7	530 $\pm$ 4	0,8
Ácido <i>p</i> -cumárico	17,4 $\pm$ 0,1	0,7	2160 $\pm$ 7	0,4
Ácido ferúlico	20,0 $\pm$ 0,1	0,6	1431,4 $\pm$ 0,9	0,05
Ácido elágico	21,5 $\pm$ 0,1	0,5	2060 $\pm$ 23	1
Pelargonidina	24,0 $\pm$ 0,1	0,6	645 $\pm$ 6	0,9
Quercetina	29,00 $\pm$ 0,03	0,1	780 $\pm$ 22	3
Naringenina	30,06 $\pm$ 0,04	0,12	1002,7 $\pm$ 0,7	0,07
Kaempferol	31,24 $\pm$ 0,02	0,06	330 $\pm$ 9	3
Pinocembrina	35,13 $\pm$ 0,05	0,14	1850,8 $\pm$ 0,8	0,05
BHA	36,98 $\pm$ 0,06	0,16	320 $\pm$ 1	0,4
Ácido carnósico	41,12 $\pm$ 0,03	0,07	56 $\pm$ 2	4
BHT	43,354 $\pm$ 0,007	0,017	110 $\pm$ 6	5

^aPromedio de las determinaciones realizadas durante tres días seguidos $\pm$ desviación estándar ($n=3$), patrones de 20 ppm. ^bCV: Coeficiente de variación.

Tabla 28. Reproducibilidad de tiempos de retención relativos (t_{RR}) y áreas relativas (A_R) de los compuestos analizados por HPLC, después de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}.

No. pico ^a	Compuesto	$t_{RR} \pm S$, min ^b	CV, % ^c	$A_R \pm S$, mAU ^b	CV, % ^c
1	Dopamina	0,2322 $\pm$ 0,0002	0,0646	1,439 $\pm$ 0,001	0,159
2	Ácido gálico	0,2867 $\pm$ 0,0002	0,0766	1,94 $\pm$ 0,02	0,84
3	Procianidina B1	0,3620 $\pm$ 0,0002	0,0600	0,771 $\pm$ 0,002	0,304
4	Catequina	0,4817 $\pm$ 0,0002	0,0373	0,814 $\pm$ 0,003	0,323
5	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	Procianidina C1	0,634 $\pm$ 0,001	0,093	0,554 $\pm$ 0,001	0,192
7	Epicatequina	0,7007 $\pm$ 0,0003	0,0359	1,158 $\pm$ 0,004	0,385
8	Cianidina-3-glucósido	0,735 $\pm$ 0,001	0,110	0,890 $\pm$ 0,002	0,225
9	Cianidina-3-rutinósido	0,806 $\pm$ 0,001	0,172	0,672 $\pm$ 0,002	0,351
10	Pelargonidina-3-glucósido	0,868 $\pm$ 0,001	0,147	0,316 $\pm$ 0,001	0,279
11	Galato de epicatequina	E.I.	E.I.	E.I.	E.I.
12	Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	Ácido ferúlico	1,186 $\pm$ 0,002	0,167	0,2298 $\pm$ 0,0003	0,1298
14	Ácido elágico	1,266 $\pm$ 0,001	0,070	1,192 $\pm$ 0,002	0,168
15	Pelargonidina	1,397 $\pm$ 0,003	0,210	0,409 $\pm$ 0,004	0,978
16	Quercetina	1,669 $\pm$ 0,003	0,173	1,048 $\pm$ 0,003	0,286
17	Naringenina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	Kaempferol	1,785 $\pm$ 0,006	0,326	0,3544 $\pm$ 0,0001	0,028
19	Pinocembrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	BHA	2,08 $\pm$ 0,01	0,47	0,711 $\pm$ 0,002	0,282
21	Ácido carnósico	2,32 $\pm$ 0,01	0,49	0,2389 $\pm$ 0,0002	0,1283
22	BHT	2,46 $\pm$ 0,01	0,49	0,4166 $\pm$ 0,0008	0,2014

^aEn la **Figura 16**. ^bPromedio de las determinaciones realizadas durante tres días seguidos $\pm$ desviación estándar ($n=3$), patrones de 20 ppm. ^cCV: Coeficiente de variación. N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante en la concentración evaluada (20 ppm). E.I. Estándar interno.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** Se elaboraron curvas de calibración, usando el método de estándar externo, para los compuestos antes de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+} y, por el método de estándar interno, para los compuestos después de su reacción con el ABTS^{•+} (**Tablas 29 y 30**).

Las pendientes de las curvas de calibración de los analitos, antes de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}, variaron en el rango de 2,37-108,51. Esto indica, que el método presentó una sensibilidad alta, para algunos compuestos, y baja, para otros. Las desviaciones estándar de las pendientes de las curvas de calibración estuvieron en el rango de 0,009-0,4 para los compuestos antes de su reacción con el catión-radical, y variaron en el intervalo 0,001-0,02, para los analitos después de reaccionar con el ABTS^{•+}, esto demuestra la precisión de las curvas de calibración.

Los coeficientes de determinación (R^2) demuestran la linealidad del método en el rango de concentraciones evaluado (2,5-55 ppm). Koleva y col. (2001) obtuvieron curvas de calibración en un sistema HPLC- ABTS^{•+} para la quercetina, el ácido rosmarínico, el eugenol y el α -tocoferol y hallaron coeficientes de determinación entre 0,9988 y 0,9994. Raudonis y col. (2010) encontraron comportamiento lineal ($R^2=0,9910-0,9997$) para los ácidos rosmarínico, caféico y clorogénico. McDermott y col. (2011) determinaron valores de estos coeficientes entre 0,996-0,999, para la epicatequina, quercetina, rutina y los ácidos rosmarínico, cafeico y gálico.

- **Determinación de límites de detección y de cuantificación.** En las **Tablas 31 y 32**, se muestran los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para los compuestos fenólicos antes y después de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}, respectivamente.

Tabla 29. Linealidad y sensibilidad del método para la determinación por HPLC de compuestos fenólicos, antes de su reacción con el catión-radical ABTS⁺.

Compuesto	λ , nm	Ecuación ^a	R ²	S _B	B $\pm$ tS _B ^b
Dopamina	270	y=7,35x + 3,0	0,9999	0,02	7,35 $\pm$ 0,05
Ácido gálico	270	y=45,78x + 4	0,9999	0,03	45,78 $\pm$ 0,07
Procianidina B1	240	y=3,07x + 2,9	0,9996	0,02	3,07 $\pm$ 0,05
Catequina	270	y=7,34x + 1,7	0,9999	0,02	7,34 $\pm$ 0,04
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	270	y=55,08x + 11	0,9999	0,06	55,1 $\pm$ 0,1
Procianidina C1	240	y=2,37x + 8,6	0,9971	0,05	2,4 $\pm$ 0,1
Epicatequina	270	y=8,13x + 3,8	0,9999	0,03	8,13 $\pm$ 0,06
Cianidina-3-glucósido	515	y=45,38x + 2,9	0,9999	0,03	45,38 $\pm$ 0,06
Cianidina-3-rutinósido	515	y=31,01x + 5	0,9999	0,03	31,01 $\pm$ 0,07
Pelargonidina-3-glucósido	515	y=23,6x + 0,113	0,9999	0,02	23,6 $\pm$ 0,04
Ácido <i>p</i> -cumárico	315	y=108,51x + 15	0,9999	0,08	108,5 $\pm$ 0,2
Ácido ferúlico	315	y=73,09x + 13	0,9999	0,08	73,1 $\pm$ 0,2
Ácido elágico	240	y=101,1x + 35	0,9998	0,2	101,1 $\pm$ 0,4
Pelargonidina	515	y=31,14x + 12	0,9999	0,07	31,1 $\pm$ 0,1
Quercetina	270	y=40,52x + 14	0,9999	0,08	40,5 $\pm$ 0,2
Naringenina	290	y=49,5x + 20	0,9999	0,1	49,5 $\pm$ 0,2
Kaempferol	270	y=16,60x + 1,0	0,9999	0,02	16,60 $\pm$ 0,03
Pinocembrina	290	y=90,50x + 5	0,9998	0,03	90,50 $\pm$ 0,07
BHA	290	y=16,703x - 1,4	0,9999	0,004	16,703 $\pm$ 0,009
Ácido carnósico	290	y=2,54x + 2,2	0,9995	0,02	2,54 $\pm$ 0,05
BHT	270	y=5,54x + 2,6	0,9999	0,02	5,54 $\pm$ 0,05

^aCurvas realizadas por el método de estándar externo. ^bB: pendiente; t: coeficiente de *student* para un nivel de confianza del 95%. S_B: desviación estándar de la pendiente.

Tabla 30. Linealidad y sensibilidad del método para la determinación por HPLC de compuestos fenólicos, después de su reacción con el catión-radical ABTS⁺, $\lambda=734$ nm.

Compuesto	Ecuación ^a	R ²	S _B	B ± tS _B ^b
Dopamina	y=0,732x + 0,004	0,9999	0,004	0,732 ± 0,008
Ácido gálico	y=0,947x + 0,04	0,9997	0,009	0,95 ± 0,02
Procianidina B1	y=0,361x + 0,006	0,9998	0,001	0,361 ± 0,003
Catequina	y=0,417x + 0,020	0,9998	0,002	0,417 ± 0,004
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Procianidina C1	y=0,269x + 0,005	0,9999	0,001	0,269 ± 0,003
Epicatequina	y=0,5783x - 0,0007	0,9999	0,001	0,578 ± 0,002
Cianidina-3-glucósido	y=0,45x + 0,007	0,9999	0,001	0,450 ± 0,003
Cianidina-3-rutinósido	y=0,297x + 0,04	0,9996	0,003	0,297 ± 0,005
Pelargonidina-3-glucósido	y=0,153x + 0,006	0,9995	0,001	0,153 ± 0,003
Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido ferúlico	y=0,117x + 0,011	0,9990	0,001	0,117 ± 0,003
Ácido elágico	y=0,575x + 0,051	0,9997	0,003	0,575 ± 0,007
Pelargonidina	y=0,195x + 0,010	0,9999	0,001	0,195 ± 0,003
Quercetina	y=0,505x + 0,05	0,9994	0,003	0,505 ± 0,007
Naringenina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	y=0,1696x - 0,005	0,9996	0,0007	0,170 ± 0,001
Pinocembrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BHA	y=0,366x + 0,012	0,9999	0,002	0,366 ± 0,003
Ácido carnósico	y=0,116x + 0,002	0,9995	0,001	0,116 ± 0,003
BHT	y=0,197x + 0,012	0,9994	0,002	0,197 ± 0,004

^aCurvas realizadas por el método del estándar interno. ^bB: pendiente; t: coeficiente de *student* para un nivel de confianza del 95%. S_B: desviación estándar de la pendiente. N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante en las concentraciones evaluadas.

Tabla 31. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos fenólicos^a antes de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}.

Compuesto	λ , nm	LOD, ppm	LOQ, ppm
Dopamina	270	0,77	1,76
Ácido gálico	270	0,16	0,37
Procianidina B1	240	1,84	4,23
Catequina	270	0,59	1,36
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	270	0,26	0,60
Procianidina C1	240	0,91	5,10
Epicatequina	270	0,82	1,87
Cianidina-3-glucósido	515	0,13	0,30
Cianidina-3-rutinósido	515	0,25	0,58
Pelargonidina-3-glucósido	515	0,50	1,15
Ácido <i>p</i> -cumárico	315	0,18	0,41
Ácido ferúlico	315	0,24	0,54
Ácido elágico	240	0,41	0,93
Pelargonidina	515	0,16	0,36
Quercetina	270	0,44	1,00
Naringenina	290	0,49	1,13
Kaempferol	270	0,22	0,51
Pinocembrina	290	0,08	0,19
Ácido carnósico	290	1,89	4,33

^aNo se incluyen el BHT y el BHA porque estos compuestos no se encuentran de manera natural en los extractos.

Tabla 32. Límites de detección y de cuantificación de los compuestos fenólicos^a después de su reacción con el catión-radical ABTS⁺.

Compuesto	LOD, ppm^b	LOQ, ppm^b
Dopamina	0,46	1,05
Ácido gálico	0,80	1,84
Procianidina B1	0,88	2,02
Catequina	1,07	2,46
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	N.D.	N.D.
Procianidina C1	1,02	2,34
Epicatequina	0,36	0,83
Cianidina-3-glucósido	0,74	1,40
Cianidina-3-rutinósido	1,94	3,45
Pelargonidina-3-glucósido	2,16	4,96
Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D.	N.D.
Ácido ferúlico	2,72	6,70
Ácido elágico	1,65	3,79
Pelargonidina	0,68	1,55
Quercetina	2,27	5,20
Naringenina	N.D.	N.D.
Kaempferol	1,92	4,41
Pinocembrina	N.D.	N.D.
Ácido carnósico	2,08	4,66

^aNo se incluyen el BHT y el BHA porque estos compuestos no se encuentran de manera natural en los extractos.

^bMWD, $\lambda=734$ nm. N.D. No detectado: no presentó capacidad antioxidante.

4.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS⁺, de compuestos presentes en extractos sólido-líquido de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

En la **Figura 17**, se muestran cromatogramas típicos, obtenidos por HPLC-ABTS⁺, de extractos de mora de Castilla procedente de la finca Rosas Rojas. Los cromatogramas a $\lambda=515$ nm (**Figura 17A**) y $\lambda=270$ nm (**Figura 17B**), corresponden a los analitos antes de su reacción con el catión-radical ABTS⁺. En el cromatograma de la **Figura 17C** ($\lambda=734$ nm), se observan los compuestos que presentaron capacidad antioxidante. Los extractos obtenidos con mora de Castilla cosechada en la finca La Estancia, presentaron los mismos perfiles cromatográficos (**Anexo B**).

Por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos y de sus espectros UV-Vis, se identificaron las antocianinas cianidina-3-glucósido (5), cianidina-3-rutinósido (7) y pelargonidina-3-glucósido (8) (**Figura 17A**). Los tiempos de retención de otros picos cromatográficos coincidieron con los de los patrones, pero sus espectros UV-Vis no, por lo tanto, no se pudo inferir acerca de la identidad de estos compuestos.

En la **Tabla 33**, se reportan las concentraciones de las antocianinas identificadas y se muestran los valores de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de mora de Castilla cosechada en las fincas Rosas Rojas y La Estancia. Se observa que la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido contribuyeron con solo el 2,2 y 4,6%, respectivamente, de la capacidad antioxidante total de los extractos de mora analizados; mientras que el pico número 4 (**Figura 17** y **Tabla 33**), fue el compuesto que más contribuyó (54,9%), seguido del analito representado por el número 1 (21,9%). Posiblemente, alguno de estos picos cromatográficos correspondan a los elagitaninos, lambertianina C o sanguina H-6, ya que se ha encontrado que en los extractos de mora estos

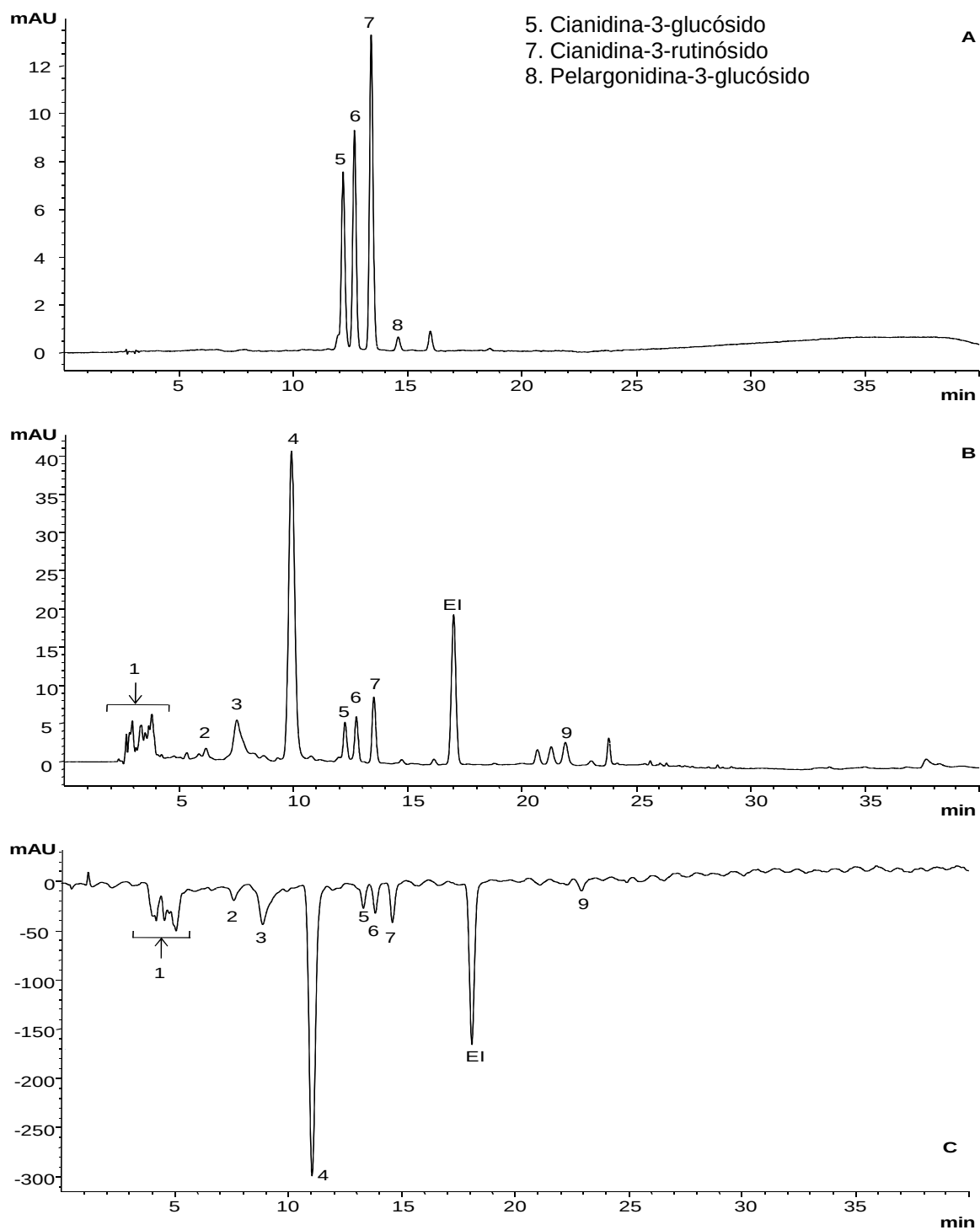


Figura 17. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de mora de Castilla cosechada en la finca Rosas Rojas. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. EI: Estándar Interno.

Tabla 33. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos sólido-líquido de mora de Castilla.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox [®] , μM ^b		Porcentaje capacidad antioxidante ^b		$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg sustancia}^b$	
	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B
1	-	-	67 ± 3	56 ± 4	$21,8 \pm 0,7$	$21,9 \pm 0,2$	-	-
2	-	-	$5,2 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	-	-
3	-	-	$32,8 \pm 0,7$	27 ± 2	$10,7 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,7$	-	-
4	-	-	169 ± 5	142 ± 4	$54,8 \pm 0,6$	$54,9 \pm 0,1$	-	-
5	$1,77 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,05$	$7,0 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$
6	-	-	$8,4 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	-	-
7	$4,5 \pm 0,3$	$3,77 \pm 0,07$	14 ± 1	$11,7 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$
9	-	-	$4,7 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	-	-
Total			308 ± 5	258 ± 6	100	100		

^aEn la **Figura 17**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Finca A: Rosas Rojas. Finca B: La Estancia. – No calculada, compuesto no identificado.

Pico No. 5: Cianidina-3-glucósido

Pico No. 7: Cianidina-3-rutinósido

compuestos son los que se encuentran en mayor proporción (92%, p/p) (Mertz y col., 2007).

Los resultados obtenidos mediante HPLC con derivatizador, indicaron que las diferencias en la capacidad antioxidante de los extractos procedentes de las dos fincas, determinadas utilizando el lector de placas (**Sección 2.3.1**), se deben a cambios en la concentración de los compuestos presentes (**Tabla 33**), porque los perfiles cromatográficos fueron muy similares (**Figura 17 y Anexo B**).

En la **Figura 18**, se muestran cromatogramas típicos obtenidos con los extractos de cáscara de plátano Hartón procedente de la finca El Prado. En el cromatograma, registrado a $\lambda=270$ nm (**Figura 18A**), aparecen los analitos antes de su reacción con el catión-radical ABTS⁺. En el cromatograma de la **Figura 18B** ($\lambda=734$ nm), se observan los compuestos que presentaron capacidad antioxidante. Los extractos obtenidos con cáscara de plátano Hartón, cosechado en la finca Guatiguará, presentaron los mismos perfiles cromatográficos (**Anexo C**). Por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV-Vis, se identificó en ellos la dopamina (pico número 2) (**Figura 18**).

En la **Tabla 34**, se muestran las concentraciones de dopamina y los valores de capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de cáscara de plátano Hartón cosechado en las dos fincas. Se observa que la dopamina es el compuesto que le confiere mayor capacidad antioxidante a estos extractos (73,6%).

Las diferencias en la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de plátano Hartón procedente de las fincas El Prado y Guatiguará (**Sección 2.3.1**), se deben a cambios en la concentración de los compuestos presentes, porque sus perfiles cromatográficos fueron muy similares (**Figura 18 y Anexo C**).

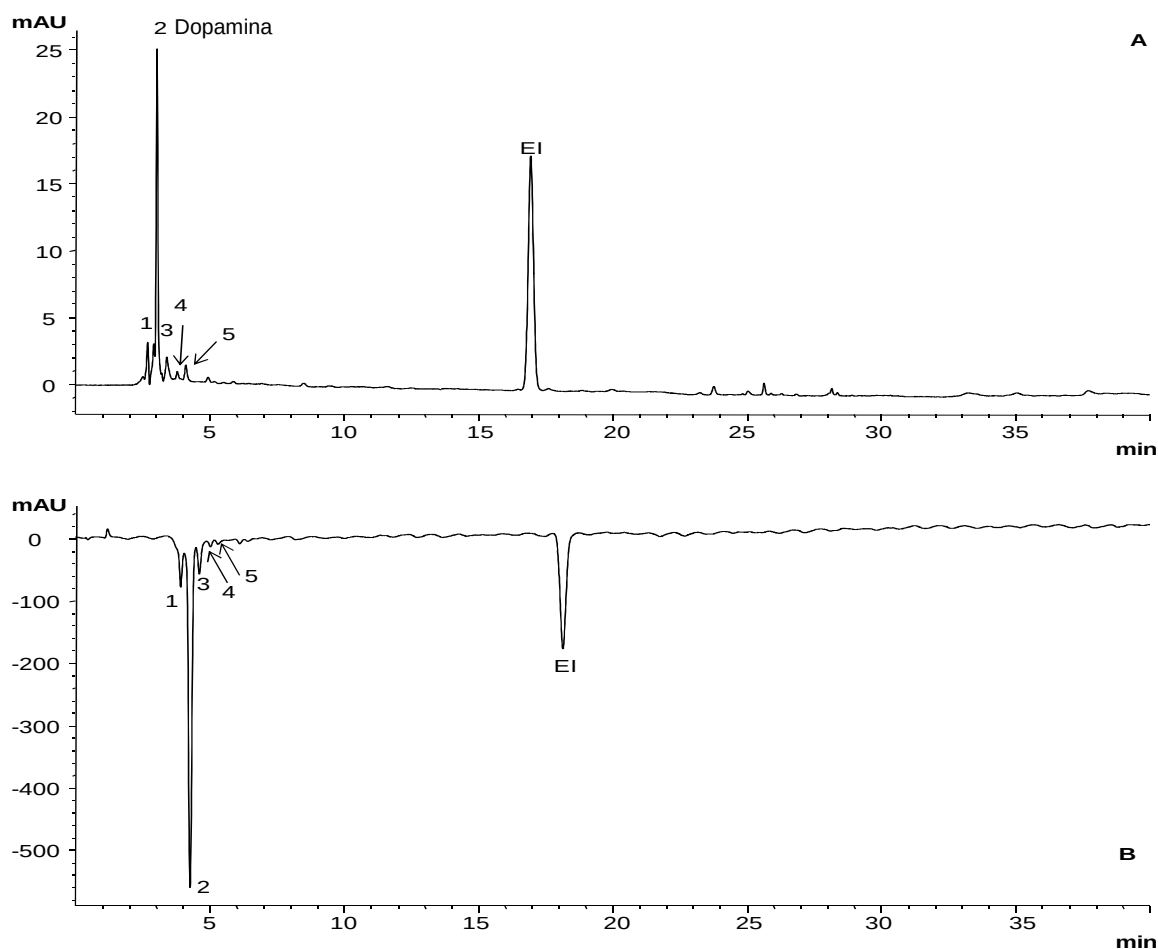


Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca El Prado. Antes (DAD, A: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, B: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

Los valores de capacidad antioxidante de los extractos, obtenidos mediante extracción sólido-líquido, de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, fueron más bajos que el valor hallado para el BHT (**Sección 2.3.1**), antioxidante comercial usado como referencia. Por este motivo, el contenido de compuestos fenólicos en los extractos se concentró, mediante SPE, y se determinó, nuevamente, la capacidad antioxidante por HPLC con derivatizador.

Tabla 34. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox [®] , μM ^b		Porcentaje capacidad antioxidante ^b		$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg sustancia}^b$	
	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D
1	-	-	$26,9 \pm 0,5$	22 ± 2	$13,6 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,7$	-	-
2	$23,2 \pm 0,4$	$18,8 \pm 0,3$	145 ± 4	116 ± 3	$73,6 \pm 0,3$	$73,5 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,2$
3	-	-	18 ± 1	$14,8 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,2$	-	-
4	-	-	$3,9 \pm 0,3$	$2,96 \pm 0,09$	$2,0 \pm 0,1$	$1,86 \pm 0,08$	-	-
5	-	-	$2,94 \pm 0,07$	$2,43 \pm 0,06$	$1,50 \pm 0,01$	$1,54 \pm 0,08$	-	-
Total			197 ± 4	158 ± 3	100	100		

^aEn la **Figura 18**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Finca C: El Prado. Finca D: Guatiguará. – No calculada, compuesto no identificado.

Pico No. 2: Dopamina.

4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS⁺, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.

Los extractos de mora de Castilla, obtenidos por SPE, mostraron los mismos perfiles cromatográficos de los extractos antes de su concentración. Los cromatogramas presentados en la **Figura 19** y el **Anexo D**, se consiguieron con la mitad de la concentración de extracto utilizada para la obtención de los cromatogramas mostrados en la **Figura 17** y el **Anexo B**.

En la **Tabla 35**, se muestran los valores de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de mora de Castilla, después de SPE, así como las concentraciones de los compuestos identificados. Al igual que en el caso de los extractos antes de SPE, la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido contribuyeron con el 2,3 y 4,6% de la capacidad antioxidante total de los extractos. El compuesto identificado con el número 6 (**Figura 19**), presentó la contribución más alta a la capacidad antioxidante de estos extractos (50,3%), seguidos de los analitos representados con el número 1 (17,8%).

En los cromatogramas de los extractos de cáscara de plátano, obtenidos por SPE, se observaron picos de analitos (**Figura 20** y **Anexo E**), que no se detectaron en los extractos a los que no se les hizo SPE. Esto se debe a que la extracción en fase sólida, tal como se realizó en este trabajo, remueve los azúcares y ácidos orgánicos de los extractos y concentra los compuestos fenólicos, de manera que permite la detección de sustancias, que inicialmente pudieron no ser detectadas. El blanco del cartucho de extracción (**Anexo F**), permitió descartar que estos compuestos fueran impurezas o contaminantes del procedimiento.

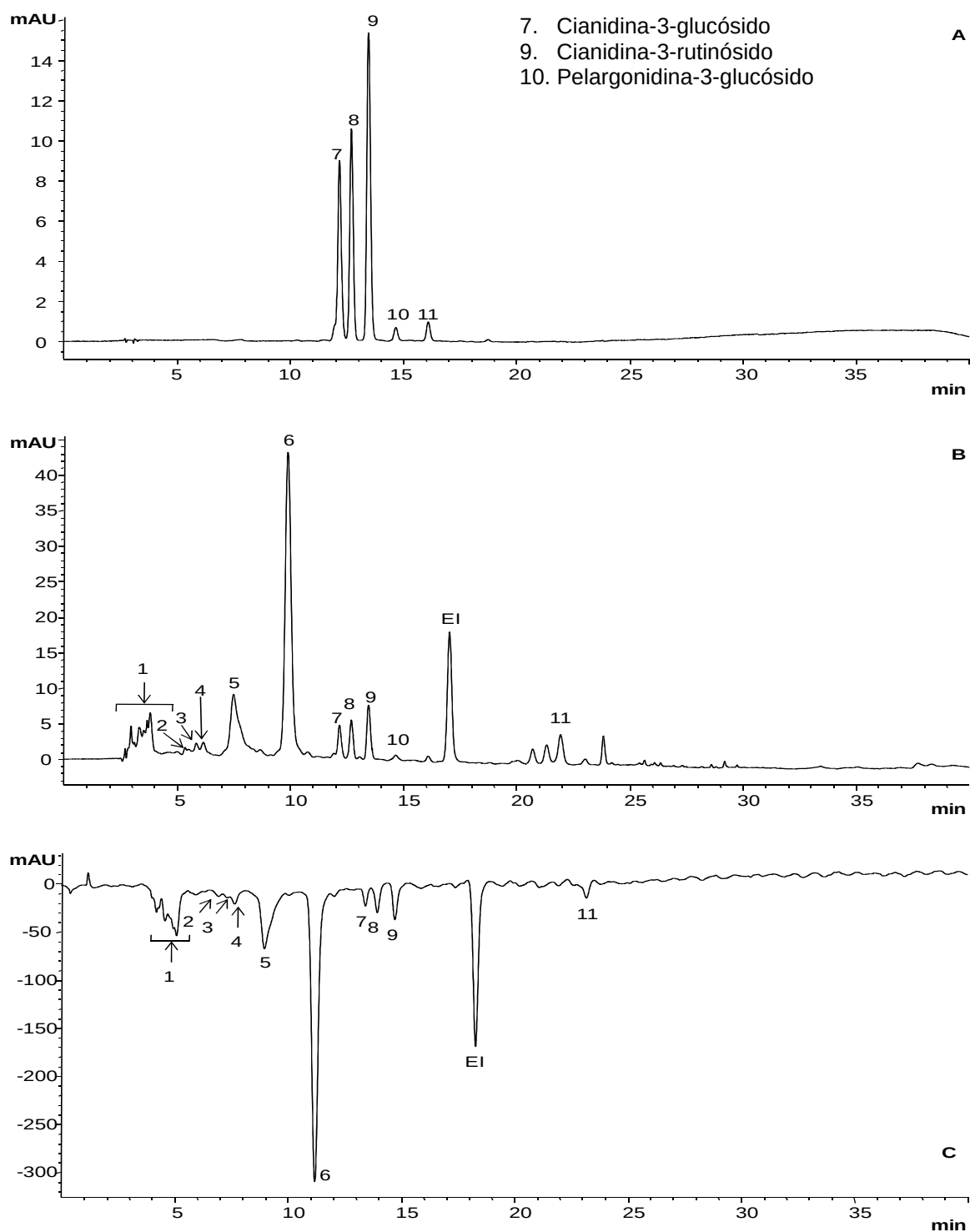


Figura 19. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de mora de Castilla cosechada en la finca Rosas Rojas, después de su extracción en fase sólida. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

Tabla 35. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de mora de Castilla, después de su extracción en fase sólida.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox [®] , μM^b		Porcentaje capacidad antioxidante ^b		$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg sustancia}^b$	
	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B
1	-	-	59 ± 1	49 ± 1	$17,7 \pm 0,4$	$17,9 \pm 0,4$	-	-
2	-	-	$3,4 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,2$	$1,03 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,06$	-	-
3	-	-	$3,4 \pm 0,2$	N.D.	$1,03 \pm 0,04$	N.D.	-	-
4	-	-	$7,5 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	-	-
5	-	-	55 ± 1	45 ± 1	$16,4 \pm 0,4$	$16,6 \pm 0,4$	-	-
6	-	-	166 ± 2	137 ± 1	$50,1 \pm 0,6$	$50,5 \pm 0,3$	-	-
7	$1,84 \pm 0,03$	$1,57 \pm 0,04$	$7,4 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,1$	$2,23 \pm 0,06$	$2,34 \pm 0,05$	$4,03 \pm 0,03$	$4,04 \pm 0,05$
8	-	-	$8,0 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	-	-
9	$4,6 \pm 0,1$	$3,93 \pm 0,02$	$14,9 \pm 0,5$	$12,6 \pm 0,2$	$4,57 \pm 0,01$	$4,66 \pm 0,05$	$3,3 \pm 0,1$	$3,22 \pm 0,06$
11	-	-	$7,4 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,4$	$2,24 \pm 0,08$	$2,22 \pm 0,01$	-	-
Total			332 ± 3	271 ± 2	100	100		

^aEn la **Figura 19**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Finca A: Rosas Rojas. Finca B: La Estancia. – No calculada, compuesto no identificado.

Pico No. 7: Cianidina-3-glucósido

Pico No. 9: Cianidina-3-rutinósido

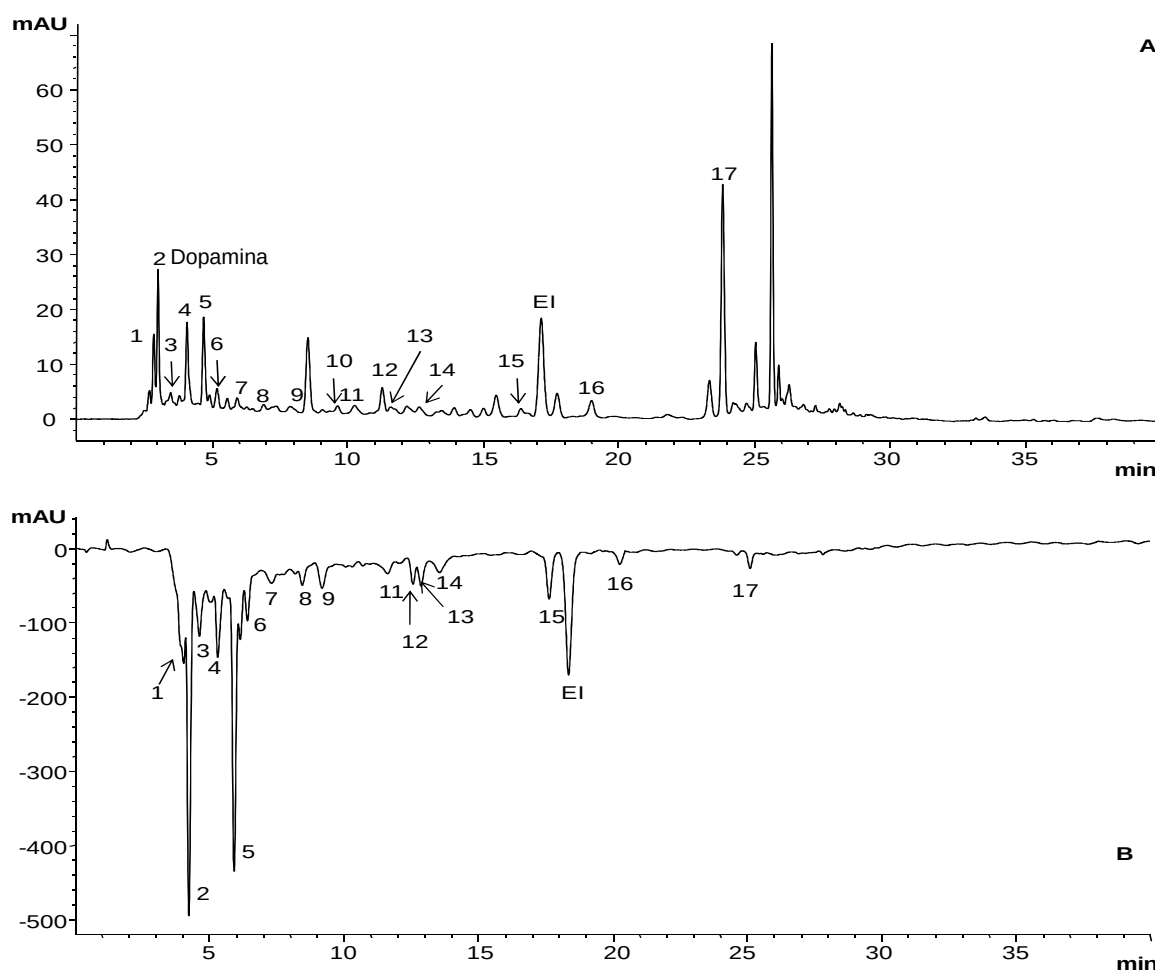


Figura 20. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca El Prado, después de su extracción en fase sólida. Antes (DAD, A: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, B: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

En los extractos de cáscara de plátano Hartón, después de SPE, a pesar de que se detectaron otros analitos con capacidad antioxidante, la dopamina fue el compuesto que más contribuyó (28,9%) a este observable (**Tabla 36**).

Tabla 36. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos de cáscara de plátano Hartón, después de su extracción en fase sólida.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox®, µM ^b		Porcentaje capacidad antioxidante ^b		µmol Trolox®/mg sustancia ^b	
	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D
1	-	-	39 ± 1	31 ± 2	7,4 ± 0,2	7,4 ± 0,3	-	-
2	24,8 ± 0,5	19,7 ± 0,9	153 ± 2	123 ± 3	28,9 ± 0,4	28,8 ± 0,5	6,15 ± 0,04	6,2 ± 0,3
3	-	-	24 ± 2	18 ± 1	4,5 ± 0,4	4,4 ± 0,3	-	-
4	-	-	72 ± 3	57 ± 2	13,7 ± 0,6	13,6 ± 0,5	-	-
5	-	-	130 ± 3	102 ± 3	24,6 ± 0,6	24,2 ± 0,7	-	-
6	-	-	23 ± 1	18,3 ± 0,8	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	-	-
7	-	-	10 ± 1	7,8 ± 0,9	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	-	-
8	-	-	5,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3	0,87 ± 0,06	0,81 ± 0,06	-	-
9	-	-	13,5 ± 0,6	10,6 ± 0,6	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2	-	-
10	-	-	N.D.	5,2 ± 0,1	N.D.	1,25 ± 0,03	-	-
11	-	-	5,7 ± 0,6	4,86 ± 0,06	1,1 ± 0,1	1,15 ± 0,02	-	-
12	-	-	4,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	0,80 ± 0,06	0,76 ± 0,05	-	-
13	-	-	5,1 ± 0,8	3,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,87 ± 0,01	-	-
14	-	-	10 ± 1	8,3 ± 0,4	1,9 ± 0,2	1,91 ± 0,08	-	-
15	-	-	23,4 ± 0,8	18 ± 2	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,4	-	-
16	-	-	2,81 ± 0,05	2,3 ± 0,1	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,03	-	-
17	-	-	7 ± 1	4,6 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	-	-
Total			529 ± 6	421 ± 5	100	100		

^aEn la **Figura 20**. ^bPromedio ± desviación estándar (*n*=3). Finca C: El Prado. Finca D: Guatiguará. – No calculada, compuesto no identificado.

Pico No. 2: Dopamina

4.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante, mediante HPLC-ABTS⁺, de compuestos presentes en extractos hidrolizados de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón

Los compuestos que se identificaron en los extractos de mora fueron la cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido. En los extractos de cáscara de plátano se identificó la dopamina. Con el propósito de identificar otros compuestos, y teniendo en cuenta que la mayoría de sustancias patrón utilizadas están en su forma aglicona, mientras que en la naturaleza estas sustancias se encuentran, principalmente, glicosiladas, se hizo hidrólisis ácida de los extractos obtenidos por SPE. En las **Figuras 21 y 22**, se observan perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=515$ nm y $\lambda=270$ nm, respectivamente, de extractos de mora antes y después de su hidrólisis ácida.

A $\lambda=515$ nm, se evidenció la hidrólisis de las antocianinas cianidina-3-glucósido (1), cianidina-3-rutinósido (2) y pelargonidina-3-glucósido (3) a sus agliconas cianidina (4) y pelargonidina (5), respectivamente (**Figura 21 y Esquema 10**).

La identificación de la cianidina y de la pelargonidina, se hizo por comparación de sus tiempos de retención, antes y después de su reacción con el catión-radical ABTS⁺, y por comparación con los espectros UV-Vis de las agliconas obtenidas mediante hidrólisis ácida, bajo las mismas condiciones a las que se realizó la hidrólisis de los extractos, de una mezcla de sustancias patrón de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido.

A $\lambda=270$ nm, se identificó el ácido elágico, lo que puede indicar la presencia de elagitaninos en los extractos de mora sin hidrolizar (**Figura 22 y Esquema 11**). El ácido elágico fue uno de los compuestos que contribuyó en mayor medida (35,4%) a la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados de mora (**Figura 23 y Tabla 37**).

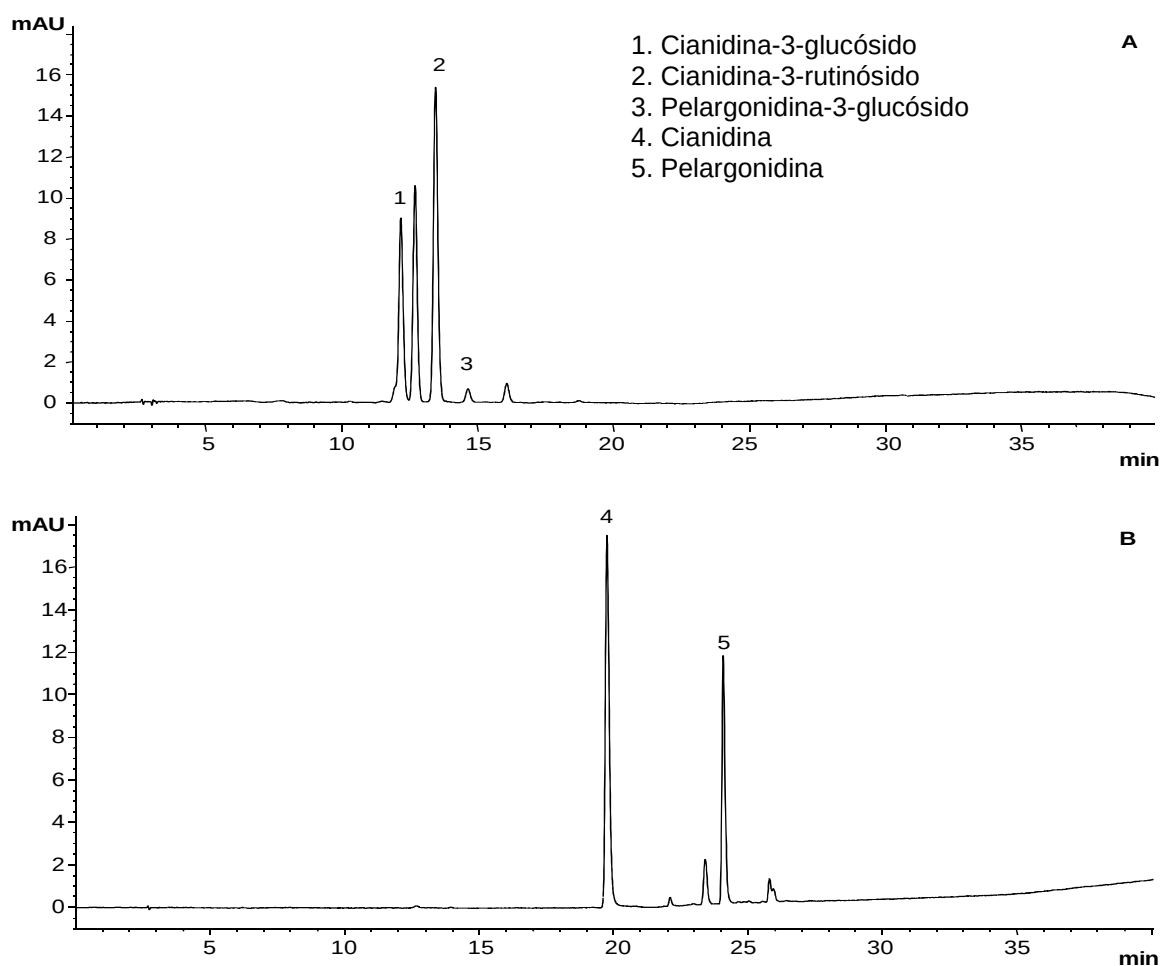
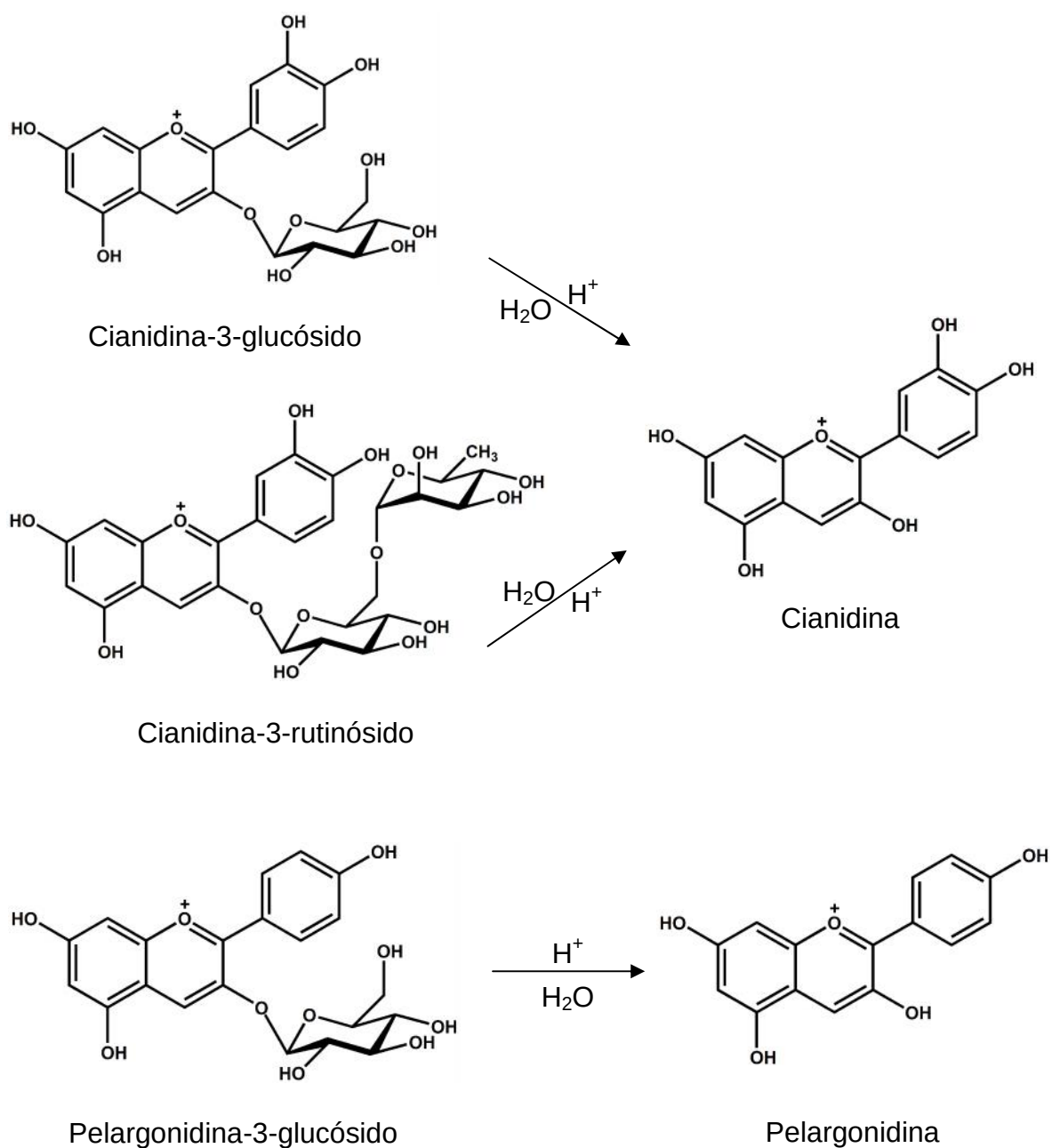


Figura 21. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=515$ nm, de extractos de mora de Castilla: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida.

En los extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón, a $\lambda=515$ nm, se identificaron la cianidina y la pelargonidina, posiblemente, productos de la hidrólisis de sus respectivas leucoantocianidinas (**Figuras 24 y 25**), tal como lo reportaron Porter y col. (1986).

A $\lambda=270$ nm, se identificaron la quercetina y el kaempferol, esto indicó la presencia de derivados glicosídicos de estos compuestos en los extractos de cáscara de plátano Hartón antes de su hidrólisis ácida (**Figura 26**).



Esquema 10. Estructuras de antocianinas y antocianidinas encontradas en los extractos de mora de Castilla antes y después de su hidrólisis ácida, respectivamente.

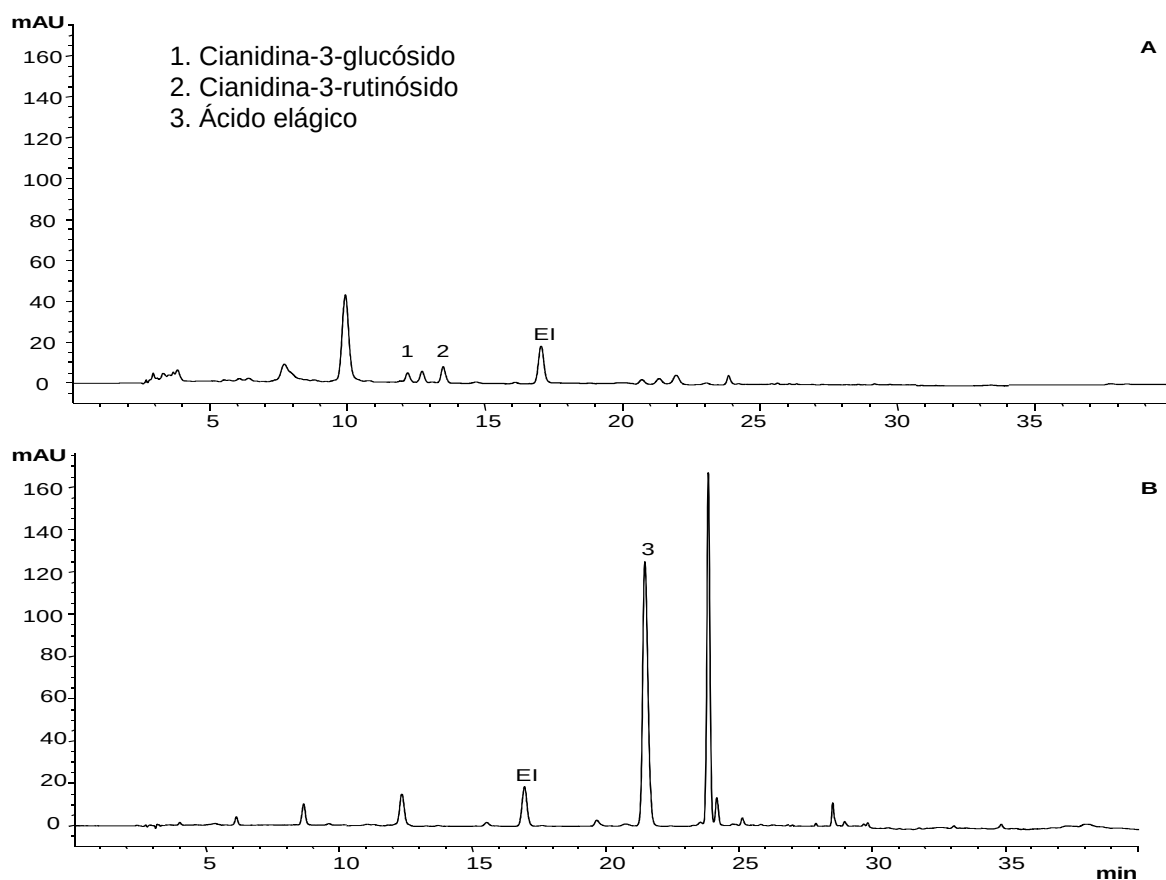
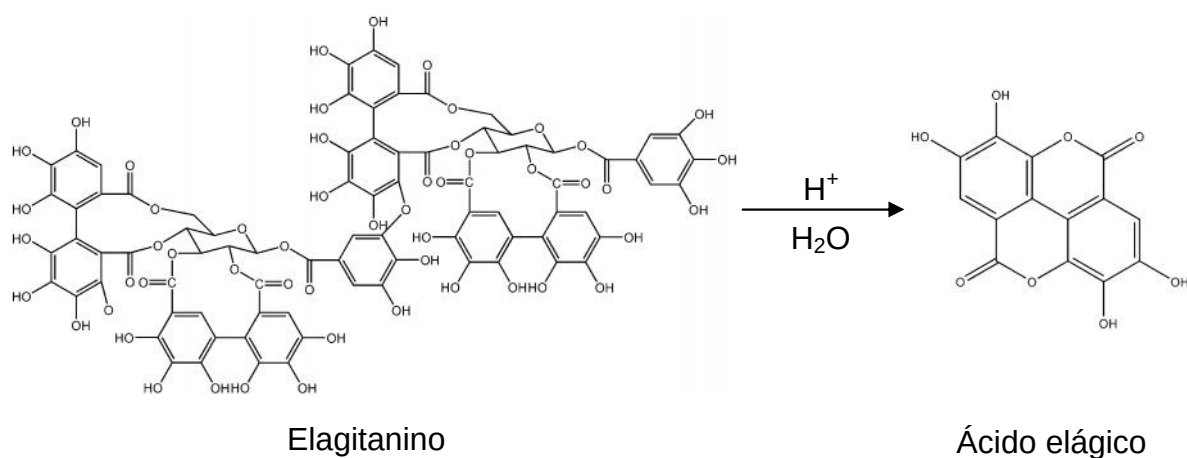


Figura 22. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=270$ nm, de extractos de mora de Castilla: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida. EI: Estándar interno.



Esquema 11. Estructura del ácido elágico, obtenido por hidrólisis ácida de un elagitanino.

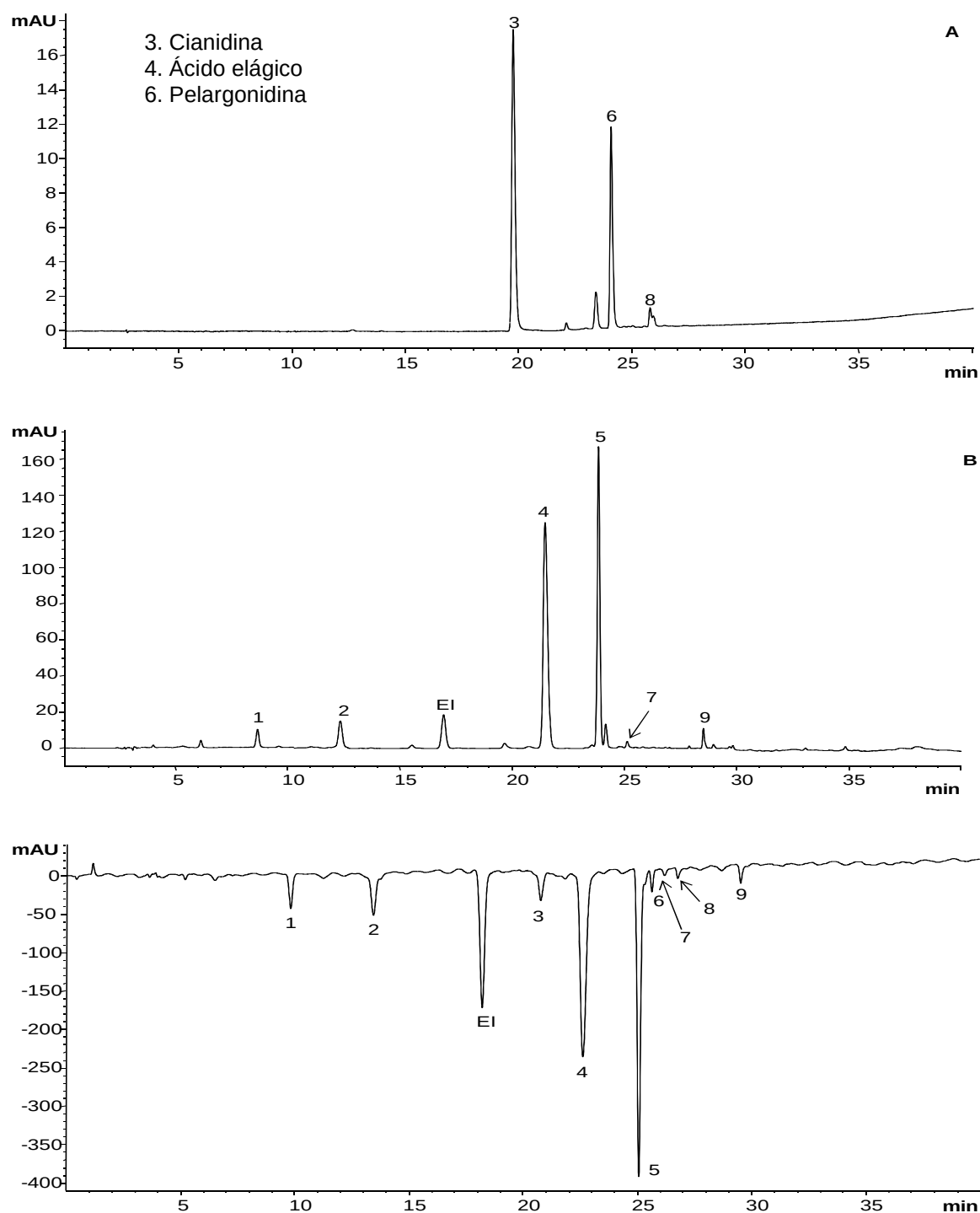


Figura 23. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos hidrolizados de mora de Castilla. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. EI: Estándar interno.

Tabla 37. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos hidrolizados de mora de Castilla.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox [®] , μM ^b		Porcentaje capacidad antioxidante		$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg sustancia}^b$	
	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B	Finca A	Finca B
1	-	-	$22,6 \pm 0,4$	$19,3 \pm 0,7$	$6,0 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,3$	-	-
2	-	-	$37,2 \pm 0,8$	29 ± 1	$9,9 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,4$	-	-
3	-	-	$26,4 \pm 0,6$	$22,4 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,2$	-	-
4	$26,8 \pm 0,5$	$20,9 \pm 0,4$	134 ± 1	104 ± 1	$35,6 \pm 0,3$	$35,1 \pm 0,4$	$5,01 \pm 0,06$	$4,98 \pm 0,04$
5	-	-	139 ± 1	108 ± 1	$36,5 \pm 0,2$	$36,5 \pm 0,4$	-	-
6	$4,0 \pm 0,2$	$3,01 \pm 0,01$	$7,0 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2$	$1,85 \pm 0,05$	$1,83 \pm 0,05$	$1,76 \pm 0,03$	$1,81 \pm 0,06$
7	-	-	$2,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$0,62 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,04$	-	-
8	-	-	$2,5 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,04$	-	-
9	-	-	$5,6 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$1,50 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,09$	-	-
Total			377 ± 2	296 ± 3	100	100		

^aEn la **Figura 23**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Finca A: Rosas Rojas. Finca B: La Estancia. – No calculada, compuesto no identificado.

Pico No. 3: Cianidina

Pico No. 4: Ácido elágico

Pico No. 6: Pelargonidina

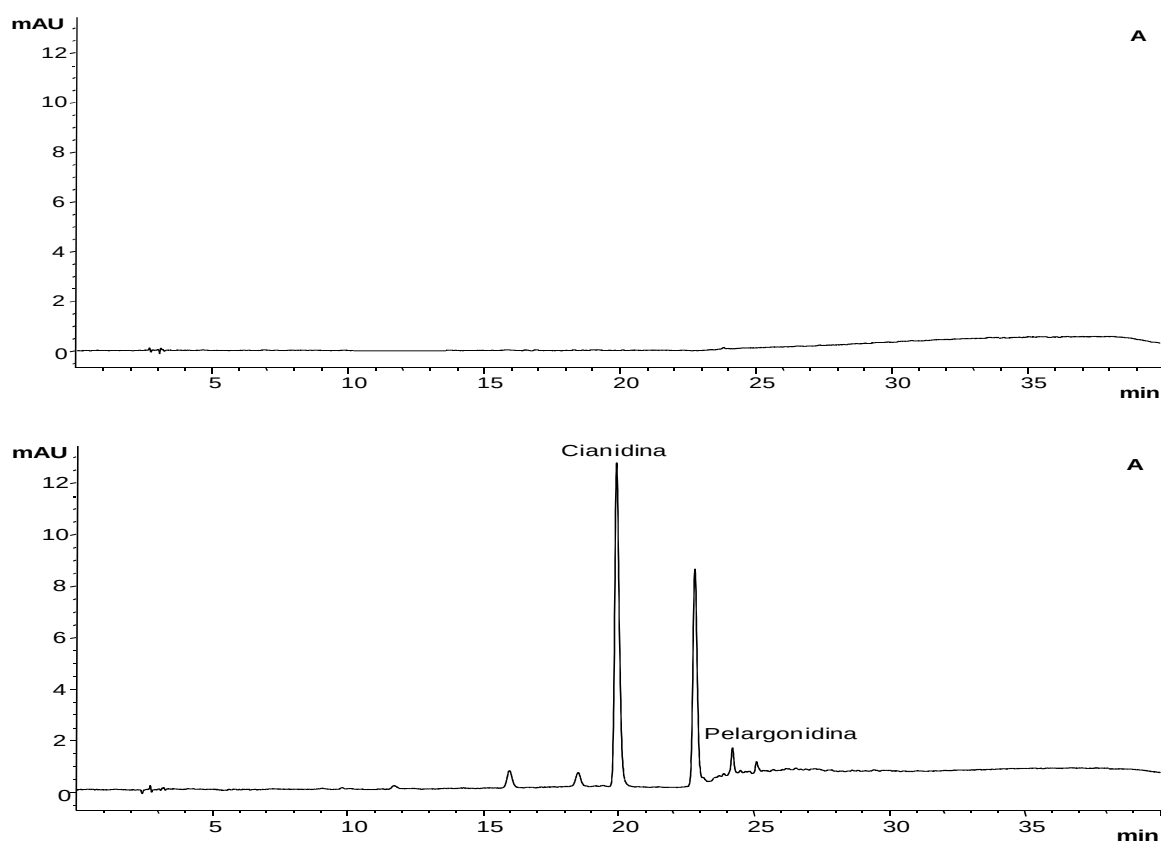


Figura 24. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=515$ nm, de extractos de cáscara de plátano: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida.

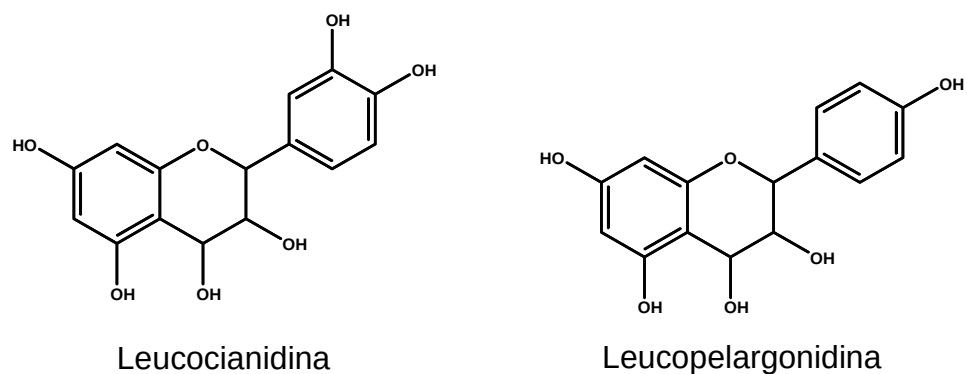


Figura 25. Estructuras de las leucoantocianidinas, posibles precursoras de las antocianidinas encontradas en los extractos hidrolizados de cáscara de plátano.

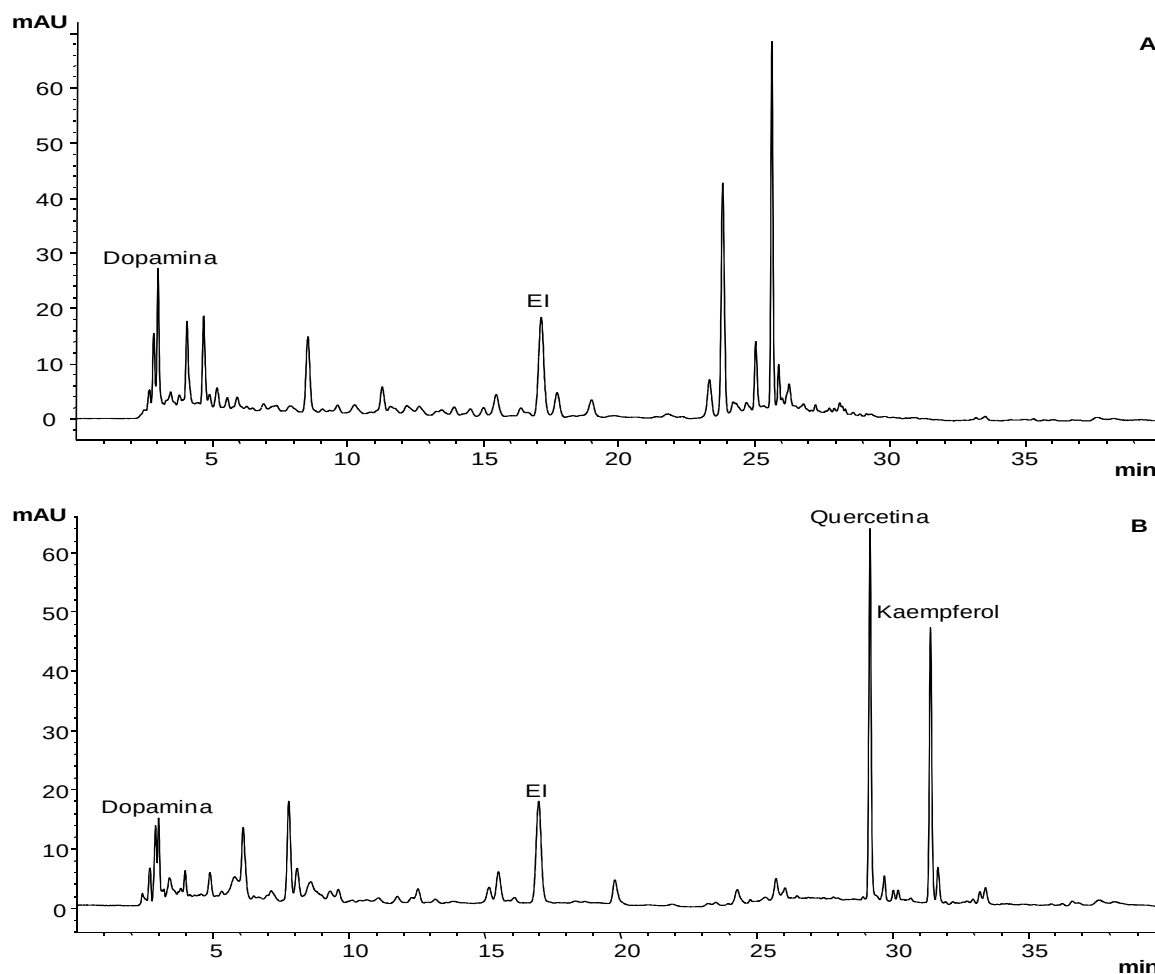


Figura 26. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC-DAD a $\lambda=270$ nm, de extractos de cáscara de plátano: A. antes y B. después de su hidrólisis ácida.

La dopamina fue el compuesto que contribuyó en medida más alta (21,8%), a la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón (Figura 27 y Tabla 38).

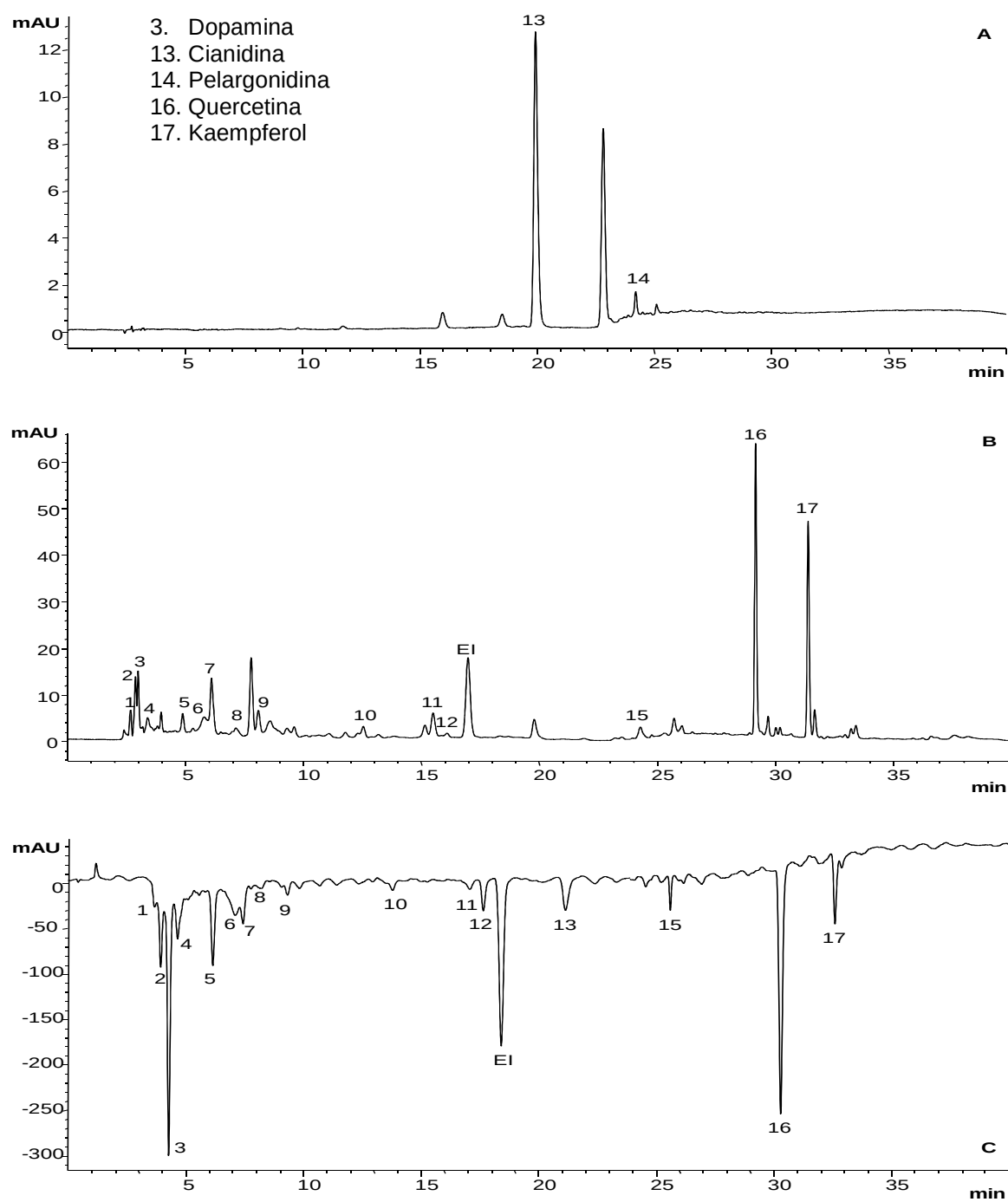


Figura 27. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

Tabla 38. Capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos hidrolizados de cáscara de plátano Hartón.

No. pico ^a	Concentración, mg/L ^b		Concentración equivalente de Trolox [®] , μM ^b		Porcentaje capacidad antioxidante ^b		$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg sustancia}^b$	
	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D	Finca C	Finca D
1	-	-	$8,1 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	-	-
2	-	-	$31,2 \pm 0,7$	$25,4 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,1$	-	-
3	$14,5 \pm 0,7$	$11,1 \pm 0,7$	$89,3 \pm 0,9$	$70,3 \pm 0,3$	$21,7 \pm 0,2$	$21,8 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,4$
4	-	-	$33,0 \pm 0,6$	$26,6 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,1$	-	-
5	-	-	36 ± 1	$29,3 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,1$	-	-
6	-	-	39 ± 1	$29,78 \pm 0,06$	$9,6 \pm 0,3$	$9,25 \pm 0,09$	-	-
7	-	-	$20,1 \pm 0,7$	$16,8 \pm 0,9$	$4,9 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	-	-
8	-	-	$6,8 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,5$	$1,60 \pm 0,08$	$1,6 \pm 0,1$	-	-
9	-	-	$7,05 \pm 0,03$	$5,5 \pm 0,6$	$1,68 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,2$	-	-
10	-	-	$6,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$1,50 \pm 0,03$	$1,49 \pm 0,03$	-	-
11	-	-	$6,0 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$	$1,46 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,05$	-	-
12	-	-	15 ± 1	$10,3 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$	-	-
13	-	-	20 ± 1	$15,1 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,3$	$4,75 \pm 0,08$	-	-
15	-	-	$11,82 \pm 0,05$	$9,0 \pm 0,7$	$2,86 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,2$	-	-
16	$13,53 \pm 0,03$	$10,07 \pm 0,03$	62 ± 2	46 ± 2	$15,1 \pm 0,4$	$14,3 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$
17	$14,6 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,2$	$20,1 \pm 0,5$	$16,2 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$1,38 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,03$
Total			412 ± 3	322 ± 3	100	100		

^aEn la **Figura 27**. ^bPromedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$). Finca C: El Prado. Finca D: Guatiguará. – No calculada, compuesto no identificado. Pico No. 3: Dopamina. Pico No. 13: Cianidina. Pico No. 16: Quercetina. Pico No. 17: Kaempferol.

Con base en las concentraciones de los compuestos identificados en los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, y en sus concentraciones equivalentes de Trolox, calculadas según la curva de calibración, se hallaron sus valores de capacidad antioxidante. También, se determinó la capacidad antioxidante de estos compuestos a partir de las sustancias-patrón y se encontraron los mismos valores que los hallados con los extractos. Además, se determinó la capacidad antioxidante de estas sustancias con el lector de placas y se encontraron los mismos resultados que con el HPLC-derivatizador (**Tabla 39**).

Tabla 39. Capacidad antioxidante de los compuestos identificados en los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

Compuesto	Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia)*		
	HPLC-Derivatizador		Lector de placas
	Según el extracto	Según el patrón	
Cianidina-3-glucósido	4000 $\pm$ 130	4000 $\pm$ 10	4100 $\pm$ 100
Cianidina-3-rutinósido	3200 $\pm$ 180	3160 $\pm$ 11	3230 $\pm$ 63
Ácido elágico	5000 $\pm$ 50	4960 $\pm$ 15	5030 $\pm$ 72
Pelargonidina	1780 $\pm$ 48	1750 $\pm$ 32	1800 $\pm$ 30
Dopamina	6200 $\pm$ 240	6180 $\pm$ 42	6200 $\pm$ 80
Quercetina	4600 $\pm$ 150	4610 $\pm$ 14	4700 $\pm$ 180
Kaempferol	1390 $\pm$ 35	1380 $\pm$ 11	1410 $\pm$ 45
BHT		1680 $\pm$ 16	1680 $\pm$ 20

*Promedio $\pm$ desviación estándar ($n=3$).

Los resultados presentados en este capítulo permiten hacer las siguientes conclusiones:

Se desarrolló un método, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-ABTS^{•+}), para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en extractos. Este método permitió la separación sobre la línea base de 22 sustancias patrón.

En la literatura no se encuentra otro procedimiento por el que se pueda separar este número de sustancias empleando esta técnica.

En los extractos de mora, se identificaron las antocianinas cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido, además, se evidenció la presencia de otros compuestos que contribuyeron en medida más alta a la capacidad antioxidante de los extractos. Después de la hidrólisis ácida, se identificaron la cianidina, la pelargonidina y el ácido elágico, este último fue uno de los compuestos que contribuyó en porcentaje más alto a la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados de mora.

En los extractos de cáscara de plátano, se identificó la dopamina, compuesto que contribuyó en medida más alta a la capacidad antioxidante de estos extractos. Después de la hidrólisis ácida, se identificaron la cianidina y la pelargonidina, lo cual sugirió la presencia de sus respectivas leucoantocianidinas en los extractos sin hidrolizar. También se identificaron, después de la hidrólisis, la quercetina y el kaempferol, provenientes de sus derivados glicosídicos.

5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE MORA DE CASTILLA Y DE CÁSCARA DE PLÁTANO HARTÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Durante los últimos 15 años, el uso de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés) ha aumentado, principalmente, debido al advenimiento de los métodos de ionización a presión atmosférica (API, por sus siglas en inglés) (Kruve y col., 2015).

Las fuentes API producen iones en fase gaseosa con poca o ninguna descomposición de analitos. Esto, combinado con la sensibilidad intrínseca de los espectrómetros de masas, ha permitido el uso de LC-MS en casi todas las áreas del análisis químico (bioanalítica, médica, ambiental, alimentos, descubrimiento de drogas, etc.), donde se determinan compuestos, presentes en cantidades traza, en matrices complejas (Korfmacher, 2005).

Una de las fuentes API, es la ionización por electronebulización, o *electrospray* (ESI, por sus siglas en inglés), que se puede utilizar para una amplia variedad de analitos, tales como iones inorgánicos, polímeros ionizados, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas, con masas moleculares desde kilo- hasta cientos de mega-Daltons (Kearle y Verkerk, 2009). También, se ha usado en el análisis de drogas, productos naturales, pesticidas, carbohidratos y otras moléculas pequeñas (Cech y Enke, 2001).

En LC-MS, para la identificación de los analitos, los iones generados por alguna de las fuentes de ionización, se separan según su relación masa:carga (m/z), antes de ser detectados. Uno de los analizadores para llevar a cabo esta separación, es el de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) que se ha utilizado, entre otras aplicaciones, para la elucidación estructural, o con fines

confirmatorios, en el campo ambiental y de alimentos, para la identificación inequívoca de contaminantes y de drogas veterinarias en carne (Ferrer y col., 2005).

En este capítulo, se muestran los resultados obtenidos en el análisis, por LC-ESI⁺-TOF-MS, de extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón.

5.1 MARCO TEÓRICO

5.1.1 MS como un detector de LC

La importancia de la técnica LC-MS radica en que ofrece, simultáneamente, tres datos. Primero, los compuestos se separan, según su tiempo de retención en la columna del LC. Posteriormente, los iones pasan de fase líquida a gaseosa en la fuente de ionización, y se separan, según su relación m/z en el analizador de masas. Finalmente, el detector (MS) mide las corrientes de los iones producidos, que luego se convierten en señales gráficas, *i.e.*, espectros de masas (Kruve y col., 2015).

Comparado con los detectores de LC, tales como UV-Vis o de fluorescencia, los detectores MS convencionales, con la resolución de masas nominales, tales como los de triple cuadrupolo o de trampa iónica, permiten la identificación significativamente más confiable de los compuestos que eluyen del LC, y esto se logra, aún más con los instrumentos de alta resolución, como los TOF u Orbitrap. De manera que, entre otros beneficios, LC-MS reduce el riesgo de falsos positivos en la identificación. Otra ventaja es que se pueden determinar analitos en concentraciones traza en matrices complejas (Kruve y col., 2015).

5.1.2 Fuentes de ionización

Durante largo tiempo, el acople de LC a MS fue obstaculizado por dificultades en la transferencia de moléculas de analitos, en forma de iones, desde la fase líquida a la fase gaseosa. Estos inconvenientes se resolvieron por la invención de fuentes API, que cubren un amplio rango de compuestos y polaridad de disolventes. Las fuentes API más comunes son ionización por *electrospray*, ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés) y fotoionización a presión atmosférica (APPI, por sus siglas en inglés) (Kruve y col., 2015).

Los modos de ionización positivo y negativo están disponibles en la mayoría de fuentes API, aunque el modo positivo es el más extensamente usado. Los iones positivos, usualmente, se forman como moléculas protonadas del analito $[M+H]^+$, pero también como aductos con cationes (principalmente sodio, amonio y potasio), e.g., $[M+Na]^+$, o, en pocos casos como cationes-radicales después de la pérdida de un electrón $M^{+\bullet}$. En el modo de ionización negativo, también pueden ocurrir diferentes formas de ionización; la más común es la deprotonación $[M-H]^-$. En menor extensión se presenta la formación de aductos con aniones cloruro $[M+Cl]^-$, nitrato $[M+NO_3]^-$ o acetato $[M+CH_3COO]^-$. También puede ocurrir la formación de aniones-radicales por medio de la adición de un electrón (Kruve y col., 2015).

En las fuentes API la ionización es “suave”, esto significa que los iones que se forman tienen poco exceso de energía, de manera que presentan poca o nula fragmentación. En esto, la ionización a presión atmosférica se diferencia de la ionización electrónica (EI, por sus siglas en inglés), que se usa en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, donde la fragmentación (a menudo extensiva) es más una regla que una excepción (Kruve y col., 2015).

5.1.3 Los mecanismos de ESI-MS

En ESI-MS, una solución diluida de analito se impulsa por un flujo de gas nebulizador (N_2 , generalmente) a través de un capilar a una velocidad de flujo muy baja ($0,1-10 \mu\text{L}/\text{min}$). Un voltaje alto, $1-6 \text{ kV}$, se aplica al capilar. Este voltaje puede ser negativo o positivo, según el modo escogido. El voltaje aplicado proporciona el gradiente de campo eléctrico requerido para producir la separación de cargas en la superficie del líquido. Como resultado, el líquido sobresale de la superficie de la punta del capilar, lo que se conoce como “cono de Taylor” (**Figura 28**). Cuando la solución que comprende el cono de Taylor alcanza el límite Rayleigh (punto en que la repulsión coulombica de la carga superficial iguala a la tensión superficial de la solución), las gotas que contienen un exceso de carga positiva o negativa se separan de la punta. Estas gotas, mientras se mueven a través de la atmósfera hacia la entrada del espectrómetro de masas, generan moléculas de analitos cargadas (iones) por uno de los varios mecanismos propuestos (Cech y Enke, 2001).

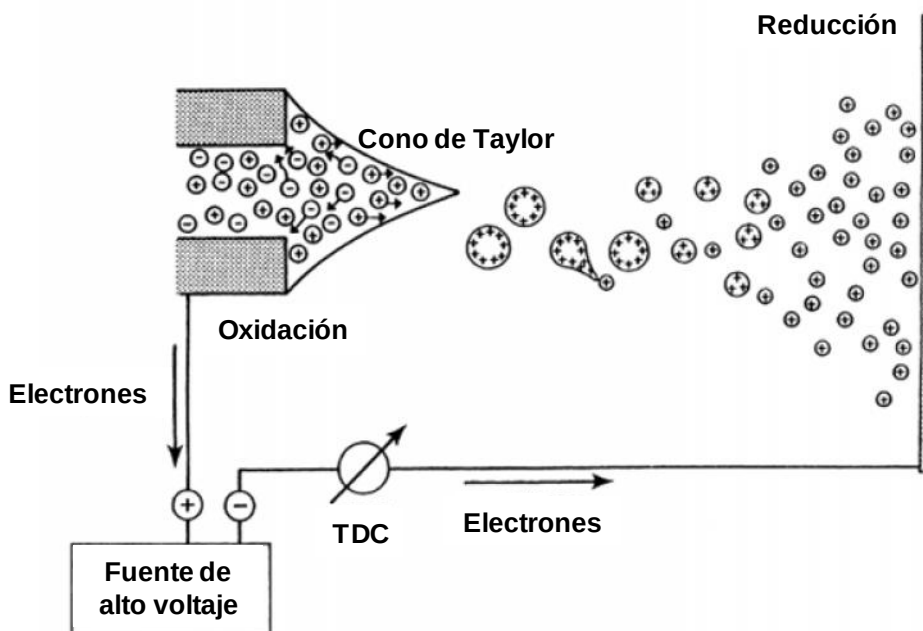


Figura 28. Representación del proceso ESI. Fuente: Kobarle y Peschke, 2000.

Los iones generados entran, por la región de vacío de la interfaz, al espectrómetro de masas. Esta interfaz es un orificio muy pequeño o un capilar (**Figura 29**). Los iones que entran a través del capilar pueden unirse con las moléculas de solvente y otros aditivos, por lo que son sometidos al desagrupamiento térmico “limpieza” por medio de las altas temperaturas del capilar y la acción de un gas secante (N_2 , generalmente), impulsado en contracorriente. La cámara después del capilar tiene vacío parcial (presión de unos pocos torr). Una segunda limpieza se obtiene aplicando una diferencia de potencial eléctrico entre la salida del capilar y el *skimmer*, lo que conduce a la segunda cámara (alto vacío) que contiene el espectrómetro de masas (Kearle y Verkerk, 2009).

5.1.4 Separación de masas

En cada MS, se usa un analizador de masas para separar los iones generados, según su relación masa/carga (m/z), y después llevar a cabo su detección. Uno de estos analizadores es el TOF, que separa los iones mediante mediciones de sus respectivos tiempos de vuelo (Ardrey, 2003).

El principio del analizador TOF se basa en que los iones, generados por alguna de las fuentes de ionización (ESI, APCI, APPI), se aceleran por un potencial eléctrico V_0 , y adquieren una energía potencial de zV_0 , donde z es la carga del ion. Si toda la energía potencial se convierte en energía cinética (**Ecuación 5.1**), la velocidad v se expresa, según la **Ecuación 5.2**. Los iones menos pesados viajan a mayor velocidad y llegan primero al detector (Ardrey, 2003).

Esta explicación se basa en condiciones ideales (**Ecuación 5.3**). Debido a que los iones poseen una distribución inicial de velocidades, esto es, energía cinética ϵ , su tiempo de llegada al detector (t') mostrará alguna distribución, incluso entre iones de la misma masa (**Ecuación 5.4**). Esto ocasiona la disminución de la resolución de masas (Ardrey, 2003).

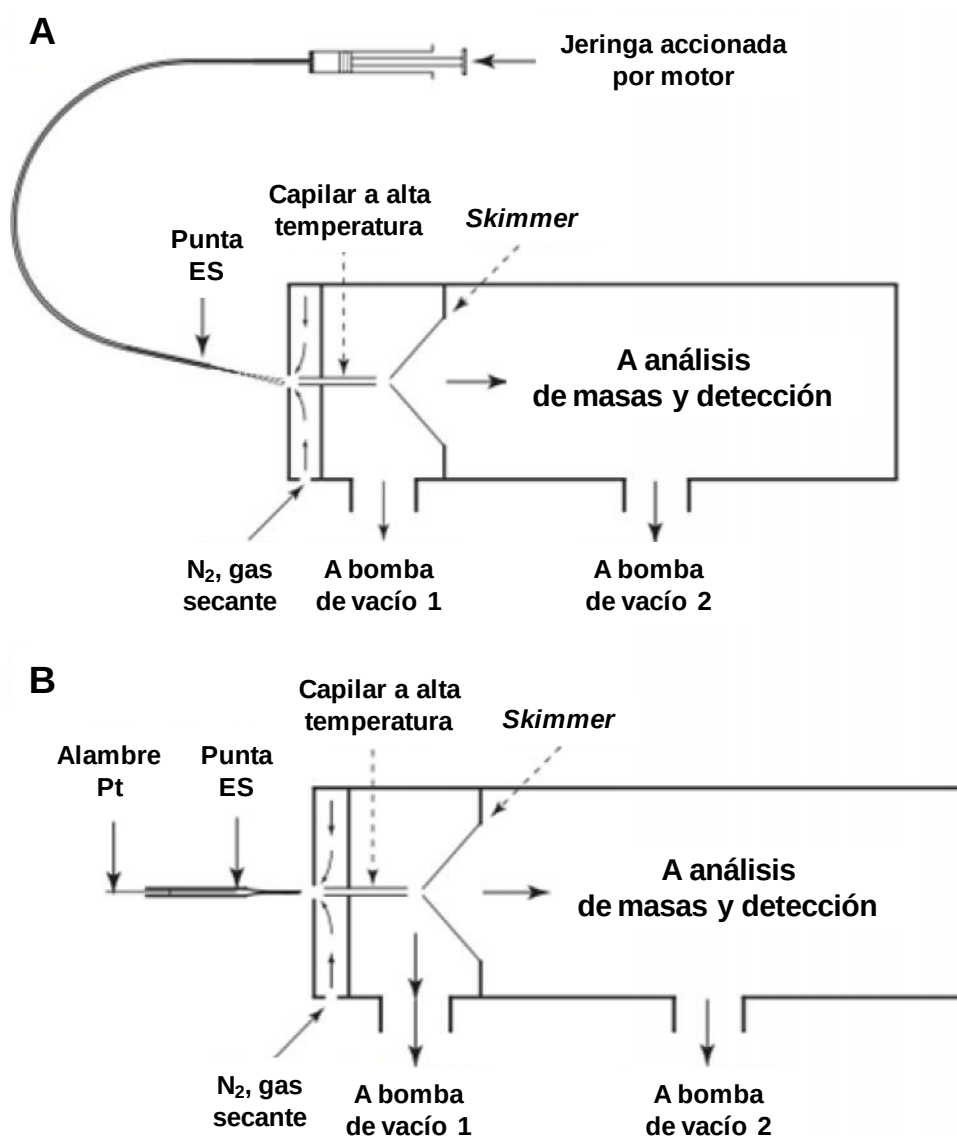


Figura 29. Fuente de ionización por *electrospray* e interfaz al espectrómetro de masas. **A.** La solución que contiene el analito es suministrada a la punta de metal del *electrospray* (ES) por medio de una jeringa y un capilar flexible de vidrio. **B.** *Nanoelectrospray*: la punta del capilar se carga con μL de solución. El potencial eléctrico se aplica a la nanopunta por medio de un alambre de Pt, o de una película metálica que recubre el capilar. Fuente: Kebarle y Verkerk, 2009.

$$zV_o = \frac{1}{2}mv^2 \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

$$v = \sqrt{\frac{2zV_o}{m}} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

$$t = \frac{L}{v} = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2zV_o}} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

$$t' = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2(zV_o + \epsilon)}} \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

Donde:

z : Carga del ion, m : Masa del ion, v : Velocidad del ion, L : Espacio recorrido por los iones, t : Tiempo de vuelo de los iones, t' : Tiempo de vuelo del ion con energía cinética inicial ϵ .

5.1.5 Tecnología del reflectrón

Para mejorar la resolución, Mamyrin y col. (1973), diseñaron un mecanismo conocido con el nombre de reflectrón, que se usa para reflejar los iones a mitad de camino en su vuelo hacia el detector. Esta devolución tiene el efecto de ajustar el tiempo de vuelo de los iones en conjunción con sus energías cinéticas iniciales, para asegurar que los iones de la misma masa y carga lleguen al detector exactamente al mismo tiempo (**Figura 30**).

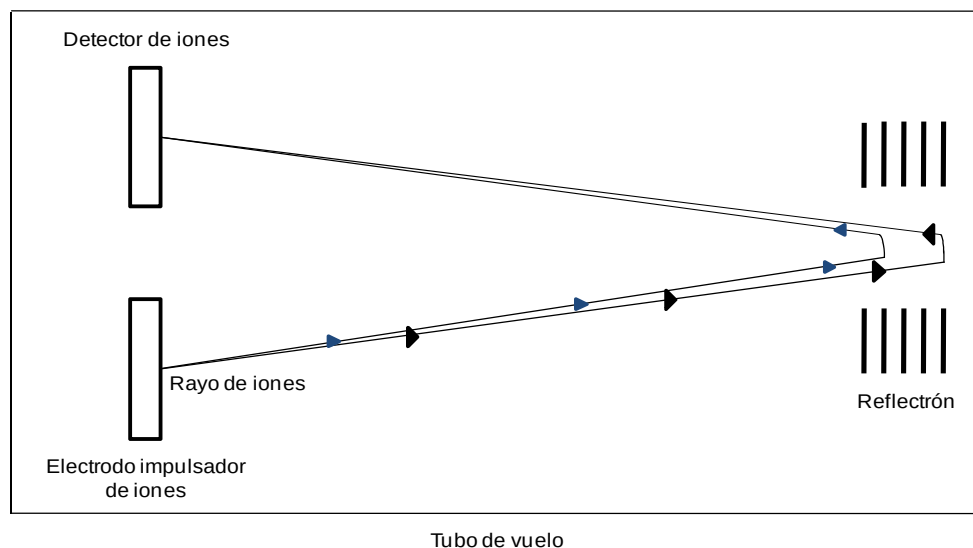


Figura 30. Representación de un analizador de tiempo de vuelo que implica el uso de un reflectrón. ▲▲ Iones con mayor y menor energía cinética, respectivamente.

5.1.6 Determinación de compuestos en extractos de mora y de cáscara de plátano mediante LC-MS.

Los resultados de una búsqueda bibliométrica sobre el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a MS, en la caracterización de extractos de mora, indica que el interés en este tema surgió en el año 2001 y, desde entonces, se han publicado 12 artículos al respecto. El 2005 fue el año con el mayor número de publicaciones (3) sobre este tema (**Figura 31**).

Wu y col. (2005), analizaron extractos de mora cosechada en Oregon, EE.UU., y Seeram y col. (2006), estudiaron extractos de mora (*Rubus* sp.) cultivada en California, EE.UU.; los autores determinaron la presencia de las antocianinas cianidina-3-glucósido, cianidina-3-arabinósido, cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-(3''-malonil)-glucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-xilósido, cianidina-3-(6''-malonil)-glucósido y cianidina-3-dioxaloilglucósido. Seeram y col. (2006), también encontraron derivados de la

quercetina y del ácido elágico en los extractos de mora. Estos autores utilizaron un sistema HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

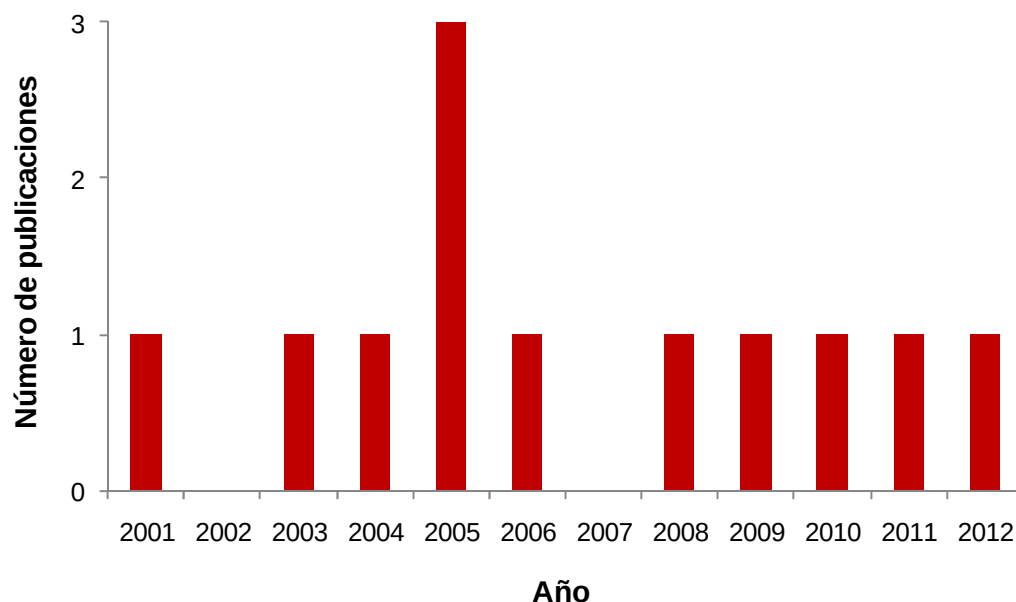


Figura 31. Número de publicaciones sobre el uso de HPLC-ESI-MS en extractos de mora, en función del tiempo. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2001 - 2015. Fecha de consulta: 19 de julio de 2015. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY ("HPLC-ESI-MS blackberry")*.

La abreviatura MS/MS hace referencia a un grupo de técnicas en que en una de las etapas de MS, no necesariamente la primera, se aísla un ion de interés que es usado en una segunda etapa, para mostrar la relación de este ion con otros de los que pudo haber sido generado o a los que puede dar origen por su fragmentación (Ardrey, 2003).

Garzón y col. (2009), analizaron las antocianinas aisladas en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), adquirida en un mercado local en Bogotá, y las caracterizaron como cianidina-3-sambubiósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-xilorutinósido, cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-glucósido y pelargonidina-3-

rutinósido. Estos autores utilizaron un HPLC-PDA-ESI-MS/MS. PDA, por sus siglas en inglés, hace referencia a un detector de arreglo de fotodiodos.

Ferreira y col. (2010), analizaron por LC-PDA-ESI-MS/MS extractos de mora (*Rubus* spp.) cosechada en Campinas, Brasil, y encontraron cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido, cianidina-3-malonil-glucósido y cianidina-3-dioxaloil-glucósido.

La búsqueda cuantitativa sobre el uso de HPLC-ESI-MS en extractos de plátano mostró solo un artículo, en el que Pothavorn y col. (2010), analizaron por HPLC-ESI-MS extractos de la savia de banano (*Musa balbisiana*), guineo (*M. laterita* y *M. ornata*) y plátano (*M. acuminata*), y encontraron glicósidos de apigenina y de naringenina, miricetina-3-rutinósido, kaempferol-3-rutinósido, quercetina-3-rutinósido, dopamina y *N*-acetilserotonina.

Kanazawa y Sakakibara (2000), estudiaron extractos de la cáscara y de la pulpa de banano (*Musa cavendishii*), mediante LC-APCI-MS, e identificaron la dopamina, L-dopa, norepinefrina, naringina y rutina.

5.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.2.1 Reactivos

Se utilizaron acetonitrilo grado LC-MS ($\geq 99,9\%$), proveído por Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, New Jersey, EE.UU.), ácido fórmico Suprapur (98-100%) y agua Tipo I producida por un equipo purificador *Synergy* UV, proporcionados por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

5.2.2 Preparación de muestras

Se analizaron los extractos acetónicos de mora fresca de Castilla y de cáscara fresca de plátano Hartón, obtenidos de la manera descrita en las **Secciones 2.2.1** y **2.2.8**. Los extractos secos se pesaron (1 mg) y se disolvieron en una solución (1 mL) conformada por 50% de ácido fórmico al 0,5% en agua y 50% de acetonitrilo al 0,5% en agua. Las disoluciones se pasaron por filtros de PVDF (0,22 μ m), se diluyeron y se inyectaron al LC-MS.

5.2.3 Análisis cromatográfico

Los extractos se analizaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 Series, (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con una unidad de desgasificación de disolventes (G1379B), una bomba binaria (G1312A), un inyector automático (G1367B) y una unidad termostataada para la columna (G1316A). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 Kinetex, (*Phenomenex*, Torrance, CA, EE.UU.), 100 mm, L $\times$ 4,6 mm, D.I. $\times$ 2,6 μ m de tamaño de partícula, a 35°C.

La fase móvil fue: A. agua (0,5% de ácido fórmico) y B. acetonitrilo (0,5% de ácido fórmico). La condición inicial de gradiente fue de 95% de A y 5% de B, cambiando linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego, 20% de B en 5 min, y 80% de B en 10 min, se mantuvo durante 5 min, cambió a 100% de B en 5 min, y se mantuvo durante 5 min, el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min; el tiempo total de la corrida fue de 40 min. El flujo fue de 0,2 mL/min y el volumen de inyección fue de 4 μ L.

El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS 6210 Series, *Agilent Technologies*, Palo Alto, CA,

EE.UU.), a través de una interfaz de electronebulización (ESI), operada en modo positivo (**Figura 32**).



Figura 32. Equipo LC-ESI-TOF-MS utilizado. Fotografía tomada por la autora el 2 de mayo de 2014, en CROM-MASS.

Se usó nitrógeno (Generador N₂ *PEAK Scientific*, Billerica, MA, EE.UU.) como gas secante (350°C, 7 L/min) y gas nebulizador (40 psi). Se evaluaron los efectos de los voltajes del capilar, de 1000 a 5000 V, y del fragmentador, de 50 a 250 V, sobre las áreas de la dopamina y de la cianidina-3-glucósido, componentes de los extractos de cáscara de plátano y de mora, respectivamente. Los voltajes del *skimmer* y del primer octopolo fueron 65 y 250 V, respectivamente. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 900, con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s. Se realizó la corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución que incluye purina (C₅H₄N₄ a m/z 121,05087) y hexaquis

(1*H*,1*H*,3*H*-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ a m/z 922,00980). Los datos obtenidos se procesaron con el *software Mass Hunter WorkStation* versión B.02.00-SP3. La identificación de los compuestos se realizó usando la corriente iónica extraída (EIC, por sus siglas en inglés) del cromatograma, para las masas exactas de los compuestos buscados y con base en el material de referencia (patrones certificados).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Efectos de los voltajes del capilar y del fragmentador sobre las áreas de la cianidina-3-glucósido, la cianidina y la dopamina.

El área de la cianidina-3-glucósido aumentó con el incremento del voltaje del capilar de 1000 a 4000 V y con el voltaje del fragmentador de 100 a 150 V (**Figura 33**). Voltajes del fragmentador superiores a 150 V favorecieron el rompimiento del enlace glicosídico de la antocianina, razón por la cual aumentó el área de su aglicona, tal como lo indica la **Figura 34**, donde se observa que el área de la cianidina aumentó con el voltaje del capilar de 1000 a 4000 V y con el voltaje del fragmentador de 100 a 250 V. Por esto, para analizar las antocianinas y sus agliconas, el voltaje del capilar se estableció en 4000 V con voltajes del fragmentador de 150 y 250 V.

De otra parte, el área de la dopamina disminuyó con el aumento del voltaje del capilar de 1000 a 3000 V y aumentó con el incremento del voltaje del fragmentador de 50 a 100 V (**Figura 35**), por esta razón, la dopamina y los aminoácidos, en los extractos de cáscara de plátano, se analizaron con voltajes del capilar y del fragmentador de 1000 y 100 V, respectivamente.

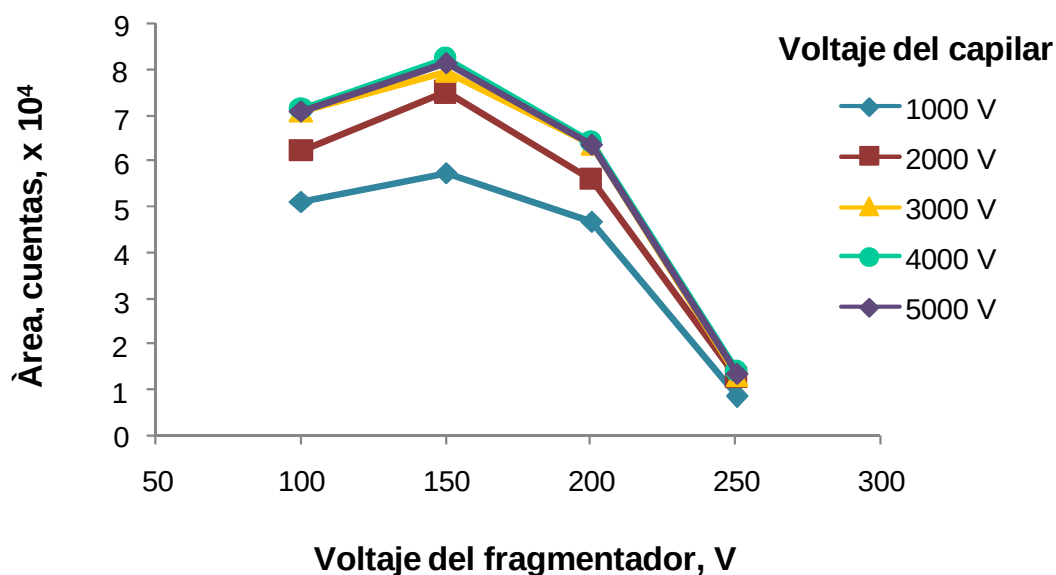


Figura 33. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion M^+ ($C_{21}H_{21}O_{11}$, m/z 449,1084) de la cianidina-3-glucósido, obtenidas por LC-ESI⁺-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.

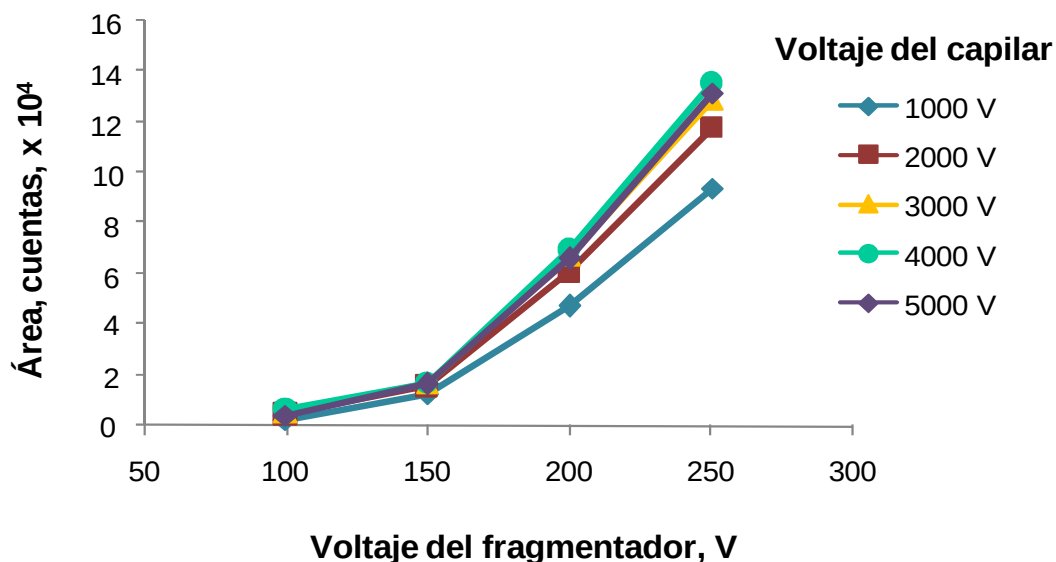


Figura 34. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion M^+ ($C_{15}H_{11}O_6$, m/z 287,0556) de la cianidina, obtenidas por LC-ESI⁺-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.

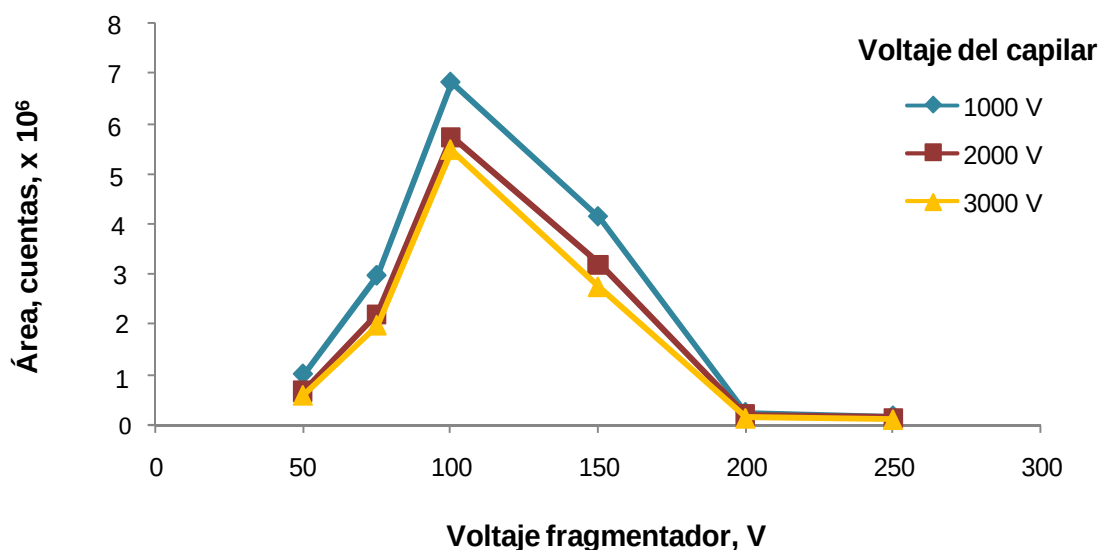


Figura 35. Áreas de las corrientes iónicas extraídas del ion MH^+ ($C_8H_{12}NO_2$, m/z 154,0863) de la dopamina, obtenidas por LC-ESI⁺-TOF-MS, en función de diferentes voltajes del capilar y del fragmentador.

5.3.2 Caracterización de extractos de mora de Castilla por LC-ESI⁺-TOF-MS.

A partir de la corriente iónica total (TIC, por sus siglas en inglés), se extrajeron las corrientes iónicas correspondientes a las masas exactas de los analitos cargados, M^+ , o protonados, MH^+ , presentes en los extractos de mora, según lo hallado en el **Capítulo 4** y lo reportado en la literatura. Se encontraron los compuestos cianidina-3-(2-xilosilrutinosido), cianidina-3-sambubiósido, cianidina-3-rutinosido, cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, quercetina-3-rutinosido y quercetina-3-glucurónido. En la **Figura 36**, se observan las corrientes iónicas extraídas para los compuestos mencionados y en la **Figura 37** se muestran sus espectros de masas.

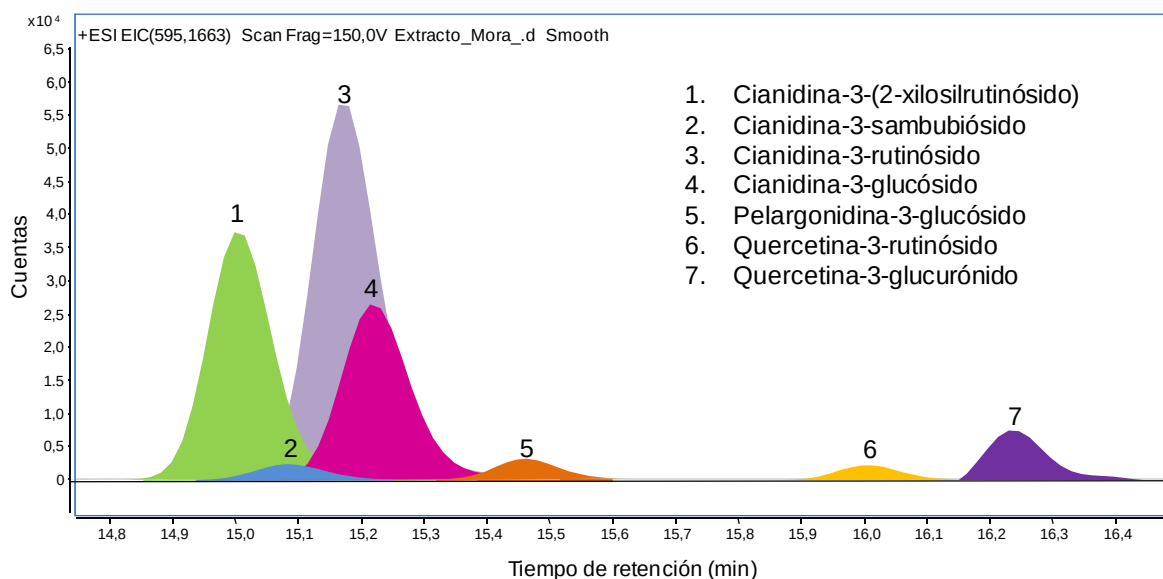


Figura 36. Corrientes iónicas extraídas, por LC-ESI⁺-TOF-MS, de moléculas cargadas o protonadas presentes en extractos de mora de Castilla.

La cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinosido y pelargonidina-3-glucósido también se identificaron por HPLC-DAD (**Sección 4.3.2**). Estas antocianinas fueron encontradas en extractos de mora por Wu y col. (2005), Seeram y col. (2006), Garzón y col. (2009), Ferreira y col. (2010) y Osorio y col. (2012). En la **Sección 4.3.3**, se reporta el hallazgo de las agliconas cianidina y pelargonidina solo en los extractos hidrolizados. La presencia de estas agliconas en los espectros de masas (**Figura 37**) se debe a la fragmentación de sus derivados glicosídicos. A partir de la cianidina-3-rutinosido, por fragmentación, se produce la cianidina-3-glucósido, tal como se observa en su espectro de masas (**Figura 37**).

En la **Tabla 40**, se muestran las masas experimentales de los compuestos identificados en los extractos de mora de Castilla y sus errores de medición, Δppm (exactitud).

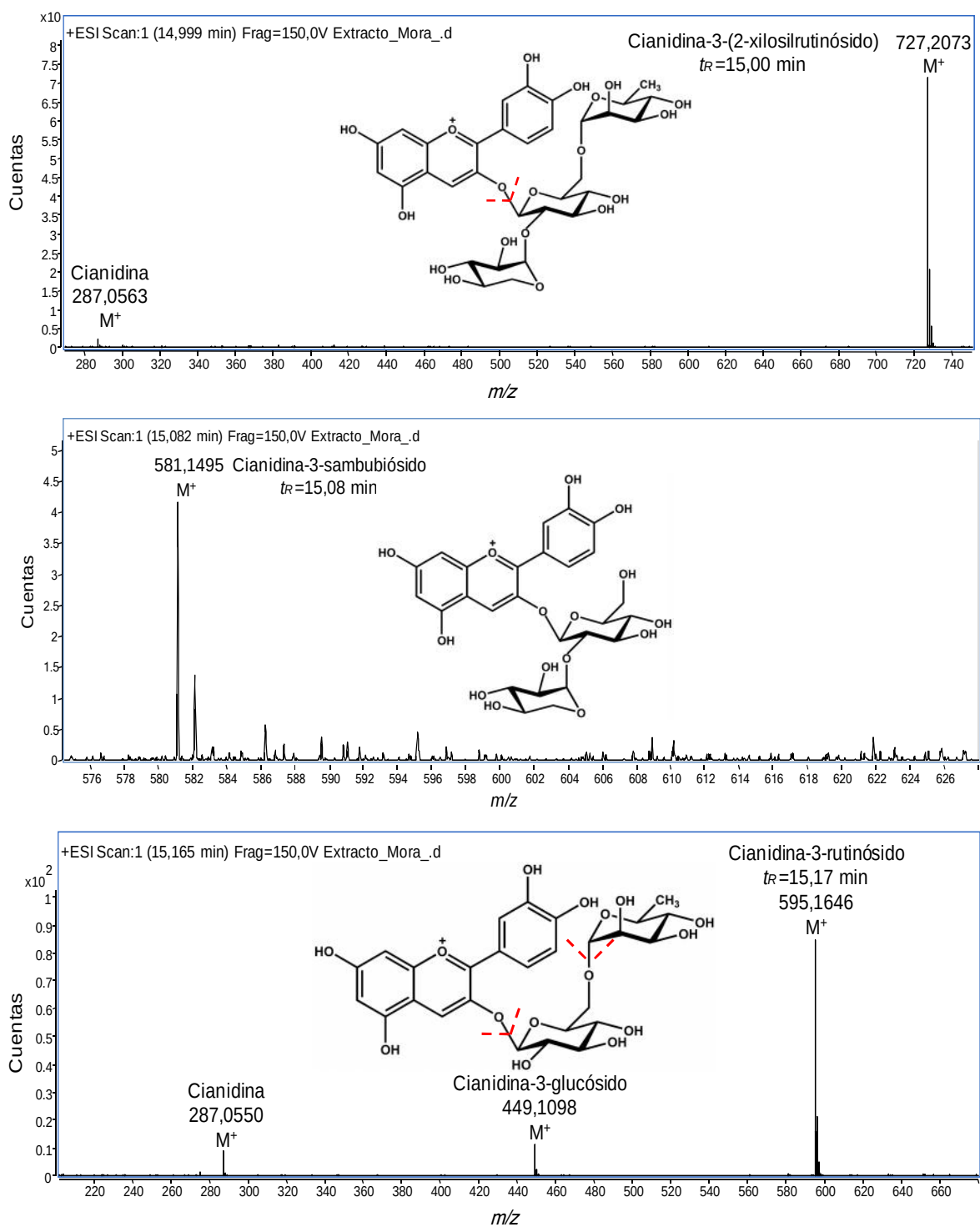


Figura 37. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla. ---Enlace susceptible al rompimiento para producir cianidina.

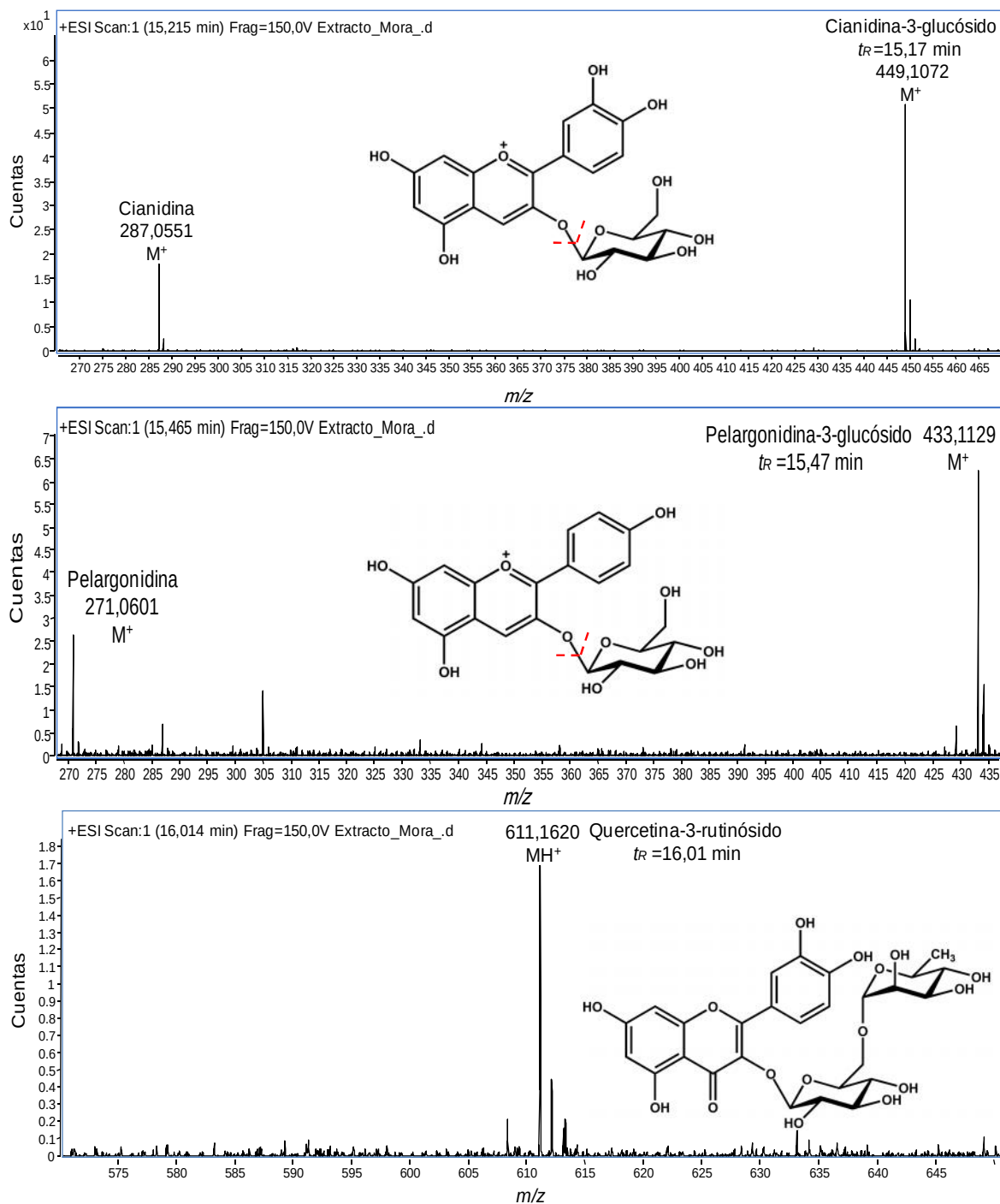


Figura 37. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla. ---Enlaces susceptibles al rompimiento para producir cianidina-3-glucósido, cianidina o pelargonidina, respectivamente.

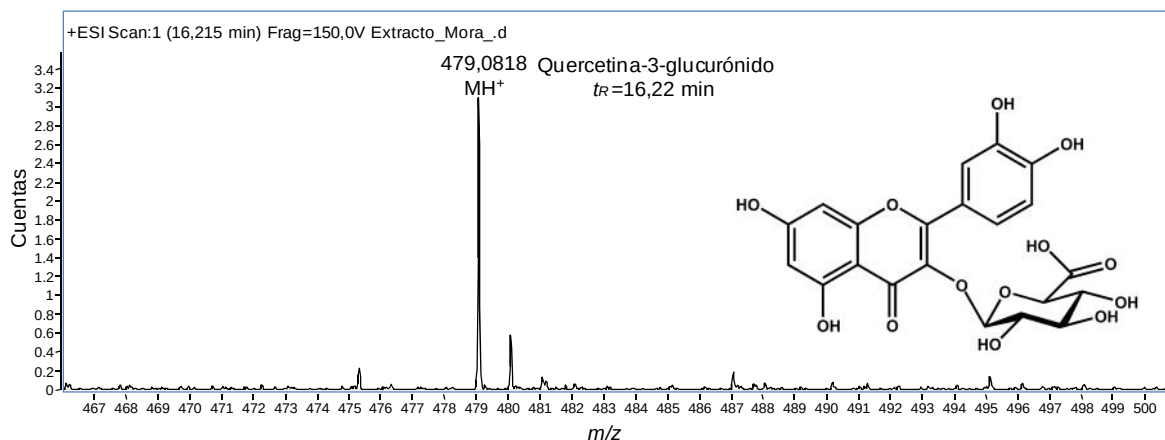


Figura 37. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de mora de Castilla.

Los resultados obtenidos por LC-MS permitieron confirmar la presencia de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido en extractos de mora de Castilla, tal como se encontró por HPLC-DAD (**Sección 4.3.2**). Además, se identificaron las antocianinas cianidina-3-(2-xilosilrutinosido), cianidina-3-sambubiósido, y los compuestos quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-glucurónido, encontrados también por otros autores en extractos de mora de Castilla (Garzón y col., 2009; Osorio y col., 2012).

5.3.3 Caracterización de extractos de cáscara de plátano Hartón por LC-ESI⁺-TOF-MS.

A partir de la corriente iónica total de los extractos de cáscara de plátano, se extrajeron las corrientes iónicas correspondientes a las masas exactas de los compuestos protonados, MH^+ , presentes en estos extractos, según lo hallado en el **Capítulo 4** y lo reportado en la literatura. Se encontraron los compuestos dopamina, quinona de la dopamina, histidina, norepinefrina, valina, fenilalanina, serotonina, leucina, triptófano, quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3-rutinósido (**Figura 38**). En la **Figura 39**, se observan los espectros de masas de los compuestos mencionados.

Tabla 40. Masas exactas de los compuestos identificados por LC-ESI⁺-TOF-MS en extractos de mora de Castilla*.

Compuesto	Fórmula	Masas		Δ ppm
		Calculada	Experimental	
Cianidina-3-(2-xilosilrutinosido)	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	727,2086	727,2073	1,79
Cianidina-3-sambubiosido	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	581,1506	581,1495	1,89
Cianidina-3-rutinosido	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1663	595,1646	2,86
Cianidina-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1084	449,1072	2,67
Cianidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0556	287,0548	2,79
Pelargonidina-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1135	433,1129	1,39
Pelargonidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,0606	271,0601	1,84
Quercetina-3-rutinosido	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,1607	611,1620	-2,13
Quercetina-3-glucurónido	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	479,0820	479,0818	1,67

*Iones moleculares, M⁺, en el caso de las antocianinas, iones moleculares protonados, MH⁺, para los demás compuestos.

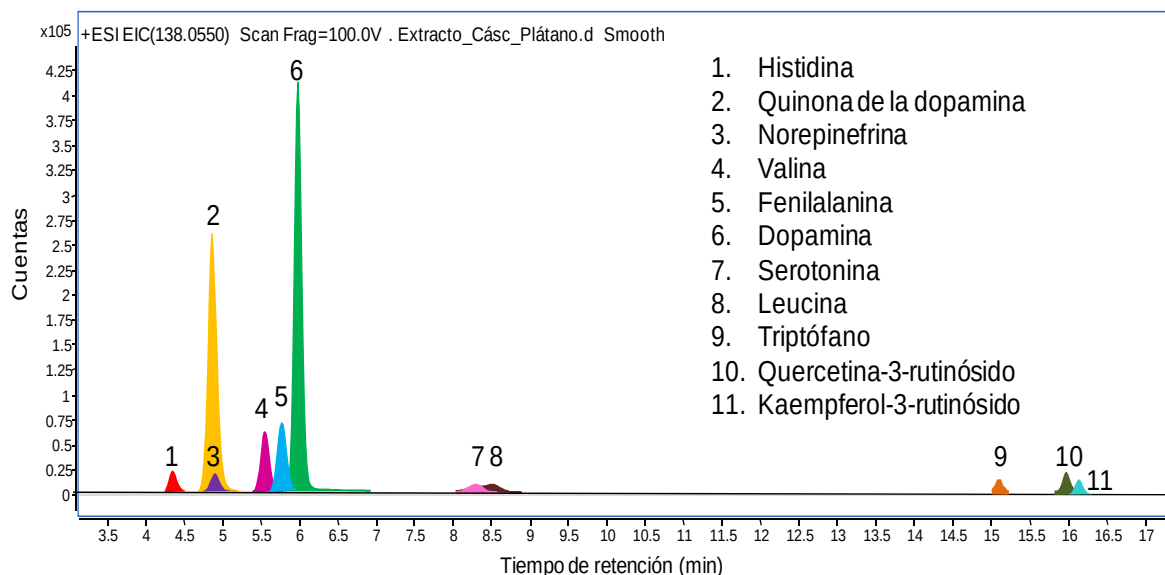


Figura 38. Corrientes iónicas extraídas, por LC-ESI⁺-TOF-MS, de moléculas protonadas presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón.

La quercetina-3-rutinósido se fragmenta, para producir quercetina-3-glucósido (611,1607-ramnosa) y quercetina (611,1607-ramnosa-glucosa), tal como se observa en el espectro de masas de este compuesto (**Figura 39**). De manera que, la quercetina encontrada en los extractos hidrolizados de cáscara de plátano (**Sección 4.3.3**) pudo provenir de la quercetina-3-rutinósido. Con el kaempferol-3-rutinósido se observó la misma tendencia, este compuesto se fragmenta en kaempferol-3-glucósido (595,1657-ramnosa) y kaempferol (595,1657-ramnosa-glucosa). De modo que el kaempferol detectado por HPLC-DAD, en los extractos de cáscara de plátano sometidos a hidrólisis ácida (**Sección 4.3.3, Figura 27**), provino, posiblemente, del kaempferol-3-rutinósido.

En la **Tabla 41**, se muestran las masas experimentales de los compuestos protonados, MH⁺, identificados en los extractos de cáscara de plátano con sus errores de medición (Δppm).

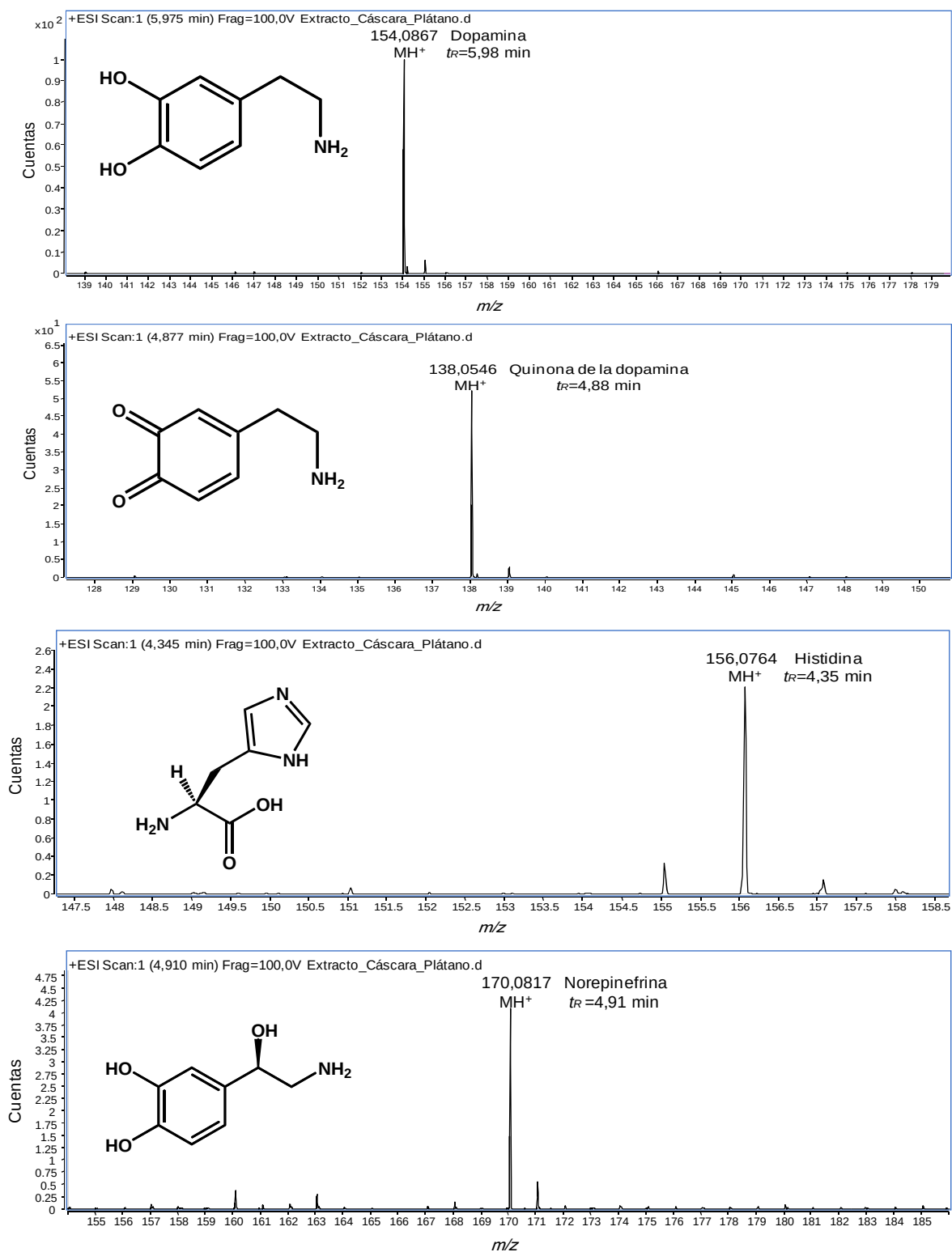


Figura 39. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón.

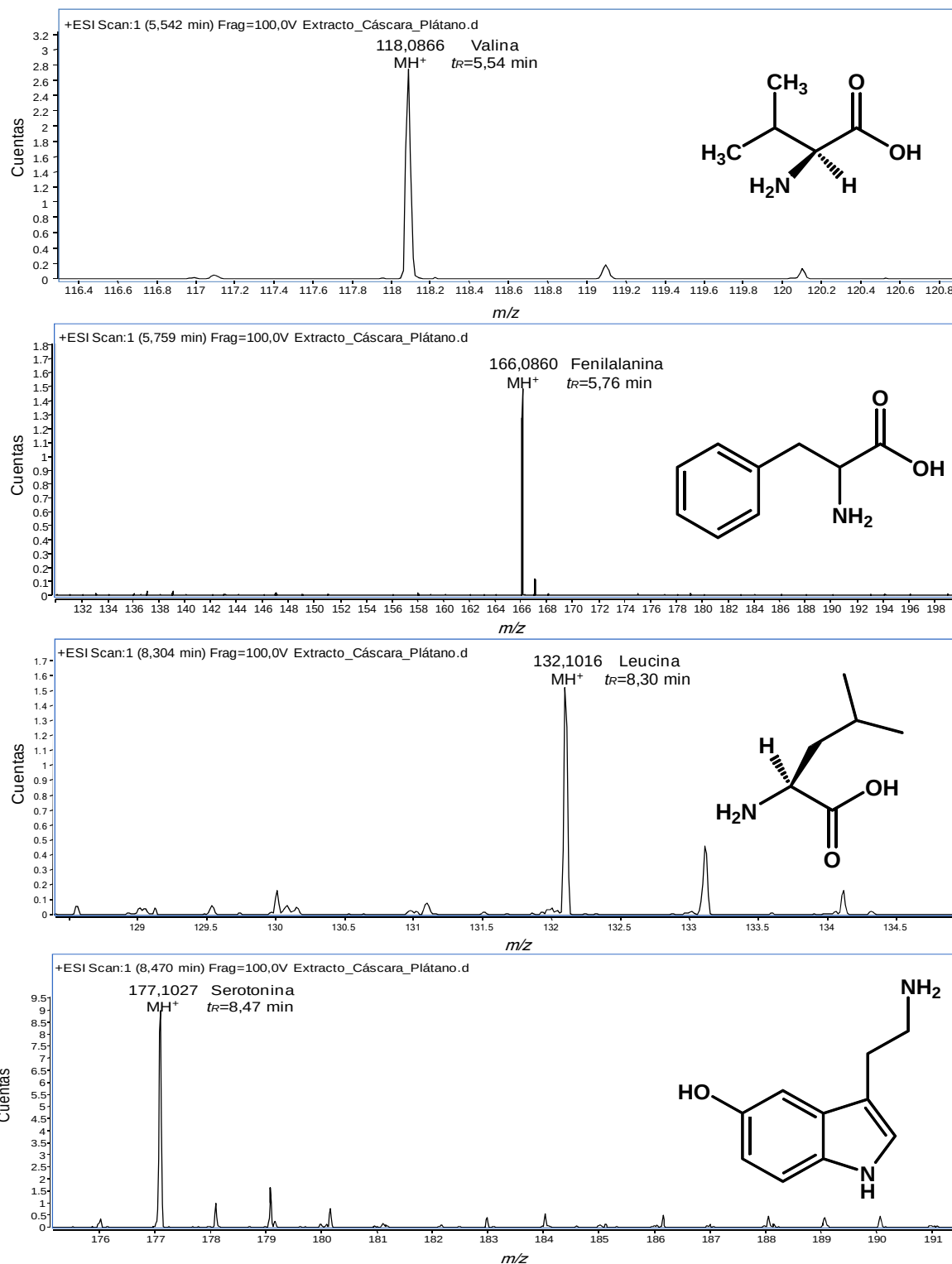


Figura 39. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón.

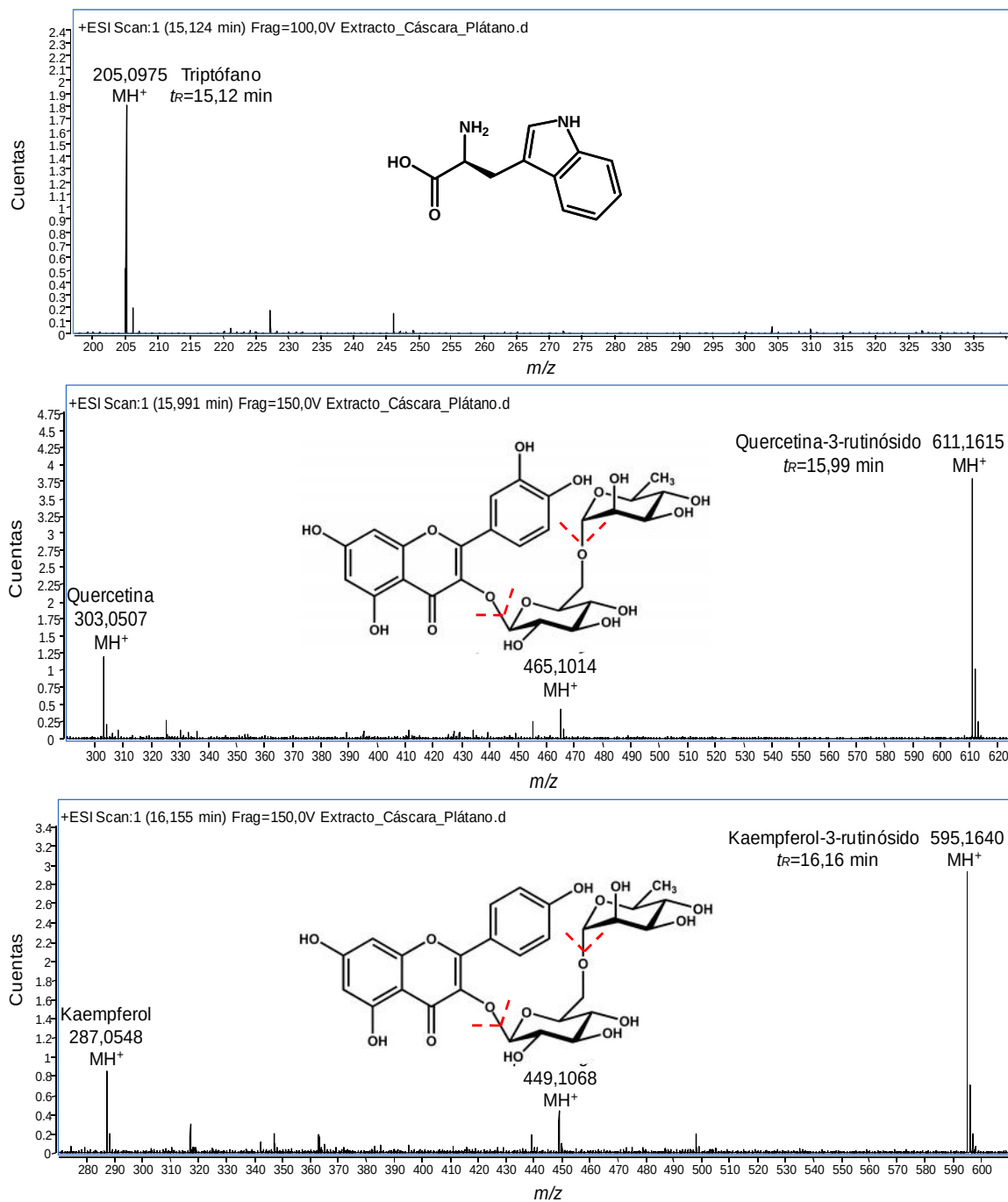


Figura 39. Espectros de masas, obtenidos por LC-ESI⁺-TOF-MS, de compuestos presentes en extractos de cáscara de plátano Hartón. ---Enlaces susceptibles al rompimiento para producir iones de quercetina-3-glucósido, quercetina, kaempferol-3-glucósido y kaempferol, respectivamente.

Tabla 41. Masas exactas de los compuestos protonados, MH^+ , identificados por LC-ESI⁺-TOF-MS en extractos de cáscara de plátano Hartón.

Compuesto	Fórmula	Masas		Δppm
		Calculada	Experimental	
Histidina	$C_6H_{10}N_3O_2$	156,0768	156,0764	2,56
Quinona de la dopamina	$C_7H_8NO_2$	138,0550	138,0546	2,90
Norepinefrina	$C_8H_{12}NO_3$	170,0812	170,0817	-2,94
Valina	$C_5H_{12}NO_2$	118,0863	118,0866	-2,54
Fenilalanina	$C_9H_{12}NO_2$	166,0863	166,0860	1,81
Dopamina	$C_8H_{12}NO_2$	154,0863	154,0867	-2,60
Leucina	$C_6H_{14}NO_2$	132,1019	132,1016	2,27
Serotonina	$C_{10}H_{13}N_2O$	177,1022	177,1027	-2,82
Triptófano	$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205,0972	205,0975	-1,46
Quercetina-3-rutinósido	$C_{27}H_{31}O_{16}$	611,1607	611,1615	1,31
Quercetina-3-glucósido	$C_{27}H_{21}O_{12}$	465,1028	465,1038	-2,15
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	303,0499	303,0490	2,97
Kaempferol-3-rutinósido	$C_{27}H_{31}O_{15}$	595,1657	595,1640	2,86
Kaempferol-3-glucósido	$C_{21}H_{21}O_{11}$	449,1078	449,1068	2,23
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	287,055	287,0548	0,70

Con base en los resultados presentados en este capítulo, se concluye que:

En los extractos de mora de Castilla, se confirmó la presencia de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido, compuestos identificados tentativamente por HPLC-DAD. Adicionalmente, se detectaron y se identificaron la cianidina-3-(2-xilosilrutinósido), cianidina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-glucurónido.

En los extractos de cáscara de plátano Hartón, se confirmó la presencia de dopamina y se detectaron y se identificaron los aminoácidos esenciales: histidina, valina, fenilalanina, leucina, y triptófano, y los neurotransmisores serotonina y norepinefrina. En estos extractos, también se detectaron y se identificaron la quercetina-3-rutinósido y el kaempferol-3-rutinósido.

6. CONCLUSIONES

Los extractos de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón presentaron los valores de contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante, ORAC y ABTS^{•+}, más altos, cuando las extracciones se realizaron con soluciones acuosas de acetona al 31% (v/v), durante 100 min de extracción con ultrasonido.

Los extractos de mora y de cáscara de plátano obtenidos a partir de material vegetal fresco, presentaron resultados de contenido de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante, ORAC y ABTS^{•+}, más altos que los de los extractos adquiridos con material vegetal liofilizado.

Los extractos, después de SPE, de mora de Castilla y de cáscara de plátano Hartón, adquiridos con material vegetal fresco, procedente, cada uno, de dos fincas ubicadas en diferentes municipios de Santander, presentaron valores de capacidad antioxidante, ORAC y ABTS^{•+}, más altos que los del BHT y del α -tocoferol, antioxidantes comerciales usados en las industrias de alimentos y cosméticos.

Los extractos, después de SPE, de mora fresca de Castilla protegieron las emulsiones de aceite en agua, contra el deterioro oxidativo ocasionado por la radiación UVA-Vis, en mayor grado que el BHT y el α -tocoferol, en las concentraciones evaluadas en el intervalo de 0,01-0,10% (p/v). Los extractos, después de SPE, de cáscara fresca de plátano Hartón, presentaron mayor efecto protector que los antioxidantes comerciales, en las concentraciones de 0,05 y 0,10% (p/v).

Se desarrolló un método, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} acoplado a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-ABTS^{•+}), para

determinar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en extractos. Este método permitió la separación sobre la línea base de 22 sustancias-patrón. En la literatura no se encuentra otro procedimiento por el que se pueda separar este número de sustancias empleando esta técnica.

En los extractos de mora de Castilla, mediante el ensayo por HPLC-ABTS⁺, se identificaron las antocianinas cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-glucósido. Se evidenció la presencia de otros compuestos que contribuyeron en medida más alta a la capacidad antioxidante de estos extractos. En los extractos hidrolizados de mora, se determinaron la cianidina, la pelargonidina y el ácido elágico, este último fue uno de los compuestos que contribuyó en porcentaje más alto a la capacidad antioxidante de estos extractos.

En los extractos de cáscara de plátano, a través del ensayo por HPLC-ABTS⁺, se identificó la dopamina, compuesto que aportó en medida más alta a la capacidad antioxidante de estos extractos. Después de la hidrólisis ácida, se determinaron la cianidina y la pelargonidina, lo cual sugirió la presencia de sus respectivas leucoantocianidinas en los extractos sin hidrolizar. También se identificaron, en los extractos hidrolizados, la quercetina y el kaempferol, provenientes de sus derivados glicosídicos.

En los extractos de mora de Castilla, por LC-ESI⁺-TOF-MS, se confirmó la presencia de las antocianinas identificadas por HPLC-DAD y se identificaron la cianidina-3-(2-xilosilrutinósido), cianidina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-glucurónido. En los extractos de cáscara de plátano Hartón, mediante LC-ESI⁺-TOF-MS, se confirmó la presencia de dopamina y se identificaron la quercetina-3-rutinósido, el kaempferol-3-rutinósido, los aminoácidos esenciales: histidina, valina, fenilalanina, leucina, y triptófano, y los neurotransmisores serotonina y norepinefrina.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PÉREZ, A.M.; CASTRO, M.V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schlttdl.) during three edible maturity stages. *Food Chem.* **2010**; 119: 1497-1501.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* **2009**; 115: 785-788.

ARDREY, B. Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction. Analytical techniques in the sciences. John Wiley & Sons: Chichester, Reino Unido. **2003**; 276 p.

AROSARENA, I.; ORTIZ, J.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; URRETAVIZCAYA, I.; SALVATIERRA, S.; CÓRDOVA, I.; MARÍN-ARROYO, M.A.; NORIEGA, M.J.; NAVARRO, M. Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**; 60: 7463-7473.

ARRAZOLA, G.; ROJANO, B.A.; DÍAZ, A. Capacidad antioxidante de cinco cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) y evaluación de su comportamiento en una matriz alimentaria. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* **2013**; 7(2): 161-172.

ASOCIACIÓN HORTOFRUTÍCOLA DE COLOMBIA. Los Santanderes y Cesar en el plan frutícola nacional. En: Frutas y Hortalizas. *Revista de la Asociación Hortofrutícola de Colombia.* **2008**. 1(6): 16-25.

AYBASTIER, Ö.; ISIK, E.; SAHIN, S.; DEMIR, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **2013**; 44: 558-565.

BABBAR, N.; SINGH, H.; SINGH, D.; TUMADU, R. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res. Int.* **2011**; 44: 391-396.

BARRERO, L.S. Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado. Corpoica: Cundinamarca, Colombia. **2009**. 84 p.

BARWICK, V.J. Strategies for solvent selection - a literature review. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1997**; 16(6): 293-309.

BASKAR, R.; SHRISAKTHI, S.; SATHYAPRIYA, B.; SHYAMPRIYA, R.; NITHYA, R.; POONGODI, P. Antioxidant potential of peel extracts of banana varieties (*Musa sapientum*). *Food Nutr. Sci.* **2011**; 2: 1128-1133.

BAUER AK, DWYER-NIELD LD, HANKIN JA, MURPHY RC, MALKINSON AM. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicol.* **2001**; 169: 1-15.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiol. Mol. Plant P.* **2000**; 57: 101-110.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. 2ª. Ed. Acribia: Zaragoza, España. **1997**. 1134 p.

BENAVIDES, A.; HERNÁNDEZ, R.E.M.; RAMÍREZ, H.; SANDOVAL, A. Tratado de botánica económica moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro: Buenavista, México. **2010**. 332 p.

BENTHAM, G. Plantas Hartwegianas. Sociedad Linneana de Londres: Londres, Reino Unido. **1839**. 393 p.

BHAT, R.; KAMARUDDIN, N.S.B.; MIN-TZE, L.; KARIM, A.A. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason. Sonochem.* **2011**; 18: 1295-1300.

BRANEN, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1975**; 52(2): 59-63.

BREWER, M.S. Natural Antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2011**; 10: 221-247.

CARBAJO, J.M.; DEL TÍO, R.; RUIZ, R.M.; HERNÁNDEZ, B. Ingredientes en cosmética. *Aula de la farmacia.* **2006**; 3(29): 51-62.

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ACOSTA, M.; ARNAO, M.B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox Rep.* **2002**; 7(2): 103-109.

CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M.; ARNAO, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **1998**; 9: 196-202.

CECH, N.B.; ENKE, C. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**; 20: 362-387.

CODEX ALIMENTARIUS. Normas Internacionales de los Alimentos. Norma general para los aditivos alimentarios. Codex Stan 192-1995. **2014**; 403 p. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf
Fecha de consulta: 13 de marzo de 2015.

CONNOR, A.M.; FINN, C.E.; MCGHIE, T.K.; ALSPACH, P.A. Genetic and environmental variation in anthocyanins and their relationship to antioxidant activity in blackberry and hybridberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2005**; 130(5): 680-657.

CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. **2002**. 145 p.

COULTATE, T.P. Food: The chemistry of its components. 5th ed. The Royal Society of Chemistry: Londres, Reino Unido. **2009**. 528 p.

CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem.* **1995**; 67(10): 1699-1723.

DADZIE, B.K.; ORCHARD, J.E. Routine Post-Harvest Screening of Banana/Plantain Hybrids: Criteria and Methods. *INIBAP Technical Guidelines*. International Plant Genetic Resources Institute: Montpellier, Francia. **1997**; 2: 75 p.

DAI, J.; GUPTE, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **2009**; 47: 837-847.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. **2010**; 15: 7313-7352.

DAVIES, M.J.; FORNI, L.G.; WILLSON, R.L. Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochem. J.* **1988**; 255: 513-522.

DÁVILA, J.A.; HERNÁNDEZ, V.; CASTRO, E.; CARDONA, C.A. Economic and environmental assessment of syrup production. Colombian case. *Bioresour. Technol.* **2014**; 161: 84-90.

DEIGHTON, N.; BRENNAN, R.; FINN, C.; DAVIES; H.V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.* **2000**; 80: 1307-1313.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press: Boca Ratón, Estados Unidos. **2002**. 342 p.

EXARCHOU, V.; YIANNIS C. FIAMEGOS, Y.C.; VAN BEEK, T.A.; NANOS, C.; VERVOORT, J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J. Chromatogr. A*. **2006**; 1112: 293-302.

FAN, L.; ESKIN, N.A.M. The use of antioxidants in the preservation of edible oils. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. Woodhead Publishing: Cambridge, Reino Unido. **2015**; 373-388.

FATEMEH, S.R.; SAIFULLAH, R.; ABBAS, F.M.A.; AZHAR, M.E. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of banana pulp and peel flours: influence of variety and stage of ripeness. *Int. Food Res. J.* **2012**; 19(3): 1041-1046.

FERNANDES, F.A.N.; RODRIGUES, S. Ultrasound applications in fruit processing. En: *Advances in Fruit Processing Technologies*. Taylor & Francis Group: Abingdon, Reino Unido. **2012**. 36 p.

FERREIRA, D.S.; DE ROSSO, V.V.; ZERLOTTI, A. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). *Rev. Bras. Frutic.* **2010**; 32(3): 664-674.

FERRER, I.; GARCÍA-REYES, J.F.; MEZCUA, M.; THURMAN, E.M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2005**; 1082: 81-90.

FINN, C.E.; CLARK J.R. Emergence of blackberry as a world crop. *Chron Hortic.* **2011**; 51(3): 13-18.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**; 73(2): 627-650.

GALANAKIS, C.M.; GOULAS, V.; GEKAS, V. Predicting the solubilization preference of natural phenols to different solvents. Conference paper: 11th International Congress on Engineering and Food. National Technical University of Athens: Atenas, Grecia. **2011**; 1-6.

GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* **2004**; 84: 13-18.

GARZÓN, G.A.; RIEDL, K.M.; SCHWARTS, S.J. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *J. Food Sci.* **2009**; 74(3): 227-232.

GENTERBACH, D.D. Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals. En: Shi J, Mazza G, Maguer ML. Functional foods biochemical and processing aspects. CRC Press: Boca Ratón, Estados Unidos. **2002**; 2: 331-366.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**. F1.2.1-F1.2.13.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.* **1996**; 61(2): 322-326.

GONG, Y.; LIU, X.; HE, W.H.; XU, H.G.; YUAN, F.; GAO, Y.X. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia.* **2012**; 83: 481-489.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem.* **2010**; 119: 1030-1039.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **1990**; 9(1): 1-32.

HE, L.; XU, H.; LIU, X.; HE, W.; YUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS⁺ assay. *Food Res. Int.* **2011**; 44: 1161-1167.

HE, W.; LIU, X.; XU, H.; GONG, Y.; YUAN, F.; GAO, Y. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. *Food Chem.* **2010**; 123: 521-528.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53: 1841-1856.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chem.* **2009**; 114: 1147-1154.

HUANG, W.Y.; ZHANG, H.C.; LIU, W.X.; LI, C.Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. **2012**; 13(2): 94-102.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids (ISO 12966-2:2011). ISO: Ginebra, Suiza. **2011**. 17 p.

ITO, N., FUKUSHIMA, S., HASEGAWA, A., SHIBATA, M., & OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**; 70: 343-347.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; SIEBENHANDL, S.; BAUER, F. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Sci.* **2006**; 72: 446-456.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 4076-4082.

KANAZAWA, K.; SAKAKIBARA, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**; 48: 844-848.

KARAÇELİK, A.A; KÜÇÜK, M.; ISKEFIYELİ, Z.; AYDEMİR, S.; DE SMET, S.; MISEREZ, B.; SANDRA, P. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. *Food Chem.* **2015**; 175: 106-114.

KEBARLE, P.; PESCHKE, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chim. Acta.* **2000**; 406: 11-35.

KEBARLE, P.; VERKERK, U.H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**; 28: 898-917.

KHAN, M.K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A.S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.* **2010**; 119: 851-858.

KIM, S.M.; UM, B.H. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds among blueberry cultivars by HPLC-ESI/MS and on-line HPLC-ABTS system. *J. Med. Plants Res.* **2011**; 5(20): 5008-5016.

KOLEVA, I.I.; NIEDERLÄNDER, H.A.G.; VAN BEEK, T.A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal. Chem.* **2001**; 73: 3373-3381.

KOLNIAK-OSTEK, J.; OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A. Effect of apple leaves addition on physicochemical properties of cloudy beverages. *Ind. Crop. Prod.* **2013**; 44: 413-420.

KORFMACHER, W.A. Foundation Review: principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov. Today.* **2005**; 10: 1357-1367.

KRINSKY, NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1992**; 200(2): 248-54.

KRUBE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Anal. Chim. Acta.* **2015**; 870: 29-44.

KUCHARSKA, A.Z.; SOKÓL-LETOWSKA, A.; GABRIELSKA, J.; BAKOWSKA-BARCZAK, A.; WLOCH, A.; DUDRA, A.; SROKA, Z.; ZBIKOWSKA, B. Antioxidant properties of polyphenolics extracts from chokeberry, blackcurrant, blackberry, and raspberry fruits. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska: Lublin, Polonia.* **2001**; 24(3): 183-188.

KUSZNIEREWICZ, B.; PIASEK, A.; BARTOSZEK, A.; NAMIESNIK, J. Application of a commercially available derivatization instrument and commonly used reagents to HPLC on-line determination of antioxidants. *J. Food Comp. Anal.* **2011**; 24: 1073-1080.

LI, B.B.; SMITH, B.; HOSSAIN, M.D. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *Sep. Purif. Technol.* **2006**; 48: 189-196.

LI, F.; ZHANG, L.D.; LI, B.C.; YANG, J.; YU, H.; WAN, J.B.; WANG, Y.T.; LI, P. Screening of free radical scavengers from *Erigeron breviscapus* using on-line HPLC-ABTS/DPPH based assay and mass spectrometer detection. *Free Rad. Res.* **2012**; 46(3): 286-294.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). *Ultrason. Sonochem.* **2005**; 12: 295-300.

LI, S.Y.; YU, Y.; LI, S.P. Identification of antioxidants in essential oil of radix *Angelicae Sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. *J. Agric. Food Chem.* **2007**; 55: 3358-3362.

LUTHRIA, D.L.; BISWAS, R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem.* **2007**; 105: 325-333.

MA, Y.Q.; CHEN, J.C.; LIU, D.H.; YE, X.Q. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2009**; 16: 57-62.

MAGALHAES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C.; RANGEL, A.O.S.S. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**; 54: 5241-5246.

MAMYRIN, B.A.; KARATAEV, V.I.; SHMIKK, D.V.; ZAGULIN, V.A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *J. Exp. Theor. Phys.* **1973**; 37(1): 45-48.

MARKOM, M.; HASAN, M.; WAN, W.R.; SINGH, H.; JAHIM, J.M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Sep. Purif. Technol.* **2007**; 52: 487-496.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochem.* **2006**; 67: 2318-2331.

MAZZA, G. Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanità.* **2007**; 43(4): 369-374.

McDERMOTT, G.P.; CONLAN, X.A.; NOONAN, L.K.; COSTIN, J.W.; MNATSAKANYAN, M.; SHALLIKER, R.A.; BARNETT, N.W.; FRANCIS, P.S. Screening for antioxidants in complex matrices using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **2011**; 684: 134-141.

MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z.; BRAT P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-performance liquid chromatography with Diode array detection and electrospray ion trap Mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**; 55: 8616-8624.

MEYER, V. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4^a. Ed. John Wiley & Sons: New York, Estados Unidos. **2005**. 357 p.

MILLER, J.N.; MILLER J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4^a. Ed. Pearson Prentice Hall: Madrid, España. **2002**; 296 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas. Resultados evaluaciones agropecuarias municipales 2011. Bogotá, Colombia. **2012**; 301 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. La cadena del plátano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá, Colombia. **2005**; 40 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Mejoramiento de 31 hectáreas de mora en la zona de cordillera del departamento de Quindío para la producción de materia prima industrial con destino a la empresa nacional Meals de Colombia S.A. Quindío, Colombia. **2006**; 185 p.

MINISTERIO DE SALUD. Resolución No. 4124 de 1991. Bogotá, Colombia **1991**; 3 p.

MOREIRA, M.M.; MORAIS, S.; BARROS, A.A.; DELERUE-MATOS, C.; GUIDO, L.F. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**; 403: 1019-1029.

MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50: 519-525.

NDHLALA, A.R.; MOYO, M.; STADEN, J.V. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*. **2010**; 15: 6905-6930.

NIEDERLÄNDER, H.A.G.; VAN BEEK, T.A.; BARTASIUTE, A.; KOLEVA, I.I. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2008**; 1210: 121-134.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4106. Frutas frescas. Mora de Castilla. Especificaciones. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación: Bogotá, Colombia. **1997**. 15 p.

OLALEKAN, A.J.; AYODEJI, K.E. Antioxidative potentials of banana and plantain peel extracts on crude palm oil. *Ethnobot. Leaflets.* **2010**; 14: 559-569.

OSORIO, C.; HURTADO, N.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; HEREDIA-MIRA, F.J.; MORALES, A.L. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chem.* **2012**; 132: 1915-1921.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 4619-4626.

PALA, C.U.; TOKLUCU, A.K. Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *J. Food Comp. Anal.* **2011**; 24: 790-795.

PANIWNYK, L.; CAI, H.; ALBU, S.; MASON, T.J.; COLE, R. The enhancement and scale-up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2009**; 16: 287-292.

PANTELIDIS, G.E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G.A.; DIAMANTIDIS, G.R. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**; 102: 777-783.

PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; DA PIEVE, S.; BUTLER, F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2009**; 10: 308-313.

PÉREZ-BONILLA, M.; SALIDO, S.; VAN BEEK, T.A.; LINARES-PALOMINO, J.P.; ALTAREJOS, J.; NOGUERAS, M.; SANCHEZ, A. Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *J. Chromatogr. A.* **2006**; 1112: 311-318.

PLAN FRUTÍCOLA NACIONAL DE COLOMBIA. Diagnóstico y análisis de los recursos para la fruticultura en Colombia. Cali, Colombia. **2006**; 88 p.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.* **1986**; 25(1): 223-230.

POTHAVORN, P.; KITDAMRONGSONT, K.; SWANGPOL, S.; WONGNIAM, S.; ATAWONGSA, K.; SVASTI, J.; SOMANA, J. Sap phytochemical compositions of some bananas in Thailand. *J. Agric. Food Chem.* **2010**; 58(15): 8782-8787.

RAUDONIS, R.; BUMBLAUSKIENE, L.; JAKSTAS, V.; PUKALSKAS, A.; JANULIS, V. Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *J. Chromatogr. A.* **2010**; 1217: 7690-7698.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**; 26 (9-10): 1231-1237.

REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G.G.; MARTÍNEZ-PENICHE, R.A.; LILA, M.A. Antioxidant capacity of fruit extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* **2005**; 70(7): 497-503.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.* **1996**; 20(7): 933-956.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A.* **2003**; 1000: 657-691.

ROBARDS, K; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**; 66: 401-436.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**. F1.1.1-F1.1.11.

ROMDHANE, M.; GOURDON, C. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chem. Eng. J.* **2002**; 87: 11-19.

SALISOVÁ, M.; TOMA, S.; MASON, T.J. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrason. Sonochem.* **1997**; 4: 131-134.

SCHRECKINGER, M.E.; LOTTON, J.; LILA, M.A.; GONZÁLEZ, E. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J. Med. Food*. **2010**; 13(2): 233-246.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem*. **2006**; 54: 9329-9339.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Effects. CRC Press: Boca Raton, Estados Unidos. **2004**. 540 p.

SHI, S.Y.; ZHOU, H.H.; ZHANG, Y.P.; JIANG, X.J.; CHEN, X.Q.; HUANG, K.L. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. *TrAC, Trend Anal. Chem*. **2009**; 28(7): 865-877.

SINGHAL, M.; RATRA, P. Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic content of *Musa acuminata* peel extracts. *Global J. Pharmacol*. **2013**; 7(2): 118-122.

SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH, J. Practical HPLC method development. 2^a. Ed. John Wiley & Sons: New York, Estados Unidos. **1997**. 765 p.

SOMEYA, S.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chem*. **2002**; 79: 351-354.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci*. **2007**; 30: 3268-3295.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**; 18(1): 253-262.

STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; MARTÍNEZ, J.R. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**; 373: 70-74.

STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; SALGAR, W.; DELGADO, W.; MARTÍNEZ, J.R. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A.* **2000**; 886: 175-181.

STRUBE, M.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Rad. Res.* **1997**; 26: 515-521.

TAFURT, G. Evaluación de la actividad antioxidante de tres aceites esenciales en emulsiones tipo margarina degradadas por radiación ultravioleta. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. **2003**; 124 p.

TAVARES, L.; FIGUEIRA, I.; MCDOUGALL, G.J.; VIEIRA, H.L.A.; STEWART, D.; ALVES, P.; FERREIRA, R.B.; SANTOS, C.N. Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *Eur. J. Nutr.* **2013**; 52: 225-236.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2001**; 8: 137-142.

VALENZUELA, A.; NIETO, K. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas Aceites.* **1996**. 47(3): 186-196.

VALMAYOR, R.V.; JAMALUDDIN, S.H.; SILAYOI, B.; KUSUMO, S.; DANH, L.D.; PASCUA, O.C.; ESPINO, R.R.C. Banana cultivars names and synonyms in southeast Asia. *INIBAP*. International Plant Genetic Resources Institute: Laguna, Filipinas: **2000**. 28 p.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* **2008**; 111: 816-823.

WADA, L.; OU, B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50: 3495-3500.

WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th Ed. John Wiley & Sons: New York, Estados Unidos. **2005**; 6: 431-489.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**; 45: 304-309.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48: 140-146.

WU, X.; PRIOR, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53: 2589-2599.

XIA, T.; SHI, S.; WAN, X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *J. Food Eng.* **2006**; 74: 557-560.

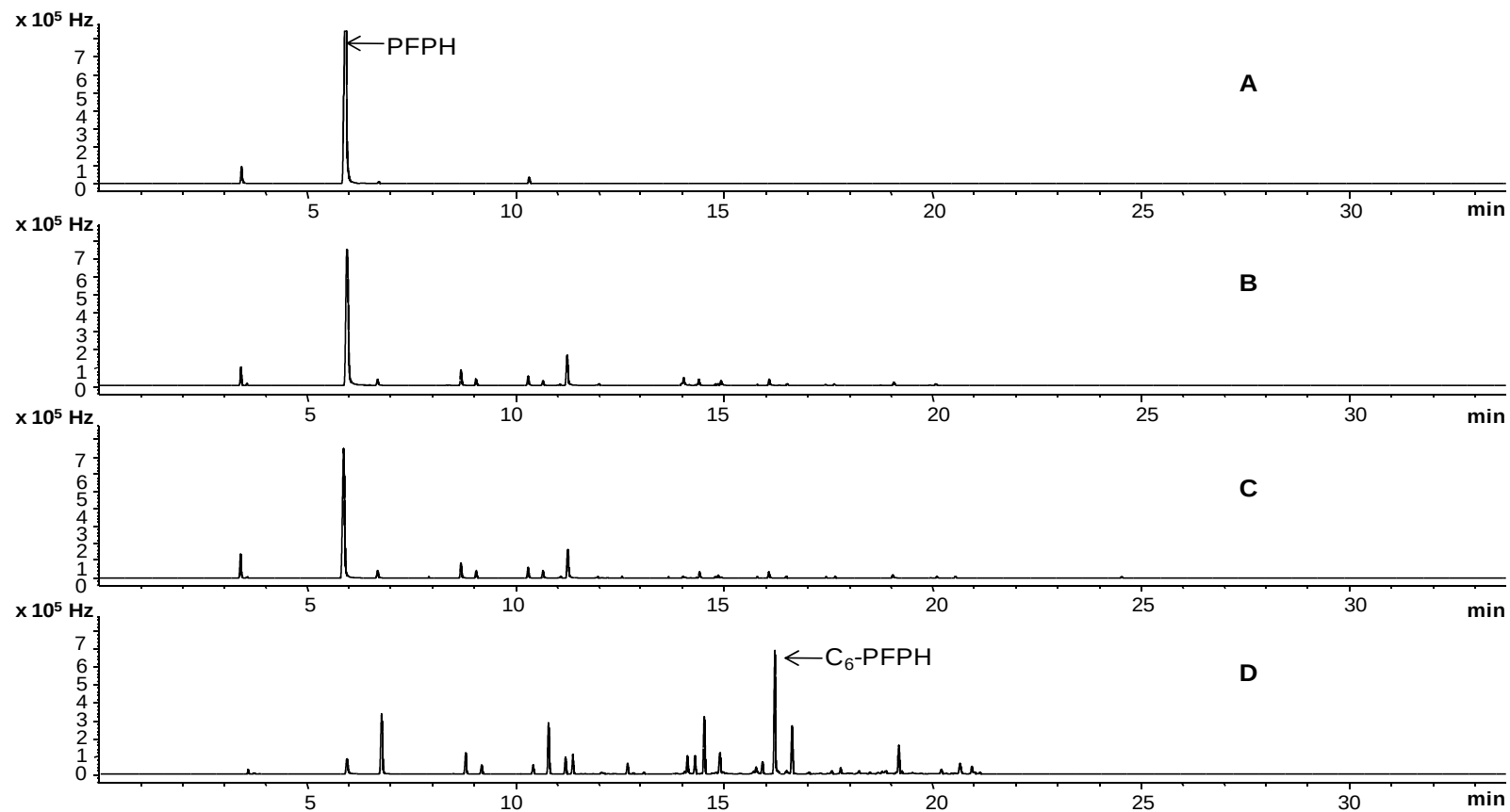
XIN, X.; FAN, R.; GONG, Y.; YUAN, F.; GAO, Y. On-line HPLC-ABTS^{•+} evaluation and HPLC-MSⁿ identification of bioactive compounds in hot pepper peel residues. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**; 238: 837-844.

ZAPATA, A.; VANEGAS, L.S.; ROJANO, B.A. Oleína de palma estabilizada con antioxidante natural de romero en un proceso discontinuo de fritura. *Información Tecnológica.* **2014**; 25(2): 131-140.

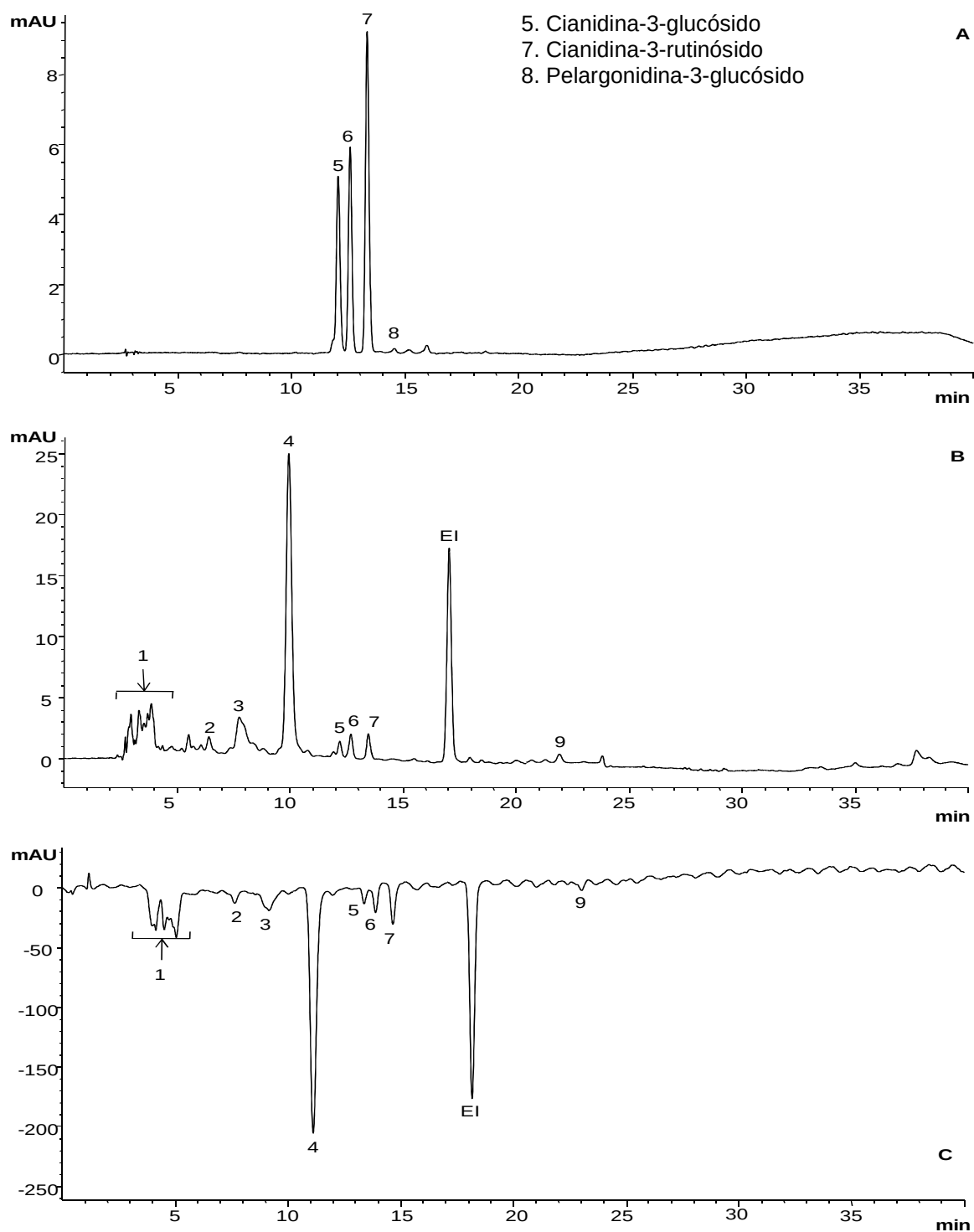
ZELIGER, H.I. Cosmetics: Toxicity and regulatory requirements in the US. Global regulatory issues for the cosmetics industry. C. I. Betton: New York, EE.UU. **2007**; 1: 63-70.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **2009**; 114: 310-316.

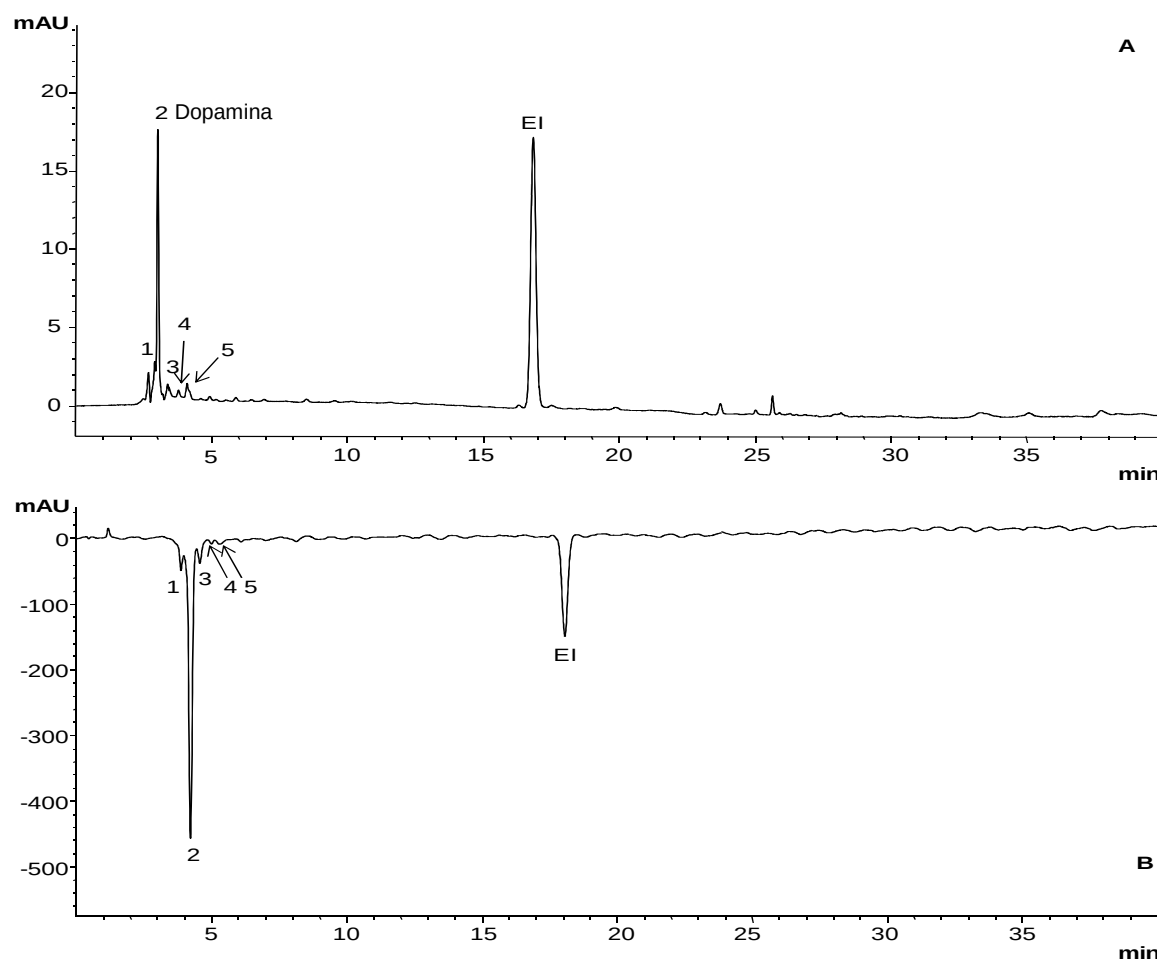
ANEXOS



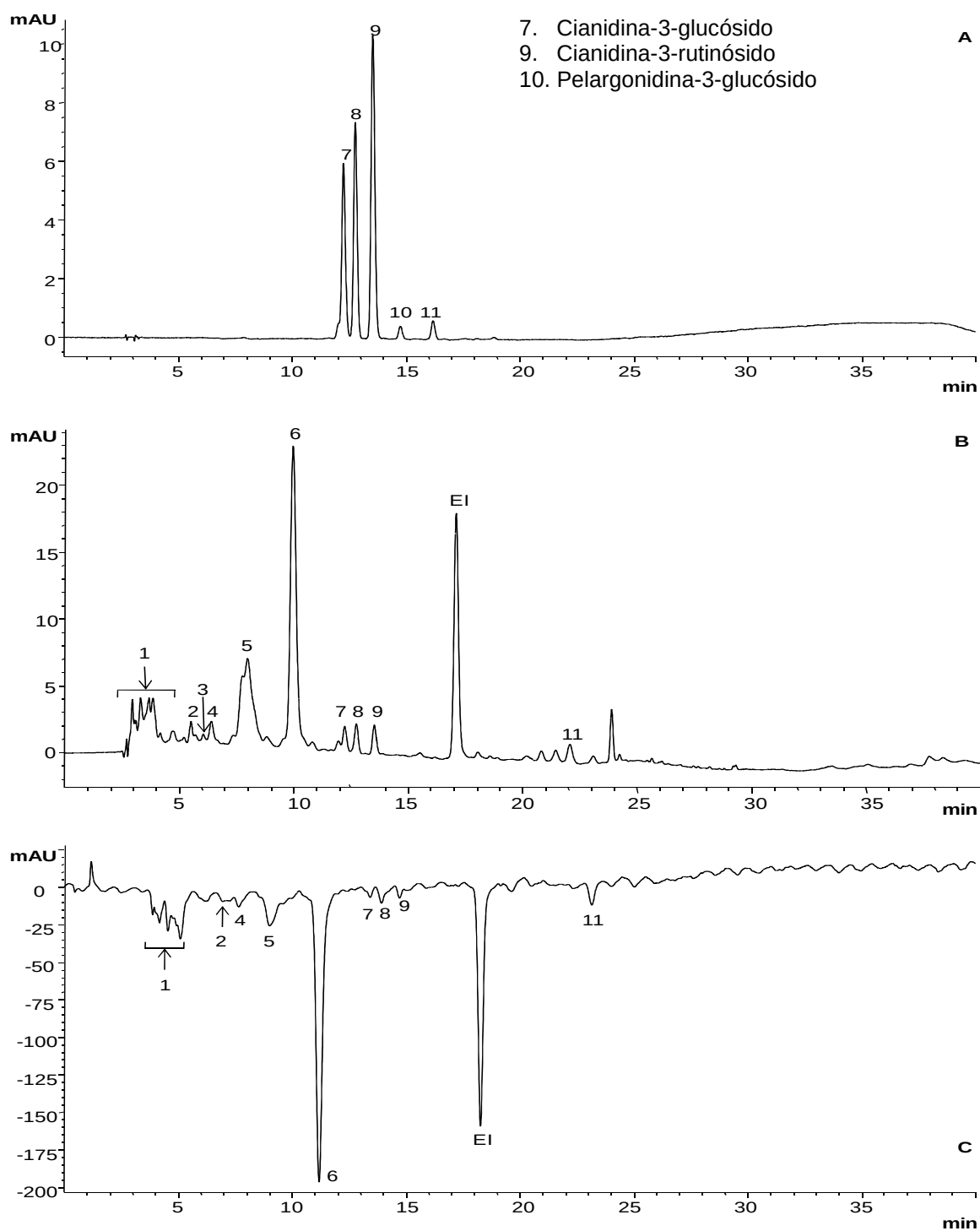
Anexo A. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-ECD, en los cuales se observa la generación del derivado hidrazónico del hexanal en emulsiones de aceite en agua expuestas a radiación UVA-Vis. **A.** Solución de PFPH (500 ppm). **B.** Aceite de soya sin irradiar. **C.** Emulsión sin irradiar. **D.** Emulsión irradiada durante 12 h, sin antioxidante agregado.



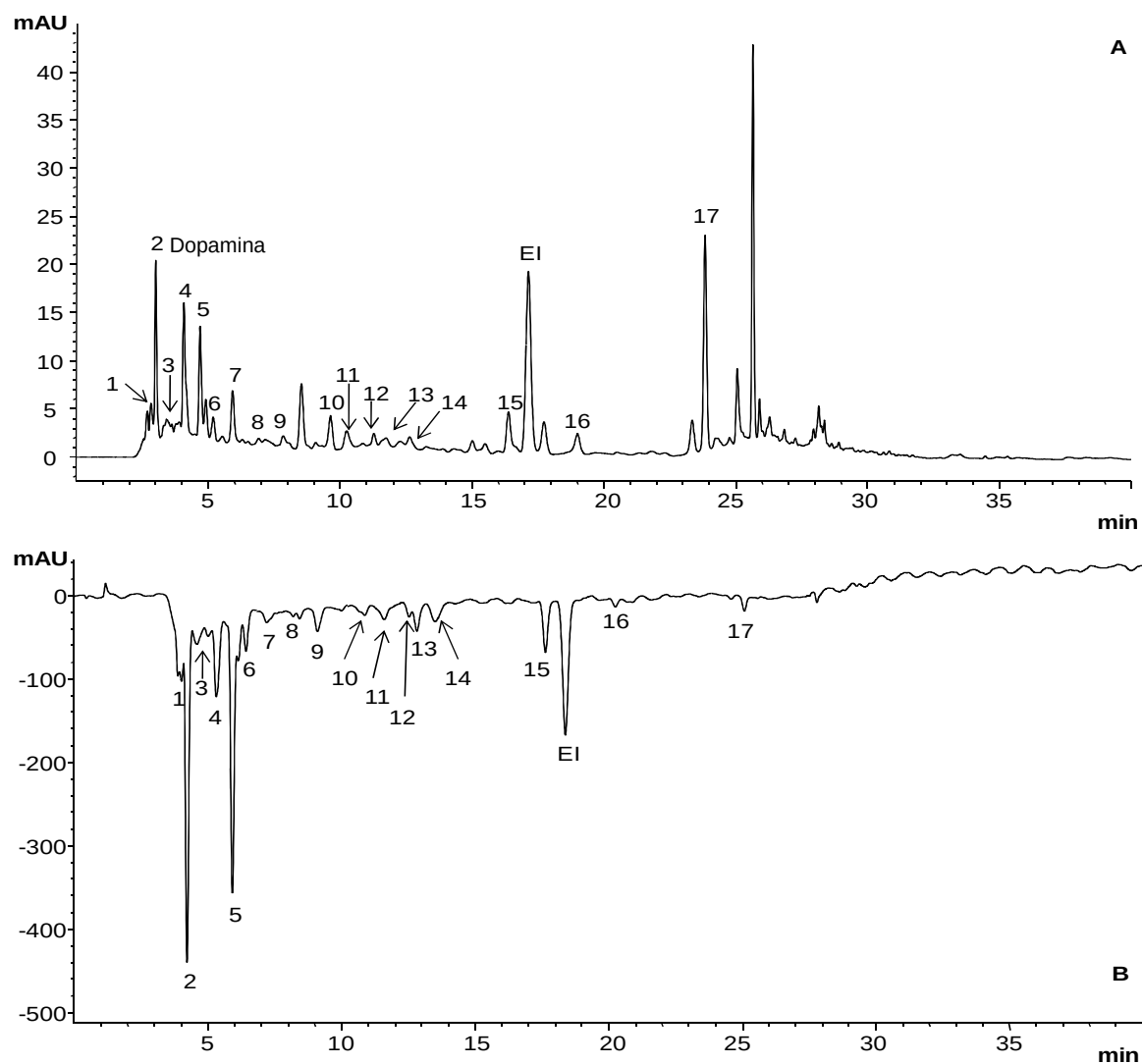
Anexo B. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de mora de Castilla cosechada en la finca La Estancia. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical ABTS⁺. EI: Estándar interno.



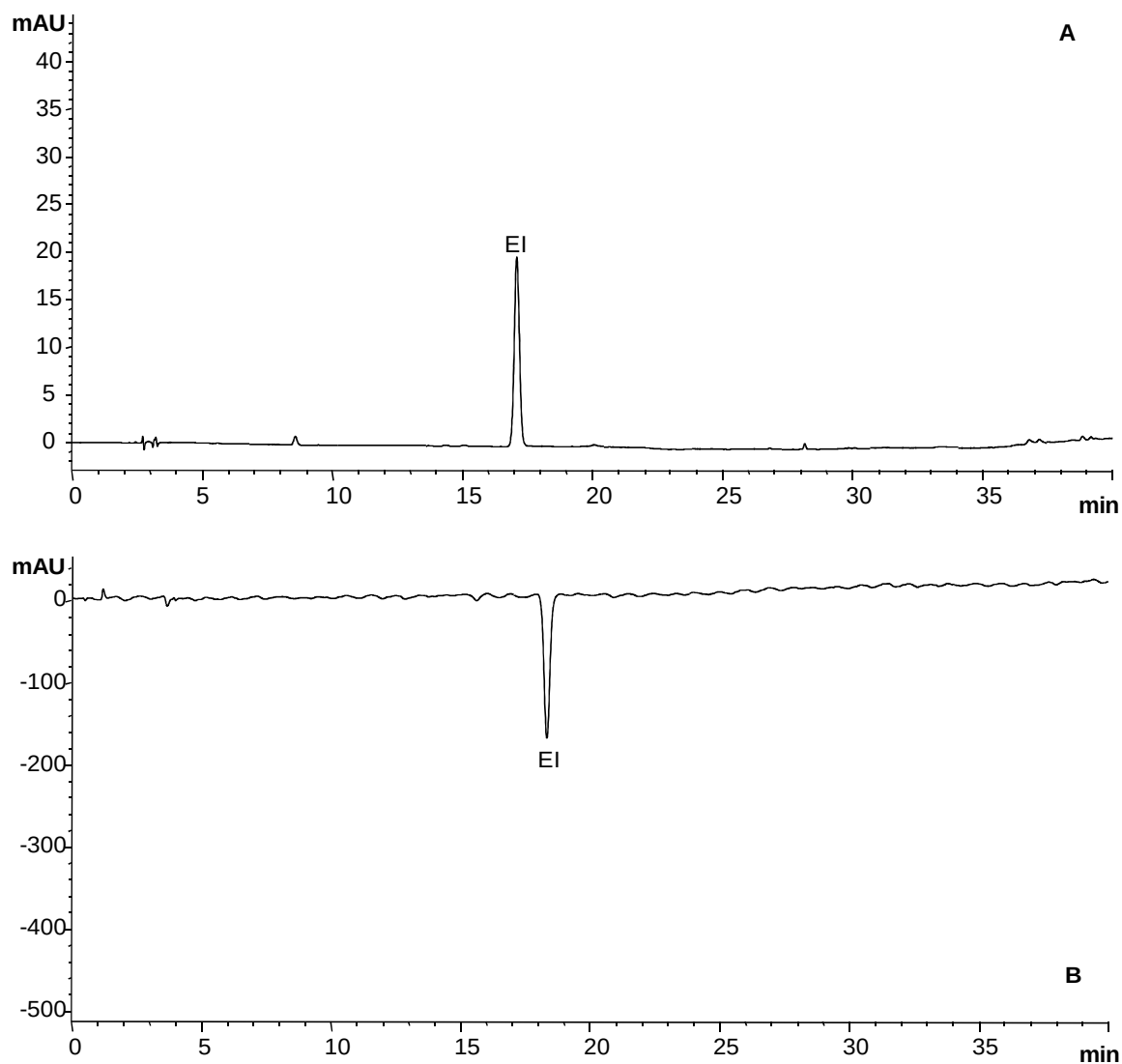
Anexo C. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos sólido-líquido de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca Guatiguará. Antes (DAD, A: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, B: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. EI: Estándar interno.



Anexo D. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de mora de Castilla cosechada en la finca La Estancia, después de su extracción en fase sólida. Antes (DAD, A: $\lambda=515$ nm, B: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, C: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. EI: Estándar interno.



Anexo E. Perfiles cromatográficos típicos, obtenidos por HPLC con derivatizador, de extractos de cáscara de plátano Hartón cosechado en la finca Guatiguará, después de su extracción en fase sólida. Antes (DAD, A: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, B: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. EI: Estándar interno.



Anexo F. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC con derivatizador, del blanco del procedimiento de extracción en fase sólida. Antes (DAD, A: $\lambda=270$ nm) y después (MWD, B: $\lambda=734$ nm) de su reacción con el catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. EI: Estándar interno.