

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE DISTINTOS SOLVENTES PARA EL PROCESO
DE EXTRACCIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE QUILETE (*Solanum americanum*)
Y MAMEY (*Mammea americana*)**

Informe de Tesis

presentado por

Sandra Patricia Lima Pimentel

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, Octubre del 2003.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE DISTINTOS SOLVENTES PARA EL PROCESO
DE EXTRACCIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE QUILETE (*Solanum americanum*)
Y MAMEY (*Mammea americana*)**

Informe de Tesis

presentado por

Sandra Patricia Lima Pimentel

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, Octubre del 2003.

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Padre, Redentor y Consolador. Centro de mi vida. Luz de mi camino. Razón de mi existir.

A LA VIRGEN MARÍA:

Mi madre. Fortaleza en mi camino.

A LOS SANTOS ÁNGELES CUSTODIOS:

Amigos y compañeros incondicionales de la vida.

A MIS PADRES:

José Enrique Lima Contreras y Beatriz Pimentel Monterroso de Lima.

Con mucho cariño.

A MIS HERMANOS:

José Mario y Dinora Beatriz

A MI SOBRINA:

Kristel Sofía

A MI ABUELITA, TIOS, PRIMOS, CUÑADO Y FAMILIA EN GENERAL.

A MIS AMIGAS:

En especial a Miriam, Patty Girón, Andrea, Margareth, Margarita, Ana Lucía, Ana Cristina, Roxy, Carl, Sully, Egly, Ana Lidia, María Eugenia, Rebeca y Sofía Monteros.

A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN

A MIS CATEDRÁTICOS

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Doctor Rubén Velásquez y Licenciada Kenia Caballeros por su apoyo y orientación, sin los cuales no hubiese sido posible la elaboración de esta tesis.

A mis revisoras, M.Sc. Blanca Samayoa y Licenciada Margarita Paz por sus orientaciones, sugerencias y opiniones.

Al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A los departamentos de Microbiología y Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A todas aquellas personas que colaboraron y permitieron hacer posible esta tesis.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
A. Radicales libres	4
1. Generalidades	4
2. Reactividad de los radicales libres	6
B. Defensa antioxidante	7
1. Primera línea de defensa	7
2. Segunda línea de defensa	8
3. Tercera línea de defensa	16
C. Fuentes de antioxidantes exógenos	16
1. Mamey (<i>Mammea americana</i>)	17
2. Quilete (<i>Solanum americanum</i>)	17
D. Extracción de antioxidantes	18
E. Polaridad de los solventes	20
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. OBJETIVOS	23
VI. HIPÓTESIS	24
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	25
A. Universo	25
B. Muestra	25
C. Materiales	25
1. Recursos humanos	25
2. Equipo	25
3. Reactivos	26
D. Métodos	27
1. Obtención de la muestra vegetal	27
2. Preparación del extracto vegetal de quilete (<i>Solanum americanum</i>)	28
3. Preparación del extracto de mamey (<i>Mammea americana</i>)	28
4. Procesamiento del extracto vegetal de quilete (<i>Solanum americanum</i>) y del extracto de la fruta mamey (<i>Mammea americana</i>)	29
5. Determinación de la actividad antioxidante utilizando α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo DPPH	30
6. Determinación de los compuestos fenólicos	30
7. Determinación de vitamina C	31
8. Determinación del peso seco de la muestra vegetal de quilete (<i>Solanum americanum</i>) y de la fruta mamey (<i>Mammea americana</i>)	31
E. Diseño estadístico	32
VIII. RESULTADOS	34
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
X. CONCLUSIONES	47
XI. RECOMENDACIONES	48
XII. REFERENCIAS	49
XIII. ANEXOS	53

I. RESUMEN

El presente estudio evaluó la extracción con ocho distintos solventes a partir de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*), para determinar la actividad antioxidante total, empleando el reactivo α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH), el contenido de grupos fenoles por la reacción de Folin Ciocalteu y la vitamina C mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La evaluación de los solventes se realizó mediante un diseño factorial que combinó las siguientes variables: parámetro de determinación de actividad antioxidante y tipo de solvente de extracción. En esta última variable se incluyeron ocho solventes de acuerdo a su distinta naturaleza polar (metanol, etanol, cloroformo, n-hexano, buffer a pH 3, buffer a pH 7.4, agua y fase móvil) para la extracción de mamey y quilete en estado fresco. La extracción con cada solvente para ambas matrices fue realizada por triplicado. A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95 por ciento ($\alpha = 0.05$). Luego se realizó una comparación múltiple mediante el empleo del test de Tukey ($\alpha = 0.05$).

El estudio permitió establecer que la polaridad de los solventes influye en la extracción de los compuestos antioxidantes de quilete y mamey. Pudo observarse que la extracción alcohólica (metanol y etanol) es la mejor opción para la cuantificación de los compuestos antioxidantes mediante los tres parámetros de medición en ambos vegetales. El etanol extrajo mejor los compuestos antioxidantes del mamey, seguido por el metanol; en el quilete se obtuvieron mejores rendimientos de antioxidantes con el metanol seguido por etanol. Los solventes cloroformo y n-hexano no fueron útiles en el estudio por su naturaleza apolar, la cual favorece la extracción de compuestos lipofílicos que no son cuantificables con las metodologías empleadas.

II. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir independientemente, contienen uno o más electrones desapareados y por su alta reactividad química pueden causar daño a las macromoléculas celulares incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, resultando en daño celular y en enfermedades crónicas como la aterosclerosis y la artritis reumatoide (1,2).

Bajo condiciones fisiológicas normales, el organismo previene el daño producido por los radicales libres a través de sus mecanismos de protección conocido como sistemas antioxidantes. Además, es sabido que la ingesta frecuente de vegetales y frutas es una fuente importante de antioxidantes exógenos, pudiendo tener gran trascendencia en la prevención y terapéutica de las enfermedades, en las que se han implicado radicales libres (3-4).

El conocimiento de la capacidad antioxidante de vegetales y frutas es importante, ya que de esta manera se puede promocionar el consumo de las que posean mayores cantidades. Actualmente se han llevado a cabo muchos estudios a nivel mundial, para caracterizar la propiedad antioxidante de los extractos de varios materiales vegetales, con el propósito de aislar e identificar los compuestos responsables de estas actividades.

Para evaluar la actividad antioxidante de manera exacta, es necesario realizar una correcta extracción de los compuestos que la posean, lo cual se dificulta por la variada naturaleza de las estructuras vegetales (matrices) y por la diferente naturaleza química de estos compuestos, los cuales pueden ser más o menos polares. Los procedimientos más comúnmente utilizados hasta el momento para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales y frutas incluyen la extracción con solventes (5). A partir de estos extractos se determinan tres parámetros distintos: la capacidad antioxidante total, el contenido total de fenoles y de vitamina C, los cuales corresponden a compuestos con distinta polaridad (6).

En el presente trabajo se evaluó la extracción con ocho distintos solventes a partir de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*), para la determinación de la actividad antioxidante total a través del método de DPPH, el contenido de grupos fenoles por el reactivo de Folin Ciocalteu y la vitamina C mediante HPLC.

III. ANTECEDENTES

A. Radicales libres

1. Generalidades

Un radical libre es toda especie capaz de existir independientemente (de ahí el nombre de libre) que contiene uno o más electrones no emparejados, esto es, un electrón impar en una órbita. Entre ellos se encuentra el átomo de hidrógeno (H^\bullet) el cual es el radical libre más simple; el triclorometilo (CCl_3^\bullet) consiste en un radical centrado en un carbono y que se forma durante el metabolismo del disolvente tetracloruro de carbono en el hígado, contribuyendo a los efectos tóxicos de este disolvente; el superóxido (O_2^-) radical centrado en el oxígeno con reactividad limitada; el hidroxilo (OH^\bullet) que consiste en un radical centrado en el oxígeno sumamente reactivo el cual ataca todas las moléculas presentes en el organismo; el peroxilo y alcoxilo (RO_2^\bullet y RO^\bullet) que son radicales centrados en el oxígeno y formados durante la degradación de los peróxidos orgánicos y también pueden mencionarse los óxidos de nitrógeno (NO^\bullet , NO_2^\bullet), el óxido nítrico se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina y el dióxido de nitrógeno se produce cuando el óxido nítrico reacciona con el oxígeno y se encuentra en el aire contaminado y en el humo de la materia orgánica en combustión (1,2).

Para que una molécula sea estable, todos sus electrones deben hallarse compensados por protones. La molécula que tiene uno o varios electrones no apareados es inestable y tiende a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y saturar sus electrones. Este proceso se denomina oxidación y puede dar lugar a una reacción en cadena dañina en el organismo (7).

Por esto los radicales libres deben ser inactivados; en caso contrario, su reactividad química puede dañar varios tipos de macromoléculas celulares, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, resultando en daño celular (1).

En el organismo humano se generan radicales libres como por ejemplo el radical superóxido O_2^- . Este puede generarse por accidentes químicos, ya que muchas moléculas en el organismo reaccionan directamente con el oxígeno y dan lugar a superóxido. Entre ellas se encuentran las catecolaminas (por ejemplo, la adreanalina y dopamina), los tetrahidrofolatos y algunas sustancias de las cadenas de transporte de electrones mitocondriales y del retículo endoplásmico. La generación de peróxido es una consecuencia inevitable de la existencia en el organismo de moléculas que requieren oxígeno. Sin embargo, también puede fabricarse superóxido en forma deliberada. Por ejemplo, las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) que defienden al organismo frente a bacterias, virus y hongos, generan grandes cantidades de superóxido como parte del mecanismo de eliminación de los organismos extraños. Sin embargo, este mecanismo puede llegar a tener errores: existen varias enfermedades (como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal) en las que hay una activación fagocitaria excesiva. Esta activación inadecuada de los fagocitos provoca lesiones de los tejidos, a las que contribuyen los radicales de oxígeno (2).

La mayor parte del superóxido experimenta una reacción no enzimática o catalizada por la superóxido dismutasa para introducir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tal como se presenta en la siguiente reacción (2):



El peróxido de hidrógeno no tiene electrones desapareados, por lo que no es un radical. Su estructura molecular se parece a la del agua. Forma parte de varias enzimas oxidasas *in vivo*, entre ellas las oxidasas de los aminoácidos y la xantina oxidasa. El peróxido de hidrógeno puede regular la expresión de algunos genes por medio de un mecanismo directo o bien un mecanismo indirecto de la subunidad inhibitoria procedente del factor de transcripción del gen NF-kappaB existente en el citoplasma (2).

Otro radical fisiológico es el óxido nitroso, NO^\bullet , que lleva a cabo muchas funciones fisiológicas útiles como la regulación de la tensión arterial y la señalización intercelular,

pero en cantidad demasiado elevada puede ser tóxico. Al parecer, la producción excesiva de óxido nitroso es un importante mecanismo de lesión hística en varias enfermedades, entre ellas la inflamación crónica, el accidente cerebrovascular y el choque séptico (2).

2. Reactividad de los Radicales libres

La reactividad depende del radical y de lo que le sea presentado. Si se encuentran dos radicales libres, pueden unir sus electrones no emparejados y formar un enlace covalente. De esta forma, el hidrógeno atómico forma hidrógeno diatómico. Así también, existe una reacción muy rápida de $\text{NO}\bullet$ con O_2^- para formar un producto no tóxico, el peroxinitrito:



Cuando un radical libre reacciona con un no radical, se produce un radical nuevo y se pone en marcha una reacción en cadena. Como la mayor parte de las moléculas biológicas no son radicales, la generación de radicales reactivos como el hidroxilo suele iniciar reacciones en cadena. Por ejemplo, el ataque de los radicales reactivos a las cadenas laterales de los ácidos grasos de las membranas y a las lipoproteínas puede restar hidrógeno, dejando un radical centrado en el carbono, con lo que se inicia el proceso de la peroxidación lipídica (2).

Cuando la generación de hidroxilo ocurre cerca del ADN, el radical ataca tanto al azúcar deoxirribosa como a las bases purina y pirimidina, dando lugar a una amplia variedad de productos. En el ADN de los tejidos humanos se encuentran niveles bajos de estos productos y sus cantidades son mayores en el ADN de las células cancerosas, lo que podría deberse a la mayor formación de radical hidroxilo en los tumores (2).

B. Defensa antioxidante

Muchos de los sistemas enzimáticos celulares, el transporte mitocondrial de electrones y la exposición a diversos factores ambientales forman especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres en condiciones normales, lo que ha dado lugar a la evolución de un complejo sistema de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen por objeto detoxificar esos radicales libres (2).

Existen tres líneas de defensa antioxidante. La primera es la línea de defensa enzimática que consiste en enzimas y sustancias liposolubles e hidrosolubles. La segunda línea consiste en compuestos de bajo peso molecular y la tercera incluye enzimas reparadoras (1,7,8).

1. Primera línea de defensa

Esta se encarga de prevenir la formación de nuevos radicales libres, convirtiendo los ya existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas (7). Forman parte de esta línea :

a) Superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la descomposición del superóxido a peróxido y oxígeno (1).

b) Glutathion peroxidasa (GSHPX), esta enzima contiene selenio y reduce los hidroperóxidos provenientes de la oxidación lipídica (1).

c) Catalasa, es una enzima que cataliza específicamente la descomposición del peróxido de hidrógeno (1).

d) Proteínas de unión a metales como la ferritina y ceruloplasmina que limitan la disponibilidad de Fe(II) necesaria para formar el radical hidroxilo (7,8,9).

2. Segunda línea de defensa

Consiste en antioxidantes que capturan los radicales, evitando la formación de las reacciones en cadena de radicales libres. En esta línea se incluye la vitamina E (alfa-tocoferol), la vitamina C (ascorbato), vitamina A (betacaroteno), ácido úrico, bilirrubina, albúmina y antioxidantes no nutritivos como los compuestos fenólicos y polifenólicos (1,2,7-9).

a) Fenoles y polifenoles: Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Los compuestos fenólicos se encuentran así mismo en forma de complejos, como polifenoles polimerizados o en forma de pequeños monómeros llamados ácidos fenólicos (ej: el ácido cafeínico y el ácido cumarínico) (figura No.1) (10,11).

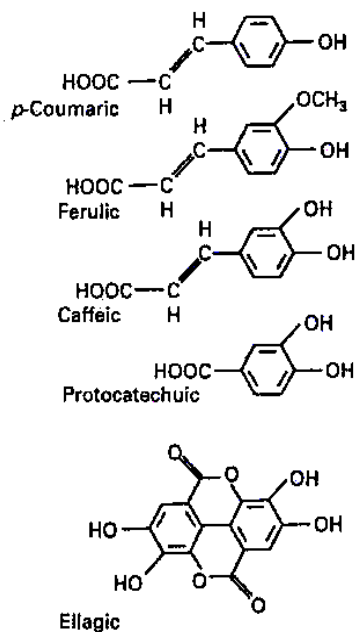


Figura No.1 Estructura de algunos ácidos fenólicos

Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua. Muchos de ellos poseen con frecuencia grupos alcohólicos, aldehídicos y carboxílicos. Entre ellos se incluyen flavonoides, cumarinas, cromenos y benzofuranos (10,11).

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de compuestos fenólicos, algunos son solubles en agua y etanol como los glicósidos o agliconas muy hidroxiladas y otros son solubles en éter y cloroformo como es el caso de las flavonas altamente metoxiladas. Como los pigmentos de la frutas y verduras, varían desde el amarillo pálido y la ausencia de color de las flavonomas de los cítricos, al rojo y azul de las antocianinas de las fresas, moras y otras frutas similares. Están ampliamente distribuidos entre las plantas. La mayoría se hallan en la piel, la cáscara y las capas más externas de las frutas y verduras, que son las zonas más expuestas a la luz. Actúan como antioxidantes, protegiendo de la oxidación al ácido ascórbico y a otros compuestos de las plantas. (12,11).

Se comportan como secuestradores de radicales oxígeno y suprimen la oxidación de las cadenas lipídicas por los radicales libres, además actúan como antioxidantes en muchos sistemas biológicos incluyendo las LDL. El ácido cafeínico ha sido detectado en el plasma humano y se ha evidenciado su acción *in vivo*. En general, su actividad antioxidante es atribuida a la capacidad de los fenoles de formar, en primer lugar, radicales fenoxil estabilizados por resonancia después de reaccionar con radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) (reacción 1) o con ferrilmioglobina ($\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$) (reacción 2) (12).



La efectividad inhibitoria de los fenoles dependerá no únicamente de las tasas constantes de estas reacciones, sino de la reactividad de los radicales $\text{Fen-O}\cdot$. Algunos estudios sugieren que las características estructurales son importantes para la actividad porque esta puede participar en la estabilización por resonancia del radical fenoxilo formado en el proceso (12-14).

Actualmente, se ha demostrado que los fenoles actúan como antioxidantes *in vivo*: (i) incrementando los niveles de glutatión reducido en ratones alimentados con ELL (derivados de taninos de frutas); (ii) suprimen los niveles de peroxidación lipídica en ratas tratadas con cloroformo o irradiadas con ^{60}Co ; (iii) inhiben la peroxidación de los lípidos del suero y del hígado en ratas alimentadas con aceites peroxidados y (iv) protegen contra la peroxidación hepática Endrin-inducida, disminuyendo la excreción de metabolitos de lípidos oxidados. En general, la capacidad antioxidante de este compuesto *in vitro* es expresada de las siguientes formas: (i) disminución de la formación del malondialdehído en muchos sistemas de peroxidación lipídica; (ii) secuestro de O_2^- y (iii) disminución de la tasa de formación de $\text{OH}\cdot$ (15).

Los ácidos fenólicos exhiben un potente efecto citoprotector de las células endoteliales contra la actividad de las LDL oxidadas. Además, el ácido cafeínico actúa como un agente citoprotector, probablemente por bloqueo de la señalización generada por las LDL oxidadas y culminando en la interrupción del aumento del calcio el cual se encuentra implicado en la apoptosis LDL-inducida. También se ha demostrado que los derivados fenólicos del ácido cinámico que se encuentran en la dieta pueden contrarrestar las oxidaciones nocivas iniciadas por la ferrilmioglobina (16,17).

b) Vitamina C (ácido ascórbico, ascorbato monoaniónico o ascorbato): químicamente, el ácido L-ascórbico es un compuesto sencillo, de fórmula empírica $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (figura No.2) (2,18).

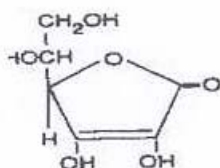


Figura No. 2 Ácido L-ascórbico

Es muy soluble en agua, menos soluble en alcohol etílico y casi insoluble en la mayoría de disolventes lipídicos. Es un ácido débil con pK de 4.2. El ácido ascórbico deriva de los alimentos vegetales, especialmente de las frutas y verduras de crecimiento rápido. El ascorbato sufre una oxidación reversible y forma el radical libre llamado ácido semideshidroascórbico, ascorbato⁻ o radical libre ascorbato. El ascorbato⁻ es un radical libre relativamente estable, se oxida a ácido dehidroascórbico, que probablemente existe *in vivo* en muchas formas. El ácido deshidroascórbico puede volver a reducirse al radical intermediario y después a vitamina C; es inestable en soluciones acuosas (figura No.3). El ascorbato actúa como donador de electrones a través de su forma de radical libre. El radical intermediario ascorbato⁻ no es ni fuertemente oxidante ni reductor. El ascorbato⁻ reacciona mal con el oxígeno, produciendo cantidades muy escasas o nulas de superóxido (2,18).

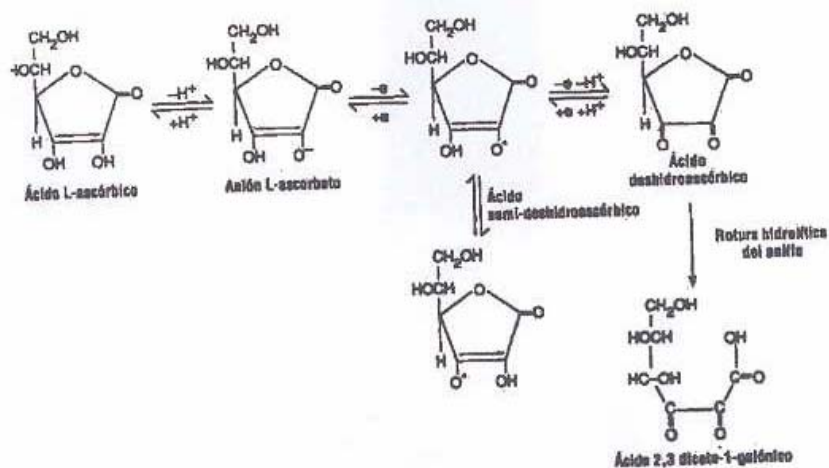


Figura No. 3 El ácido ascórbico y sus productos de oxidación

El ascorbato es un excelente antioxidante ya que proporciona electrones a las enzimas o a los compuestos químicos oxidantes. Reduce el superóxido, los radicales

hidroxilo, el ácido hipocloroso y otros oxidantes reactivos. Como dichos oxidantes pueden dañar directamente el ADN o afectar su transcripción así como alterar las proteínas o las estructuras de la membrana, el ascorbato podría desempeñar un papel esencial en la defensa contra la oxidación celular. En el interior de las células el ascorbato actúa como donador de electrones, formando parte de la interacción entre el hierro y la ferritina. Fuera de las células, puede evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El ascorbato extracelular puede también transferir electrones a los radicales de tocoferol en las partículas de lípido o en las membranas. Además de esto, el ascorbato es un cofactor o cosustrato de ocho enzimas aisladas. Facilita la absorción gastrointestinal del hierro y se cree que desempeña algún papel en la conversión del ácido fólico a su forma activa, el ácido folínico. También puede desempeñar un papel en la desintoxicación de ciertas sustancias venenosas en virtud de su papel cofactorial en las reacciones de hidroxilación (2,18).

Posee una capacidad inhibidora en la formación de nitrosaminas. Estas son sustancias cancerígenas que se originan de la reacción que se producen entre los nitritos y las aminas secundarias o terciarias, y entre sus numerosas fuentes se destacan el humo del tabaco, ciertas actividades industriales y los alimentos como carne y pescados curados, cerveza y whisky, entre otros (18,19).

El mecanismo por el cual se inhibe la formación de nitrosaminas consiste en que tanto el ácido ascórbico como el anión ascorbato reducen el ácido nitroso a óxido nítrico, impidiendo así la reacción de nitrosación (19).

c) Carotenos: el β -caroteno es una molécula simétrica que contiene dos anillos β -ionona conectados por una cadena conjugada (figura No.4). Entre los carotenos comunes, como el α -caroteno, β -caroteno y licopeno, el β -caroteno es el más importante de la provitamina A. (18).

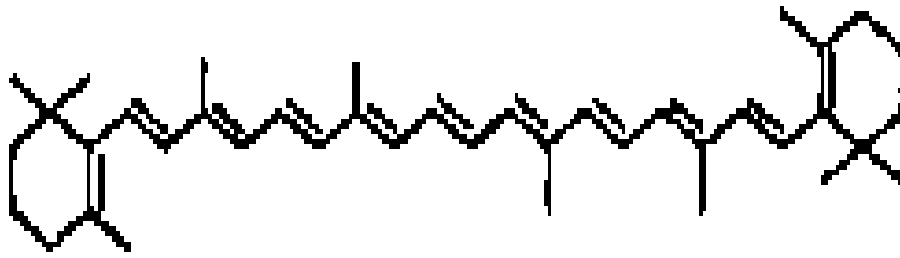


Figura No.4 Estructura del β -caroteno

El β -caroteno se funde a los 181-182 °C. Es fácilmente soluble en disulfuro de carbono, cloroformo y benceno. Es casi insoluble en etanol y metanol. Los carotenos absorben el oxígeno rápidamente cuando se exponen al aire, produciendo sustancias incoloras (18).

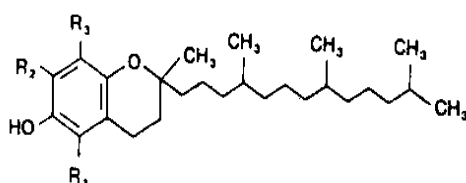
Los carotenos se encuentran en elevadas concentraciones en algunos vegetales, como las zanahorias, la calabaza amarilla, el maíz, los tomates, las papayas, las naranjas, las verduras de hoja oscura y otros ricos en clorofila. La actividad biológica de estos carotenoides con actividad de provitamina A es el resultado de su conversión a vitamina A por el organismo (18).

Se ha demostrado que los carotenos como el β -caroteno previenen la peroxidación del linoleato de metilo inducida por el singlete de oxígeno excitado o por iniciadores radicales, así mismo, la peroxidación inducida por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas liposomales y la oxidación de los lípidos microsomales. Se han presentado evidencias que los efectos antioxidantes del β -caroteno están relacionadas a las bajas tensiones de oxígeno. Sin embargo, a pesar de que se sabe acerca de la función antioxidante de los carotenos, poco se conoce acerca del mecanismo de actividad antioxidante. Se ha sugerido que la reacción en cadena del radical peroxilo es atrapada por

el sistema de conjugación polieno del β -caroteno, formando una especies radicales estabilizados por resonancia, pero no hay evidencia de este mecanismo (2, 19-21).

Se han llevado a cabo estudios epidemiológicos que intentan relacionar los niveles de β -caroteno en la dieta, o en sangre, con la aparición de cáncer, la mayor parte de ellos han puesto de manifiesto cierto efecto protector sobre los cánceres de pulmón, estómago, vejiga urinaria, esófago, laringe, colon, próstata e intestino (19).

d) Vitamina E (Tocoferol): el término vitamina E se aplica a una familia de ocho sustancias relacionadas, los tocoferoles y los tocotrienoles, que son sistemas en anillo (anillo cromanol) hidroxilados y unidos a una cadena lateral fitil. Las cuatro formas principales de vitamina E son designadas como alfa, beta, delta y gamma, según el número y posición de los grupos metilos en el anillo cromanol (figura No.5). Los tocotrienoles tienen tres enlaces dobles en la cadena lateral fitil, pero, por lo demás son similares a los tocoferoles (2,18).



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
α -tocoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tocoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tocoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tocoferol	H	H	CH ₃

Figura No. 5 Estructura química de los cuatro tocoferoles

Los tocotrienoles pueden tener una actividad biológica comparable a la de los tocoferoles pero se considera que su importancia nutricional es menor. La fuente más importante de los tocoferoles son los diversos aceites vegetales. (2,18).

La esterificación del grupo fenol del anillo cromanol con acetato, succinato o nicotinato protege de la oxidación a la molécula de tocoferol. Sin embargo, como este grupo fenol es el lugar activo para la función antioxidante de la vitamina E, los ésteres tocoferil han de ser hidrolizados para que la vitamina pueda desarrollar actividad biológica (2).

La función fisiológica de la vitamina E consiste en su papel como limpiador de los radicales libres, evitando así que dichos radicales libres y oxidantes lesionen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, a las proteínas ricas en grupos tiol de las membranas y del citoesqueleto y a los ácidos nucleicos. La vitamina E es uno de los factores primordiales de este sistema de defensa ya que es soluble en los lípidos y, por tanto, puede proteger directamente a las membranas celulares. Se ha demostrado que el α -tocoferol dona un átomo de hidrógeno a la cadena de propagación de peroxidación lipídica, dando origen al radical α -tocoferosil relativamente estable. Recientemente se ha propuesto que el α -tocoferol previene la propagación de la peroxidación lipídica en la membrana por un mecanismo que implica la reducción del radical α -tocoferosil por reductores enzimáticos y no enzimáticos como la vitamina C, el glutatión y posiblemente la ubiquinona (2,20).

La vitamina E tiene el carácter antioxidante que les confiere sus mismas propiedades en lo que respecta a la inhibición o detención de fenómenos carcinogénicos. Existen estudios que correlacionan los bajos o nulos niveles plasmáticos de vitamina E con el aumento de cáncer de colon y mama y también se sugiere que la vitamina E puede tener efectos complementarios con el selenio (19). Los estudios epidemiológicos como el de Gey, K. Y colaboradores en el año 1,991 ha demostrado que los niveles plasmáticos de tocoferol son inversamente proporcionales a la incidencia de cardiopatía isquémica en diversas poblaciones humanas (22).

Una función fisiológica muy importante de la vitamina E en el hombre es la protección del sistema nervioso, el músculo esquelético y la retina ocular frente a la oxidación. La producción de neurotransmisores en el sistema nervioso va acompañada de la generación de grandes cantidades de radicales libres, por lo que parece que esta vitamina es esencial para evitar los daños causados por los radicales libres en las mitocondrias y en las membranas axonales del sistema nervioso (2).

3. Tercera línea de defensa

Se encarga de reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Se incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (7,8).

C. Fuentes de antioxidantes exógenos.

Los tejidos lesionados se ven sometidos a un mayor número de reacciones por radicales libres que los tejidos sanos. Como consecuencia, en la mayoría de las enfermedades humanas el estrés oxidativo es un fenómeno secundario y no la causa primaria de la enfermedad. La importancia del estrés oxidativo varía según los estados patológicos. Una de las principales causas de muerte, la enfermedad cardiovascular y el cáncer, pueden prevenirse o retrasarse con ayuda de cambios de la dieta, como la reducción de la ingesta de grasas y el aumento del consumo de frutas, cereales y verduras como fuentes de antioxidantes exógenos (2).

Los vegetales y las frutas contienen numerosas sustancias fitoquímicas que incluyen compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, carotenoides y ácido ascórbico. Muchas de estas sustancias fitoquímicas poseen significativa actividad antioxidante que está asociada con la baja incidencia y baja mortalidad por cáncer (23).

1. Mamey (*Mammea americana*)

El mamey es un frutal perteneciente a la familia de la Gutíferas. Es un frutal que alcanza hasta 25m de altura y tiene una copa densa y regular. Como en otras Clusiáceas el tronco, ramas y hojas exudan un látex amarillo y espeso. Las hojas son elípticas a obovadas, gruesas y planas, de color verde brillante. El fruto es ovoide o elipsoidal, de ocho a 25 cm de largo, bien apiculado. La superficie es irregular y corchosa, de color castaño cubierta de lenticelas. El epicarpo duro forma con la parte externa del mesocarpo una cáscara de tres a cuatro milímetros de espesor rica en fibras y canales de resina. El mesocarpo, una masa amarilla o rojiza, dura, azucarada, se come crudo o se prepara en jaleas y conservas. El olor y el sabor posee parecido al albaricoque. Posee de una a cuatro semillas en posición radial (24).

Es nativa y cultivada de México a Brazil, así como de Cuba a Trinidad. Cultivada en el sur de Florida y Bahamas. La fruta es consumida fresca o cocida o en conserva. El jugo es utilizado en Guatemala en la elaboración de bebidas carbonatadas, así mismo en este país se utiliza para preparar una tintura alcohólica que sirve para eliminar pestes. En Trinidad se ingiere cocida para aliviar la hipertensión. En Ecuador se utiliza como tratamiento para la malaria que no responde a quinina. El principio activo del mamey son los derivados de la cumarina. Además, contiene taninos (25).

2. Quilete (*Solanum americanum*)

Es una hierba erecta o desparramada de 1 a 1.5 m de alto, a veces hasta 3.5 m de alto. Las hojas se encuentran en pares o solitarias, diferentes en tamaño pero similares en la forma; son enteras o sinuado-dentadas, ovadas u ovado-lanceoladas, las hojas más grandes miden de 3 a 18 cm de largo y 1.5 a 10.5 cm de ancho; el ápice es acuminado y la base atenuada, son vellosas o pilosas en el haz y envez. Las inflorescencias son laterales o internodales (26).

Es nativa de América, crece en matorrales y sembradíos. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa. Las hojas se consumen en caldo o fritas con huevo; es una hierba que se come en grandes cantidades en el país y es frecuente encontrarla en los mercados y supermercados, se acostumbra a comer para la convalecencia y recuperación de diversas enfermedades. Tiene amplio uso medicinal, por vía oral se administra en el tratamiento de afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, estreñimiento, gastritis, úlcera gástrica) y respiratoria (asma, amigdalitis, tos ferina), anemia, cirrosis, dolor de muelas, escorbuto, hinchazón, meningitis, nerviosismo, paludismo, presión alta, retención urinaria, reumatismo. La decocción de hojas se usa vía tópica para el tratamiento de afecciones dermatomucosas. Contiene alcaloides (solasodina, solasonina, glucoalcaloides y alcaninas), esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenólidos, ácido málico, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y sales minerales (27,28).

D. Extracción de antioxidantes

Se han llevado a cabo intensivas investigaciones para caracterizar las propiedades antioxidantes de extractos de distintos materiales herbáceos o para aislar e identificar los compuestos responsables de estas actividades (3). Existe para ello distintos métodos de extracción, entre los que se encuentran la extracción por solventes y la extracción por fluidos supercríticos (EFS).

La extracción por solvente es una técnica que consiste en la utilización de disolventes orgánicos polares o apolares o bien mezclas de ellos. Requiere un capital moderado para adquirir los equipos, el rendimiento es casi el doble de la extracción por arrastre o por EFS y se obtienen prácticamente todos los compuestos presentes en la matriz herbácea (29). La extracción por solvente ha sido el método más común para la preparación de muestras vegetales y frutas. Los solventes más comunes son mezclas acuosas con etanol, metanol y acetona (5).

Para la extracción por solvente se puede recurrir a la maceración, a la maceración cinética, percolación y digestión. La maceración consiste en la extracción del material con agitación frecuente durante varios días a temperatura ambiente. La intensidad del movimiento es baja. La maceración cinética se lleva a cabo a temperatura ambiente, al igual que la maceración, con la diferencia que el material se encuentra en constante movimiento. La percolación es el procedimiento más utilizado para extraer ingredientes activos, en esta técnica los ingredientes son humedecidos, se dejan en reposo y luego se colocan en el percolador, donde se agrega suficiente solvente y se deja en maceración durante 24 horas. La digestión es una maceración a alta temperatura, normalmente de 40-50°C (29).

Se han realizado algunos estudios que comparan la actividad antioxidante de algunos extractos. Soares y colaboradores en año 1,997 determinaron la actividad antioxidante de algunos extractos de *Thymus zygis*, comparando la actividad antioxidante de los extractos de metanol y éter etílico obtenidos de esta planta. Resultó muy notorio el resultado encontrado en estas investigaciones, los cuales indican que los extractos con metanol reducen los radicales DPPH más eficientemente que los extractos con éter etílico, sin embargo el éter etílico mostró mayor actividad en la peroxidación lipídica en las membranas del retículo sarcoplásmico. Los extractos metanólicos fueron más potentes para determinar los radicales peroxil y superóxido que los extractos con éter etílico. Aparentemente, existe relación entre el potencial antioxidante y el total de grupos fenólicos contenido en cada extracto (3).

Así mismo, los resultados obtenidos por Kähkönen y colaboradores en el año 2,001 fueron significativos, en su estudio sobre la composición fenólica y actividad antioxidante de manzanas y berries utilizaron acetona al setenta por ciento, metanol al sesenta por ciento, hexano, agua a temperatura ambiente y reflujo como solventes de extracción para determinar estos parámetros. Demostraron que la extracción con acetona en berries y manzanas es ligeramente superior a la extracción con metanol en la detección de fenoles y actividad antioxidante, sin embargo, para la detección de fenoles el metanol era la mejor opción pero en el caso de las berries no fue así debido a que estas son pobres en subgrupos

fenólicos. El hexano resultó ser un mal solvente para extraer compuestos fenólicos debido a su carácter apolar. Así mismo, la utilización de agua como solvente condujo a una baja detección de compuestos fenólicos en berries y manzanas debido a una probable actividad de hidroxilación por la polifenol oxidasa durante el tratamiento de extracción (5).

También los estudios llevados a cabo por Hu y Kitts en el año 2,000 sobre la actividad antioxidante de los extractos de la raíz *Echinacea* son muy relevantes, la extracción con metanol exhibe una mayor actividad antioxidante que los extractos obtenidos con cloroformo de la raíz *Echinacea* debido a que la polaridad del metanol es mayor que la del cloroformo pudiendo extraer mayor cantidad de compuestos polares tales como los compuestos fenolicos (30).

E. Polaridad de los solventes

Un solvente puede ser polar o no polar, prótico o aprótico. Un solvente prótico generalmente contiene un grupo $-OH$; ejemplos de éste son el agua, los alcoholes ($R-OH$) y los ácidos carboxílicos ($RCOOH$), estos contiene un protón moderadamente ácido. Un solvente aprótico no presenta hidrógenos no ácidos y, por lo tanto, no presenta grupos $-OH$. Un solvente no polar, no tiene ninguna polaridad asociada a él en absoluto; los solventes no polares incluyen hidrocarburos y ciertos haloalcanos sustituidos simétricamente, tales como el tetraclorometano. Una escala conveniente para definir la polaridad de un disolvente se basa en la constante dieléctrica, ϵ , que es una medida de su capacidad para aislar cargas una de la otra. Mientras mayor sea la constante dieléctrica, mayor será la polaridad del disolvente (anexo No.1) (31).

Las propiedades de un solvente que contribuyen a su capacidad de estabilizar los iones por solvatación no se comprenden del todo, pero sin duda están relacionadas con la polaridad del solvente. Los solventes polares como agua, metanol, dimetilsulfóxido y otros son eficaces para solvatar los iones, pero la mayoría de los éteres e hidrocarburos son muy deficientes para ello (32).

Antes de empezar un proceso de extracción se debe definir la selectividad del solvente a ser utilizado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, normalmente se utiliza un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad como el hexano que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares (33).

Cuando la materia prima se pone en contacto con el solvente se inicia un proceso opuesto al de secado que tiende a reconstituir el estado original de la célula. Inicialmente el solvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio de esta forma al proceso de extracción. La penetración del solvente en la célula induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente (33).

IV. JUSTIFICACIÓN

Muchos de los sistemas enzimáticos celulares, el transporte mitocondrial de electrones y la exposición a diversos factores ambientales forman especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres en condiciones normales, lo que ha dado lugar a la evolución de un complejo sistema de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen por objeto detoxificar esos radicales libres (2).

El consumo de frutas y vegetales está asociado con el bajo riesgo de cáncer y mortalidad por cáncer. Abundantes evidencias existen de que las frutas y los vegetales disminuyen el riesgo de enfermedades del corazón. Un beneficio adicional de frutas y vegetales es su asociación negativa con la presión sanguínea. Una explicación a la protección contra estas enfermedades (incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular y enfermedad cerebrovascular) es la presencia de antioxidantes como la vitamina C y E, los b-carotenos y los fenoles en estos alimentos (4).

Para evaluar la actividad antioxidante de manera exacta, es necesario realizar una correcta extracción de los compuestos que la posean, lo que se dificulta por la variada naturaleza de las estructuras vegetales (matrices) y por la diferente naturaleza química y polaridad de estos compuestos. Los procedimientos utilizados hasta el momento para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales y frutas incluyen la extracción con metanol. Sin embargo, a partir de estos extractos se determinan tres parámetros distintos: capacidad antioxidante total, contenido de fenoles totales y de vitamina C, los cuales corresponden a compuestos con distinta polaridad. Hasta el momento no se conoce si la extracción con metanol es la más adecuada para medir con la mayor exactitud los tres parámetros mencionados. Por tal motivo se evaluó en el presente trabajo ocho distintos solventes (metanol, etanol, n-hexano, cloroformo, agua, buffer de fosfatos a pH 3, buffer de fosfatos a pH 7.4 y fase móvil) con diferentes polaridades para la estimación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*), especies que representan a la mayoría de matrices típicas de vegetales y frutas autóctonas de la región.

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar la extracción con distintos solventes a partir de distintas matrices para la determinación de la actividad antioxidante total a través del método de DPPH, el contenido de grupos fenoles por el reactivo de Folin Ciocalteu y para determinar vitamina C mediante HPLC.

B. Específicos

1. Comparar los resultados de la determinación de actividad antioxidante obtenidos de los ocho distintos extractos a través del método de DPPH.
2. Comparar los resultados obtenidos del contenido de grupos fenoles de los ocho distintos extractos a través del método de Folin Ciocalteu.
3. Comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de vitamina C de los ocho distintos extractos mediante HPLC.
4. Determinar el o los solventes con los que se cuantifique mayor actividad antioxidante con los tres parámetros.

VI. HIPÓTESIS

El tipo de solvente utilizado para la extracción de antioxidantes no influye sobre los valores obtenidos en la determinación de los distintos parámetros de actividad antioxidante (actividad antioxidante total, contenido de fenoles totales y vitamina C)

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Universo

Solventes para preparar extractos para determinar actividad antioxidante, plantas y frutas consumidas por la población.

B. Muestra

Ocho solventes para preparar extractos para determinar actividad antioxidante en quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*).

C. Materiales

1. Recursos humanos

- Sandra Patricia Lima Pimentel (tesista)
- Dr. Rubén D. Velásquez Miranda (asesor)
- Licda. Kenia María de los Angeles Caballeros Barragán (asesora)

2. Equipo

- Balanza
- Horno (100°C +/- 1)
- Termómetro
- Mortero
- Baño de María (60 °C +/- 1)
- Desecadora
- Refrigeradora (4 a 7 °C)
- Vortex
- Agitador magnético

- Magnetos
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Kitazato
- Manguera para vacío
- Embudo Buchner
- Centrífuga
- Cromatógrafo para HPLC (Cromatógrafo con detector UV marca Merck Hitachi L-7400 LaChrom, bomba Merck Hitachi L-6200A intelligent pump, cromatointegrador Merck Hitachi D-2500)

3. Reactivos

- Metanol
- Etanol al 95 por ciento
- Cloroformo
- n-hexano
- Agua desmineralizada
- Buffer de fosfatos 0.01M a pH 3
- Buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4
- Fase móvil (95 por ciento de buffer a pH 3 y 5 por ciento de absoluto)
- a,a-difenil-b-picril-hidrazilo
- Ácido acético glacial
- Acetato de sodio
- Ácido gálico
- Carbonato de calcio
- Nitrógeno gaseoso
- Reactivo de Folin-Ciocalteu

D. Métodos

1. Obtención de la muestra vegetal

- Se colectaron muestras de quilete (*Solanum americanum*) de un supermercado y de mamey (*Mammea americana*) del mercado central.
- Las muestras frescas se introdujeron en bolsas plásticas y se transportaron al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia.
- El quilete (*Solanum americanum*) se sacudió para eliminar residuos y se seleccionó la parte comestible (hojas) para preparar los extractos.
- Al mamey (*Mammea americana*) se le retiró la corteza y se seleccionó la parte comestible para preparar los extractos.
- La misma muestra se utilizó para preparar las ocho extracciones.

2. Preparación del extracto vegetal de quilete (*Solanum americanum*)

- El extracto se preparó a partir de muestras vegetales frescas
- Para la preparación del extracto a partir de éstas se pesaron 10 g y se agregó 50 ml del solvente (metanol, etanol, agua, buffer de fosfatos 0.01M a pH 3, buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4, n-hexano, cloroformo o fase móvil).
 - Se saturó la atmósfera con nitrógeno gaseoso por 30 segundos
 - Se agitó por dos horas utilizando un agitador magnético, protegiendo la muestra de la luz.
 - Se filtró el extracto utilizando un embudo y papel filtro.
 - Los extractos con buffer de fosfatos 0.01M a pH 3, agua y buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4 fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos y luego filtrados al vacío.
 - Se repitieron las extracciones con fracciones de 25 ml hasta que el extracto se obtuvo incoloro.
 - Se midió el volumen total de cada extracto.

- Se repitió el mismo procedimiento para cada solvente y se realizó esto para cada solvente por triplicado.
3. Preparación del extracto de mamey (*Mammea americana*) (6)
- El extracto se preparó a partir de muestras frescas
 - Para la preparación del extracto a partir de la muestra fresca se pesó 10 g de mamey y se homogenizó en mortero con 50 ml de solvente (metanol, etanol, agua, buffer de fosfatos 0.01M a pH 3, buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4, n-hexano, cloroformo o fase móvil). Se introdujo en un erlen meyer de borde esmerilado el homogenizado.
 - Se saturó la atmósfera con nitrógeno gaseoso por 30 segundos.
 - Se agitó por dos horas utilizando un agitador magnético protegiendo la muestra de la luz
 - Se filtró utilizando un embudo y papel filtro
 - Los extractos con buffer de fosfatos 0.01M a pH 3, agua y buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4 fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos y luego se filtraron al vacío.
 - Se repitieron las extracciones con fracciones de 25 ml hasta que el extracto se obtuvo incoloro.
 - Se midió el volumen total de cada extracto.
 - Se repitió el mismo procedimiento para cada solvente y se realizaron las extracciones para cada solvente por triplicado.
4. Procesamiento del extracto vegetal de quilete (*Solanum americanum*) y del extracto de la fruta mamey (*Mammea americana*) (6)

Los extractos volátiles que causaron menos del cincuenta por ciento de disminución de color en el ensayo con DPPH se concentraron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación; igual procedimiento se realizó para

los casos en que el solvente de extracción era inmiscible con el solvente en que se realizó el análisis de la actividad antioxidante:

- Se preparó para cada extracto, alícuotas de distintos volúmenes por duplicado
- Se evaporaron con corriente de nitrógeno gaseoso y en baño de maría hasta sequedad.
- Se reconstituyó cada alícuota con el volumen apropiado de metanol.
- Se determinó por duplicado, la actividad antioxidante de las alícuotas evaporadas y reconstituídas mediante el método de DPPH , la cuantificación de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu y la determinación de vitamina C mediante HPLC.

Los extractos menos volátiles se concentraron mediante liofilización luego se siguió el siguiente procedimiento:

- Se reconstituyó cada alícuota con el volumen apropiado de metanol.
- Se determinó por duplicado, la actividad antioxidante de las alícuotas evaporadas y reconstituídas mediante el método de DPPH , la cuantificación de fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu y la determinación de vitamina C mediante HPLC.

5. Determinación de la actividad antioxidante utilizando a,a-difenil-b-picrilhidrazilo DPPH (6)

- Se preparó una serie de cuatro tubos de reacción por ensayo.
- Al primer tubo que es el blanco del control se le agregó 1 ml de una solución tampón de acetato y 2 ml de metanol
- Al segundo tubo, control, se le agregó 1 ml de tampón de acetato, 1.5 ml de metanol y 0.5 ml de solución metanólica de DPPH (0.0219 % p/v).
- Al tercer tubo, blanco del ensayo, se le agregó 1 ml de tampón de acetato, 1.9 ml de metanol y 0.1 ml del extracto de la muestra.
- Al cuarto tubo, ensayo, se le agregó 1 ml de tampón de acetato, 1.4 ml de metanol, 0.1 ml del extracto de la muestra y 0.5 ml de solución de DPPH

- Se agitó en vortex por 30 segundos e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, protegiéndolo de la luz.
- Se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 517 nm contra el blanco respectivo.
- Se calculó el porcentaje de disminución de la Abs (517) causado por el extracto.

$$\{[\text{Abs b control} - \text{Abs e}]/(\text{Abs control})\} * 100 = \% \text{ dis Abs (517)}.$$
- Se graficó la concentración del extracto (eje x) vrs % dis Abs (517) (eje y). Se interpoló el valor de IC₅₀.
- La actividad antioxidante se expresó en términos de la concentración de inhibición al 50 por ciento (IC₅₀), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50 por ciento de disminución de la absorbancia de DPPH.

6. Determinación de los compuestos fenólicos (6)

- Se preparó una curva patrón con 4 ml de ácido gálico disuelto en agua en concentraciones entre 0.625-6.25 mg/ml.
- Se agregó un blanco con 8.0 ml de agua, 0.8 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.6 ml de Na₂CO₃ al 10%.
- Se prepararon dos tubos de muestra a analizar.
- Al primer tubo se le agregó 3.95 ml de agua, 0.4 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.8 ml de Na₂CO₃ al 10% y 50 ml de muestra.
- Al segundo tubo se le agregó 3.90 ml de agua, 0.4 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.8 ml de Na₂CO₃ al 10% y 100 ml de muestra.
- Se mezclaron bien y se colocaron de 90-100 °C durante 1 minuto. Se realizó la lectura de la absorbancia a 765 nm.
- Utilizando una curva patrón se calculó la concentración de compuestos fenólicos totales, expresados como equivalentes de ácido gálico/g de peso seco.

7. Determinación de vitamina C

20 ml del extracto filtrado a través de una membrana de poro 0.2 mm se inyectó en un cromatógrafo con las condiciones siguientes:

- Columna de acero inoxidable (250mm por 4 mm), diámetro interno empacada con octadecil sílica gel (C18, 100 m de partícula y 5 m de porosidad).
- Elución isocrática con buffer de NaH_2PO_4 0.01M a pH 3 / metanol (95:5 v/v) y flujo de 1 ml por minuto.
- Detección UV/vis a 370 nm (volumen de la célula de 12 ml).
- La señal se analizó con un integrador programado para calcular el área debajo de la superficie de los picos.
- Como patrón se inyectó 1mg de ácido ascórbico/1 ml de agua
- Soluciones de ácido ascórbico que varían entre 5 a 500 mg/ml de fase móvil se utilizaron como curva patrón.

8. Determinación del peso seco de la muestra vegetal de quilete (*Solanum americanum*) y de la fruta mamey (*Mammea americana*) (6)

- Se realizó en triplicado el siguiente procedimiento para la muestra fresca
- Se introdujo un vidrio de reloj en un horno a 100 °C por una hora, se retiró y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente en una desecadora (aproximadamente 15 minutos). Se determinó el peso.
- Se repitió el procedimiento hasta obtener un peso constante (tara).
- Se agregó exactamente 1 gramo de muestra y se llevó a 100 °C por una hora. Se retiró del horno y se introdujo en una desecadora hasta que alcanzó la temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos). Se determinó el peso.
- Se repitió el procedimiento hasta que se alcanzó un peso constante.
- Se restó la tara y se determinó el peso seco de la materia vegetal expresado como mg materia seca/g de materia vegetal.

E. Diseño estadístico

Tipo de estudio: Experimental de una fase.

Diseño estadístico factorial de dos factores: parámetro de determinación de actividad antioxidante y tipo de solvente para extracción

Factores:

- Parámetro de determinación de actividad antioxidante
 - Determinación de actividad antioxidante mediante DPPH a₁
 - Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu a₂
 - Cuantificación de vitamina C mediante HPLC a₃
- Tipo de solvente para extracción
 - Metanol b₁
 - Etanol b₂
 - Agua b₃
 - Buffer de fosfatos 0.01M a pH 3 b₄
 - Buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.4 b₅
 - n-hexano b₆
 - Cloroformo b₇

Se realizaron veintiún tratamientos (tres niveles del primer factor por siete niveles del segundo factor) que se establecen por la combinación de los dos factores mencionados anteriormente (anexo No.2).

Cada uno de los extractos obtenidos se utilizó en duplicado para los siguientes análisis: DPPH con el cual se determina un valor de IC₅₀ expresado como mg materia seca, mg extracto seco; fenoles totales expresado como equivalentes de ácido gálico/g de peso seco y vitamina C expresado como mg/g de peso seco.

Análisis estadístico: A los resultados obtenidos de los análisis mencionados se les realizó un análisis de varianza de una vía. Con un nivel de confianza del 95 por ciento ($\alpha = 0.05$). Luego se emplearon cajas de Tukey para una comparación múltiple.

VIII. RESULTADOS

La tabla 1 muestra los promedios, desviaciones estándar, mínimos y máximos de los distintos parámetros de actividad antioxidante (actividad antioxidante total, contenido de fenoles totales y vitamina C). Los resultados fueron analizados mediante una prueba de varianza de una vía a un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$). Esta prueba estadística reveló que existen diferencias (valor $P < 0.05$) al utilizar distintos solventes para la extracción. Estas diferencias se establecieron para cada uno de los distintos parámetros determinados.

Las gráficas 1 y 2 comparan la actividad antioxidante total obtenida con los ocho distintos solventes usados en dos matrices vegetales distintas (quilete y mamey). Se observa que los extractos con el etanol, la fase móvil y el metanol son los que presentan los valores más altos de actividad antioxidante total (menor IC_{50}) así como los buffers y el agua; además, es evidente que el n-hexano extrae muy escasa cantidad de este tipo de compuestos.

Posterior al análisis de varianza, se realizó una comparación múltiple a través del empleo del test de Tukey ($\alpha = 0.05$) para cada parámetro de medición, tomando en cuenta los ocho distintos solventes (metanol, etanol, cloroformo, n-hexano, agua, buffer a pH 3, buffer a pH 7.4 y fase móvil) y las dos matrices (mamey y quilete).

La tabla 2 y 3 muestran la actividad antioxidante total expresada como IC_{50} para el mamey y quilete, respectivamente; en ellas es evidente que los solventes se comportan en distintos subgrupos y que el primero de ellos está integrado por los que muestran mayor actividad antioxidante (valores menores de IC_{50}). Se observa que este primer subgrupo está integrado por etanol, fase móvil, metanol, buffer a pH 7.4, buffer a pH 3 y agua. Cloroformo se muestra en este primer subgrupo únicamente en la tabla 3. Además, etanol, fase móvil, metanol y buffer a pH 7.4 son los cuatro solventes que encabezan el primer subgrupo en ambas tablas

Tabla 1. Valores de actividad antioxidante total, fenoles totales y vitamina C del mamey y quilete utilizando distintos solvente para su extracción. Los resultados se expresan como media, desviación estándar, mínimo y máximo.

PARÁMETRO DE MEDICIÓN	VEGETAL	SOLVENTE								Valor P ^{1,2}			
		Metanol	Etanol	Cloroformo	n-Hexano	Agua	Buffer pH3	Buffer pH 7.4	Agua				
Actividad antioxidante total (IC ₅₀) ³	Mamey	Media ⁴	3.54	2.74	74.81	141.03	28.43	15.48	13.98	3.22	<0.05		
		DS ⁵	0.73	0.22	20.45	17.21	5.26	2.94	2.55	0.56			
		Mínimo	2.97	2.57	52.26	126.37	23.56	12.12	11.72	2.74			
		Máximo	4.37	2.99	92.14	159.97	34.01	17.57	16.74	3.84			
	Quilete	Media ⁴	0.14	0.34	2.16	116.98	0.58	0.98	0.36	0.24		<0.05	
		DS ⁵	0.01	0.02	0.25	51.59	0.05	0.14	0.05	0.070			
		Mínimo	0.13	0.33	1.87	71.48	0.54	0.87	0.31	0.19			
		Máximo	0.15	0.37	2.30	173.03	0.63	1.14	0.41	0.33			
	Fenoles totales (Eq.Ac.Gál./g peso seco) ⁶	Mamey	Media ⁴	47.46	59.02	0.00	0.00	19.25	16.56	21.51		48.72	<0.05
			DS ⁵	10.35	4.44	0.00	0.00	3.26	0.93	2.97		3.00	
			Mínimo	40.62	54.18	0.00	0.00	15.96	15.81	18.27		45.60	
			Máximo	59.36	62.92	0.00	0.00	22.47	17.60	24.11		51.59	
Quilete		Media ⁴	538.54	231.81	50.51	0.00	213.34	182.67	357.06	189.63	<0.05		
		DS ⁵	38.29	10.03	2.94	0.00	13.34	16.41	25.41	30.72			
		Mínimo	497.92	222.06	47.40	0.00	200.54	171.52	327.72	156.74			
		Máximo	573.98	242.10	53.24	0.00	227.17	201.51	371.77	217.58			
Vitamina C (mg/g peso seco)		Mamey	Media ⁴	3.71	3.96	0.00	0.00	2.52	0.00	0.00	3.27	<0.05	
			DS ⁵	0.17	0.21	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.40		
			Mínimo	3.57	3.83	0.00	0.00	2.36	0.00	0.00	2.88		
			Máximo	3.90	4.20	0.00	0.00	2.83	0.00	0.00	3.69		
	Quilete	Media ⁴	15.69	12.09	0.00	0.00	2.27	4.48	12.07	5.70	<0.05		
		DS ⁵	1.08	0.17	0.00	0.00	3.93	3.97	0.33	0.02			
		Mínimo	14.54	11.90	0.00	0.00	0.00	0.00	11.75	5.69			
		Máximo	16.70	12.19	0.00	0.00	6.80	7.55	12.40	5.72			

¹ Valor P= valor de la probabilidad.

² Análisis de varianza univariado; $\alpha=0.05$, nivel de confianza del 95%

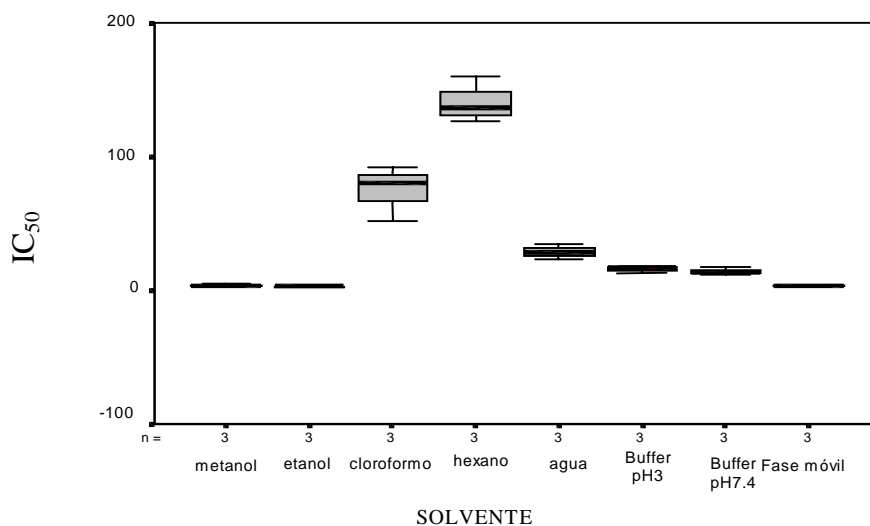
³ Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.

⁴ Media de ensayos realizados en triplicado.

⁵ Desviación estándar de ensayos realizados en triplicado.

⁶ Concentración basada en ácido gálico como estándar.

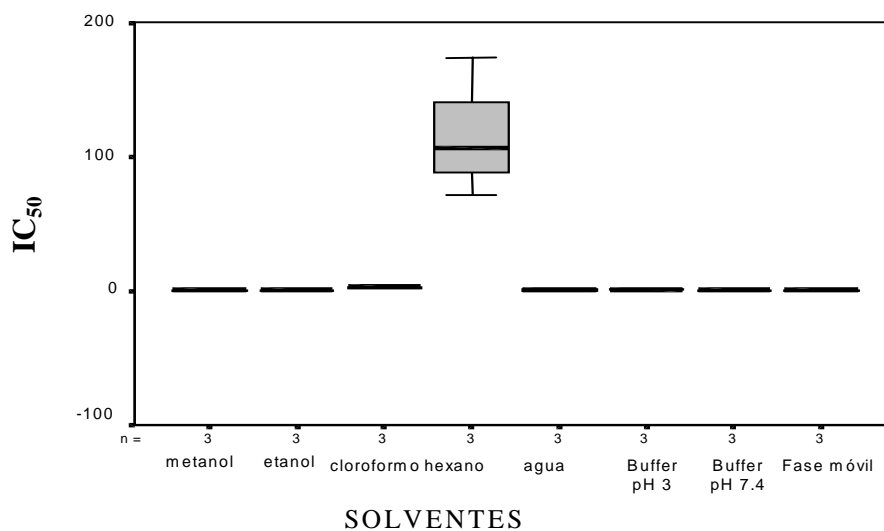
Grafica 1. Actividad antioxidante en extractos de mamey con ocho distintos solventes^{1,2}.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.)

Grafica 2. Actividad antioxidante en extractos de quilete con ocho distintos solventes^{1,2}.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.)

Tabla 2. Actividad antioxidante total del mamey con los ocho distintos solventes^{1,2}.

Solvente	n	Subgrupos		
		1	2	3
Etanol	3	2.74 ²		
Fase Móvil	3	3.22		
Metanol	3	3.54		
Buffer pH 7.4	3	13.98		
Buffer pH 3	3	15.47		
Agua	3	28.42		
Cloroformo	3		74.81	
n-hexano	3			141.03
Significancia		0.01	1.00	1.00

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg).

Tabla 3. La actividad antioxidante total del quilete con ocho distintos solventes^{1,2}.

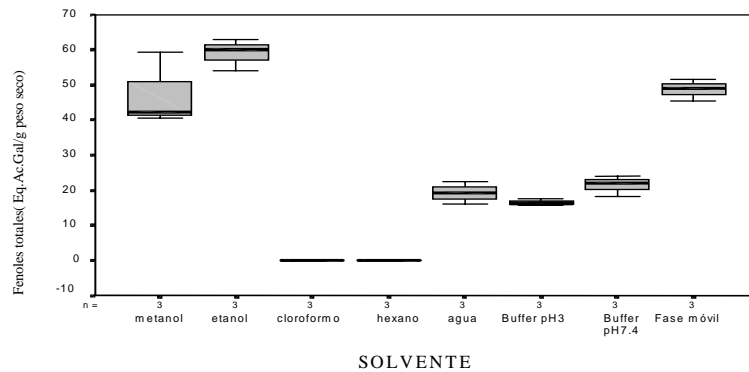
Solvente	n	Subgrupos	
		1	2
Metanol	3	0.14 ²	
Fase móvil	3	0.24	
Etanol	3	0.34	
Buffer pH 7.4	3	0.36	
Agua	3	0.58	
Buffer pH 3	3	0.98	
Cloroformo	3	2.16	
n-hexano	3		116.97
Significancia		1.00	1.00

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg).

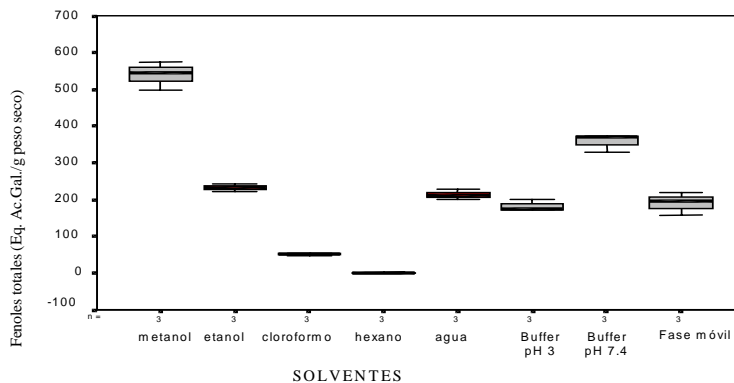
En las gráficas 3 y 4 se observan los valores del contenido de los compuestos fenólicos totales de mamey y quilete, respectivamente, con los distintos solventes. Puede observarse que metanol, etanol y fase móvil son los solventes que extraen mayor cantidad de estos compuestos en el mamey y que el metanol es el solvente con el que se extrae mayor cantidad de estos analitos en quilete. Es evidente que el intervalo de confianza de la extracción metanólica de mamey es muy amplio.

Gráfica 3. Extracción de compuestos fenólicos totales en mamey con ocho distintos solventes¹.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

Gráfica 4. Extracción de compuestos fenólicos totales en quilete con ocho distintos solventes¹.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

Las tablas 4 y 5 muestran el contenido de los compuestos fenólicos totales de mamey y quilete, respectivamente. Los distintos solventes se comportan de nuevo en distintos subgrupos para este parámetro. El último subgrupo en ambas tablas contiene los solventes en los cuales se encontró el mayor contenido de compuestos fenólicos. Metanol está presente en dicho subgrupo en ambas tablas. En la tabla No. 4 este subgrupo está integrado por tres solventes (metanol, fase móvil y etanol) de los cuales etanol es el que presenta mayor rendimiento de estos compuestos.

Tabla 4. Contenido de los compuestos fenólicos del mamey obtenido mediante ocho distintos solventes^{1,2}.

Solvente	n	Subgrupos		
		1	2	3
Cloroformo	3	0.00 ²		
n-Hexano	3	0.00		
Buffer pH 3	3		16.56	
Agua	3		19.25	
Buffer pH 7.4	3		21.51	
Metanol	3			47.46
Fase Movil	3			48.72
Etanol	3			59.12
Significancia		1.00	0.86	0.08

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Fenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico / gramo de peso seco.

Tabla 5. Contenido de los compuestos fenólicos del quilete obtenido mediante ocho distintos solventes^{1,2}.

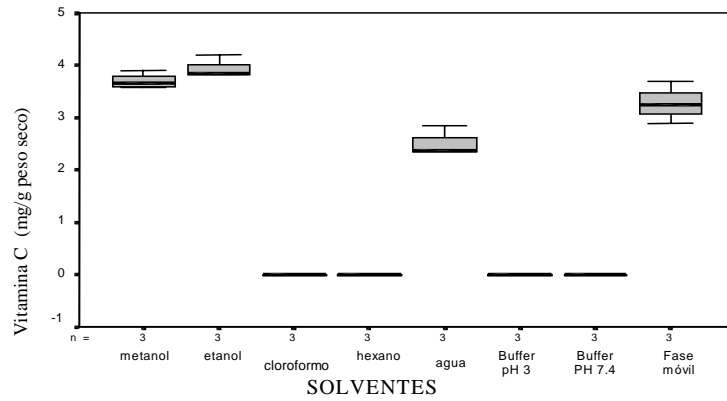
Solvente	n	Subgrupos			
		1	2	3	4
n-hexano	3	0.00 ²			
Cloroformo	3	50.51			
Buffer pH 3	3		182.67		
Fase móvil	3		189.63		
Agua	3		213.34		
Etanol	3		231.81		
Buffer pH 7.4	3			357.06	
Metanol	3				538.54
Significancia		0.13	0.15	1.00	1.00

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Fenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico / gramo de peso seco.

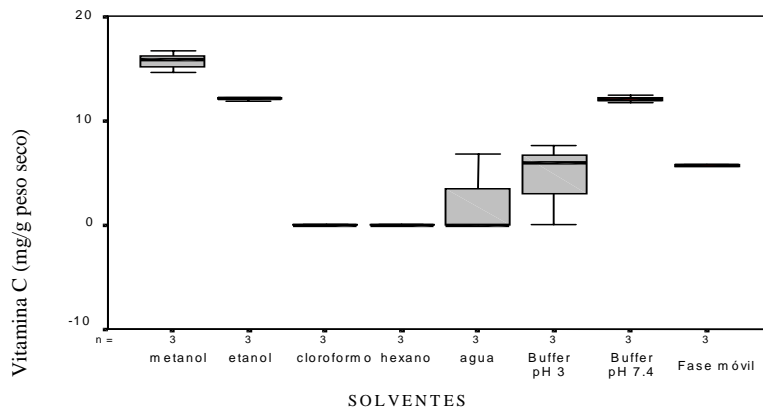
Las gráficas 5 y 6 muestran los contenidos de vitamina C en mamey y quilete, respectivamente, con los distintos solventes de extracción. Metanol y etanol son los solventes con los que se extrae mayor cantidad de este analito. Ambos solventes muestran estrechos intervalos de confianza en ambas gráficas.

Gráfica 5. Extracción de vitamina C del mamey con ocho distintos solventes¹.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

Gráfica 6. Extracción de vitamina C del quilete con ocho distintos solventes.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

Las tablas 6 y 7 corresponden a la vitamina C del mamey y quilete, respectivamente, con los ocho distintos solventes en estudio. La mayor cantidad de vitamina C fue detectada con el empleo de etanol y metanol como solventes de extracción los cuales integran el último subgrupo en ambas tablas. Así también puede notarse que el empleo de buffer a pH 7.4 produjo buenos resultados en la extracción de este analito en quilete y que integra parte del último subgrupo en este vegetal.

Tabla 6. La extracción de Vitamina C de mamey con ocho distintos solventes^{1,2}.

Solvente	n	Subgrupos			
		1	2	3	4
Cloroformo	3	0.00 ²			
n-hexano	3	0.00			
Buffer pH 3	3	0.00			
Buffer pH 7.4	3	0.00			
Agua	3		2.52		
Fase móvil	3			3.27	
Metanol	3			3.71	3.71
Etanol	3				3.96
Significancia		1.00	1.00	0.19	0.77

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Vitamina C expresada en miligramos / gramo de peso seco.

Tabla 7. La extracción de Vitamina C del quilete con ocho distintos solventes^{1,2}.

Solvente	n	Subgrupos		
		1	2	3
Cloroformo	3	0.00 ²		
n-hexano	3	0.00		
Agua	3	2.27	2.27	
Buffer pH 3	3	4.48	4.48	
Fase móvil	3		5.69	
Buffer pH 7.4	3			12.07
Etanol	3			12.09
Metanol	3			15.69
Significancia		0.18	0.46	0.40

¹ Comparación por test de Tukey, $\alpha = 0.05$.

² Vitamina C expresada como miligramos / gramo de peso seco.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los solventes incluidos en el estudio se escogieron en base a su grado de polaridad. Tanto el metanol y el etanol son solventes frecuentemente utilizados en la extracción de compuestos fitoquímicos por su relativo alto grado de polaridad. El agua a temperatura ambiente por ser solvente universal. Los buffers por representar solventes polares en los que se protege el pH, siendo estos de gran interés especialmente en la determinación de vitamina C. El cloroformo y el n-hexano son los solventes con mayor facilidad de extraer compuestos apolares. Y la fase móvil para la determinación de vitamina C por medio de HPLC. Las extracciones y las determinaciones fueron realizadas en materia fresca, estado en el cual el vegetal contiene mayor cantidad de compuestos antioxidantes (6).

Se pudo observar que los solventes se comportaron de distinta forma de acuerdo a los parámetros estudiados tanto en mamey como en quilete en estado fresco. Se presentan en distintos subgrupos en cada parámetro. Se observó que los extractos etanólicos y metanólicos presentaron los mejores rendimientos con los distintos parámetros de medición en ambos vegetales, y que los extractos con mayor actividad antioxidante son ricos en compuestos polifenólicos lo cual se relaciona con estudios previos (3,5,6).

El etanol como solvente presentó altos rendimientos y estrechos intervalos de confianza en ambos vegetales. En mamey es evidente que fue el solvente con el que se obtuvo mejores resultados en todos los parámetros (actividad antioxidante total, contenido de compuestos fenólicos totales y vitamina C) mostrándose superior a metanol. Su habilidad de extracción radica en que es capaz de extraer compuestos fenólicos glicosilados (11) los cuales se encuentran en abundancia en frutas, ello explica el alto rendimiento en los parámetros de fenoles totales y actividad antioxidante total. A pesar de que la vitamina C es menos soluble en etanol que en agua, se obtuvo mejor rendimiento en la extracción etanólica que en la extracción acuosa.

A pesar de que los extractos metanólicos de mamey también presentaron buenos rendimientos muy cercanos a los extractos etanólicos, el intervalo de confianza en la determinación de fenoles totales es muy amplio, siendo esta una desventaja en la extracción con metanol. Con respecto a los demás parámetros, muestra resultados comparables a los de etanol y estrechos intervalos de confianza.

El metanol fue el mejor solvente de extracción del contenido total de compuestos antioxidantes, compuestos fenólicos y vitamina C, en quilete, debido a su naturaleza polar (constante dieléctrica 33.6) que facilita la extracción de compuestos polares seguido por etanol (constante dieléctrica 24.3), que presenta resultados cercanos, excepto en el contenido de compuestos fenólicos en donde el agua lo supera. Además de presentar altos rendimientos y estrechos intervalos de confianza de estos parámetros, metanol extrae rápida y fácilmente los compuestos antioxidantes de la matriz herbácea y requiere escasa cantidad del mismo para completar la extracción al igual que etanol.

Los extractos obtenidos con fase móvil muestran resultados cercanos a los de etanol y metanol en la determinación de actividad antioxidante total. La presencia de metanol en un cinco por ciento facilitó la extracción de ciertos compuestos fenólicos y la estabilización de los extractos. Sin embargo, a pesar de que es buena opción para la determinación de compuestos fenólicos en mamey, no lo es para quilete. En la determinación de vitamina C no fue la mejor opción ya que se presenta en un segundo subgrupo de elección para ambos vegetales.

A pesar de que el agua es un solvente universal y presenta alto grado de polaridad (constante dieléctrica 78.3), no muestra altos rendimientos como era de esperarse. Por su naturaleza tiene capacidad de ionizarse y de participar en reacciones ácido-base. No mantiene estable el pH y en ella se encuentra oxígeno disuelto que puede ocasionar que las moléculas extraídas sean oxidadas (5) impidiendo de esta forma medir con exactitud los parámetros incluidos.

Los extractos acuosos de mamey en un corto intervalo de tiempo adquirieron olor a fermento y los mismos en quilete se tornaron fétidos, lo cual indica que este tipo de extracto no puede conservarse durante largos períodos en refrigeración a menos que sean liofilizados. Además, se dificultó el procedimiento de extracción pues fue necesario centrifugar el extracto obtenido antes de filtrar al vacío. Así mismo, fue necesario concentrar mediante liofilización mayor cantidad de dichos extractos para realizar las determinaciones de los parámetros de medición, invirtiéndose dos días en este procedimiento. Por el contrario, con etanol, se concentró y evaporó rápidamente con corriente de nitrógeno utilizando baño de maría (42° C) y luego se realizaron las determinaciones el mismo día con mayor éxito.

El buffer a pH 7.4 presenta también resultados cercanos a los de metanol y etanol excluyendo el contenido de compuestos fenólicos. Sus buenos resultados se deben a que el buffer se encuentra a pH cercano al que se encuentra la planta en estado natural y por su habilidad de amortiguar el medio, mantiene los analitos en el mismo estado, sin embargo, no presenta muchas ventajas sobre los solventes antes descritos ya que al igual que los extractos acuosos requiere emplear centrifugación antes de filtrar el extracto y liofilización para concentrarlo, lo cual implica mayor tiempo para llevar a cabo la determinación de este parámetro. Además, no puede conservarse mucho tiempo el extracto sin ser analizado pues se fermenta rápidamente.

Los buffers a pH 3 y pH 7.4 muestran resultados cercanos al agua en la determinación de el contenido total de compuestos antioxidantes. En la determinación de vitamina C el buffer a pH 7.4 presenta mejores resultados que agua y buffer a pH 3 en quilete. El agua mostró mejores rendimientos que los buffers en la determinación de vitamina C en mamey. Así también mostraron similares dificultades en la determinación de los parámetros que el agua, los cuales ya fueron descritos anteriormente. A pesar de que la utilización de buffers era una opción ideal para determinar vitamina C, no fueron útiles debido a que no son estables en el transcurso del tiempo y por las condiciones con las que se cuenta en el laboratorio, no presentan ser una buena opción.

El cloroformo y el n-hexano no son apropiados para la extracción ya que los rendimientos obtenidos son muy bajos. Las metodologías utilizadas para la medición de los compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante total no permiten utilizar solventes apolares ya que estos no son solubles en el medio de reacción (en el caso de las mediciones colorimétricas como Folin-Ciocalteu y DPPH) y por lo tanto, requiere que sean evaporados y reconstituidos con solventes solubles en el medio de ensayo, quedando residuos insolubles en el mismo que no pueden ser cuantificados. Los resultados obtenidos mediante estas metodologías no refleja el verdadero contenido obtenido con estos solventes.

Como se puede apreciar, el empleo de metanol y etanol como solventes de extracción fue de utilidad para obtener altos rendimientos de todos los parámetros en ambos vegetales. Las extracciones etanólicas en mamey presentan altos rendimientos de los parámetros y los intervalos de confianza son más estrechos en comparación con las extracciones metanólicas. Sin embargo las extracciones metanólicas en quilete son las que presentan los más altos rendimientos y estrechos intervalos de confianza.

X. CONCLUSIONES

- A. En la determinación de actividad antioxidante total se obtuvieron los mejores rendimientos con el empleo del metanol, la fase móvil y el etanol como solventes de extracción en ambos vegetales.
- B. En la cuantificación de fenoles totales se obtuvieron los mejores resultados con el empleo del etanol, la fase móvil y el metanol como solventes de extracción en mamey y con el metanol, el buffer a pH 7.4 y el etanol en quilete.
- C. En la determinación de vitamina C, los extractos obtenidos de mamey con el etanol, el metanol y la fase móvil mostraron altos rendimientos, así como los extractos obtenidos de quilete con el metanol, el etanol y el buffer a pH 7.4 .
- D. En general, los extractos obtenidos con etanol y metanol presentaron altos rendimientos con los distintos parámetros de medición en ambos vegetales; en mamey los resultados obtenidos con el etanol presentan estrechos intervalos de confianza y en quilete ocurre lo mismo con el metanol.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Realizar extracciones con etanol y metanol en otras plantas evaluando los distintos parámetros incluidos en este estudio (actividad antioxidante total, contenido de fenoles totales, vitamina C).
- B. Evaluar la validez externa del estudio realizado.
- C. Determinar si los solventes con mayor constante dieléctrica que la de metanol tales como la acetona, tienen mejores efectos a los obtenidos en este estudio.
- D. Llevar a cabo un estudio para conocer las condiciones óptimas de extracción como distintas temperaturas o distintos tiempos de agitación.
- E. Evaluar la extracción fraccionada como opción para determinar de manera exacta la actividad antioxidante total del vegetal en estudio.
- F. Complementar los futuros estudios con un tamizaje fitoquímico del vegetal.

XII. REFERENCIAS

1. Fürst, P., The role of antioxidants in nutritional support. *Clinical Nutrition* 1,998; 17: 4-5.
2. Ekhard E et al, Conocimientos actuales sobre nutrición. 7 ed. Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud, 1,996.
3. Soares JR et al. Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus Zygis*. *Free Rad* 1,997; 26:469-478.
4. Vinson J et al. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J Agric Food Chem* 2,001; 49: 5315-5421.
5. Kähkönen M., Hopia A., Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2,001; 49:4076-4082.
6. Caballeros K. Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2,001. 54p.
7. Halliwell B., Gutteridge JM., Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1,992;119:598-620.
8. Guiselli A et al. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad & Med* 1995; 18:29-36.
9. Laranjinha JAN., Almeida LM., Madeira VMC. Lipid peroxidation and its inhibition in low density Lipoproteins: Quenching of cis-Parinaric Acid Fluorescence. *Arch or Bioch and Bioph* 1,992; 297: 147-154.

10. Trease, Evans W. *Farmacognosia*. 13 ed. México: Editorial Interamericana McGraw-Hill, 1991.
11. Lock O. *Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales*. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad del Perú, 1988. 213p.
12. Laranjinha J. et al. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Arch of Bioch and Bioph* 1,995;323:373-381.
13. Silva F. et al. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem* 2,000;48:2122-2126.
14. Liao K., Yin M. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolics agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of partition coefficient. *J Agric Food Chem* 2,000;48:2266-2270.
15. Laranjinha J. et al. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharm* 1,994;48:487-494.
16. Vieira O. et al. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *British Journ of Pharm* 1,998;123:565-573.
17. Laranjinha J., Almeida L., Madeira V. Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid. *Free Rad Biol & Med* 1,995; 19:329-337.

18. Goodhart R., Shills M. La nutrición en la salud y la enfermedad. España: Salvat Editores, S.A., 1,987. 1258p.
19. Serra Ll., Aranceta J., Mataix J. Nutrición y Salud Pública. España: Masson, S.A., 1,995. 401p.
20. Palozza P., Krinsky NI. The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both α -tocopherol y β -carotene. Free Rad Bio & Med 1991; 11: 407-414.
21. Anguelova T., Warthesen J. Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation. Journ of food scien 2000; 65: 71-75.
22. Gey KF. et al. Inverse correlation between plasma vitamin E and motality from ischemic Herat deisease in cross-cultural epiemiology. Am J Clin Nutr 1,991;53:326-334.
23. Zheng W., Wang S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J Agric Food Chem 2,001;49:5165-5170.
24. León J. Botánica de los cultivos tropicales. Costa Rica: Servicio Editorial IICA, 1987. 440p.
25. Morton J., Tomas Ch. Atlas of medicinal plants of middle America. Bahamas to Yucatán. USA: Publisher, 1981. 1420p.
26. Montes A. Estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Gardnerella vaginalis* de seis plantas de la flora guatemalteca: *Psidium guajava* L. (guayaba), *Bixa Orellana* L. (achiote), *Persea americana* Mill. (aguacate), *Theobroma cacao* L. (cacao), *Hymenaea courbail* L. (Guapinol) y *Solanum nigrescens* Mart & Gal

- (quilete). Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1,993. 82p.
27. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p.
28. Ríos G. Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Solanum nigrescens* Mart & Gal y *Verbena litoralis* HBK (Verbena). Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1,993. 38p.
29. List PH., Schmidt P. Phytopharmaceutical Technology. United Kingdom: CRC Press, 1,989. 374p.
30. Hu Ch., Kitts D. Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract. J Agric Food Chem 2,000;48:1466-1472.
31. Wingrove A., Caret R. Química Orgánica. México: Harla & Row, Publisher, Inc., 1,984. 1569p.
32. McMurry, J. Química Orgánica. México: Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., 1994. 1278 p.
33. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED, 2,000. 247p.

XIII. ANEXOS

Anexo No.1

Tabla 1. Valores de la constante dieléctrica de algunos solventes

Solvente	Constante dieléctrica (ϵ)
Hexano	1.89
Cloroformo	4.87
Etanol	24.3
Metanol	33.6
Agua	78.3

Anexo No.2

Combinación de los factores del diseño estadístico

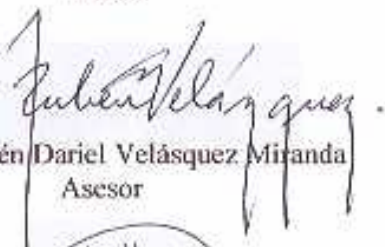
Los tratamientos utilizando la combinación de estos dos factores son los siguientes:

- a_1b_1 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó metanol como solvente.
- a_1b_2 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó etanol como solvente.
- a_1b_3 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó agua como solvente.
- a_1b_4 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó buffer de fosfatos 0.01M a pH 3 como solvente.
- a_1b_5 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 como solvente.
- a_1b_6 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó n-hexano como solvente.
- a_1b_7 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó cloroformo como solvente.
- a_1b_8 = Determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH, se utilizó fase móvil como solvente.
- a_2b_1 = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó metanol como solvente.
- a_2b_2 = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó etanol como solvente.

- a₂b₃ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó agua como solvente.
- a₂b₄ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó buffer de fosfatos 0.01M a pH 3 como solvente.
- a₂b₅ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 como solvente.
- a₂b₆ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó n-hexano como solvente.
- a₂b₇ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó cloroformo como solvente.
- a₂b₈ = Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, se utilizó fase móvil como solvente.
- a₃b₁ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó metanol como solvente.
- a₃b₂ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó etanol como solvente.
- a₃b₃ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó agua como solvente.
- a₃b₄ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó buffer de fosfatos 0.01M a pH 3 como solvente.
- a₃b₅ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 como solvente.
- a₃b₆ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó n-hexano como solvente.
- a₃b₇ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó cloroformo como solvente.
- a₃b₈ = Cuantificación de vitamina C mediante HPLC, se utilizó fase móvil como solvente.



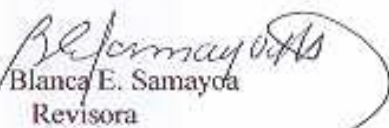
Sandra Patricia Lima Pimentel
Autora



Doctor Rubén Daríel Velásquez Miranda
Asesor



Licenciada Kenta Caballeros Barragán
Asesora



MSc. Blanca E. Samayoa
Revisora



Licenciada Margarita Paz de Ramírez
Revisora



Licenciada Alba Marina Valdés de García
Directora



MSc. Gerardo Leopel Arroyo Catalán
Decano

EVALUACION DE DISTINTOS SOLVENTES PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE QUILETE (*Solanum americanum*) y MAMEY (*Mammea americana*)

Sandra Patricia Lima Pimentel, Kenia María de los Angeles Caballeros Barragán¹, Rubén Dariel Velásquez Miranda¹

¹Departamento de Bioquímica, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la extracción con ocho distintos solventes a partir de hojas de quilete (*Solanum americanum*) y frutos de mamey (*Mammea americana*), para determinar la actividad antioxidante mediante tres parámetros: **actividad antioxidante total**, empleando el reactivo α, α -difенил- β -picrilhidrazilo (DPPH), el **contenido de fenoles totales** por la reacción de Folin Ciocalteu y **vitamina C** mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La evaluación se realizó mediante un diseño factorial que combinó las variables: parámetro de determinación de actividad antioxidante (las tres indicadas) y tipo de solvente de extracción (ocho solventes de distinta polaridad -metanol, etanol, cloroformo, n-hexano, buffer de fosfatos a pH 3, buffer de fosfatos a pH 7.4, agua y una mezcla 95:5 de buffer de fosfatos pH 3 y metanol). Las extracciones se hicieron por triplicado usando hojas de quilete y frutos de mamey en estado fresco. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95 por ciento ($\alpha = 0.05$), seguido de una comparación múltiple de medias con el test de Tukey ($\alpha = 0.05$). El estudio permitió establecer que el tipo de solvente (polaridad) influye en el rendimiento de la extracción de los compuestos antioxidantes de quilete y mamey. La extracción alcohólica (metanol y etanol) es la mejor opción para la cuantificación de los compuestos antioxidantes mediante los tres parámetros en ambos vegetales.

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir independientemente, contienen uno o más electrones desapareados y por su alta reactividad química pueden causar daño a las macromoléculas celulares: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, resultando en daño celular y en enfermedades crónicas como la aterosclerosis y la artritis reumatoide (1,2).

Bajo condiciones fisiológicas normales, el organismo previene el daño producido por los radicales libres a través de sus mecanismos de protección conocidos como sistemas antioxidantes. Además, es conocido que la ingesta frecuente de vegetales y frutas es una fuente importante de antioxidantes exógenos, pudiendo tener gran trascendencia en la prevención y terapéutica de las enfermedades, en las que se han implicado radicales libres (3-4).

El conocimiento de la capacidad antioxidante de vegetales y frutas es importante, ya que de esta manera se puede promocionar el consumo de las que posean mayores cantidades. Recientemente se han llevado a cabo estudios a nivel mundial, para caracterizar la propiedad antioxidante de los extractos de varios materiales vegetales.

A la fecha, los procedimientos más comúnmente utilizados para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales y frutas incluyen la extracción con solventes (5). Los extractos así obtenidos se analizan con una serie de métodos para conocer su capacidad antioxidante; uno de los ensayos más frecuentemente utilizados es la medición de la capacidad de los extractos para consumir al radical α, α -difенил- β -picrilhidrazilo (DPPH); además, para conocer en forma general la naturaleza de los compuestos que confieren esta actividad, se

determina los contenidos de fenoles totales (reacción de Folin Ciocalteu) y de vitamina C (HPLC) (6). Para evaluar el potencial de un vegetal como fuente de antioxidantes, es necesario realizar una extracción exhaustiva de los compuestos que la posean, lo cual se dificulta por la amplia gama de estructuras vegetales (matrices) y por las variadas naturalezas química y polar de los antioxidantes. Estas dificultades se resuelven mediante la utilización de solventes de distinta polaridad. En la literatura no se disponía de datos detallados sobre el rendimiento de distintos solventes para extracciones a partir de matrices vegetales variadas (*vr. gr.* hojas y frutos) con el fin de analizar sus propiedades antioxidantes por medio de los tres parámetros mencionados.

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la extracción con ocho distintos solventes a partir de hojas de quilete (*Solanum americanum*) y frutos de mamey (*Mammea americana*), para la determinación de la actividad antioxidante total a través del método de DPPH, el contenido de grupos fenoles por el reactivo de Folin Ciocalteu y la vitamina C mediante HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra. Muestras de quilete fueron adquiridas en un establecimiento de conveniencia (supermercado) y las de mamey en el Mercado Central, ambos de la Ciudad de Guatemala. Estas se seleccionaron en el estado de madurez apto para el consumo humano.

Preparación del extracto. 10 g de vegetal (quilete o mamey) se extrajeron con 50 ml de solvente (metanol, etanol, cloroformo, n-hexano, buffer de fosfatos a pH 3, buffer de fosfatos a pH 7.4, agua y una mezcla 95:5 de buffer de fosfatos pH 3 y metanol *-fase móvil-*) mediante agitación magnética, en oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno. Después de filtrar, el residuo se extrajo repetidamente con alícuotas de 25 ml del mismo solvente hasta obtener extractos

incolores. Los extractos obtenidos con buffer de fosfatos 0.01 M a pH 3, agua y buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos previamente a ser filtrados al vacío. Los extractos obtenidos de un mismo material vegetal fueron colocados juntos y se midió el volumen. Con este dato y con el del peso seco del vegetal, se calculó la concentración de materia seca vegetal por volumen de extracto. De cada vegetal se realizaron extracciones por triplicado con cada solvente. Los extractos se almacenaron en refrigeración, recipientes color ámbar y atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

Determinación de la capacidad antioxidante total. 100 μ l del extracto se mezclaron con 2.9 ml de 37.8 ppm de DPPH disueltos en una solución de metanol-buffer de acetatos 0.1 M a pH 6 (1.9:1). La mezcla se dejó reaccionar 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 517 nm al inicio y al final de la incubación. Se ajustó la concentración del extracto para calcular la cantidad de éste que causaba la disminución del 50% de absorbancia (IC_{50}). La determinación se realizó por duplicado.

Determinación de los Fenoles totales. 50 μ l de extracto se hicieron reaccionar con 5.15 ml de reactivo de Folin diluido (1:12.9) con Na_2CO_3 (1.68%, p/v) a 90-100 °C por un minuto. El procedimiento se efectuó también con 100 μ l de extracto. Después que la mezcla alcanzó temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 765 nm. Como curva se analizaron de la misma forma soluciones patrón de 5 a 100 mg de ácido gálico (mg Eq. ácido gálico).

Determinación de la vitamina C. 20 μ l del extracto se inyectaron en un sistema de HPLC con una columna C_{18} (LiChrospher 100, 5 μ m, Merck), de 12.5 mm por 4 mm DI; el análisis se efectuó con elución isocrática (8 ml/min de buffer de fosfatos pH 3-metanol; 95:5), y detección a 265 nm. La curva patrón se generó con el análisis similar de ácido ascórbico (5- 50 μ g/ml).

Tabla 1. Valores de actividad antioxidante total, fenoles totales y vitamina C del quilete y mamey utilizando distintos solvente para su extracción. Los resultados se expresan como media, desviación estándar, mínimo y máximo.

PARÁMETRO DE MEDICIÓN	VEGETAL	SOLVENTE								Valor P ^{1,2}		
		Metanol	Etanol	Cloroformo	n-Hexano	Agua	Buffer pH3	Buffer pH 7.4	Agua			
Actividad antioxidante total (IC ₅₀) ³	Quilete	Media ⁴	0.14	0.34	2.16	116.98	0.58	0.98	0.36	0.24	<0.05	
		DS ⁵	0.01	0.02	0.25	51.59	0.05	0.14	0.05	0.070		
		Mínimo	0.13	0.33	1.87	71.48	0.54	0.87	0.31	0.19		
		Máximo	0.15	0.37	2.30	173.03	0.63	1.14	0.41	0.33		
	Mamey	Media ⁴	3.54	2.74	74.81	141.03	28.43	15.48	13.98	3.22		
		DS ⁵	0.73	0.22	20.45	17.21	5.26	2.94	2.55	0.56		
		Mínimo	2.97	2.57	52.26	126.37	23.56	12.12	11.72	2.74		
		Máximo	4.37	2.99	92.14	159.97	34.01	17.57	16.74	3.84		
	Fenoles totales (Eq.Ac.Gál./g peso seco) ⁶	Quilete	Media ⁴	538.54	231.81	50.51	0.00	213.34	182.67	357.06		189.63
			DS ⁵	38.29	10.03	2.94	0.00	13.34	16.41	25.41		30.72
			Mínimo	497.92	222.06	47.40	0.00	200.54	171.52	327.72		156.74
			Máximo	573.98	242.10	53.24	0.00	227.17	201.51	371.77		217.58
Mamey		Media ⁴	47.46	59.02	0.00	0.00	19.25	16.56	21.51	48.72		
		DS ⁵	10.35	4.44	0.00	0.00	3.26	0.93	2.97	3.00		
		Mínimo	40.62	54.18	0.00	0.00	15.96	15.81	18.27	45.60		
		Máximo	59.36	62.92	0.00	0.00	22.47	17.60	24.11	51.59		
Vitamina C (mg/g peso seco)		Quilete	Media ⁴	15.69	12.09	0.00	0.00	2.27	4.48	12.07	5.70	
			DS ⁵	1.08	0.17	0.00	0.00	3.93	3.97	0.33	0.02	
			Mínimo	14.54	11.90	0.00	0.00	0.00	0.00	11.75	5.69	
			Máximo	16.70	12.19	0.00	0.00	6.80	7.55	12.40	5.72	
	Mamey	Media ⁴	3.71	3.96	0.00	0.00	2.52	0.00	0.00	3.27		
		DS ⁵	0.17	0.21	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.40		
		Mínimo	3.57	3.83	0.00	0.00	2.36	0.00	0.00	2.88		
		Máximo	3.90	4.20	0.00	0.00	2.83	0.00	0.00	3.69		

¹ Valor P= valor de la probabilidad.

² Análisis de varianza univariado; $\alpha=0.05$, nivel de confianza del 95%

³ Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.

⁴ Media de ensayos realizados en triplicado.

⁵ Desviación estándar de ensayos realizados en triplicado.

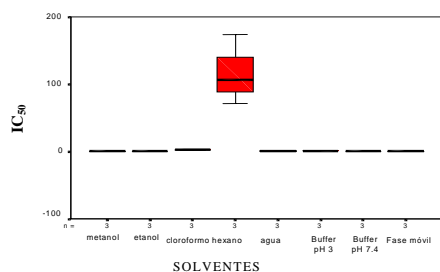
⁶ Concentración basada en ácido gálico como estándar.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los promedios, desviaciones estándar, mínimos y máximos de los distintos parámetros de actividad antioxidante (actividad antioxidante total, contenido de fenoles totales y vitamina C). Los resultados fueron analizados mediante una prueba de varianza de una vía a un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$). Esta prueba estadística reveló que existen diferencias (valor $P < 0.05$) al utilizar distintos solventes para la extracción. Estas diferencias se establecieron para cada uno de los distintos parámetros determinados.

Las gráficas 1 y 2 comparan la actividad antioxidante total obtenida con los ocho distintos solventes usados en dos matrices vegetales distintas (quilete y mamey).

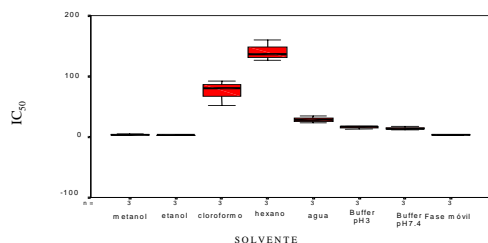
Gráfica 1. Actividad antioxidante en extractos de quilete con ocho distintos solventes^{1,2}.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.)

Gráfica 2. Actividad antioxidante en extractos de mamey con ocho distintos solventes^{1,2}.



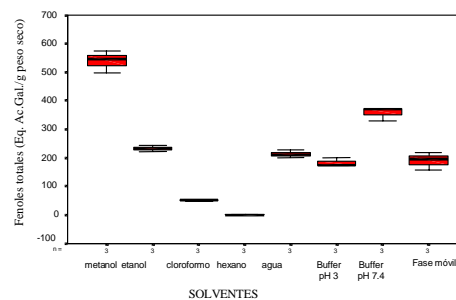
¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

² Expresada como IC₅₀ (Concentración de inhibición al 50 por ciento expresada en mg.)

Se observa que los extractos con el etanol, la fase móvil y el metanol son los que presentan los valores más altos de actividad antioxidante total (menor IC₅₀) así como los buffers y el agua; además, es evidente que el n-hexano extrae muy escasa cantidad de este tipo de compuestos.

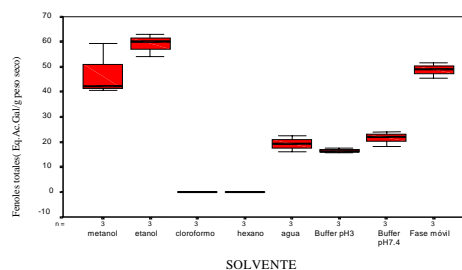
En las gráficas 3 y 4 se observan los valores del contenido de los compuestos fenólicos totales de quilete y mamey, respectivamente, con los distintos solventes. Puede observarse que el metanol, el etanol y la fase móvil son los solventes que extraen mayor cantidad de estos compuestos en el mamey y que el metanol es el solvente con el que se extrae mayor cantidad de estos analitos en quilete. Es evidente que el intervalo de confianza de la extracción metanólica de mamey es muy amplio.

Gráfica 3. Extracción de compuestos fenólicos totales en quilete con ocho distintos solventes¹.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

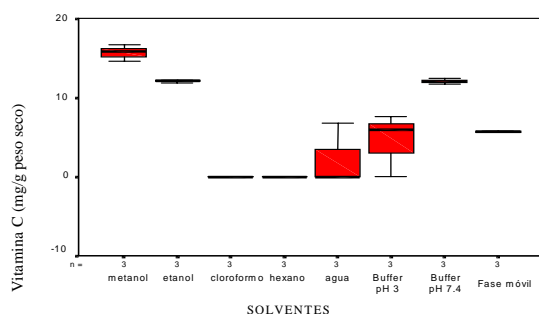
Gráfica 4. Extracción de compuestos fenólicos totales en mamey con ocho distintos solventes¹.



¹ Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

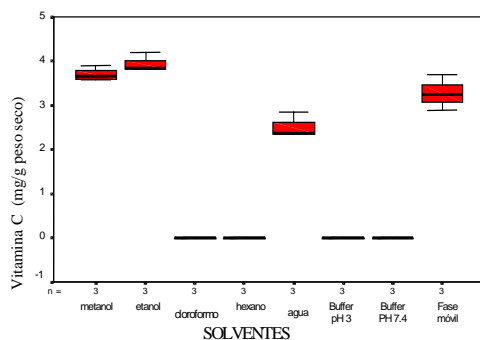
Las gráficas 5 y 6 muestran los contenidos de la vitamina C en quilete y mamey, respectivamente, con los distintos solventes de extracción. El Metanol y el etanol son los solventes con los que se extrae mayor cantidad de este analito. Ambos solventes muestran estrechos intervalos de confianza en ambas gráficas.

Gráfica 5. Extracción de la vitamina C del quilete con ocho distintos solventes¹.



¹Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

Gráfica 6. Extracción de la vitamina C del mamey con ocho distintos solventes¹.



¹Test de tukey ($\alpha = 0.05$)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los solventes incluidos en el estudio se escogieron en base a su grado de polaridad. Se observó que los solventes se comportaron de distinta forma de acuerdo a los parámetros estudiados tanto en quilete como en mamey en estado fresco y que los extractos con mayor actividad antioxidante son ricos en compuestos polifenólicos lo cual se relaciona con estudios previos (3,5,6).

El etanol como solvente presentó altos rendimientos y estrechos intervalos de confianza en ambos vegetales. En mamey es evidente que fue el solvente con el que se obtuvo mejores resultados en todos los parámetros (actividad antioxidante total, contenido de compuestos fenólicos totales y vitamina C) mostrándose superior a metanol. Su habilidad de extracción radica en que es capaz de extraer compuestos fenólicos glicosilados (7) los cuales se encuentran en abundancia en frutas, ello explica el alto rendimiento en los parámetros de fenoles totales y actividad antioxidante total. A pesar de que la vitamina C es menos soluble en etanol que en agua, se obtuvo mejor rendimiento en la extracción etanólica que en la extracción acuosa.

El metanol fue el mejor solvente de extracción del contenido total de compuestos antioxidantes, compuestos fenólicos y vitamina C en quilete, debido a su naturaleza polar (constante dieléctrica 33.6), lo que facilita la extracción de compuestos polares; es seguido por etanol (constante dieléctrica 24.3), que presenta resultados cercanos, excepto en el contenido de compuestos fenólicos, en donde el agua lo supera. Además de presentar altos rendimientos y estrechos intervalos de confianza de estos parámetros, el metanol extrae rápida y fácilmente los compuestos antioxidantes de la matriz herbácea y requiere escasa cantidad del mismo para completar la extracción al igual que etanol.

A pesar de que los extractos metanólicos de mamey también presentaron

buenos rendimientos, muy cercanos a los extractos etanólicos, el intervalo de confianza en la determinación de fenoles totales es muy amplio, siendo esta una desventaja en la extracción con metanol. Con respecto a los demás parámetros, el metanol muestra resultados comparables a los de etanol y estrechos intervalos de confianza.

Los extractos obtenidos con “*fase móvil*” muestran resultados cercanos a los de etanol y metanol en la determinación de actividad antioxidante total. En esta mezcla, la presencia de metanol en un cinco por ciento facilitó la extracción de ciertos compuestos fenólicos y la estabilización de los extractos. Sin embargo, a pesar de que es buena opción para la determinación de compuestos fenólicos en mamey, no lo es para quilete. En la determinación de vitamina C no fue la mejor opción ya que se presenta en un segundo subgrupo de elección para ambos vegetales.

A pesar de que el agua es un solvente universal y presenta alto grado de polaridad (constante dieléctrica 78.3), no muestra altos rendimientos como era de esperarse. Por su naturaleza el pH puede variar por el aporte externo de sustancias ácidas o básicas; además, en ella se encuentra oxígeno disuelto que puede ocasionar que las moléculas extraídas sean oxidadas (5) impidiendo de medir con exactitud las propiedades antioxidantes. Los extractos acuosos se fermentaron al poco tiempo, causando dificultades en los análisis.

Los buffers de fosfatos a pH 3 y pH 7.4 muestran resultados cercanos al agua en la determinación del contenido total de compuestos antioxidantes. En la determinación de vitamina C el buffer a pH 7.4 presenta mejores resultados que el agua y el buffer a pH 3 en quilete. El agua mostró mejores rendimientos que los buffers en la determinación de vitamina C en mamey. Con los buffer también se notó fermentación en los extractos, causando dificultades técnicas.

El cloroformo y el n-hexano no son apropiados para la extracción, ya que los rendimientos obtenidos son muy bajos. Las metodologías utilizadas para la medición de la actividad antioxidante total (DPPH) y los compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu) no permiten el ensayo directo del extracto obtenido con estos solventes, ya que estos no son miscibles con las fases acuosas utilizadas en estos métodos. Para realizar la cuantificación de extractos clorofórmicos y hexánicos, estos se evaporan a sequedad y luego se reconstituyen con las mismas fases utilizadas en los ensayos; puesto que no existe la certeza que todas las sustancias del residuo se disuelvan en estas fases, los resultados obtenidos mediante estas metodologías no refleja la verdadera capacidad antioxidante del extracto original.

CONCLUSIONES

En general, los extractos obtenidos con el etanol y el metanol presentaron altos rendimientos con los distintos parámetros de medición en ambos vegetales; en mamey los resultados obtenidos con el etanol presentan estrechos intervalos de confianza y en quilete ocurre lo mismo con el metanol.

RECOMENDACIONES

Evaluar si los solventes con mayor constante dieléctrica que la de los alcoholes (etanol y metanol) tales como la acetona, tienen mejores efectos a los obtenidos en este estudio. Además, llevar a cabo extracciones fraccionadas como opción para determinar de manera exacta la actividad antioxidante total de los vegetales en estudio.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Departamento de Bioquímica de la escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Se agradece el apoyo y la colaboración recibida por los Departamentos de Citohistología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en especial a la Licenciada Blanca Samayoa Herrera por sus sugerencias y apoyo en el análisis estadístico de los datos, y a la Licenciada Margarita Paz por sus observaciones.

REFERENCIAS

34. Fürst, P., The role of antioxidants in nutritional support. *Clinical Nutrition* 1,998; 17: 4-5.
35. Ekhard E et al, Conocimientos actuales sobre nutrición. 7 ed. Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud, 1,996.
36. Soares JR et al. Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus Zygis*. *Free Rad* 1,997; 26:469-478.
37. Vinson J et al. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J Agric Food Chem* 2,001; 49: 5315-5421.
38. Kähkönen M., Hopia A., Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2,001; 49:4076-4082.
39. Caballeros K. Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2,001. 54p.
40. Lock O. Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales. Perú: Fondo editorial del la Pontificia Universidad del Perú, 1,988. 213p.

