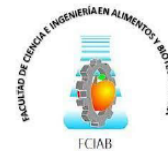




**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN**  
**ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Evaluación de compuestos bioactivos con actividad antioxidante presentes en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) provenientes de residuos de la Plaza San Jacinto ubicada en la parroquia Izamba, cantón Ambato, provincia Tungurahua.

---

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Edison Santiago Vayas Ambuludi

**Tutor:** MSc. Danae Fernández Rivero

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Lic. MSc. Danae Fernández Rivero**

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 25 de julio de 2023.

---

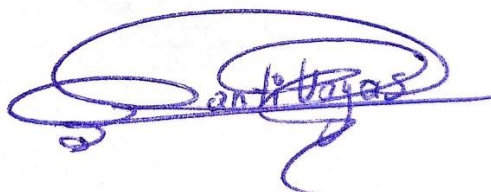
Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

**TUTORA**

## **AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Edison Santiago Vayas Ambuludi, manifiesto que los resultados obtenidos en el Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Edison Santiago Vayas Ambuludi

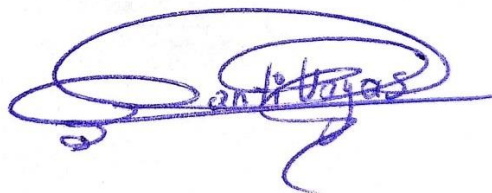
C.I. 180368705-0

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este presente Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Edison Santiago Vayas Ambuludi

C.I. 180368705-0

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

**Presidente del Tribunal**

---

Dr. Pablo Vinicio Tuza Alvarado

**C.I. 1104063241**

---

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

**C.I. 1309651998**

Ambato, 25 de agosto de 2023

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, a Dios por las oportunidades que me ha brindado a través de la vida, las mismas que me han permitido llegar al fin de esta etapa importante para mí como persona.

A mi familia, por ser un apoyo incondicional y mostrarme el valor del esfuerzo diario para conseguir mis objetivos de manera satisfactoria.

Al amor incondicional de Diana Jaque, he podido alcanzar mis metas y proyectos propuestos durante el transcurso de la carrera.

A mi tutora, MSc. Danae Fernández Rivero, que, gracias a sus amplios conocimientos, permitieron que el presente trabajo cumpla con los objetivos propuestos.

A la Universidad Técnica de Ambato, que ha sido mi segundo hogar y al que le tengo un enorme cariño.

Gracias a los amigos y personas que hicieron ameno el trayecto en la carrera. Agradeciéndoles siempre su conocimiento y simpatía.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
RESUMEN EJECUTIVO .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Propiedades medicinales de las plantas.....	1
1.1.2 Espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> ).....	2
1.1.2.1 Producción anual, clasificación taxonómica y morfológica .....	2
1.1.2.2 Composición química .....	3
1.1.2.3 Propiedades medicinales.....	5
1.1.2.4 Efecto del tiempo postcosecha.....	7
1.1.3 Métodos de detección de compuestos bioactivos .....	7
1.1.4 Moléculas antioxidantes .....	10
1.1.4.1 Estrés oxidativo.....	10
1.1.4.2 Actividad antioxidante.....	10
1.1.4.3 Actividad antioxidante de origen natural.....	11
1.1.4.4 Evaluación de la actividad antioxidante .....	11
1.1.4.5 Fármacos utilizados con actividad antioxidante .....	12
1.1.5 Actividad antioxidante de los fenoles.....	13

1.1.6 Actividad antioxidante de los carotenoides .....	13
1.1.7 Extracción con disolventes orgánicos.....	14
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 General .....	15
1.2.2 Objetivos Específicos .....	15
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA .....	16
2.1. Materiales.....	16
2.1.1 Recursos institucionales .....	16
2.1.2 Material vegetal .....	16
2.1.3 Materiales de laboratorio.....	16
2.1.4 Equipos .....	17
2.1.5 Reactivos .....	18
2.2 Métodos.....	18
2.2.1 Recolección del material vegetal.....	18
2.2.2 Obtención del material vegetal molido.....	18
2.2.3 Preparación del disolvente etanólico .....	19
2.2.4 Determinación de la masa de sólidos extraídos.....	19
2.2.5 Determinación de carotenoides totales .....	20
2.2.6 Determinación de fenoles totales.....	21
2.2.7 Evaluación de la actividad antioxidante .....	22
2.2.8 Planteamiento del diseño experimental .....	22
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
3.1 Análisis y discusión de los resultados.....	25
3.1.1 Determinación de masa de sólidos extraídos.....	25
3.1.2 Determinación de carotenoides totales presentes en los extractos de espinaca .....	29



3.1.3 Determinación de fenoles totales presentes en los extractos de espinaca .....	33
3.1.4 Determinación de la actividad antioxidante de los carotenoides y fenoles totales presentes en los extractos de espinaca .....	38
3.2 Verificación de hipótesis.....	39
CAPÍTULO VI. - CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	40
4.1 Conclusiones.....	40
4.2 Recomendaciones .....	42
MATERIALES DE REFERENCIA .....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta espinaca spinacia oleracea .....	3
<b>Figura 2.</b> Análisis estadístico diagrama de pareto estandarizada tratamientos de espinaca.....	28
<b>Figura 3.</b> Análisis estadístico superficie de respuesta para los tratamientos de espinaca.....	29
<b>Figura 4.</b> Análisis estadístico diagrama de pareto estandarizada para carotenoides totales. ....	32
<b>Figura 5.</b> Análisis estadístico superficie de respuesta para concentración de carotenoides totales presentes en la espinaca.....	33
<b>Figura 6.</b> Análisis estadístico diagrama de pareto estandarizada para fenoles totales. ....	36
<b>Figura 7.</b> Análisis estadístico superficie de respuesta para concentración de fenoles totales presentes en la espinaca. ....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica y morfológica de la espinaca.....	2
<b>Tabla 2</b> Composición nutricional de la espinaca.....	4
<b>Tabla 3</b> Beneficios de la espinaca para la salud y prevención de enfermedades .....	6
<b>Tabla 4</b> Ejemplos de compuestos bioactivos de origen natural .....	11
<b>Tabla 5</b> Material vegetal.....	16
<b>Tabla 6</b> Materiales de laboratorio.....	16
<b>Tabla 7</b> Equipos de laboratorio .....	17
<b>Tabla 8</b> Reactivos de laboratorio.....	18
<b>Tabla 9</b> Modelo del diseño experimental axb .....	23
<b>Tabla 10</b> Sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y eficiencia de extracción .....	25
<b>Tabla 11</b> Promedio de las réplicas para los sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y eficiencia de extracción .....	26
<b>Tabla 12</b> Análisis de varianza (anova) para la selección óptima de extracción de la espinaca.....	27
<b>Tabla 13</b> Valor óptimo de la eficiencia de extracción.....	28
<b>Tabla 14</b> Resultados de la concentración de carotenoides totales presentes en la espinaca.....	30
<b>Tabla 15</b> Promedio de las réplicas para la concentración de carotenoides totales....	31
<b>Tabla 16</b> Análisis de varianza (anova) para la determinación de carotenoides totales presentes en la espinaca .....	31
<b>Tabla 17</b> Valor óptimo de la concentración de carotenoides totales.....	33
<b>Tabla 18</b> Determinación de fenoles totales .....	34
<b>Tabla 19</b> Promedio de las réplicas para la concentración de fenoles totales.....	35
<b>Tabla 20</b> Análisis de varianza (anova) para la determinación de fenoles totales presentes en la espinaca .....	36
<b>Tabla 21</b> Valor óptimo de la concentración de fenoles totales .....	37
<b>Tabla 22</b> Porcentaje de inhibición y concentración trolox.....	39

## RESUMEN EJECUTIVO

El uso de las plantas medicinales para poder aliviar y tratar enfermedades o afecciones se ha incrementado considerablemente en los últimos años, siendo reconocidas por organizaciones internacionales como medicina complementaria. El presente estudio está enfocado en la reutilización de la espinaca sobrante como una fuente de obtención de compuestos bioactivos, los cuales son carotenoides y fenoles totales considerados como agentes antioxidantes, los cuales presentan un beneficio positivo para la salud.

Las condiciones óptimas de extracción se evaluaron mediante un diseño experimental donde, se tomó en cuenta el tiempo postcosecha (semana 1 y 2) y el tiempo de extracción (30 y 60 minutos), donde el valor óptimo fue de 20.057 por ciento en la semana 1 en un tiempo de 60 minutos. La concentración de carotenoides totales se determinó mediante espectrofotometría cuyo valor óptimo fue de 137.109 microgramo sobre gramo, en la semana 1 en un tiempo de 60 minutos. Por otro lado, el contenido de fenoles totales se evaluó mediante el método de Folin Ciocalteu aplicando una curva estándar de ácido gálico (GAE) cuyo valor óptimo fue de 26.8307 miligramos GAE en la semana 2 en un tiempo de 30 minutos.

Finalmente, se determinó la actividad antioxidante mediante una curva de calibración estándar de trolox donde, se obtuvo un valor de 480.850 micromol de trolox sobre gramos, para la semana 1 en un tiempo de 60 minutos. Por ende, la presente investigación demostró que la espinaca contiene compuestos bioactivos, que con el paso del tiempo postcosecha su actividad antioxidante disminuye.

**Palabras clave:** antioxidante, espectrofotometría, plantas medicinales, espinaca, eficiencia de extracción, carotenoides totales y fenoles totales.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants to alleviate and treat diseases or conditions has increased considerably in recent years, being recognized by international organizations as complementary medicine. The present study is focused on the reuse of leftover spinach as a source of obtaining bioactive compounds, which are carotenoids and total phenols considered as antioxidant agents, which present a positive benefit for health.

The optimal extraction conditions were evaluated through an experimental design where postharvest time (week 1 and 2) and extraction time (30 and 60 minutes) were taken into account, where the optimal value was 20.057 percent in week 1 in a time of 60 minutes. The concentration of total carotenoids was determined by spectrophotometry whose optimal value was 137.109 micrograms per gram, in week 1 in a time of 60 minutes. On the other hand, the content of total phenols was evaluated by the Folin Ciocalteu method applying a standard curve of gallic acid (GAE) whose optimal value was 26.8307 milligrams GAE in week 2 in a time of 30 minutes.

Finally, the antioxidant activity was determined using a trolox standard calibration curve where a value of 480,850 micromol of trolox per grams was obtained for week 1 in a time of 60 minutes. Therefore, the present investigation demonstrated that spinach contains bioactive compounds, that with the passage of postharvest time its antioxidant activity decreases.

**Keywords:** antioxidant, spectrophotometry, medicinal plants, spinach, extraction efficiency, total carotenoids and total phenols

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

#### 1.1.1 Propiedades medicinales de las plantas

Dentro del Ecuador existen una gran variedad de plantas que contienen propiedades medicinales ya sean endémicas o de consumo masivo, las cuales han aportado significativamente al crecimiento de la medicina tradicional o también llamada complementaria (MTC) dentro de la región sierra (FAO, 2022). Estos tratamientos han crecido en un 60% en los últimos años gracias a que la población de hoy en día conocen las propiedades medicinales que pueden llegar a tener diferentes tipos de plantas, vegetales, hortalizas o frutas, puesto que, su uso en terapias ha logrado el alivio y mejoramiento de enfermedades que afectan a la salud humana. Por ende, organizaciones como la OMS han reconocido que la medicina tradicional puede usarse como tratamientos terapéuticos en diferentes regiones a nivel mundial (Almeida & Schlechta, 2018).

En la actualidad, se conoce que la mayoría de los componentes bioactivos que poseen los fármacos para el tratamiento de enfermedades proviene de plantas, las cuales sintetizan o producen estos compuestos bioactivos de manera natural. Esto sitúa a las plantas como una fuente accesible y práctica ante los distintos fármacos que se producen por grandes empresas alrededor del mundo, sin embargo, estos medicamentos pueden presentar posibles efectos secundarios con un efecto a largo plazo si se los consumen con frecuencia (Moreiras, 2013). Los principales componentes que poseen las plantas medicinales se pueden clasificar en tres grupos: el primero corresponde a los terpenoides que abarcan: carotenoides, capsaicina y fitoesteroles. El segundo, los compuestos fenólicos que contienen: las antocianinas, catequinas, flavonoides, isoflavonas, lignanos y taninos. Por último, los tioles que son compuestos organosulfurados (Vázquez, 2015). Estos compuestos son beneficiosos en la respuesta a procesos inflamatorios, reducción del colesterol, efectos positivos en relación con el cáncer de mama y de próstata, y protección frente a la radiación ultravioleta (Romero et al., 2022).

### 1.1.2 Espinaca (*Spinacia oleracea*)

#### 1.1.2.1 Producción anual, clasificación taxonómica y morfológica

La espinaca, es una planta que se cultiva alrededor del mundo, dentro de sector ecuatoriano la región sierra es el sector más productivo, abarcando el 86% de toda la producción anual teniendo un estimado de 800 toneladas aproximadamente. Teniendo esto en cuenta las parroquias que más producen espinaca dentro de Ambato son: Pasa, Emilio Terán, Pinguilí, Huambaló e Izamba en donde, esta última se caracteriza por comercializar y proveer a muchos supermercados y plazas del centro de la ciudad (Heredia et al., 2022). Muchos de estos sectores producen espinaca durante todo el año debido que, su propagación se lo puede realizar en cualquier época del año y es considerada un alimento altamente codiciado por su alto nivel nutricional, según Cai et al., (2021) posee la siguiente clasificación:

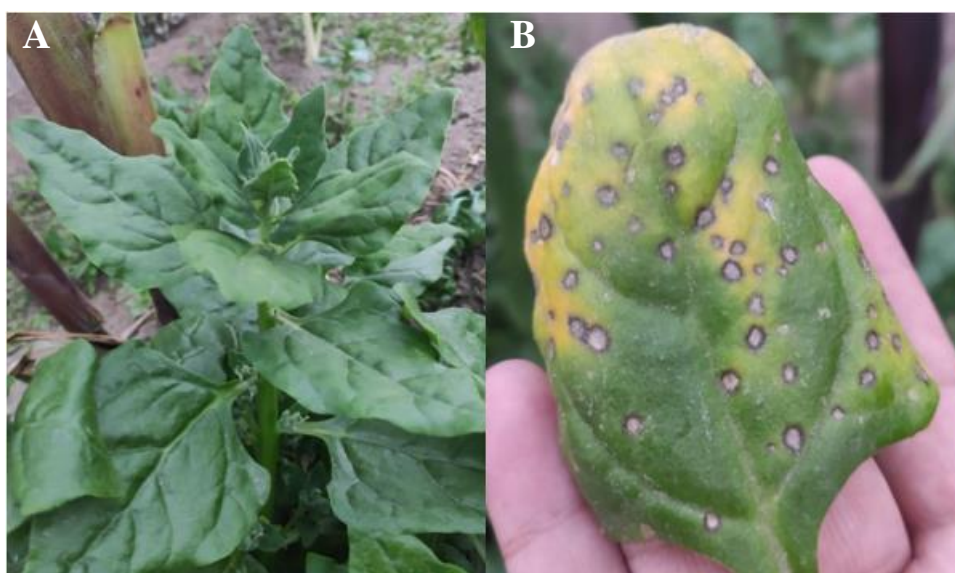
**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica y morfológica de la espinaca*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Caryophyllidae
<b>Orden:</b>	Caryophyllales
<b>Familia:</b>	Amaranthaceae
<b>Subfamilia:</b>	Chenopodioideae
<b>Género:</b>	<i>Spinacia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Spinacia oleracea</i> L., 1753

*Nota:* Adaptado de “Genomic analyses provide insights into spinach domestication and the genetic basis of agronomic traits” (p. 10), Cai et al., 2021, *Nature Communications*, 12(1).

La espinaca en una planta de cultivo anual con un promedio de siembra de 3 meses aproximadamente, posee una raíz pivotante, poco ramificada y su desarrollo es superficial, su deformación se da en forma de rosetas, su tallo floral puede alcanzar una altura de 1 metro (Figura 1A) (Kandel et al., 2019). Las hojas presentan una coloración verde oscura en un estado de maduración óptimo para ser cosechados, por otro lado, cuando la coloración es amarillenta con manchas de coloración café se encuentra en un estado avanzado de maduración o descomposición (Figura 1B) por lo que, su cosecha y comercialización ya no resulta viable por ende, muchas plazas o mercados optan por desechar estas hojas en dicho estado (Pérez et al., 2018).



*Figura 1.* Planta espinaca *Spinacia oleracea*

#### 1.1.2.2 Composición química

Según menciona Fonseca (2015), la espinaca contiene una baja cantidad de calorías y grasas, por otro lado, contiene una gran variedad de nutrientes los cuales se recomienda consumir de manera natural sin someterla a temperaturas altas. Como se muestra en la Tabla 2 dentro de los componentes más destacados que se pueden obtener por cada 100 g son:



**Tabla 2***Composición nutricional de la espinaca*

<b>Sustancia</b>	<b>Contenido nutricional</b>
Carbohidratos	3.6 g
Azúcares	0.4 g
Grasas	0.4 g
Proteínas	2.9 g
Agua	91.4 g
Retinol (vit. A)	469 µg (52%)
β-caroteno	5626 µg (52%)
Tiamina (vit. B <sub>1</sub> )	0.078 mg (6%)
Riboflavina (vit. B <sub>2</sub> )	0.189 mg (13%)
Niacina (vit. B <sub>3</sub> )	0.724 mg (5%)
Ácido pantoténico (vit. B <sub>5</sub> )	0.065 mg (1%)
Vitamina B <sub>6</sub>	0.195 mg (15%)
Ácido fólico (vit. B <sub>9</sub> )	0.2 mg (49%)
Vitamina C	28.1 mg (47%)
Vitamina E	2 mg (13%)
Calcio	99 mg (10%)
Hierro	4.1 mg (22%)
Magnesio	79 mg (21%)
Manganeso	0.9 mg (45%)
Fósforo	49 mg (7%)
Potasio	558 mg (12%)
Sodio	79 mg (5%)
Zinc	0.53 mg (5%)

*Nota:* Adaptado de “Manual: Espinaca” (p. 52), Fonseca, 2015, *Cámara de Comercio de Bogotá*, 4(16).

Si bien es cierto, que la espinaca contiene un porcentaje de agua de alrededor del 90% en su composición, también contiene sustancias fitoquímicas como son los carotenoides mismos que se encuentran en una concentración de alrededor del 60.88 mg por cada 100 g y fenoles los cuales se encuentran en una concentración de 40.22 mg por cada 100 g, convirtiéndola en una planta no solo de interés comercial o culinario sino también terapéutico debido a que, estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias y son considerados como potentes antioxidantes, ya que son capaces de inactivar o silenciar especies reactivas de oxígeno que se producen en las células de manera natural (**Simonovska et al., 2013**).

### **1.1.2.3 Propiedades medicinales**

Comúnmente las hojas que presentan una coloración verde oscura como la espinaca poseen propiedades beneficiosas para la salud de la piel, el cabello y los huesos también son consideradas como una fuente de obtención de proteínas, hierro, vitaminas y minerales (**Tanveer et al., 2022**). Según estudios realizados por **Mitra et al., (2021)**, la espinaca presenta beneficios significativos para la salud si se consume esta hortaliza dentro de una dieta equilibrada, por ende, la espinaca ha sido utilizada por varias culturas a lo largo de la historia, especialmente en el Mediterráneo, Medio Oriente y Sudeste Asiático (**Moreiras, 2013**). Sin embargo, en muchos sectores de Latinoamérica en los últimos años ha tenido un incremento significativo debido a que, se la puede incorporar fácilmente en cualquier dieta, ya que es económica y de fácil preparación según menciona **Iraizoz, (2022)**, se la consume para poder reducir el riesgo y aliviar síntomas de diferentes afecciones (Tabla 3).

**Tabla 3***Beneficios de la espinaca para la salud y prevención de enfermedades*

<b>Afecciones</b>	<b>Beneficios de la espinaca</b>	<b>Referencia</b>
<b>Hipertensión</b>	Posee nitratos que son metabolizados por el cuerpo para producir óxido nítrico el cual tiene un efecto vasodilatador en las arterias contribuyendo de manera positiva a la presión arterial.	<b>(Jonvik et al., 2016)</b>
<b>Anemia</b>	Aporta alrededor de 4.1 mg de hierro por cada 100 g de espinaca, superando a la carne en un 30%.	<b>(Shohag et al., 2012)</b>
<b>Colesterol alto</b>	La fibra que aporta la espinaca regula la absorción del colesterol y los ácidos biliares, y sus sustancias antioxidantes reducen la oxidación del colesterol malo para prevenir la aterosclerosis.	<b>(Sun et al., 2016)</b>
<b>Digestión</b>	Sus niveles elevados de fibra ayudan a tener un buen tránsito intestinal y a una buena digestión, también ayuda a depurar el hígado.	<b>(Tshikalange et al., 2022)</b>
<b>Sobrepeso</b>	En muchas dietas de adelgazamiento se recomienda consumir espinaca ya que es muy ligero (22 cal/100 g) y vitamínico.	<b>(Stenblom et al., 2015)</b>
<b>Problemas en el embarazo</b>	Gracias a su gran contenido de ácido fólico y antianémico, se recomienda consumir espinaca durante el embarazo y la vitamina B9 también ayuda en la etapa de lactancia.	<b>(Marbrey et al., 2023)</b>
<b>Envejecimiento</b>	Sus propiedades antioxidantes y su alto contenido de vitamina E, ayudan a proteger la dermis de daños provocados por exceso de luz solar.	<b>(Xu et al., 2017)</b>
<b>Problemas de vista</b>	Los carotenoides presentes en la espinaca como la luteína y la zeaxantina generan una potente acción antioxidante en las células del sistema ocular retardando la pérdida visual provocado por la degeneración macular causada por el envejecimiento.	<b>(Mares, 2017)</b>

#### **1.1.2.4 Efecto del tiempo postcosecha**

Dentro de la agricultura el tiempo postcosecha de frutas, hortalizas y verduras es el responsable de mantener las propiedades internas estables por cierto período de tiempo, sin embargo, estas continúan madurando y envejeciendo con el paso de los días (**Abdelfattah et al., 2020**). Dentro de supermercados o mercados comerciales se almacenan a temperaturas de alrededor de 3-8 °C, para poder conservar sus propiedades y alargar su vida útil, sin embargo, las plazas del sector de Ambato no cuentan con un sistema de refrigeración o de conservas, por lo que, existen factores externos que afectan de manera significativa y aceleran el tiempo de postcosecha (**Feng et al., 2020**). Para el caso de la espinaca el factor más importante que afecta de manera directa es la producción del etileno el cual es compuesto gaseoso que producen de forma natural las frutas y verduras en la fase inicial del proceso de maduración, sin embargo, se ha reportado que este gas se produce incluso después de ser cosechado acelerando el proceso de maduración y senescencia (**Martínez et al., 2017**).

Según menciona **Zapata et al., (2017)** la espinaca produce etileno en niveles muy bajos alcanzando un valor menor al 0.1 µL al momento de ser cosechada, no obstante, se considera que la espinaca es muy susceptible al contacto con el etileno que existe en un ambiente compartido con frutas como: la manzana, mango, melón, plátano y aguacate y también las verduras como: el tomate que lo producen a gran escala (**Moreiras, 2013**). Por ende la conservación de la espinaca se ve amenazada en estos ambientes debido a que, al cabo de 1 semana de ser trasladadas a su venta las hojas se tornan amarillentas y la textura de las hojas decae considerablemente, produciendo un factor negativo en todos los centros de comercialización de la espinaca puesto que, comúnmente dentro de plazas, mercados o supermercados se las almacena o exhibe junto a frutas y verduras comprometiendo su tiempo de vida (**Suárez, 2021**).

#### **1.1.3 Métodos de detección de compuestos bioactivos**

Actualmente existen varios métodos de detección para sustancias bioactivas, minerales y vitaminas, dentro de los cuales se encuentra los métodos cromatográficos los cuales

se basan en un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas en donde existan más de una sustancia, el objetivo principal de este método es separar los distintos componentes de una solución madre. Este método utiliza un diferencial sobre la fase estacionaria, produciendo, una separación efectiva en función de los tiempos de retención para cada uno de los componentes de la mezcla (**Mannemala & Kannappan, 2015**). Investigaciones recientes han demostrado que la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) son eficaces en la identificación y separación de componentes bioactivos como los compuestos fenólicos y carotenoides de manera específica, puesto que, al estar disueltos en un medio líquido ya sea mediante disolventes polares o no polares la columna de HPLC resulta óptima para su análisis (**Bulut et al., 2019**).

Otra cromatografía que puede llegar a ser útil es la de Gases (GC), dentro de la cual la muestra se introduce mediante un vial (septum), en la cámara de inyección donde procede a evaporarse para ser transportada hasta el principio de la columna. La temperatura de la columna depende del tipo de disolvente que tenga la muestra el cual no debe estar por debajo del punto de ebullición, para poder ser condensado, la separación de compuestos bioactivos se da gracias a la presión del vapor, el cual es captado por el detector cuya respuesta aparece a manera de cromatograma (**Mommers & van der Wal, 2021**). A pesar de la alta resolución y la sensibilidad que ofrece la GC, este método por lo general no se usa para la determinación de compuestos bioactivos derivados de vegetales como: la luteína, zeaxantina y capsantina, debido a la falta de volatilidad que tienen la mayoría de ellos, especialmente cuando se trata de compuestos polares. Comúnmente su uso se centra en la separación de fitoquímicos antioxidantes como los flavonoides y los polifenoles que provienen de aceites esenciales de plantas o vegetales (**Rodríguez et al., 2020**).

Otro método de separación es la electroforesis capilar (CE), la cual se basa en un movimiento de migración de iones en disolución por medio de la atracción o repulsión que tiene un campo eléctrico, para lo cual se utiliza una disolución que contenga iones para poder introducir un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) para

aplicar un voltaje en ambas posiciones, ocasionando que se muevan a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta (**Stolz et al., 2019**). La muestra se introduce dentro del capilar reemplazando temporalmente a uno de los viales iniciales, comúnmente el del ánodo, por un vial que contenga la muestra posteriormente se aplica un potencial eléctrico para fijar la muestra y se vuelve a insertar el ánodo, finalmente se realiza una carga más a lo largo del capilar para provocar la separación (**Fukushi et al., 2019**).

Una vez separados de la muestra los compuestos bioactivos, pueden ser detectados por medio de detección óptica como, por ejemplo: UV-Vis, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja (**Ramautar, 2016**). Si bien es cierto que la técnica de HPLC es la más utilizada en cuestión a separación y análisis de compuestos bioactivos, la electroforesis capilar es una alternativa específicamente diseñada para la separación y cuantificación de compuestos cuyas cargas se encuentren en niveles bajos de peso molecular, como en el caso de los isoflavonas los cuales son compuestos fenólicos que están presentes en la soya, que comúnmente técnicas como HPCL no las pueden cuantificar, sin embargo, son de suma importancia para la prevención de enfermedades cardiovasculares (**Hrušková et al., 2022**).

Por otro lado, también hay que considerar las técnicas espectrofotométricas la cuales se basan en técnicas analíticas utilizadas para medir la cantidad de luz que puede absorber una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de una muestra en fase líquida. También puede usarse para medir la cantidad de un producto químico conocido en una determinada sustancia previamente diluida con algún solvente ya sea polar o apolar (**Valenzuela et al., 2016**). Para la implementación de este método es necesario conocer el tipo de compuesto que se quiere identificar debido a que, según investigaciones realizadas por **Mendoza et al., (2015)** los compuestos bioactivos como carotenoides y fenoles presentes en plantas poseen una longitud de onda específica para su detección e implementación de diversas fórmulas que requieren la absorción medida por el espectrofotómetro por ejemplo: los compuestos fenólicos se miden a una longitud de

onda de 750 nm. Sin embargo, este método cuenta con una desventaja la cual radica en que no cuenta con un mecanismo para poder separar varias sustancias de una misma muestra **(Ortiz et al., 2016)**.

#### **1.1.4 Moléculas antioxidantes**

##### **1.1.4.1 Estrés oxidativo**

Este tipo de estrés se da gracias a la oxidación que se encuentra presente de forma natural en el cuerpo humano esta ocurre por la presencia del oxígeno, si bien es cierto el oxígeno es indispensable para la vida, también es un elemento químico muy reactivo que genera radicales libres de manera normal por el metabolismo **(Bulut et al., 2019)**. Estos radicales libres se producen para el control de la musculatura, eliminación de bacterias y regulación de las actividades internas como órganos. Sin embargo, existen sobrantes de estos radicales libres que no se logran eliminar de manera natural, generando problemas y posibles enfermedades futuras comúnmente se asocia con daños en especies moleculares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. **(Baek et al., 2021)**.

##### **1.1.4.2 Actividad antioxidante**

La acción antioxidante hace referencia a la inhibición de los compuestos celulares restringiendo las reacciones con las cadenas oxidativas, producidos por reacciones oxido reductoras las cuales son una parte esencial del metabolismo aeróbico en los organismos vivos, para producir energía, fagocitosis, regulación del crecimiento celular, señalización entre células y síntesis de compuestos biológicos como el ATP **(Pérez et al., 2018)**. La acción antioxidante se da por medio de una transición redox, a través de una molécula antioxidante que libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre o puede dar origen a la formación de ligandos los cuales aceleran la quelación de iones metálicos como:  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  **(Vargas et al., 2014)**. Por ende, los compuestos como carotenoides y fenoles poseen la capacidad de interceptar y reaccionar con los agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres inactivando el estrés oxidativo que pueden llegar a tener si no se los elimina **(Pupo et al., 2017)**.

### 1.1.4.3 Actividad antioxidante de origen natural

El aprovechamiento de compuestos antioxidantes de origen natural no es un tema reciente, sin embargo, la mayoría de las personas no conocen los beneficios que tienen ciertos alimentos de origen natural, por lo que, prefieren consumir productos farmacológicos de origen químico que en muchos casos tienen un costo muy elevado y en ciertos casos su disponibilidad resulta limitada (Pérez et al., 2018). En la actualidad, los compuestos bioactivos están presentes en una gran variedad de frutas, hortalizas y vegetales de fácil acceso como se muestra en la Tabla 4, la mayoría de estos compuestos han presentado un alto nivel de actividad antioxidante superando incluso a los de origen químico puesto que, en su mayoría son carotenoides y fenoles, los cuales no poseen efectos adversos significativos si se los consume en su estado natural (Romero et al., 2022).

**Tabla 4**

*Ejemplos de compuestos bioactivos de origen natural*

<b>Alimento</b>	<b>Compuesto bioactivo</b>
Brócoli y col	Glucosinolatos
Zanahoria, mango y calabaza	Alfa y beta caroteno
Tomate	Licopeno
Uvas, moras, frambuesas y arándanos	Antocianinas
Melón, melocotón, papaya, naranja y mandarina	Flavonoides y criptoxantina
Espinaca, aguacate, maíz y melón	Luteína y zeaxantina

*Nota:* Adaptado de “Oxidative Stress” (p.177), *Citma Certificado*, 21(1).

### 1.1.4.4 Evaluación de la actividad antioxidante

En la actualidad existen varios métodos para evaluar la actividad antioxidante de un fármaco o extracto, esto se hace mediante evaluación *in vitro* y se lo puede realizar de dos maneras, la primera mediante transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y la segunda mediante la transferencia de electrones (ET) (Canelo et al., 2017). De los cuales destacan los siguientes:



El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de tipo HAT, en este ensayo se mide la fluorescencia final del compuesto fluoresceína el cual ayuda al diagnóstico a partir de una exposición a agentes oxidantes. Donde, mientras más se conserve la fluorescencia de la fluoresceína, mejor es la actividad antioxidante **(Benítez et al., 2020)**.

El ensayo de reducción férrica con poder antioxidante (FRAP) de tipo ET, el cual se basa en la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$  — TPTZ al complejo azul  $\text{Fe}^{2+}$  — TPTZ. Donde, el cambio en la coloración es directamente proporcional a la capacidad antioxidante **(Djeridane et al., 2015)**.

Por último, el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl radical) el cual es tanto HAT como ET. Este proceso ocurre mediante una reacción de reducción en donde, se evidencia un cambio en la coloración del reactivo DPPH, el cual inicia en una coloración violeta y pasan a ser de un color amarillo pálido cuando las moléculas presentes son capaces de reducir el DPPH **(Irivibulkovit et al., 2018)**.

#### **1.1.4.5 Fármacos utilizados con actividad antioxidante**

Si bien es cierto, muchos productos químicos que ayudan a mejorar la actividad antioxidante no tienen efectos inmediatos sobre la salud de las personas que los consumen, sin embargo, según menciona **Valenzuela & Pérez, (2016)** las altas dosis de compuestos antioxidantes que contengan como compuesto activo al butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y el galato de propilo (PG) a largo plazo estas moléculas antioxidantes sintéticas se les ha relacionado con varios efectos negativos en la salud humana como alergias en la piel, problemas del tracto gastrointestinal y un efecto cancerígeno **(Pupo et al., 2017)**. Por lo cual, la evaluación de la actividad antioxidante de moléculas naturales se ha incrementado constantemente.

### **1.1.5 Actividad antioxidante de los fenoles**

Dentro de los compuestos que más predominan en la espinaca se encuentran los fenólicos de los cuales podemos encontrar isómeros cis y trans del ácido p-cumárico, ácido gálico y ácido ferúlico. Todos ellos muestran en su estructura química grupos ( $\text{OH}^-$ ) unidos por anillos aromáticos, ocasionando que tenga propiedades antioxidantes ya que, dependiendo de la situación, pueden donar un átomo de hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) o un electrón a un radical libre de oxígeno para saturarlo y neutralizarlo (**Li et al., 2021**). Algunos de estos compuestos fenólicos contienen propiedades quelantes, es decir, que se adhieren a sustancias tóxicas, como el plomo, el cobre, el hierro, el cadmio y otros metales pesados eliminándolos por vía renal o por un proceso de digestión (**Cherubim et al., 2020**). Estos procedimientos son importantes debido que, estos agentes tóxicos son directamente responsables de más del 80% de enfermedades crónicas como la arterioesclerosis, la diabetes o la hipertensión arterial, además muchos de ellos han mostrado también actividad antiinflamatoria y antibacteriana, potenciando la acción del sistema inmune (**Zhou et al., 2021**).

### **1.1.6 Actividad antioxidante de los carotenoides**

Los carotenoides también son una parte importante en la composición de la espinaca puesto que, su actividad principal es la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS) cuyo papel es de suma importancia en el desarrollo y mantenimiento del estrés oxidativo y celular dentro de los cuales predominan luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina los cuales actúan como agentes antioxidantes protegiendo a la célula contra el estrés oxidativo disipando la energía que se encuentra en exceso a través del ciclo de las xantofilas y eliminando las ROS (**Bulut et al., 2019**). Estos compuestos son considerados como fotosensibles debido que, puede existir una variación entre la cantidad de los pigmentos fotosintéticos primarios y secundarios, en donde, los primarios comúnmente disminuyen si se encuentran en exceso de luz, mientras que los carotenoides secundarios aumentan, sin embargo, se recomienda mantener estos compuestos fuera del alcance de la luz para preservar su propiedades (**Martínez et al., 2017**).

### **1.1.7 Extracción con disolventes orgánicos**

El proceso de extracción se basa en la separación y purificación de un compuesto de interés por medio de una transferencia selectiva utilizando un medio sólido o líquido (disolvente orgánico) (**Pupo et al., 2017**). Esta técnica se basa en las diferencias de solubilidad del compuesto de interés, el disolvente y otros factores, uno de ellos es la capacidad de solubilidad en un medio acuoso puesto que, la temperatura de ebullición permite eliminar o neutralizar el disolvente una vez realizada la extracción, esto se utiliza en muchos casos en donde se requiere aislar el disolvente de los componentes bioactivos presentes en la muestra (**Cherubim et al., 2020**). Sin embargo, la efectividad que pueden llegar a tener depende de factores como: la temperatura, concentración del disolvente, tiempo de secado o macerado y la relación que existe entre material vegetal y volumen del disolvente orgánico, de entre ellos destaca el etanol ya que es considerado como un disolvente óptimo para compuestos polares como carotenoides y fenoles (**Romero, 2014**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 General**

Evaluar los compuestos bioactivos y su actividad antioxidante presentes en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) provenientes de residuos de la Plaza San Jacinto ubicada en la parroquia Izamba, cantón Ambato, provincia Tungurahua.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Obtener extractos de compuestos bioactivos de espinaca a partir de diferentes tiempos de cosecha.
- Determinar que extracto presenta mayor concentración de carotenoides y fenoles totales mediante espectrofotometría y aplicando el método de Folin y Ciocalteu.
- Comparar si la capacidad antioxidante de los extractos disminuye según su tiempo de cosecha mediante el método DPPH (2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil).

## CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1 Recursos institucionales

Laboratorios académicos y UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

#### 2.1.2 Material vegetal

Las hojas de espinaca se recolectaron tomando en cuenta la siguiente proporción:

**Tabla 5**

*Material vegetal*

<b>MATERIAL VEGETAL</b>	<b>CANTIDAD</b>
Hojas de espinaca	100 g

#### 2.1.3 Materiales de laboratorio

Para el presente proyecto se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio:

**Tabla 6**

*Materiales de laboratorio*

<b>MATERIAL</b>	<b>CANTIDAD</b>
Frascos ámbar (125 mL)	2
Frascos ámbar (60 mL)	13
Matraces Erlenmeyer (1L)	2
Matraces aforados (10 mL)	6
Vasos de precipitación (50 mL)	6
Probetas graduadas de 100 mL	2
Magnetos Elicrom	6

<b>MATERIAL</b>	<b>CANTIDAD</b>
Papel aluminio (DIAMOND)	1
Papel absorbente	1
Papel absorbente	1
Papel Filtro	1
Micropipeta (10 – 50 $\mu$ L)	1
Micropipeta (100 – 1000 $\mu$ L)	1
Puntas de micropipeta	1
Peras de succión	2
Placas de 96 pocillos	1
Pipetas Graduadas (5 - 25 mL)	2

#### **2.1.4 Equipos**

Para el presente proyecto se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio:

**Tabla 7**

*Equipos de laboratorio*

<b>EQUIPO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Balanza analítica Ohaus PA-313	1
Balanza de humedad Kern MLS 50-3	1
Computador Lenovo con sistema operativo Windows 11	1
Destilador de agua QUMIS	1
Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go	1
Deshidratador por convección GANDER MTN	1
Planca calefactora Corning PC-420D	1
Refrigerador Indurama	1
Statgraphics (Centurión XIX 64-bit)	1

### 2.1.5 Reactivos

Para el presente proyecto se utilizaron los siguientes reactivos:

**Tabla 8**

*Reactivos de laboratorio*

REACTIVOS	CANTIDAD
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) 70%	1L
Reactivo Folin Ciocalteu 2N, Merck	5 mL
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 99%	5 g
Ácido gálico (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ) 98%	2 g
2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH)	1 g
Metanol (CH <sub>3</sub> OH) 80%	500 mL
Agua destilada	5L

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Recolección del material vegetal

Las hojas de espinaca se obtuvieron de la Plaza San Jacinto ubicada en la parroquia Izamba, de la ciudad de Ambato. Una vez recolectadas las hojas de espinaca se las almacenó en dos cajas cada una rotulada con la fecha para su análisis al cabo de 1 semana y la segunda caja rotulada para su análisis al cabo de 2 semanas de su tiempo de cosecha y se las trasportó al Laboratorio de investigación UODIDE 2.6 (conservación de alimentos) y 2.4 (Alimentos funcionales), de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

### 2.2.2 Obtención del material vegetal molido

El proceso de molienda de las hojas de espinacas se lo realizó desinfectando superficialmente mediante un lavado constante con agua, para retirar la mayor cantidad de impurezas o residuos que pueda tener la hoja. Posteriormente, se cortaron de manera transversal y se colocaron en el deshidratador por convección GANDER MTN a una temperatura de 60 °C para poder retirar la humedad de manera efectiva, esto se lo

realizó por un tiempo de 5 horas (Nemzer et al., 2021). Una vez obtenido el material seco se retiró de las bandejas para realizar el molido utilizando un molino triturador INOX-EQUIP, después se almacenaron en fundas Ziploc rotuladas acorde a su tiempo de cosecha, posteriormente se pesaron en una balanza analítica Ohaus PA-313 registrando su peso. Este proceso se lo realizó en el laboratorio de conservación de alimentos 2.6 perteneciente a la UODIDE.

### **2.2.3 Preparación del disolvente etanólico**

El proceso de extracción se lo realizó pesando 4 g del material seco y molido teniendo en cuenta el tiempo de cosecha el cual fue de una semana tras el almacenamiento de las muestras y otro después de dos semanas, para este procedimiento se empleó etanol a una concentración del 70% como disolvente. Posteriormente se ensayó utilizando una relación 1:10, es decir, 1 g de material vegetal en 10 ml de cada solución por triplicado, el disolvente se lo mantuvo a una temperatura de 60 °C utilizando una placa calefactora, puesto que, es una temperatura óptima para mantenerse debajo de los rangos de ebullición (Bulut et al., 2019). Los tiempos de extracción fueron de 30 y 60 min. Una vez finalizado el tiempo los extractos se filtraron a través de filtros de 0.22 µm y fueron almacenados en frascos de vidrio ámbar a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis (Pérez et al., 2018). Este proceso se lo llevó a cabo en el laboratorio de alimentos funcionales 2.4 perteneciente a la UODIDE.

### **2.2.4 Determinación de la masa de sólidos extraídos**

En este apartado se midió la masa de sólidos presentes en los extractos, para lo cual se procedió a tarar la Balanza de humedad Kern MLS 50-3, para poder añadir 4 ml de los extractos líquidos obtenidos de las hojas asegurándose de no sobrecargar el equipo, seguidamente se recopilaron los valores obtenidos en la balanza. Para calcular el porcentaje de sólidos solubles totales (SST), los cálculos se realizaron mediante la diferencia del cien por ciento menos la humedad obtenida anteriormente (Ecuación 1) (García & Fernández, 2012). Este cálculo se lo realizó en el laboratorio de caracterización microscópica 1.1 perteneciente a la UODIDE, utilizando la siguiente ecuación:



$$\% SST = 100 - \% Humedad \quad (\text{Ecuación 1})$$

Posteriormente, la masa de sólidos extraídos (MSE) se calculó mediante el volumen obtenido del extracto durante el proceso de extracción y el resultado del % SST (Ecuación 2).

$$(MSE) = \frac{\% SST}{100} * V(mL) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

%SST: Porcentaje de sólidos solubles totales

V: Volumen del extracto

Finalmente, se calculó el porcentaje de eficiencia para cada uno de los extractos obtenidos (Ecuación 3).

$$\text{Eficiencia de extracción} = \frac{MSE}{W (g)} * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

MSE: Masa de sólidos extraídos

W (g): Peso inicial de espinaca

### 2.2.5 Determinación de carotenoides totales

Para determinar la concentración de carotenoides totales presentes en el extracto, se tomó en cuenta el coeficiente de absorción para mezclas de carotenoides cuyo valor es de 2500 según menciona **Bunea et al., (2008)**. Para lo cual, se realizó una dilución 1/100 de la muestra tomando 10  $\mu$ L y se aforó con etanol (70%) el cual se utilizó como blanco para poder colocarlo en la celda de medición del espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go, esto se realizó por triplicado. Este procedimiento es recomendado por el Manual Harvest Plus para análisis de carotenoides totales

(Ecuación 4) (**Schmalzer et al., 2008**). Este cálculo se lo llevó a cabo en el laboratorio de caracterización microscópica 1.1 perteneciente a la UODIDE, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenoides totales} = \frac{(\text{ABS} * V \text{ (ml)} * 10^4)}{A \text{ (1\%)} * w \text{ (g)}} = \mu\text{g/g muestra} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

ABS: Absorbancia medida a 450 nm

V: Volumen muestra (mL)

A 1%: Coeficiente de absorción recomendado por Manual Harvest Plus para análisis de carotenoides totales 2500  $A_{1cm}^{1\%}$

W: Peso de la muestra (g)

### 2.2.6 Determinación de fenoles totales

Para determinar el contenido fenólico total presente en el extracto, se usó el método de Folin y Ciocalteu modificado. Para lo cual, se utilizó una placa de 96 micropocillos en los cuales se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto con 130  $\mu\text{L}$  de agua destilada, posteriormente, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N. Al cabo de 6 minutos de reacción se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio al 7% (p/v), posteriormente se incubaron durante 90 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (**Pérez et al., 2018**).

Finalmente se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go. Para el proceso de calibración se utilizó una curva estándar, preparada con soluciones seriadas de ácido gálico (GAE) las cuales variaron de 10 a 100 mg/L. El contenido fenólico total se expresó como equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g DW) (**Baek et al., 2021**). Este proceso se lo realizó en el laboratorio de caracterización microscópica 1.1 perteneciente a la UODIDE.

### 2.2.7 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó en el laboratorio de caracterización microscópica 1.1 perteneciente a la UODIDE, para lo cual se utilizó el compuesto químico DPPH (2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil), el cual posee un electrón desapareado que es susceptible a reacciones con compuestos oxidantes. Para este procedimiento, se utilizó una placa de 96 pocillos donde se colocaron 20 µL de extracto diluido o disolución estándar, con 180 µl del reactivo (DPPH) disuelto en metanol y agua en proporción (80:20) a una concentración de 150 µmol/L, posteriormente se agitaron por 60 segundos, la placa fue incubada en un tiempo de 40 minutos en ausencia de la luz a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron las lecturas de la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm a 25 °C en el espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go (Poma et al., 2015).

Para calcular el porcentaje de inhibición del compuesto DPPH sobre los extractos, se realizó una curva de calibración con una solución estándar utilizando el compuesto trolox, mediante la ecuación de la recta se determinó la concentración del equivalente trolox al porcentaje de inhibición obtenido en los extractos. Finalmente, los resultados se obtuvieron como µmol de trolox/g de muestra aplicando (Ecuación 5) (Bobo et al., 2015).

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[ 1 - \left( \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la solución de DPPH con los extractos o estándar

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia conformada DPPH y agua como control

$A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia del metanol.

### 2.2.8 Planteamiento del diseño experimental

Para el análisis de los resultados obtenidos, se cuantificó la eficiencia de extracción de acuerdo a la metodología planteada, en el cual se determinó la concentración de carotenoides y fenoles totales, para lo cual se tomó en cuenta la influencia del tiempo

de cosecha (semanas) y el tiempo de extracción de (30 y 60 min) utilizando el siguiente diseño experimental (Tabla 9):

**Tabla 9**

*Modelo del diseño experimental AxB*

Tiempo de cosecha (semanas)						
Tiempo Extracción (min)	Primera			Segunda		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30	E1R1	E1R2	E1R3	E2R1	E2R2	E2R3
60	E3R1	E3R2	E3R4	E4R1	E4R2	E4R3

*Nota.* En la presente tabla se muestra el modelo que se realizó para el análisis de la concentración de carotenoides y fenoles totales en relación a los factores planteados.

Se empleó el Software Statgraphics XVII64x en su versión gratuita (Centurión XIX 64-bit) para el análisis de datos estadísticos y gráficos, para lo cual se aplicó un diseño AxB en la etapa de extracción de carotenoides y fenoles totales por triplicado, se evaluó el mejor tratamiento a partir del análisis ANOVA para cada uno de los análisis, en los cuales se verificó la eficacia de los factores, interacciones y tratamientos, así mismo (**Dagnino, 2014**). Una vez que se determinó la existencia de una significancia del 95 % ( $p < 0.05$ ) en la aplicación de los tratamientos y las variables, se procedió a analizar mediante diagramas de Pareto y superficie de respuesta para la determinación del mejor tratamiento. Cabe recalcar que los datos que se aplicaron para el análisis de actividad antioxidante tanto para fenoles como para carotenoides totales presentes en el extractos, fueron los que presentaron el valor más alto en ambos casos, la validez del modelo vendrá determinada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el nivel de significancia ( $p$ ) (**Jiménez et al., 2017**).

**Hipótesis:**

**Hipótesis nula:** El tiempo de cosecha no influye en el contenido de carotenoides y fenoles totales presentes en la espinaca.

**Hipótesis alternativa:** El tiempo de cosecha si influye en el contenido de carotenoides y fenoles totales presentes en la espinaca.

**Variables:**

**Variable independiente:** Tiempo de extracción (min) y tiempo de cosecha (semana).

**Variable dependiente:** Concentración de fenoles y carotenoides totales con actividad antioxidante.

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1 Determinación de masa de sólidos extraídos

La masa de sólidos extraídos establece las condiciones óptimas para la extracción puesto que, permite cuantificar los sólidos solubles totales (SST) presente en la espinaca que se extraen por el disolvente, estableciendo una relación óptima entre los tratamientos aplicados (Naviglio et al., 2019). Esto se realizó mediante la evaluación de dos factores: el tiempo de postcosecha (semana 1 y 2) y el tiempo de extracción (30 y 60 min), para lo cual, se utilizó un diseño experimental AxB con lo cual se logró determinar el mejor tratamiento a partir de la obtención de SST. En la Tabla 10, se observan los porcentajes de SST, masa de sólidos extraídos y la eficiencia de extracción.

**Tabla 10**

*Sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y eficiencia de extracción*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>SST (%)</b>	<b>Masa de sólidos extraídos (g)</b>	<b>Eficiencia de extracción (%)</b>
E1R1	1	30	2.509	0.577	14.428
E1R2	1	30	2.193	0.500	12.493
E1R3	1	30	2.676	0.628	15.565
E2R1	2	30	1.059	0.222	5.465
E2R2	2	30	1.442	0.288	7.127
E2R3	2	30	1.708	0.358	8.915
E3R1	1	60	2.090	0.480	11.982
E3R2	1	60	2.709	0.623	15.414

E3R3	1	60	3.686	0.847	20.775
E4R1	2	60	1.826	0.365	9.130
E4R2	2	60	2.068	0.413	10.135
E4R3	2	60	1.742	0.348	8.667

*Nota.* La tabla presenta los factores para cada uno de los tratamientos y réplicas por triplicado para la extracción de sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y la eficiencia de la extracción de la espinaca.

**Tabla 11**

*Promedio de las réplicas para los sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y eficiencia de extracción*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>SST (%)</b>	<b>Masa de sólidos extraídos (g)</b>	<b>Eficiencia de extracción (%)</b>
E1	1	30	2.459±0.24	0.568±0.06	14.162±1.55
E2	2	30	1.403±0.32	0.298±0.08	7.169±1.72
E3	1	60	2.828±0.40	0.651±0.18	16.057±4.43
E4	2	60	1.878±0.16	0.375±0.03	9.311±0.75

*Nota.* La tabla presenta los promedios para cada uno de los tratamientos y su desviación estándar para sólidos solubles totales, masa de sólidos extraídos y la eficiencia de la extracción de la espinaca.

La muestra que presentó mayor porcentaje de SST fue el tratamiento E3 el cual tiene un tiempo postcosecha de 1 semana en un tiempo de extracción de 60 min, cuyo valor fue de: 2.828±0.40 %. Por otro lado, para la semana postcosecha 2 se obtuvo un valor de 1.878±0.16 % en un tiempo de 60 min para el tratamiento E4. Según menciona **Sravan et al., (2015)** los SST extraídos dependen del estado de maduración que tiene la planta al momento de ser cosechada, esto ocurre mientras más tiempo postcosecha sea la

cantidad de solidos solubles disminuye entre un 10 – 20% esto ocurre para poder retrasar el envejecimiento natural de la mayoría de frutas y verduras.

Por ende, los porcentajes obtenidos en el presente ensayo se encuentran dentro de los rangos aceptables para la determinación de SST extraídos, puesto que, investigaciones realizadas por **Espinoza et al., (2018)** afirma que, la espinaca procesada en un medio liquido (puré) no debe sobrepasar el 11.48% de SST. Sin embargo, estos valores pueden variar según las condiciones de maduración y la relación entre material vegetal/disolvente debido que, al momento de extracción mediante agitación magnética el etanol al 70% o menor tiende a evaporarse por el contenido de agua presente disminuyendo la cantidad de extracto que se obtiene (**Martínez et al., 2017**).

Por medio del análisis estadístico ANOVA se observó la relación de los factores para poder determinar las condiciones óptimas de extracción que presentaron cada uno de los tratamientos obtenidos a partir de la espinaca, mediante la Tabla 12 se determinó que el factor A posee un valor significativo puesto que, el valor p es menor de 0.05, adicionalmente el diagrama de Pareto (Figura 2) indicó que mientras más bajo sea el tiempo de postcosecha la eficiencia de extracción será mayor (**Pérez et al., 2018**).

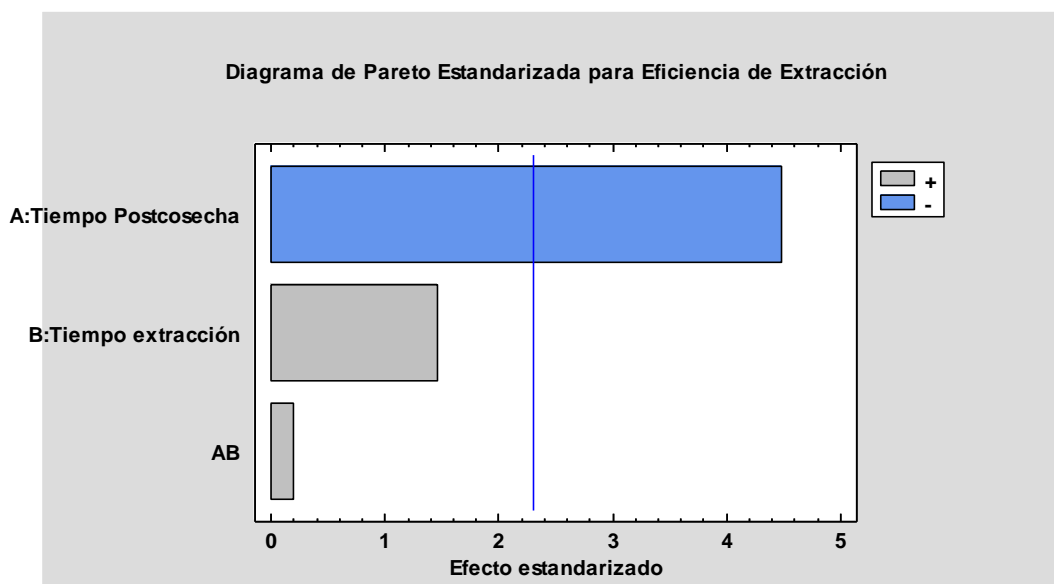
**Tabla 12**

*Análisis de varianza (ANOVA) para la selección optima de extracción de la espinaca*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: Tiempo Postcosecha</b>	134.875	1	134.875	20.16	<b>0.0020</b>
B: Tiempo extracción	14.3433	1	14.3433	2.14	0.1813
AB	0.255275	1	0.255275	0.04	0.8500
Error total	53.5299	8	6.69124		
Total (corr.)	203.003	11			

*Nota.* La presente tabla muestra relación entre los factores y el valor p obtenido en cada caso.





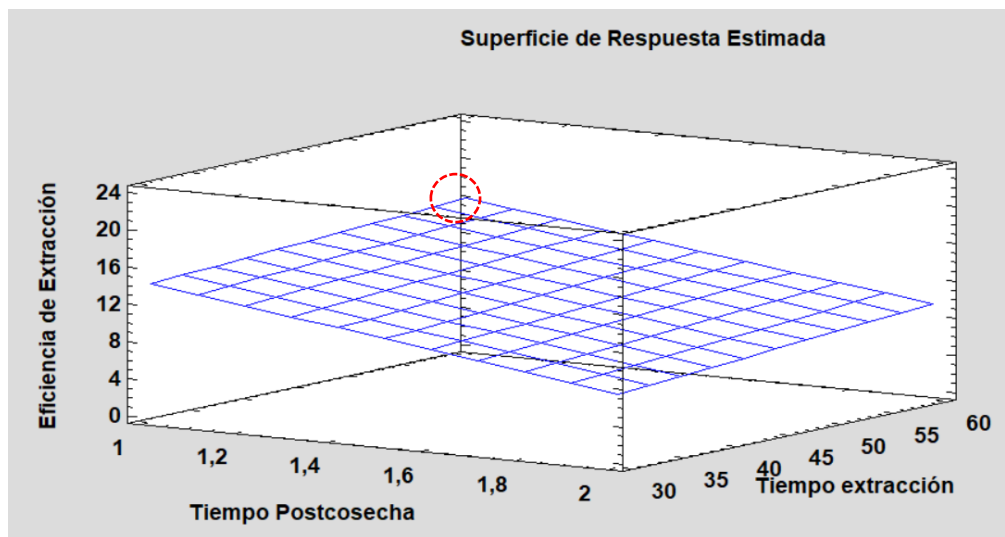
**Figura 2.** Análisis estadístico diagrama de Pareto Estandarizada tratamientos de espinaca.

La Tabla 13 representa el valor óptimo para poder maximizar la eficiencia de extracción la cual corresponde al tiempo de postcosecha de la semana 1 en un tiempo de 60 min puesto que, el valor estimado bajo estas condiciones fue de 20.057% el cual está representado por un círculo de color rojo (Figura 3). Esto se debe, gracias a la interacción entre el tiempo que tarda en madurar la planta, el cual tiende hacer inversamente proporcional a la eficiencia de extracción puesto que, investigaciones realizadas por **Kandel et al., (2019)** demostraron las plantas como la espinaca, col y lechuga tras un tiempo de cosecha de 24 h, la eficiencia de extracción se encuentra en un 85% mientras que, al cabo de 72 h la eficiencia decae a un 65%. Por ende, el valor óptimo obtenido en la Tabla 13 demuestra que la obtención de compuestos bioactivos a partir de la espinaca al cabo de 1 semana, aún resulta viable.

**Tabla 13**

*Valor óptimo de la eficiencia de extracción*

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo Postcosecha	1	2	1
Tiempo extracción	30	60	60
Valor Óptimo	20.057 %		



**Figura 3.** Análisis estadístico Superficie de Respuesta para los tratamientos de espinaca.

### 3.1.2 Determinación de carotenoides totales presentes en los extractos de espinaca

Los criterios para determinar carotenoides totales presentes en una muestra líquida se dan por varias formas, para esta investigación se optó por utilizar una técnica de espectrofotometría sustentada mediante un fórmula propuesta por **Schmalzer et al., (2008)**, la cual refleja la cantidad de muestra y volumen utilizado de disolvente a una absorción espectrofotométrica de 450 nm para este compuesto. Cabe recalcar, que los factores que más afectan a la concentración de este compuesto son la luz y la humedad, esto se debe ya que al utilizar un disolvente como el etanol las moléculas polares extraídas son más susceptibles a la degradación por la radiación (UV) por ende, se almacenaron las muestras en frascos ámbar y en refrigeración a 4°C (**Marbrey et al., 2023**).

El tratamiento que presentó una mayor concentración de carotenoides totales fue el tratamiento E3 el cual tiene un tiempo postcosecha de 1 semana en un tiempo de extracción de 60 min, cuyo valor fue de:  $131.108 \pm 6.53 \mu\text{g/g}$ . Por otro lado, para la semana postcosecha 2 se obtuvo un valor de  $93.868 \pm 6.88 \mu\text{g/g}$  en un tiempo de 60 min para el tratamiento E1. Esto se debe principalmente, a que la interacción entre el tiempo postcosecha y la concentración de carotenoides es inversamente proporcional, debido a que las propiedades fitoquímicas de la espinaca especialmente los carotenoides, son

susceptibles al contacto con factores externos como la degradación de por luz UV, humedad y la temperatura condiciones que están presentes en plazas tras ser cosechadas (Cai et al., 2021).

**Tabla 14**

*Resultados de la concentración de carotenoides totales presentes en la espinaca*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (450 nm)</b>	<b>Concentración de carotenoides totales (µg/g)</b>
E1R1	1	30	0.249	91.730
E1R2	1	30	0.252	92.245
E1R3	1	30	0.276	103.913
E2R1	2	30	0.265	89.096
E2R2	2	30	0.275	88.138
E2R3	2	30	0.283	95.412
E3R1	1	60	0.337	124.187
E3R2	1	60	0.336	131.973
E3R3	1	60	0.372	137.165
E4R1	2	60	0.271	87.008
E4R2	2	60	0.213	100.772
E4R3	2	60	0.293	93.824

*Nota.* La tabla presenta la concentración de carotenoides totales obtenidos por triplicado, medidos a una longitud de onda de 450 nm.

**Tabla 15***Promedio de las réplicas para la concentración de carotenoides totales*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (450 nm)</b>	<b>Concentración de carotenoides totales (µg/g)</b>
E1	1	30	0.259±0.01	95.962±6.89
E2	2	30	0.274±0.00	90.882±3.95
E3	1	60	0.348±0,02	131.108±6.53
E4	2	60	0.259±0.04	93.868±6.88

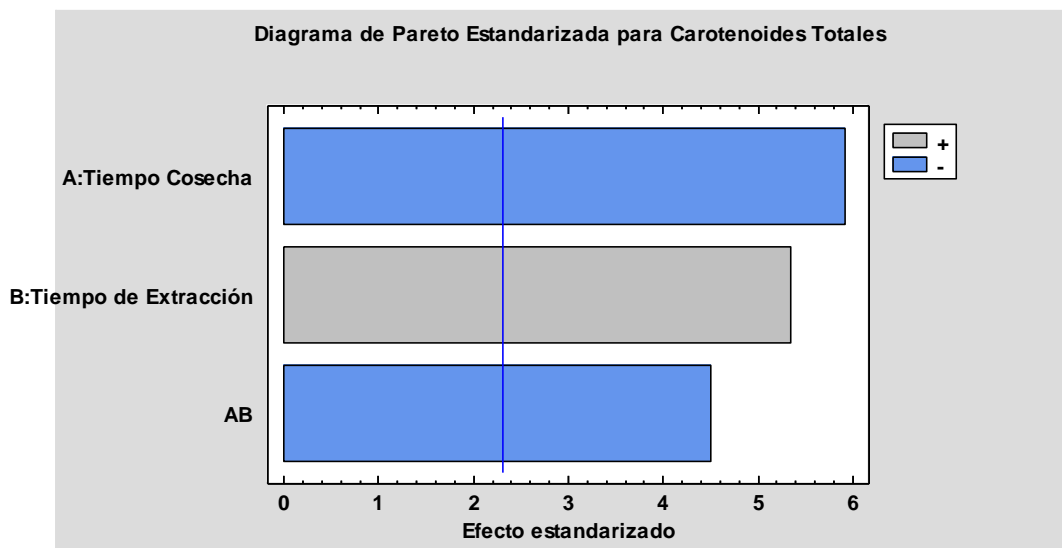
*Nota.* La tabla presenta el promedio de la concentración de carotenoides totales obtenidos y su desviación estándar, medidos a una longitud de onda de 450 nm.

Por medio del análisis estadístico ANOVA se observó la relación de los factores para poder determinar la concentración de carotenoides totales, la Tabla 16 determinó que si existe diferencias significativas entre los factores (A y B) puesto que, el valor p es menor de 0.05 para ambos factores, también se estimó que la interacción entre los dos factores presenta diferencias significativas, adicionalmente el diagrama de Pareto (Figura 4) indicó que mientras menor sea el tiempo de postcosecha la concentración de carotenoides totales aumentan de manera significativa (Mitra et al., 2021).

**Tabla 16**

*Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de carotenoides totales presentes en la espinaca*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A: Tiempo Cosecha</b>	1343.35	1	1343.35	35.09	<b>0.0004</b>
<b>B: Tiempo de Extracción</b>	1090.49	1	1090.49	28.49	<b>0.0007</b>
<b>AB</b>	775.707	1	775.707	20.26	<b>0.0020</b>
Error total	306.258	8	38.2823		
Total (corr.)	3515.81	11			



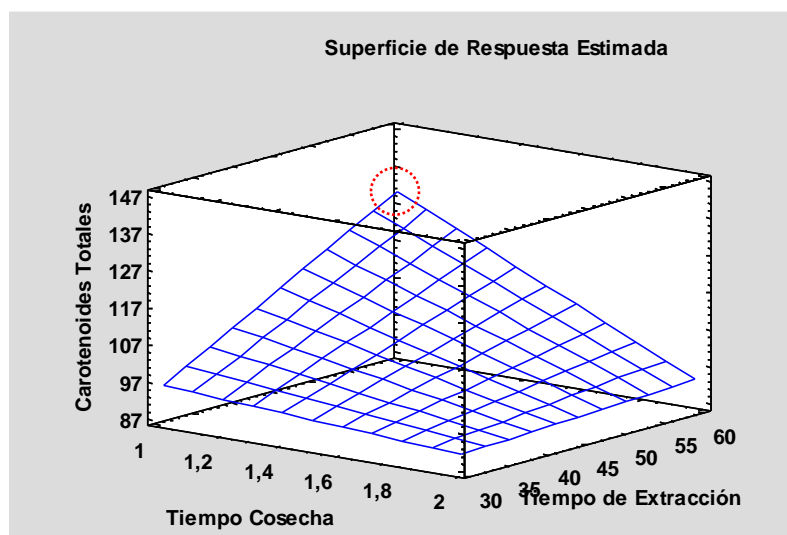
**Figura 4.** Análisis estadístico diagrama de Pareto estandarizada para carotenoides totales.

La Tabla 17 representa el valor óptimo para poder maximizar la concentración de carotenoides totales, la cual corresponde al tiempo de postcosecha de la semana 1 en un tiempo de 60 min puesto que, el valor estimado bajo estas condiciones fue de 137.109  $\mu\text{g/g}$ , el cual está representado por un círculo de color rojo (Figura 5), en donde, investigaciones realizadas por **Beltrán et al., (2012)**, menciona que la ingesta de espinaca fresca (cruda) contiene los siguientes carotenoides específicos: luteína (41.5%),  $\beta$ -caroteno (25.1%), violaxantina (21.2%) y neoxantina (12.2%) los cuales proporcionan un estimado de 225.58  $\mu\text{g/g}$  obtenidos de carotenoides totales. Cabe recalcar que el método de deshidratación utilizado en este estudio fue un proceso de liofilización, el cual destaca por conservar de mejor manera la integridad interna del material vegetal, en comparación al método de deshidratación por convección utilizado en este proyecto de investigación (**Bhatta et al., 2020**). Sin embargo, se estima que la concentración obtenida por medio del análisis realizado, se encuentra dentro de un rango óptimo puesto que, la diferencia entre los métodos no es significativa en relación al tiempo postcosecha para la espinaca.

**Tabla 17**

*Valor óptimo de la concentración de carotenoides totales*

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Tiempo Cosecha	1	2	1
Tiempo de Extracción	30	60	60
Valor Óptimo	137.109 µg/g		



**Figura 5.** Análisis estadístico Superficie de Respuesta para concentración de carotenoides totales presentes en la espinaca.

### 3.1.3 Determinación de fenoles totales presentes en los extractos de espinaca

La determinación de compuestos fenólicos totales (TPC) se realizó por medio de una curva estándar a partir de ácido gálico, los resultados se expresaron como mg de GAE/g biomasa seca, el contenido promedio de fenoles totales se calcularon en base a la ecuación de regresión lineal  $A_{750\text{ nm}} = 0.0027 [\text{GAE}] + 0.113$  con un  $R^2$  de 0.9989 (Anexo A). Según menciona **Yang et al., (2020)**, el ácido gálico es considerado como un fenol natural el cual está presente en una gran variedad de frutas, hortalizas y vegetales por lo que, es ampliamente utilizado como un estándar puesto que, si el contenido se encuentra dentro de la curva estándar de ácido gálico se puede cuantificar la presencia de fenoles totales en los extractos analizados (**Wianowska & Olszowy, 2023**). Como se muestra en la Tabla 19 el tratamiento que presentó una mayor

concentración de fenoles totales fue el tratamiento E2 el cual tiene un tiempo postcosecha de 2 semanas en un tiempo de extracción de 30 min, cuyo valor fue de:  $26.830 \pm 2.08$  mg GAE/g biomasa seca. Por otro lado, para la semana postcosecha 1 se obtuvo un valor  $21.728 \pm 8.14$  mg GAE/g biomasa seca en un tiempo de 60 min para el tratamiento E3.

**Tabla 18**

*Determinación de fenoles totales*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (750 nm)</b>	<b>Concentración de Fenoles totales (mg GAE/g biomasa seca)</b>
E1R1	1	30	0.152	14.444
E1R2	1	30	0.162	18.271
E1R3	1	30	0.181	27.407
E2R1	2	30	0.188	27.777
E2R2	2	30	0.179	24.444
E2R3	2	30	0.189	28.271
E3R1	1	60	0.160	17.530
E3R2	1	60	0.157	16.543
E3R3	1	60	0.197	31.111
E4R1	2	60	0.167	20.246
E4R2	2	60	0.174	22.839
E4R3	2	60	0.169	20.987

*Nota.* La tabla presenta las absorbancias obtenidas para determinar la concentración de fenoles totales por triplicado a partir de una curva estándar de ácido gálico.

**Tabla 19**

*Promedio de las réplicas para la concentración de fenoles totales*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (750 nm)</b>	<b>Concentración de Fenoles totales (mg GAE/g biomasa seca)</b>
E1	1	30	0.165±0.01	20.040±6.66
E2	2	30	0.185±0.00	26.830±2.08
E3	1	60	0.171±0.02	21.728±8.14
E4	2	60	0.170±0.02	21.335±1.33

*Nota.* La tabla presenta el promedio de la concentración de fenoles totales obtenidos y su desviación estándar, medidos a una longitud de onda de 750 nm.

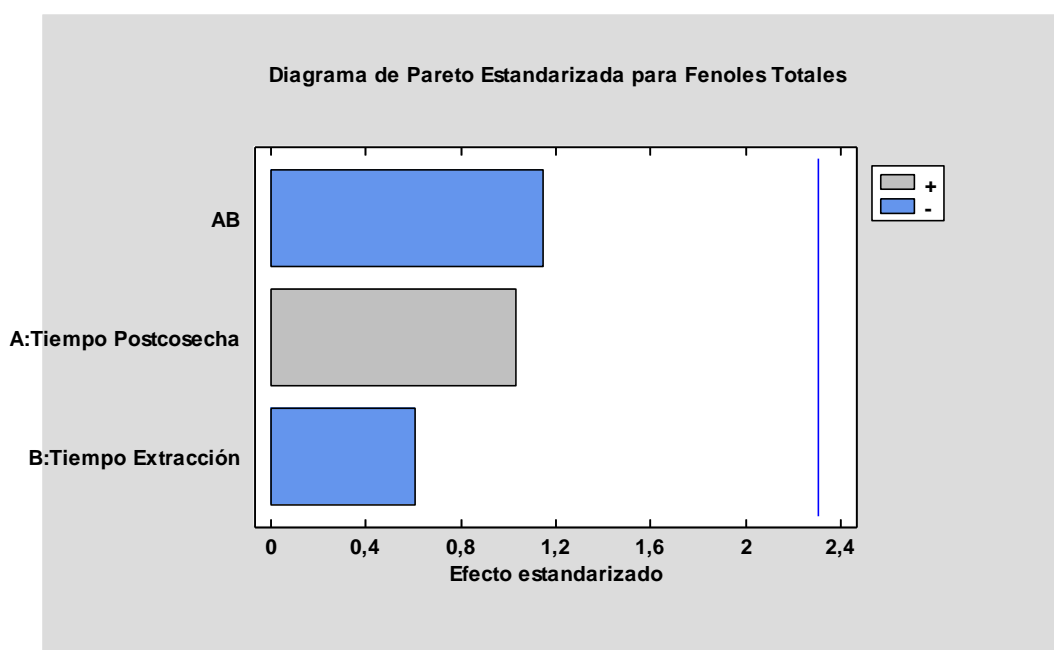
Por medio del análisis estadístico ANOVA se observó la relación de los factores para poder determinar la concentración de fenoles totales que presentaron cada uno de los tratamientos obtenidos a partir de la espinaca, mediante la Tabla 20 se determinó que no existen diferencias significativas entre los factores (A y B) puesto que, el valor p es mayor de 0.05 para ambos factores, también se estimó que la interacción entre los dos factores no presenta diferencias significativas ya que su valor p es mayor de 0.05. Adicionalmente el diagrama de Pareto (Figura 6) detalla que no existe una relevancia significativa que afecte a la concentración de fenoles totales. Esto ocurre gracias a que los compuestos fenólicos no se ven afectados por temperaturas inferiores a 60°C ya sea en su etapa de extracción como de almacenamiento, también al estar en un medio etanólico no sufre degradación puesto que su polaridad mantiene sus moléculas estables (Nieto et al., 2018).



**Tabla 20**

*Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de fenoles totales presentes en la espinaca*

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo Postcosecha	30.9059	1	30.9059	1.06	0.3336
B: Tiempo Extracción	10.7503	1	10.7503	0.37	0.5607
AB	38.4564	1	38.4564	1.32	0.2842
Error total	233.499	8	29.1874		
Total (corr.)	313.612	11			



**Figura 6.** Análisis estadístico diagrama de Pareto estandarizada para fenoles totales.

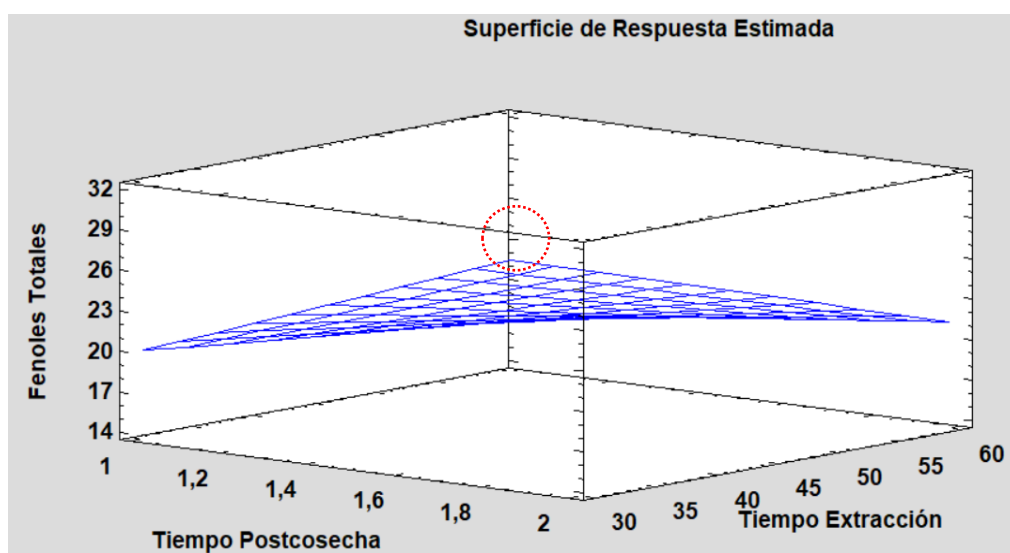
Según detalla la Tabla 21, el valor óptimo para obtener una mayor concentración de fenoles totales corresponde a un tiempo de postcosecha de 2 semanas en un tiempo de 30 min puesto que, el valor estimado bajo estas condiciones la concentración esperada de 26.8307 mg GAE/g de biomasa seca (Anexo A), el cual está representado por un círculo de color rojo (Figura 7). Según el estudio realizado por **Román et al., (2018)**

menciona que el contenido fenólico de la espinaca no decae con el proceso de maduración o senescencia puesto que, en dicho estudio se obtuvieron valores de 432.9 y 420.2 mg equivalentes de ácido Gálico/ 100 g de peso fresco, en los cuales los tiempos de postcosecha fueron de 75 y 95 h respectivamente. Cabe recalcar que esta concentración está presente en espinaca fresca por lo cual, el contenido óptimo de fenoles totales establecido para el tiempo de postcosecha es menor al estimado, sin embargo, no se lo considera como un valor despreciable para la obtención de compuestos fenólicos.

**Tabla 21**

*Valor óptimo de la concentración de fenoles totales*

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Tiempo Postcosecha	1	2	2
Tiempo Extracción	30	60	30
Valor Óptimo	26.8307 mg GAE/g biomasa seca		



**Figura 7.** Análisis estadístico Superficie de Respuesta para concentración de fenoles totales presentes en la espinaca.

### **3.1.4 Determinación de la actividad antioxidante de los carotenoides y fenoles totales presentes en los extractos de espinaca**

El ensayo DPPH establece la capacidad reductora de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de espinaca para que logren dirigirse hacia el radical DPPH, esto se da por una reducción directa mediante la transferencia de electrones o por eliminación de los radicales por medio de una transferencia de átomos de hidrógeno (**Benítez et al., 2020**). Como se observa en la Tabla 22 todos los extractos que obtuvieron mayor contenido de carotenoides y fenoles totales presentaron la capacidad para neutralizar el efecto oxidativo de los radicales DPPH. La actividad antioxidante de los extractos de espinaca se determinó mediante el ensayo de actividad captadora de radicales libres DPPH. En donde, los resultados de la actividad antioxidante se expresó en  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra, utilizando una curva de calibración estándar para el Trolox (Anexo B) para poder estimar si los compuestos bioactivos presentes en los extractos se encuentran dentro de la estimación con el compuesto Trolox el cual es un potente antioxidante por excelencia (**Xiao et al., 2020**).

Como se observa en el Anexo 2D los mejores tratamientos para en análisis de la actividad antioxidante fueron el E3 perteneciente a la semana postcosecha 1 en un tiempo de 60 min y E2 que corresponde a la semana postcosecha 2 en un tiempo de 30 min, estos tratamientos presentaron una mayor concentración de carotenoides y fenoles totales respectivamente (**Bulut et al., 2019**). Por ende, se tomaron en cuenta ya que al poseer la mayor concentración de dichos compuestos bioactivos la actividad antioxidante será mayor. Cabe recalcar que estos valores serán comparados mediante una curva de calibración de trolox (Anexo B) el cual se utilizó puesto que, según menciona **Bobo et al., (2015)** el compuesto químico trolox es un poderoso antioxidante de venta comercial para la fabricación de diversos medicamentos.

La Tabla 22 indica el porcentaje de inhibición de DPPH en el cual el valor más alto obtenido fue de 87.839 % para el tratamiento E3 y para el E2 un valor de 69.114 %. Estos valores se encuentran dentro de la curva de calibración trolox. Sin embargo, (**Gruszycki et al., 2019**) menciona que, el valor óptimo que puede alcanzar las especies (*oleracea*) como es el caso de la espinaca son de alrededor de un 90% de

inhibición mientras que, el valor más bajo que pueden presentar es de 45% esto en un ambiente donde el tiempo postcosecha sea de alrededor de 1 mes o superior. Por otro lado, la concentración establecida según el estándar que es el compuesto trolox, los extractos de espinaca tienden hacer agentes oxidativos ya que alcanzaron concentraciones similares a las que el reactivo trolox obteniendo una concentración máxima de 480.850  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra y un valor bajo de 379.907  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra (Tabla 22). En donde se estima que, si los valores de la curva estándar se encuentran en el centro de la misma con tendencia ascendente se considera óptima la acción antioxidante que presenta el extracto según investigaciones realizadas por **Irivibulkovit et al., (2018)** la actividad antioxidante tras el análisis de una muestra de espinaca previamente liofilizada fue de 435.356  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra corroborando de manera positiva el valor obtenido en esta investigación.

**Tabla 22**

*Porcentaje de inhibición y concentración Trolox*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>% de Inhibición</b>	<b><math>\mu\text{mol}</math> de trolox/g de muestra</b>
E3	1	60	87.839	480.850
E2	2	30	69.114	379.907

Nota. La tabla presenta la inhibición que tienen los dos extractos y la concentración del reactivo trolox.

### **3.2 Verificación de hipótesis**

$H_0 \neq 0$  Se rechaza la hipótesis nula

$H_a \neq 0$  Se acepta la hipótesis alternativa en la cual se verificó que la relación entre los parámetros óptimos de extracción como: tiempo de postcosecha (semanas) y tiempo de extracción (min) a partir de las hojas de espinaca, si incidió en la obtención de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes.

## CAPÍTULO VI. -CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Se evaluó el contenido de compuestos bioactivos presentes en la espinaca los cuales fueron carotenoides y fenoles totales provenientes de residuos de la Plaza San Jacinto ubicada en la parroquia Izamba, cantón Ambato, provincia Tungurahua, las mismas que presentaron actividad antioxidante óptima, cuyo valor fue de  $480.850 \mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra en un tiempo postcosecha de 1 semana en un tiempo de extracción de 60 minutos. Por ende, se estimó que los compuestos bioactivos presentes en la espinaca contienen actividad antioxidante.
- A partir del empleo de etanol al 70% se obtuvieron extractos líquidos de espinaca, los tiempos empleados para la extracción fueron de 30 y 60 min teniendo en cuenta el tiempo postcosecha el cual fue de 1 y 2 semanas respectivamente. La eficiencia de esta extracción se cuantificó a partir de un porcentaje de sólidos solubles totales (SST) de  $2.828 \pm 0.40 \%$  un valor de masa de sólidos extraídos (MSE) tuvo un valor de  $0.651 \pm 0.18 \text{ g}$ . Teniendo estos factores en cuenta se determinó una eficiencia de extracción óptima de  $20.057 \%$ .
- El extracto que presentó mayor concentración de carotenoides totales fue el tratamiento E3, el cual dio una concentración de  $131.108 \pm 6.53 \mu\text{g/g}$  en un tiempo postcosecha de 1 semana a un tiempo de extracción de 60 min, donde se observó que mientras menor sea el tiempo postcosecha la concentración de carotenoides no decae.
- La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin y Ciocalteu donde se obtuvo un valor de  $26.830 \pm 2.08 \text{ mg GAE/g}$  biomasa seca, sin embargo, este valor se dio en la semana postcosecha 2 en un tiempo de 30 min. Por ende, la concentración de compuestos fenólicos no decae significativamente con el tiempo de postcosecha siempre y cuando no se lo exponga a altas temperaturas y se mantenga en un sitio libre de humedad la concentración no varía entre las semanas postcosecha.

- Se comparó la actividad antioxidante de los extractos mediante el método DPPH (2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil), en el cual se determinó que sí existe una interacción la cual es inversamente proporcional debido a que, mientras el tiempo de postcosecha se incrementa la actividad antioxidante disminuye puesto que, el valor máximo obtenido en la semana 2 postcosecha fue de 379.907  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra, el cual si se compara con el valor obtenido de la semana 1 postcosecha el cual fue de 480.850  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de muestra, se observó que existe una disminución de un 40% tras comparar las concentraciones.

## 4.2 Recomendaciones

- Se recomienda estimar más tiempos de postcosecha para poder determinar el punto final en donde los compuestos bioactivos presentes en la espinaca suspendan su actividad antioxidante o su concentración sea muy baja.
- Es necesario que se realicen estudios aplicando otros métodos de detección como los cromatográficos para poder contrastar de manera específica cual es compuesto ya sea carotenoide o fenol que más predomina en los extractos de espinaca estimando así cual es compuesto que genera mayor actividad antioxidante.
- Revisar de manera más profunda estudios sobre la optimización de la extracción de metabolitos de plantas con propiedades antioxidantes, además de, la optar por diversos métodos complementarios como la extracción por microondas y ultrasonido, lo cual podría maximizar el rendimiento de la extracción.
- Se recomienda utilizar disolventes más polares debido a que el etanol tiende a evaporarse al momento de la extracción ocasionando que su volumen final disminuya, por ende, sería útil probar con otros disolventes y comparar con las concentraciones obtenidas en este proyecto de titulación.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelfattah, A., Whitehead, S. R., Macarisin, D., Liu, J., Burchard, E., Freilich, S., Dardick, C., Droby, S., & Wisniewski, M. (2020). Effect of washing, waxing and low-temperature storage on the postharvest microbiome of fruit. *Microorganisms*, 8(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060944>
- Almeida, F., & Schlechta, F. (2018). Research methods in complementary and alternative medicine: an integrative review. *Journal of Integrative Medicine*, 16(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2017.12.001>
- Baek, S., Cao, L., Jeong, S., Kim, H., Nam, T., & Lee, S. (2021). The Comparison of Total Phenolics, Total Antioxidant, and Anti-Tyrosinase Activities of Korean Sargassum Species. *Journal of Food Quality*, 2021, 7(3), 1-11, <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., & Alonso, B. O. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina a; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina a de adultos jóvenes. *Nutricion Hospitalaria*, 27(4), 1334–1343. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5886>
- Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V., Puga, R., & Quintero, A. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23(5), 1–9. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Bhatta, S., Janezic, T., & Ratti, C. (2020). Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Institute of Nutrition and Functional Foods*, 87(9), 1–22. <https://doi.org/doi:10.3390/foods9010087>
- Bobo, G., Davidov, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín, M., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional



- spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bulut, O., Akin, D., Sönmez, Ç., Öktem, A., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2019). Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1726-5>
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R., & Camp, J. Van. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108(2), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.056>
- Cai, X., Sun, X., Xu, C., Sun, H., Wang, X., Ge, C., Zhang, Z., Wang, Q., Fei, Z., Jiao, C., & Wang, Q. (2021). Genomic analyses provide insights into spinach domestication and the genetic basis of agronomic traits. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27432-z>
- Canelo, P., Mendoza, Y., Villacres, J., Aranda, J., & Gonzalez, G. (2017). Análisis fitoquí-mico, actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto acuoso liofilizado de *Curcuma longa* en lesiones hepáticas inducidas con tetraclorometano en ratas albinas. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.23.60>
- Cherubim, D., Buzanello, C., Oliveira, L., & Da Silva de Lucca, R. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>
- Dagnino, J. (2014). Análisis de varianzas enfocados a dos factores. *Bioestadística y Epidemiología*, 43(1), 306–310
- Djeridane, A., Hamdi, A., Bensania, W., Cheifa, K., Lakhdari, I., & Yousfi, M. (2015). The in vitro evaluation of antioxidative activity,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 9(4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.10.007>
- Espinoza, Y., Gamarra, N., & Tarazona, R. (2018). Sustitución de la Harina de Trigo

por Harina de Quinoa y Puré de Espinaca en la Elaboración de una Pasta Enriquecida y Fortificada. *Tayacaja*, 1(3), 69–80. <https://doi.org/10.46908/rict.v1i1.5>

FAO. (2022). Reseña de Agricultura Familiar Ecuador. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*, 3(1), 1–7

Feng, Y., Wei, L., Li, C., Cai, G., & Zhu, T. (2020). Combined effects of ultrasound and aqueous chlorine dioxide treatments on nitrate content during storage and postharvest storage quality of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 33(7), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127500>

Fonseca, L. (2015). Manual: Espinaca. *Cámara de Comercio de Bogotá*, 4(16), 52

Fukushi, K., Hirokawa, T., & Timerbaev, A. R. (2019). Recent developments of capillary electrophoresis in seawater analysis. *Journal of Chromatography A*, 16(4), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.020>

García, E., & Fernández, I. (2012). Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. *ETSIAMN. Universitat Politècnica de València*, 1(3), 1–5

Gruszycki, M., Valenzuela, G., Báez, M., Leguiza, P., Gruszycki, A., & Alba, D. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2), 1–11. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82720>

Heredia, A., Toscano, R., Peñaloza, B., & Carrera, F. (2022). Diagnóstico Y Análisis De La Producción Agrícola Y Pecuaria En Las Parroquias Rurales Del Cantón Ambato. *Sigma*, 10(4), 24–35. <https://doi.org/10.24133/ris.v10i01.2916>

Hrušková, H., Voráčová, I., Řemínek, R., & František, F. (2022). Current applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biologically important analytes in urine review. *Journal of Separation Science*, 45(1), 305–324. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100621>

Iraizoz, A. (2022). Evaluación de diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopenos procedentes de residuos de tomate de árbol (

Solanum betaceum ). *Evaluation of different polymer combinations in the microencapsulation of lycopenes from tree tom*. 7(2), 1–6

Irivibulkovit, K., Ouanthavong, S., & Ameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 1–6

Jiménez, J., Ruiz, A., González, R., & De Fuentes Ruiz, P. (2017). Determinants of university students' academic performance in European higher education. *Innovar*, 25(58), 159–176. <https://doi.org/10.15446/innovar.v25n58.52440>

Jonvik, K. L., Nyakayiru, J., Pinckaers, P. J. M., Senden, J. M. G., van Loon, L. J. C., & Verdijk, L. B. (2016). Nitrate-rich vegetables increase plasma nitrate and nitrite concentrations and lower blood pressure in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 146(5), 986–993. <https://doi.org/10.3945/jn.116.229807>

Kandel, S. L., Mou, B., Shishkoff, N., Shi, A., Subbarao, K. V., & Klosterman, S. J. (2019). Spinach downy mildew: Advances in our understanding of the disease cycle and prospects for disease management. *Plant Disease*, 103(5), 117–141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1720-FE>

Li, X., Sun, J., Chen, Z., Jiang, J., & Jackson, A. (2021). Characterization of carotenoids and phenolics during fruit ripening of Chinese raspberry (*Rubus chingii*Hu). *RSC Advances*, 11(18), 1–13. <https://doi.org/10.1039/d0ra10373j>

Mannemala, S. S., & Kannappan, V. (2015). Systematic robustness testing of a liquid chromatographic method: A case study. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1769–1774. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-027>

Marbrey, M., Douglas, E., Goodwin, E., & Caron, K. (2023). Coumestrol induces oxidative stress and impairs migration and embryonic growth. *Reproduction (Cambridge, England)*, 166(1), 1–11. <https://doi.org/10.1530/REP-23-0017>

Mares, J. (2017). Nutrition, Healthy Lifestyles and Eye Health. *Eye Clinics*, 1(3), 2–10

Martínez, M., Balois, R., Alia, I., Alberto, M., Apatzingan-Hermosillo, Y., & Gúzman, G. (2017). Postharvest fruits: maturation and biochemical changes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(12), 2–11

- Mendoza, B., Almao, L., Marcó Parra, L. M., & Rodríguez, V. (2015). Evaluación de dos métodos de digestión ácida en el análisis de tejido foliar de caña (*Saccharum officinarum* L.). *Ciencia y Tecnología*, 7(2), 9–20. <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i2.98>
- Mitra, S., Rauf, A., Tareq, A. M., Jahan, S., Emran, T. Bin, Shahriar, T. G., Dhama, K., Alhumaydhi, F. A., Aljohani, A. S. M., Rebezov, M., Uddin, M. S., Jeandet, P., Shah, Z. A., Shariati, M. A., & Rengasamy, K. R. (2021). Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. *Food and Chemical Toxicology*, 154(June), 112328. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112328>
- Mommers, J., & van der Wal, S. (2021). Column Selection and Optimization for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(2), 183–202. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1707643>
- Moreiras, C. (2013). Espinacas. *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria*, 4(3), 191–192
- Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., & Gallo, M. (2019). Rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE): A powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques. *Foods*, 8(7), 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods8070245>
- Nemzer, B., Al-Taher, F., & Abshiru, N. (2021). Extraction and natural bioactive molecules characterization in spinach, kale and purslane: A comparative study. *Molecules*, 26(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules26092515>
- Nieto, M., García, J., Caltzontzin, V., Chávez, R., & Estrada, M. de la L. (2018). Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(21), 1–10. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i21.1530>
- Ortiz, W., Aguilera, Y., Jorge, M., Guzmán, D., Cobo, H., & Bravo, L. (2016). Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de *Psidium guajava*

L. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 5(3), 276–288

- Pérez, S., Morón, N., Cervantes, M., & Barón, M. (2018). Evaluación del potencial antioxidante en extracto de espinaca por voltamperometría cíclica. *Revista ION*, 30(2), 99–105. <https://doi.org/10.18273/revion.v30n2-2017009>
- Poma, E., Inocente, M. A., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo ( DPPH ) para determinar capacidad antioxidante. *ORIGINAL BREVE*, 2(1), 0–3
- Pupo, E., Robles, L., Reyna, I., & Marrero, C. (2017). Oxidative Stress. *Citma Certificado*, 21(1), 171–186
- Ramautar, R. (2016). Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Clinical Metabolomics. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.002>
- Rodríguez, R., Lehotay, S., Michlig, N., Socas, B., & Rodríguez, M. (2020). Critical review and re-assessment of analyte protectants in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1632. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461596>
- Román, N., García, R., Castillo, A., Sahagún, J., & Jiménez, M. A. (2018). Nutritional and nutraceutical characteristics of vegetables of ancestral use in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(3), 1–9
- Romero-Tapias, O. Y., Perilla-Benítez, J. C., Cedeño-Tapia, S. J., Tapiero-Rojas, J. D., & Tamayo-Ortiz, J. L. (2022). Medicina tradicional ancestral en el sistema de salud de Ecuador. *Sapienza: International Journal of Interdisciplinary Studies*, 3(8), 272–286. <https://doi.org/10.51798/sijis.v3i8.587>
- Romero, L. E. (2014). *Influencia De La Variación De La Temperatura Sobre El Rendimiento Y La Calidad En La Extracción Del Aceite De Sacha Inchi (Plukenetia Volubilis)*, 4(2), 120-131
- Schmalzer, P. N., Thompson, T. R., & Simpson, A. L. (2008). Trends in deflection with application of repeated loads: Impact on deflection data averaging. *Transportation Research Record*, 4(68), 71–77. <https://doi.org/10.3141/2068-08>
- Shohag, M. J. I., Wei, Y., Yu, N., Lu, L., Zhang, J., He, Z., Patring, J., & Yang, X.

- (2012). Folate Content and Composition of Vegetables Commonly Consumed in China. *Journal of Food Science*, 77(11), 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02939.x>
- Simonovska, B., Vovk, I., Glavnik, V., & Černelič, K. (2013). Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. *Journal of Chromatography A*, 1276(45), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.032>
- Sravan, S., Manoj, P., & Giridhar, P. (2015). A method for red-violet pigments extraction from fruits of Malabar spinach (*Basella rubra*) with enhanced antioxidant potential under fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3037–3043. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1335-5>
- Stenblom, E., Egecioglu, E., Landin, M., & Erlanson, C. (2015). Consumption of thylakoid-rich spinach extract reduces hunger, increases satiety and reduces cravings for palatable food in overweight women. *Appetite*, 91(5), 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.04.051>
- Stolz, A., Jooß, K., Höcker, O., Römer, J., Schlecht, J., & Neusüß, C. (2019). Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications. *Electrophoresis*, 40(1), 79–112. <https://doi.org/10.1002/elps.201800331>
- Suárez, D. (2021). Incidencia en la maduración de la fruta climaterica y no climaterica durante la poscosecha para su exportación y comercialización en el Ecuador. *Caribeña De Ciencias Sociales*, 6(11), 1–22
- Sun, Y., Yang, X., Li, T., & Lu, X. (2016). Effects of spinach nitrate on insulin resistance, endothelial dysfunction markers and inflammation in mice with high-fat and high-fructose consumption. *Food & Nutrition*, 1(3), 1–10
- Tanveer, K., Ilyas, N., Akhtar, N., Yasmin, H., Hefft, D. I., El-Sheikh, M. A., & Ahmad, P. (2022). Role of biochar and compost in cadmium immobilization and on the growth of *Spinacia oleracea*. *PLoS ONE*, 17(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263289>
- Tshikalange, B., Ololade, O., Jonas, C., & Bello, Z. A. (2022). Effectiveness of cattle

- dung biogas digestate on spinach growth and nutrient uptake. *Heliyon*, 8(3), e09195. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09195>
- Valenzuela, C., & Pérez, P. (2016). Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. *Revista Chilena de Nutricion*, 43(2), 188–195. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000200012>
- Valenzuela, V., Bofill, S., Crisóstomo, J., Pavez, F., & Brunet, J. (2016). Selección de color dentario: comparación de los métodos visual y espectrofotométrico. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9(2), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.05.004>
- Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, W., Vallejo, B., Acedo, F., Sánchez, E., & Peñalba, G. (2014). Mechanisms Involved in Antioxidant and Antibacterial Activity of Propolis. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud Biotecnia*, 16(1), 32–37
- Vázquez, R. E. (2015). Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones. *Ciencias de La Alimentación (CIAL)*, 1(4), 1–45
- Wianowska, D., & Olszowy, M. (2023). A Concise Profile of Gallic Acid—From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination. *Molecules*, 28(3), 1–67. <https://doi.org/10.3390/molecules28031186>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Xu, C., Jiao, C., Sun, H., Cai, X., Wang, X., Ge, C., Zheng, Y., Liu, W., Sun, X., Xu, Y., Deng, J., Zhang, Z., Huang, S., Dai, S., Mou, B., Wang, Q., Fei, Z., & Wang, Q. (2017). Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions. *Nature Communications*, 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15275>
- Yang, T., Zhang, Q., Chen, T., Wu, W., Tang, X., Wang, G., Feng, J., & Zhang, W. (2020). Facile potentiometric sensing of gallic acid in edible plants based on molecularly imprinted polymer. *Journal of Food Science*, 85(8), 1–7.

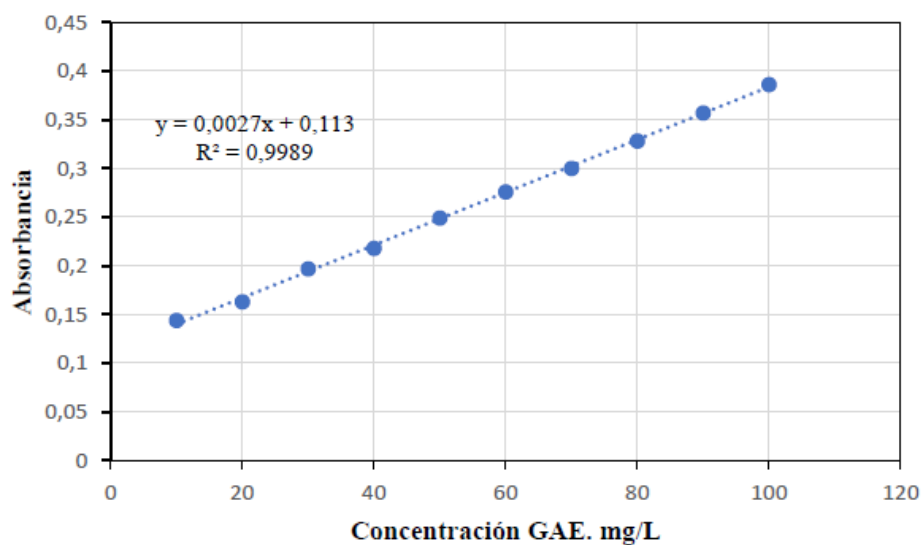
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15346>

- Zapata, P., Serrano, M., García, M., Pretel, M., & Botella, M. (2017). Short term effect of salt shock on ethylene and polyamines depends on plant salt sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, 8(5), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00855>
- Zhou, D. D., Luo, M., Huang, S. Y., Saimaiti, A., Shang, A., Gan, R. Y., & Li, H. Bin. (2021). Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(10), 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/9932218>



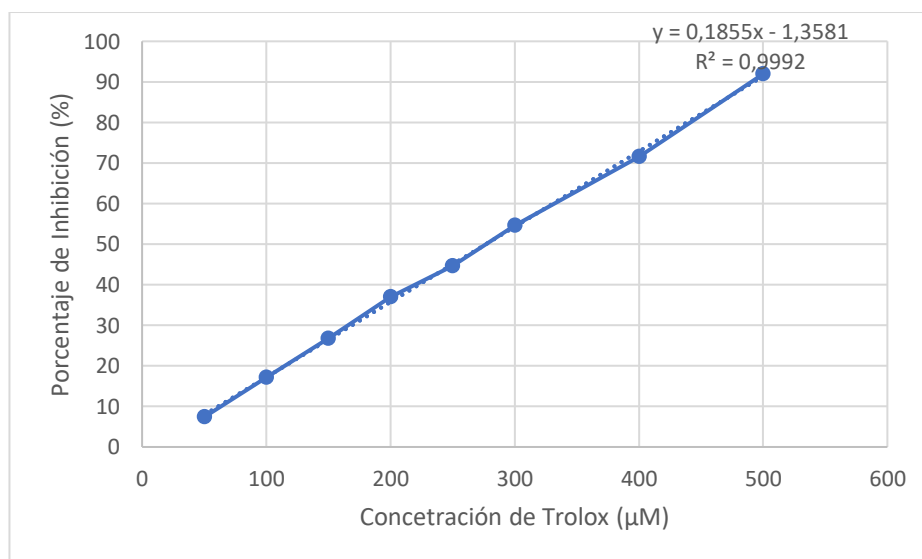
## ANEXOS

### ANEXO A. Curva de calibración para fenoles totales



*Figura 1A.* Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.

### ANEXO B. Curva de calibración para actividad antioxidante



*Figura 1B.* Curva de calibración de trolox para cuantificación de actividad antioxidante.

## ANEXO C. Fotografías



*Figura 1C.* Creación de la Plaza



*Figura 2C.* Recolección del material vegetal



*Figura 3C.* Almacenamiento al aire libre



*Figura 4C.* Deshidratación de hojas



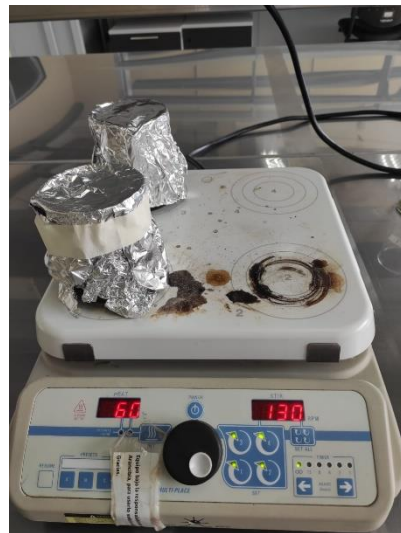
**Figura 5C.** Hojas deshidratadas



**Figura 6C.** Pesaje de hojas procesadas



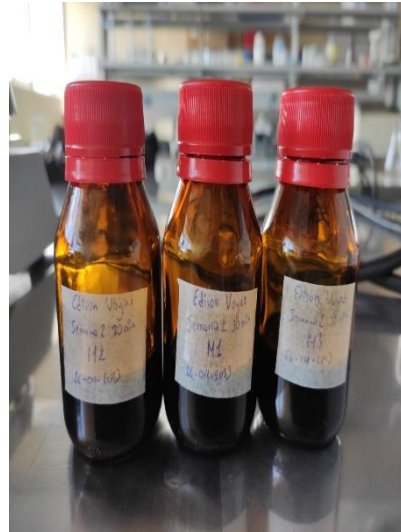
**Figura 7C.** Peso 4g de muestra



**Figura 8C.** Extracción y agitación magnética



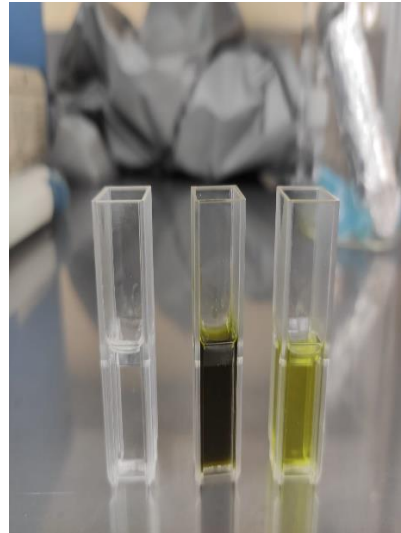
**Figura 9C.** Filtrado de extractos



**Figura 10C.** Almacenamiento en frascos ámbar



**Figura 11C.** Balanza de humedad



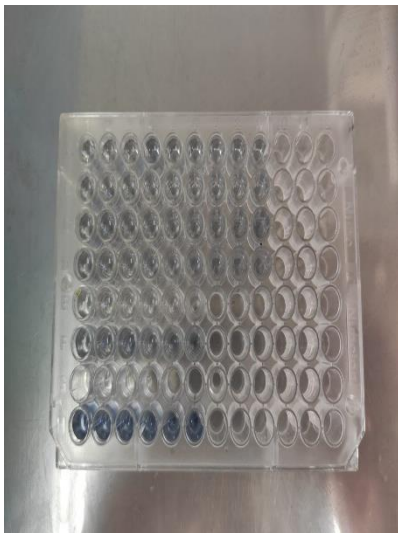
**Figura 12C.** Dilución de extractos



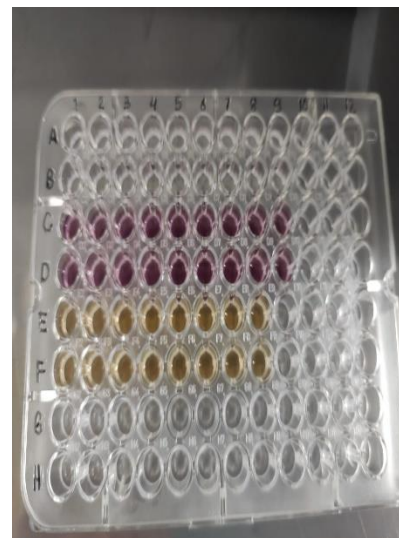
**Figura 13C.** Solidos solubles totales



**Figura 14C.** Medición espectrofotométricas



**Figura 15C.** Método de Folin y Ciocalteu



**Figura 16C.** Actividad antioxidante

## ANEXO D. Tablas

**Tabla 1D**

*Determinación de la actividad antioxidante*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (515 nm)</b>	<b>ABS Blanco</b>	<b>ABS Control</b>
E3R1	1	60	0.219	0.039	0.716
E3R2	1	60	0.213	0.037	0.713
E3R3	1	60	0.210	0.037	0.714
E2R1	2	30	0.415		
E2R2	2	30	0.420		
E2R3	2	30	0.352		

*Nota.* La tabla presenta las absorbancias obtenidas para determinar la actividad antioxidante de fenoles totales por triplicado a partir de una curva estándar de trolox.

**Tabla 2D**

*Determinación del promedio de las variables de la actividad antioxidante*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo postcosecha (semanas)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>	<b>ABS (515 nm)</b>	<b>ABS Blanco</b>	<b>ABS Control</b>
E3	1	60	0.212±0.00	0.03±0.00	0.714±0.00
E2	2	30	0.399±0.31		

*Nota.* La tabla presenta el promedio de las variables para calcular la actividad antioxidante presente en los extractos y su desviación estándar.