



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE ESPECIES
SILVESTRES, UTILIZANDO TECNOLOGÍAS VERDE DE EXTRACCIÓN.

BERNARDO CRISTELER

TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

TUTOR: Dr. FARRONI, ABEL EDUARDO

CO- TUTOR: MgSc MICHELONI, OSCAR BERNARDO

AÑO 2023

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE ESPECIES SILVESTRES, UTILIZANDO TECNOLOGÍAS VERDE DE EXTRACCIÓN.

Bernardo Christeler

Este trabajo de Tesina es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional de Rosario. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, durante el período comprendido entre el 01 de octubre de 2022 y 01 de septiembre de 2023, bajo la dirección de Farroni, Abel Eduardo y Micheloni, Oscar Bernardo.

Bernardo, Christeler



Abel Eduardo, Farroni



Oscar Bernardo, Micheloni



Defendida: 06 de abril de 2024

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Materiales.....	16
Equipamiento	16
Preparación de soluciones	17
Material Vegetal	17
Recolección de material vegetal	17
Acondicionamiento del material vegetal	18
Extracción utilizando asistencia enzimática.....	19
Caracterización de extractos	19
Ensayos autográficos.....	19
Desarrollo de una autografía para reacción de CUPRAC.....	19
Autografía de ABTS	21
Autografía de DPPH.....	21
Autografía enzimática para inhibidores de PPO.....	21
Ensayos cuantitativos	22
Cuantificación de Polifenoles totales	22
Medición de capacidad antioxidante por reducción de Cu (II) (CUPRAC)	22
Medición de capacidad antioxidante por captación de ABTS•+.....	22
Medición de capacidad antioxidante por captación de DPPH•	23
Análisis estadísticos.....	24
RESULTADOS y DISCUSIONES	25
Rendimiento de las extracciones realizadas con enzimas	25
Evaluación de los perfiles cromatográficos de los extractos.....	26
Desarrollo de una nueva autografía basada en la reducción del cobre (II) (CUPRAC).....	28
Autografía revelada con ensayo de ABTS	34
Autografía revelada con ensayo de DPPH.....	35
Autografía para inhibidores de polifenol oxidasa	37

Ensayos cuantitativos de capacidad antioxidante	38
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS: 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico.

CCD: Cromatografía en capa delgada.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

E_c: Extracto control.

E_{ENZ}: Extracto Enzimático.

EAM: Extracciones Asistidas por Microondas.

EAU: Extracciones Asistidas por Ultrasonidos.

ELP: Extracciones por Líquidos Presurizados.

FDA: Food and Drug Administration

MBTH: 3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona

NC: Neocuproína.

ODS: Objetivos de desarrollo sostenible.

POD: Peroxidasa.

PPO: Polifenol oxidasa.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

TROLOX (TL): 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

UV: Ultravioleta.

RESUMEN

Los extractos vegetales son una alternativa para usar como mezclas antioxidantes que pueden ser utilizadas en preservación de alimentos o como aditivos funcionales. El objetivo de este trabajo fue obtener extractos a partir de especies vegetales silvestres utilizando asistencia enzimática y caracterizar su actividad antioxidante.

En este trabajo se analizaron diez especies vegetales silvestres con utilización documentada como alimento o medicina recolectadas en la región norte de la provincia de Buenos Aires. Se realizaron extractos acuosos con y sin enzimas carbohidrolasas. Se utilizó cromatografía en capa delgada revelada con luz UV y técnicas autográficas acopladas a dicha cromatografía para analizar los extractos obtenidos. Se desarrolló una nueva autografía para reducción del catión Cu (II) (CUPRAC) y se utilizaron autografías para actividad captadora de DPPH, ABTS e inhibidores de enzima PPO. Además, se cuantificaron los polifenoles totales y la actividad antioxidante según las técnicas de DPPH, ABTS y CUPRAC.

La utilización de enzimas incrementó la masa y alteró la composición de los extractos. El efecto sobre la recuperación de capacidad antioxidante fue dependiente de la especie en estudio. Las especies *Passiflora careulea* y *Eryngium horridum* presentaron altos valores de capacidad antioxidante comparadas con el resto lo que las hace interesantes candidatas para continuar su estudio. El nuevo método autográfico de CUPRAC permitió detectar compuestos antioxidantes que ejercen su acción por reducción, diferenciándose de DPPH y ABTS que detectan compuestos que ejercen su acción por un mecanismo mixto. El análisis integrado de las tres autografías permitió detectar compuestos con actividad antirradicalaria para ABTS^{•+} y DPPH[•] y que no poseen capacidad reductora para CUPRAC en las especies *Sorghum halepense* y *Urtica urens* diferenciando de esta manera su mecanismo de acción ya en el análisis separativo preliminar.

ABSTRACT

Vegetal extracts are becoming an interesting alternative in the search of antioxidant activity. Antioxidant extracts can be used as food additives, preservatives or functional ingredients. The objective of the present work was to obtain vegetal extracts from wild growing species by using enzymatic assisted techniques and characterize their antioxidant activity.

Ten wild growing vegetal species which have previous documented use as food or medicine were harvested in North Buenos Aires region. Water based extracts were obtained with and without carbohydrolytic enzymes. The extracts were analyzed by thin layer chromatography revealed under UV light and TLC coupled autographic techniques. A new Cu II cation reduction-based autography was developed and DPPH, ABTS and PPO inhibitor based autographic assays were used. Antioxidant activity based on DPPH, ABTS y CUPRAC assays were also quantified.

Enzymatic extraction increased mass extracted and modified the extracts composition. The effect of hydrolases assisted extraction on antioxidant capacity recovery was dependent on the species under study. The species *Passiflora careulea* and *Eryngium horridum* showed high antioxidant capacity values as compared to the other species under study making them interesting subjects for continuing this research line. The developed autographic CUPRAC method allowed to detect reducing antioxidant compounds unlike DPPH and ABTS assays which detect antioxidant compounds working through both mechanism (electron and proton transfer). Integrated autographic results analysis allowed to detect compounds with radical scavenging activity for ABTS^{•+} and DPPH[•] that had no activity on the CUPRAC assay in *Sorghum halepense* and *Urtica urens* species thus allowing to differentiate antioxidant mechanism in early stages of study.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años los consumidores han incrementado la demanda de vegetales y frutas frescas, como consecuencia del aumento en su calidad de vida y de las evidencias médicas que relacionan un consumo regular de estos alimentos con una disminución en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas (Ghasemzadeh et al., 2010; Astley S., 2003; Vinson et al., 2001). Algunas de estas enfermedades están asociadas a radicales libres generados por diversos factores como: metabolismo del oxígeno en las células vivas, contaminantes ambientales, radiación, pesticidas, diversos métodos de tratamiento médico y las aguas contaminadas, (Shahid et al., 2014). En ese contexto, ha tomado interés la utilización de sustancias de origen natural, que contienen antioxidantes, para la conservación o fortificación de alimentos (Jukanti A., 2017). Los compuestos antioxidantes son considerados multifuncionales debido a su variada composición química y a la diversidad en sus mecanismos de acción los cuales pueden ser: quelar metales, captar radicales libres o inhibir enzimas (González et al., 2021).

En las reacciones de oxidación mediadas por enzimas, intervienen enzimas endógenas como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) en el proceso conocido como pardeamiento enzimático. El mecanismo de acción de la enzima PPO, no ocurre en células sanas de los productos frutihortícolas ya que los sustratos (compuestos fenólicos) están contenidos en vacuolas celulares citoplasmáticas, separadas de la enzima. Una vez que el tejido celular se encuentra dañado, ya sea por la propia manipulación o por el corte de la fruta, se pierde la compartimentalización, se pone en contacto la enzima y el sustrato, y se desencadenan las reacciones de pardeamiento (Toivonen & Brummell, 2008). Por otro lado, las enzimas peroxidases catalizan reacciones bisustrato de carácter *redox*, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido.

Estos procesos oxidativos conducen al deterioro de los alimentos vegetales frescos y generan una coloración superficial oscura en la superficie, lo que provoca un impacto visual negativo que lleva a una disminución de la preferencia por parte de los consumidores. Para contrarrestar este efecto oxidativo se ha utilizado durante mucho tiempo los sulfitos, sin embargo, en los últimos tiempos han sido prohibidos por la *Food and Drug Administration* (FDA) para la utilización de los cortes frescos de vegetales por los efectos secundarios que producen en personas alérgicas (Buta y Moline, 2001).

Las reacciones mediadas por radicales libres conducen en muchos casos al deterioro de diferentes alimentos produciendo un acortamiento de la vida útil. En la actualidad, se utilizan comúnmente como antioxidante comercial compuestos sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT). Sin embargo, su uso ha generado importantes efectos secundarios en seres humanos, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otros (Fuchs, 1998; Bush et al., 1998; Ito et al., 1983), siendo estos la principal desventaja en su utilización (Chen et al., 1992). Estrictas normas gubernamentales en cuanto a la seguridad alimentaria han hecho necesaria la búsqueda de alternativas para ser utilizadas como conservantes alimenticios (Wang et al., 2003).

Las especies de origen vegetal son entonces una alternativa para usar como mezclas antioxidantes y controlar las reacciones que se llevan a cabo por mecanismos enzimáticos o radicalarios, porque poseen una variedad de compuestos como: ácido cinámico, ácido benzoico, ácido fólico, antocianinas, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles, tocotrienoles, etc., los cuales son sintetizados por las plantas para su sustento y protección (Ghasemzadeh et al., 2010). Estos compuestos presentan la ventaja de actuar en bajas concentraciones, lo que favorece su inocuidad. En nuestra región existen muchas especies vegetales silvestres, algunas de las cuales fueron utilizadas por diferentes culturas como alimentos y medicinas (Rapoport et al., 2009). Se ha reportado que este tipo de especies son más ricas en fibras y compuestos con actividad antioxidante (Schmeda-Hirschmann et al., 2005) que las especies cultivadas. Por lo tanto, la recolección de las mismas en el norte de la provincia de Buenos Aires, es de gran utilidad como fuente de aditivos antioxidantes, aplicables a diversas matrices alimentarias

La concentración de metabolitos secundarios de ocurrencia natural en los extractos obtenidos está sujeta a variables tales como: técnica de extracción, tratamiento o almacenamiento del material vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento (Stashenko et al., 2004). Por lo tanto, es importante el estudio de diferentes métodos de obtención de extractos los cuales pueden aplicarse a vegetales silvestres.

La implementación de técnicas conocidas como “tecnologías verdes” además de presentar diversas ventajas en el proceso de extracción como la mejora en el rendimiento (Dar, Hussain, Paracha & Akhter, 2015), no impactan negativamente al ambiente, debido a que permiten reducir significativamente el uso de disolventes orgánicos o bien, emplear disolventes verdes. Las principales técnicas amigables con el medio ambiente son las extracciones asistidas por ultrasonido (EAU), microondas (EAM), líquidos presurizados (ELP) y los fluidos supercríticos (Carciochi et al., 2017). Las más utilizadas son la EAU y la EAM debido a que se han reportado

altos rendimientos en la obtención de compuestos bioactivos con menor cantidad de disolvente, en tiempos cortos de extracción (Bandar et al., 2013). Además de las técnicas mencionadas, la extracción asistida por enzimas es particularmente interesante cuando se trabaja con material vegetal. El complejo de enzimas carbohidrolasas actúa degradando los principales polisacáridos estructurales de la pared celular alcanzando su máxima actividad en un rango de temperatura entre 25-55 °C. Los complejos enzimáticos como las carbohidrolasas favorecen la ruptura de la pared celular mejorando la extracción de los compuestos celulares y por ende aumentando la recuperación de la actividad biológica de la mezcla. También mejoran la eficiencia de la recuperación de metabolitos secundarios, como los polifenoles, y por lo tanto aumentan la recuperación de actividad antioxidante (Camargo et al., 2016; Lavecchia R. y Zuurro A., 2008; Dueñas et al., 2007). Además, este tipo de extracción tiene como ventaja ser amigable con el medio ambiente porque no utiliza solventes orgánicos (Baiano, 2014).

Los antioxidantes, definidos como: “cualquier sustancia que cuando estando presente en bajas concentraciones, en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de este”, pueden dividirse en dos clases (primarios o secundarios) (Gutteridge, 1994). Los primarios son antioxidantes que interrumpen la reacción en cadena de la oxidación y generan radicales más estables, mientras que los secundarios son aquellos que retardan la oxidación. Los antioxidantes secundarios pueden actuar quelando metales y de esa manera evitando la oxidación (Fe^{+2}), reduciendo el producto oxidado (Fe^{+3}) o captando los radicales libres altamente reactivos, como el OH^\cdot . Como ejemplo podemos mencionar a la reacción de Fenton, donde este tipo de antioxidantes pueden quelar el sustrato, reducir el (Fe^{+3}) o captar el radical hidroxilo OH^\cdot (Apak, R. et al. 2013) (Figura 1).



Figura 1 : Reacción de Fenton.

Diferentes ensayos espectrofotométricos son ampliamente utilizados por diferentes grupos de investigación para cuantificar la acción antioxidante de mezclas complejas como los extractos vegetales (Badarinath, A. V. et al. 2010; Dontha, S. 2016). Estos ensayos se pueden clasificar en: a) ensayos basados en transferencia de átomos de hidrogeno (TH); b) ensayos basados en transferencia de electrón (TE); ensayos mixtos basados en ambos mecanismos (TH/TE)

(Munteanu I. y Apetrei C., 2021). Los ensayos basados en TH miden la capacidad de un antioxidante para atrapar los radicales libres (generados biológicamente como los radicales peroxilos), transfiriendo un átomo de hidrógeno a estos. En cambio, en los ensayos que están basados en los mecanismos de TE la acción antioxidante se simula con una reacción redox adecuada, donde los antioxidantes reaccionan con un producto de la reacción redox (generalmente coloreado) en lugar de radicales peroxilos (Apak et al., 2013) en un tiempo fijo para la reacción redox en cuestión y miden la oxidación durante ese período. Los ensayos mixtos actúan por ambos mecanismos. CUPRAC es un ensayo que se desarrolla por el mecanismo TE, mientras que ABTS⁺ y DPPH[•] son ensayos considerados mixtos. (Munteanu I. y Apetrei C., 2021).

El primer paso en la búsqueda de actividad biológica a partir de especies vegetales consiste en la realización de un *screening* para detectar los extractos activos. En este caso llamamos *screening* a la búsqueda mediante ensayos cualitativos de materiales vegetales que posean la actividad antioxidante deseada. Los ensayos más convenientes para *screening* son aquellos que permitan procesar una alta cantidad de muestras en poco tiempo siendo además sensibles y en lo posible económicos. Las autografías son ensayos versátiles que pueden ser diseñados de acuerdo al tipo de actividad biológica que se busque. Estas, consisten en separar por cromatografía en capa delgada (CCD) los componentes de un extracto y luego revelar la placa cromatográfica usando un método de tinción que permite reportar alguna actividad biológica. De esta forma, los componentes activos de la mezcla son detectados por la aparición de un halo de color en el lugar de la placa donde estos han migrado. Estos halos se visualizan por tener un color diferente al del fondo de la placa (**Figura 2**). De esta manera las autografías permiten una separación preliminar y detección de los compuestos activos de una mezcla lo cual brinda información útil para el posterior aislamiento bioquímico. Además, estas técnicas se pueden aplicar sin la separación previa que se realiza al desarrollar la placa, lo que las hace adaptables para el *screening* rápido. En los últimos tiempos se han desarrollado varias autografías químicas y enzimáticas (Micheloni et al., 2018; García y Furlan, 2015; Ramallo et al., 2015; Zampini et al., 2015; Hassan, 2012; Ramallo et al., 2012; Salazar et al., 2011; Salazar y Furlan, 2007; Wangthong et al., 2007; Ramallo et al., 2006; Rhee et al., 2001). También se ha desarrollado un nuevo método colorimétrico sobre placa delgada de sílica gel de CUPRAC (Akar y Burnaz, 2019). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas autografías y la utilización de algunas que han sido reportadas, permitirán ampliar el estudio de búsqueda de compuestos antioxidantes.

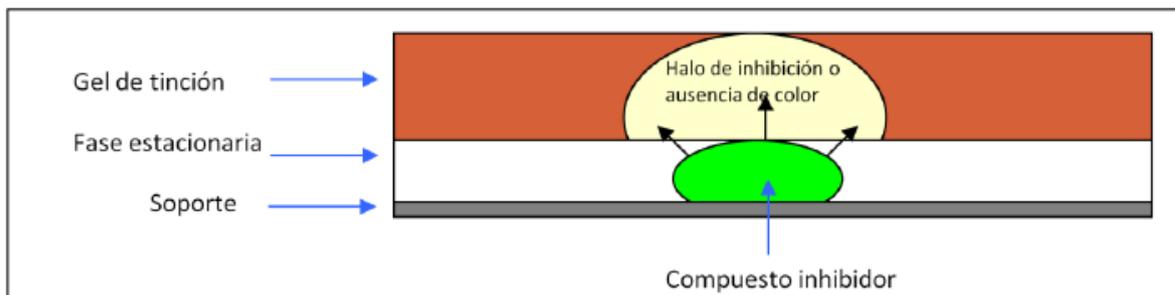


Figura 2: Fundamento del método autográfico. Corte transversal del sistema. Fuente: adaptado de Micheloni et al., 2014.

El método CUPRAC fue desarrollado por Apak, Güçlü, Özyürek y Karademir en el año 2004. En el mismo se mide la capacidad antioxidante a una absorbancia de 450 nm, utilizando la capacidad del complejo de cobre (II) -neocuproína (formado por el compuesto de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina con Cu (II)) para reducir a cobre (I) - neocuproína (Cu (I) - NC) quelato (**Figura 3**). Akar, Z., & Burnaz, N. A., (2019) desarrollaron una técnica colorimétrica en placa delgada con la cual se reemplazaría la técnica espectrofotométrica. Sin embargo, hasta el momento no se reportaron autografías con la técnica de CUPRAC por inmovilización en agarosa.

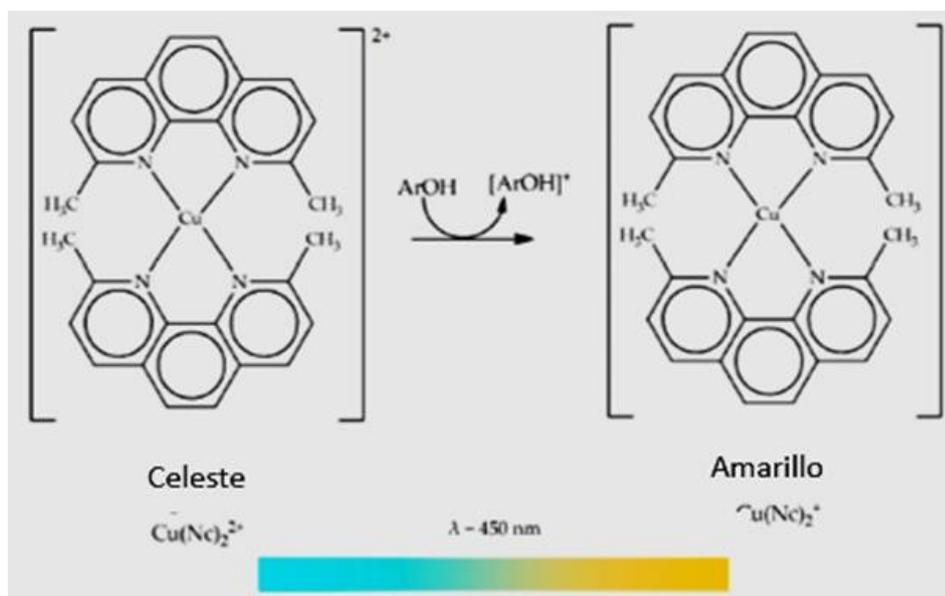


Figura 3: Formación del complejo de cobre II. Fuente: adaptado de Micheloni et al., 2018.

Para registrar la degradación del radical DPPH se aplica a la placa de cromatografía, ya sembrada con los extractos a analizar, una solución etanólica de 2,2-Di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH) en forma de spray. Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en el lugar donde han migrado compuestos con actividad antioxidantes se observará un halo de color amarillos sobre un fondo color violeta (Blois, 1958). El (DPPH[•]) es un radical sintético estable. Esta estabilidad es debida a la deslocalización del electrón desapareado por toda la molécula que impide la dimerización, como sucede para la mayoría de los otros radicales. Esta deslocalización es la responsable de originar el color violeta que lo caracteriza. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno o transferir un electrón, se origina la forma reducida del DPPH (**Figura 4**). La coloración violeta se pierde y prevalece la coloración amarilla del grupo picril presente (Molyneux, 2004).

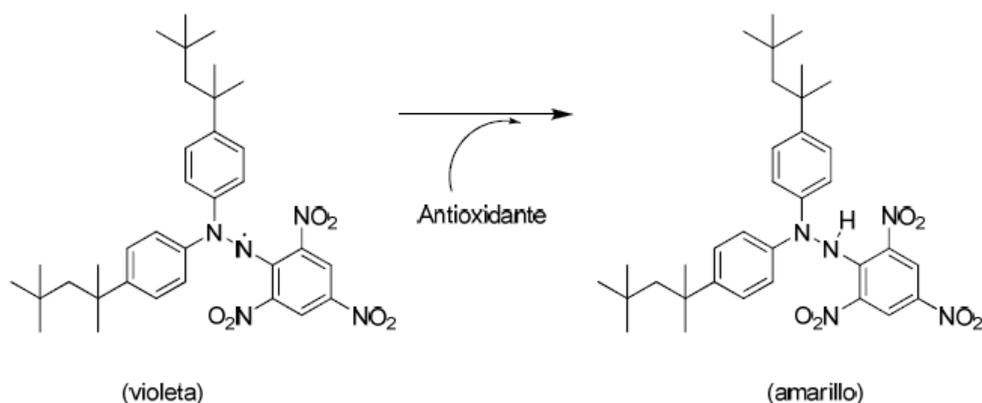


Figura 4: Reacción de captación del radical DPPH por parte de compuestos antioxidantes. Fuente: adaptado de Micheloni et al., 2014.

La autografía de ABTS fue puesta a punto por Zampini et al. (2010). El radical catión ABTS^{•+} (azul) se genera químicamente por reacción del ABTS (incoloro) con persulfato de potasio durante 16 horas en oscuridad, luego se inmoviliza incorporándolo a una solución de agarosa, la cual se derrama sobre la placa cromatográfica. Los compuestos antioxidantes presentes en la placa de CCD le transfieren un electrón o un hidrogeno al radical ABTS^{•+} generando la forma reducida ABTS la cual es incolora (**Figura 5**) y se visualizan como puntos blancos en un fondo azul.

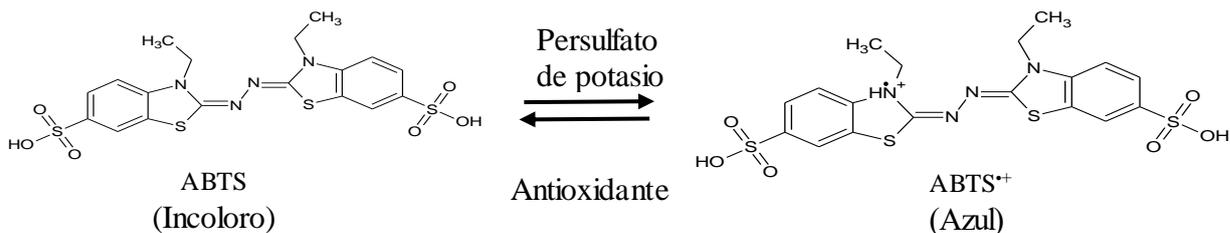


Figura 5: Reacción *redox* de ABTS con persulfato de potasio o con un antioxidante. Fuente: adaptado de Micheloni y Farroni 2017.

La autografía de PPO de manzana fue puesta a punto por Micheloni et al., (2018) y consiste en derramar sobre la placa cromatográfica una solución de tinción que contiene L-DOPA como sustrato, enzima PPO extraída de manzanas y clorhidrato de hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) como revelador para mejorar el desarrollo del color (**Figura 6**). Las zonas de localización de los posibles compuestos inhibidores de la enzima se ven como puntos blancos en un fondo rojo ladrillo.

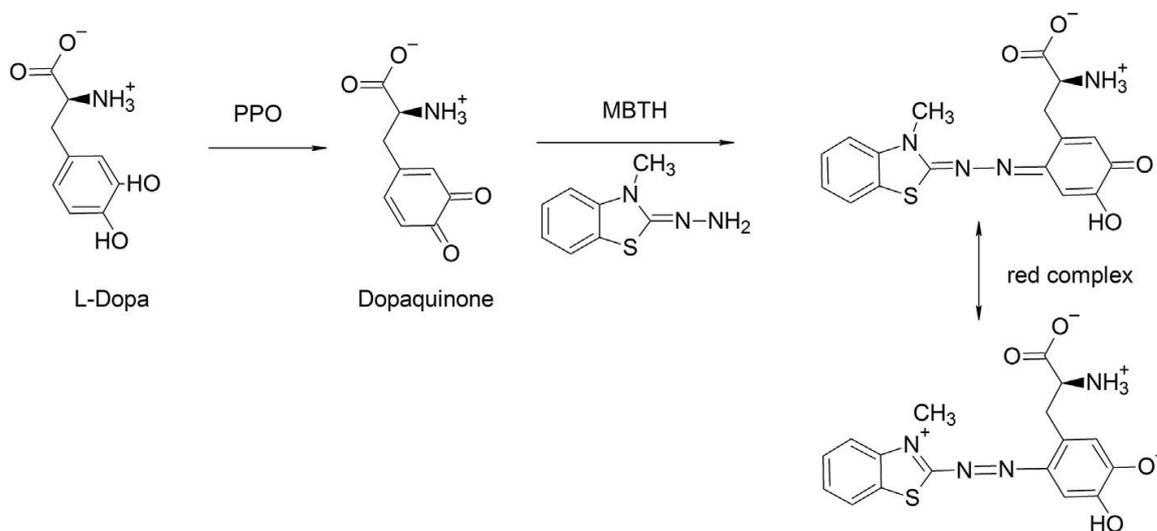


Figura 6: Reacción de la autografía de polifenol oxidasa. Fuente: adaptado de Micheloni et al., 2018.

El presente trabajo se basa en la hipótesis de que las especies silvestres que crecen en la región son potenciales fuentes de mezclas con actividad antioxidante. Su actividad podría ser detectada por técnicas sencillas (autografías) y posteriormente cuantificada. Esto hace interesante el desarrollo de herramientas sencillas para la detección de actividad antioxidante (autografías), lo cual permitiría una rápida selección de especies vegetales de interés para ser utilizadas en el desarrollo de aditivos alimentarios de base natural.

OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue obtener extractos a partir de especies vegetales silvestres de crecimiento utilizando asistencia enzimática y caracterizar su actividad antioxidante. La búsqueda se orientará a especies de crecimiento ubicuo en la zona norte de la provincia de Buenos Aires y con utilización documentada como alimento o medicina

Objetivos específicos

- 1) Recolectar e identificar especies silvestres.
- 2) Acondicionar el material vegetal.
- 3) Realizar extractos a partir de las especies recolectadas utilizando asistencia enzimática.
- 4) Caracterizar los extractos y analizar cuantitativa y cualitativamente su capacidad antioxidante.
- 5) Desarrollar una nueva autografía para detectar compuestos con poder reductor basados en la reducción de cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los reactivos Viscozyme L., ABTS, DPPH, TROLOX, cloruro de cobre (II), 3-metil-2-benzothiazolina hidrazona (MBTH) y neocuproína se adquirieron en Sigma Aldrich. El acetato de amonio y el reactivo de Folin-Ciocalteu se compraron en Biopack. Los solventes acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, cloroformo, hexano, tolueno y el ácido fórmico utilizados fueron de marca Cicarelli. Se utilizaron L-DOPA marca Parafarm, ácido cítrico Anedra y agarosa Britania. Se utilizaron reactivos de calidad analítica. Para el desarrollo de las autografías se utilizaron placas cromatográficas de 20 x 20 cm de sílica gel sobre soporte de aluminio (TLC Sílica gel 60F₂₅₄) marca Merck.

Equipamiento

Tanto para la preparación de soluciones como para la obtención de los extractos se utilizó un agitador magnético con manta calefactora marca Decalab.

Micropipetas automáticas marca Gilson, modelo Pipetman, con capacidad para dispensar desde 2 µL hasta 10 mL.

Para sembrar sobre las placas cromatográficas se utilizaron Jeringas Hamilton (1 – 10 µL) y una micropipeta marca Virtex (0,5 – 10 µL).

Los reactivos fueron pesados en una balanza analítica (Ohaus Adventurer Pro-AV 264C).

Los extractos obtenidos fueron liofilizados en un liofilizador marca Rificor modelo L-6. (Rificor, Buenos Aires, Argentina).

Para el revelado con luz ultravioleta se utilizó una cámara oscura equipada con una lámpara (UV) marca UVP modelo UVLS-28 (2UV) de luz UV de 254 nm y 365 nm. En el caso de las autografías reveladas con ABTS+, DPPH, CUPRAC y PPO, las imágenes fueron capturadas en una cabina de igualación visual (Colorlux 1000) utilizando un iluminante estándar D65.

Todas las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica (Panasonic. DMC-FH20 // LUMIX 14 Mega Pixeles).

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, en cubetas de caras paralelas de 1 cm de paso óptico.

Preparación de soluciones

1_ Buffer fosfato pH: 6,8.

5,01 g de Na_2HPO_4 y 4,32 g de NaH_2PO_4 fueron disueltos en 1,00 L de agua bidestilada y posteriormente se ajustó el pH con 1,00 mL de HCl 0,02 M. El buffer fue conservado en heladera hasta su utilización.

2_ Buffer citrato pH: 4,0.

Se prepararon las soluciones:

A: 0,10 M de ácido cítrico (21,01 g de ácido cítrico en 1000 mL de agua destilada).

B: 0,10 M de citrato sódico (29,41 g de citrato sódico en 1000 mL de agua destilada).

Posteriormente se mezclaron 33,0 mL de A con 17,0 mL de B y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada. El buffer se conservó en heladera hasta su utilización.

Material Vegetal

Recolección de material vegetal

Se recolectaron diez especies vegetales silvestres ubicuas del norte de la provincia de Buenos Aires. La selección se orientó a aquellas especies con utilización documentada como alimento o medicina (Rapoport et al., 2009). Un ejemplar se utilizó para identificar la especie y se depositó como "*voucher specimen*" en el herbario de la Facultad de Cs. Agrarias de la UNR. La identificación fue realizada por el Mg. Luis Oackey docente de la cátedra de Botánica I y II de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Bs. As. (Tabla 1).

Tabla 1: Especies silvestres recolectadas en lotes no agrícolas.

Especies	Nombre Vulgar	Abreviatura
<i>Sida rhombifolia</i> L.	escoba dura	Sr
<i>Matricaria recutita</i> L.	Manzanilla	Mr
<i>Sinapis arvensis</i> L.	Mostaza Silvestre	Sa
<i>Rapistrum rugosum</i> L.	mostasilla	Rr
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	lolium	Lm
<i>Passiflora careulea</i> L.	Pasionaria (Partes aéreas)	Pc
<i>Medicago lupulina</i>	Mielga Negra	Ml
<i>Sorghum halepense</i> L.	Sorgo de Alepo	Sh
<i>Urtica urens</i> L.	Ortiga Menor	Uu
<i>Eryngium horridum</i> Malme	Cardilla	Eh

Acondicionamiento del material vegetal

El material vegetal, libre de polvo e insectos, se secó en una cámara de secado marca MTH, a 40 °C durante 3 días. Posteriormente se trituyó en un molino de corte marca Willey 4, equipado con una malla de 2 mm de tamaño de poro. Los polvos obtenidos se conservaron, hasta su utilización, en bolsas de papel madera dentro de frascos de vidrio herméticamente cerrados a -18 °C.

Extracción utilizando asistencia enzimática

Para cada especie se realizaron 2 extracciones; un control (E_C) sin enzima y otra con 9 FBU (unidades enzimáticas de betaglucanasa fúngica) de un complejo enzimático pectinasa-hemicelulasa (Viscozyme L.) (E_{ENZ}) ambas a 40 °C. Para las extracciones se pesó 1,50 g de material vegetal seco y se trituró en mortero con 13,0 mL de buffer citrato pH: 4 y 75 μ L (9 FBU) de Viscozyme L. El buffer citrato/ácido cítrico es un sistema muy utilizado en la industria de los alimentos y regula adecuadamente el rango de pH del sistema recomendado en las especificaciones por el fabricante. Luego se completó a 30,0 mL con buffer. La mezcla se mantuvo a la temperatura mencionada con agitación durante 90 minutos. Al finalizar el tiempo de extracción se inactivó la enzima llevando la temperatura a 80 °C en microondas. Se realizó un lote de extracción para cada especie el cual se filtró con papel de filtrado rápido y la solución resultante se separó en dos envases. Luego se liofilizó para su conservación y posterior análisis y se registró el peso del material liofilizado, lo cual para este trabajo se consideró como material vegetal seco.

Caracterización de extractos

Los extractos E_{ENZ} y E_C se sembraron en placas cromatográficas y se desarrollaron con diferentes mezclas de solventes, luego fueron reveladas utilizando luz UV (254 nm y 365 nm) y los perfiles cromatográficos fueron fotografiados en una cámara oscura. Las fases móviles fueron seleccionadas empíricamente de manera de lograr la mejor separación cromatográfica posible. Se utilizó como criterio de separación que la mayor cantidad de compuestos observables a 254 nm y 365 nm se encuentre distribuida a lo largo del perfil. Las fases móviles utilizadas fueron: hexano: acetato de etilo (10:90); acetonitrilo: agua (90:10); cloroformo : metanol (80:20); acetato de etilo : metanol (50:50); acetato de etilo : agua (90:10); acetato de etilo : agua (88:12) y cloroformo : metanol (50:50). Finalmente se seleccionó la fase móvil acetonitrilo: agua (90:10) para continuar con los experimentos.

Ensayos autográficos

Desarrollo de una autografía para reacción de CUPRAC

Para el desarrollo de esta autografía se utilizó como control positivo TROLOX sembrado en punto sobre placas de CCD de 2 cm de ancho por 8 cm de largo. Se sembraron 0,5 μ L de soluciones de TROLOX de diferente concentración preparadas según lo indicado en la sección siguiente. De esa manera la masa de TROLOX sembrada fue: 5,0; 1,0; 0,50; 0,25;

0,10; 0,050; 0,025; 0,0125 µg. Se emplearon dos técnicas de revelado, rociado directo e inmovilización en gel de agarosa.

Preparación de soluciones

_ Cloruro de cobre (CuCl₂) 12,8 mM: Se pesaron 0,0430 g y se disolvieron en 25,0 mL de agua destilada.

_ Neocuproína (NC) 7,5 mM: Se pesaron 0,0039 g y se diluyeron en 2,5 mL de etanol 96°

_ Acetato de amonio (NH₄Ac) 1 M: Se pesaron 1,9270 g y se diluyeron en 25,0 mL de agua destilada.

_ Soluciones de TROLOX: Se preparo una solución madre en metanol de una concentración 40 mM, para eso se pesaron 100 mg y se llevó a un volumen de 10,00 mL en un matraz aforado. Se realizaron 7 diluciones tomando como volumen final 10,0 mL.

Revelado por rociado sobre la placa

Se aplicaron 3 secuencias de rociado y cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.

Secuencia 1: 1,7 mL cloruro de cobre + 1,7 mL neocuproína + 1,7 mL acetato de amonio.

Secuencia 2: se aplicó 30% menos de NC que el tratamiento 1: 1,7 mL CuCl₂ + 1,2 mL NC + 1,7 mL NH₄Ac.

Secuencia 3: se aplicó 50% menos de NC que el tratamiento 1: 1,7 mL CuCl₂ + 0,85 mL NC + 1,7 mL NH₄Ac.

Revelado por inmovilización en agarosa

Se realizaron 3 tratamientos en los cuales se probaron diferentes secuencias de agregado de reactivos y distintas concentraciones de CuCl₂ y de NC. En todos los casos se utilizaron 13,3 mg de agarosa (0,83 mg/cm²):

Secuencia 1: La agarosa se disolvió en 2,4 ml de una solución cuya composición fue: 1,2 mL de CuCl₂ (12,79 mM) y 1,2 mL de NC (7,5 mM). Se vertió la agarosa sobre la placa y luego de que solidifique se sumergió en buffer NH₄Ac 1 M de pH 7,0.

Secuencia 2: Se disolvió la agarosa en 2,4 mL de una solución que contenía 0,80 mL de CuCl₂ (12,79 mM) con 0,80 mL NC (7,5 mM) y 0,80 mL de NH₄Ac (1 M). En este tratamiento se indujo la reacción colocando todos los reactivos juntos, es decir que no se realizó una inmersión posterior.

Secuencia 3: La agarosa se disolvió en 2,4 mL de NH₄Ac 1 M, se vertió sobre la placa y luego de solidificar se la sumergió en una solución con partes iguales de Cl₂Cu (12,79 mM) y NC (7,5 mM).

Protocolo definitivo de autografía para CUPRAC por inmovilización en agarosa

Por cada cm² de placa se pesaron 0,80 mg de agarosa y se disolvieron en 0,15 mL de NH₄Ac 1 M, calentando a 80 °C en microondas. Una vez que la temperatura de la solución fundida descendió a 45 °C se volcó sobre la placa y se dejó solidificar. Luego se sumergió durante 1 minuto en una solución compuesta por 10,0 mL de CuCl₂ (12,79 mM) y 10,0 mL NC (7,5mM). Posteriormente se incubó 30 minutos en cámara húmeda a 25 °C.

Autografía de ABTS

Con el objetivo de evaluar la capacidad antirradicalaria de los extractos se utilizó la técnica basada en el radical estable ABTS^{•+} basada en la que fuera descripta por Zampini et al. (2010) con algunas modificaciones. Se utilizaron 1,047 mg de agarosa por cm² de placa, disueltos en 0,15 mL de agua destilada, Cuando la temperatura desciende a 45 °C se colocaron 3,75 µL de ABTS^{•+} generado químicamente por cm² de placa. Los compuestos antioxidantes se visualizaron como puntos blancos en un fondo azul.

Autografía de DPPH

Con el objetivo de ampliar el rango de actividad antioxidante detectada también se evaluó la capacidad de captación de radicales libres utilizando una autografía con el radical estable DPPH[•] según el protocolo de Molyneux (2004). Brevemente, se aplicó en forma de aerosol una solución de DPPH[•] en etanol (0,3 mg/ml) sobre la placa de TLC. Se colocó la placa en una corriente de aire para ayudar a eliminar el etanol. Los extractos positivos se visualizaron como manchas amarillas en un fondo violeta. Las imágenes se capturaron 30 minutos posteriores a la aplicación.

Autografía enzimática para inhibidores de PPO

Como medición de la actividad de control del pardeamiento enzimático se utilizó la detección de inhibidores de la enzima PPO de manzana. Par esto se utilizó el ensayo puesto a punto propuesto por Micheloni et al., (2018) el cual se describe brevemente. Por cada cm² de

superficie de placa de CCD se disolvieron a 80 °C 1,047 mg de agarosa en 0,130 mL de solución de MBTH 0,62 mM en buffer fosfato 50 mM pH 6,8. Luego se dejó enfriar hasta 45 °C y se agregó 1,5 µL (4,14 U) de la enzima y 20 µL de L-DOPA (7,5 mM) como sustrato.

Ensayos cuantitativos

Cuantificación de Polifenoles totales

Dado que los compuestos polifenólicos son compuestos fitoquímicos con importante actividad biológica (Yang J. et al., 2004) y han demostrado poseer capacidad captadora de radicales libres (Ly T. et al., 2005) se decidió cuantificarlos. Se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar (Blainski et al., 2013). Se utilizó un volumen de reacción de 1,46 mL. La reacción se realizó en tubos de ensayo agregando 668 µL de agua, 12 µL de extracto, 60 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 720 µL solución de carbonato de sodio al 10% (m/v). Todos los tubos se homogeneizaron en *vortex* durante 5 segundos. Para descontar el color de extracto se realizó para cada muestra un blanco de reacción conteniendo 728 µL de agua, 12 µL de extracto y 720 µL de solución de carbonato de sodio al 10% (m/v). Se incubó durante de 30 minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz y luego se midió la absorbancia a 760 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Medición de capacidad antioxidante por reducción de Cu (II) (CUPRAC)

La capacidad reductora se determinó cuantificando el complejo Cu(I) neocuproína obtenido por la acción de los componentes del extracto sobre una solución de Cu (II). Los resultados se expresaron como equivalentes trolox utilizando una curva de calibración previamente construida en el rango de concentraciones entre 2,000 y 0,031 mg/mL. En cada tubo muestra se colocaron 130 µL de agua destilada y 60 µL de extracto (0.016 g/mL) y se inició la reacción con 170 µL de una solución de CuCl₂ (12,79 mM), 170 µL de neocuproína (7,5 mM) y 170 µL de una solución de NH₄Ac (1 M). Se incubó 30 minutos y se tomaron las lecturas a 450 nm en el espectrofotómetro (Özyürek et al., 2011).

Medición de capacidad antioxidante por captación de ABTS•+

Se utilizó la técnica reportada por Zampini et al., (2010). El ABTS•⁺ fue generado por una reacción química entre ABTS (7 mM) y persulfato de sodio (2,45 mM), la mezcla se mantuvo en agitación y en la oscuridad durante 16hs. La solución fue diluida para ajustarla cerca de

0,700 unidades de absorbancia y medida (Abs 100% ABTS^{•+}). Posteriormente a 0,6 mL de solución de ABTS^{•+} se le agregaron 30 µL de solución de extracto vegetal (0,016 g/ml). La mezcla fue incubada 30 minutos en oscuridad y se registró la absorbancia a 756 nm. Se calculó el porcentaje de ABTS^{•+} remanente según la siguiente fórmula:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ remanente} = \frac{\text{Abs muestra} \times 100}{\text{Abs 100\% ABTS}^{\bullet+}}$$

Al mismo tiempo se construyó una curva de calibración con trolox en un rango de concentración de 0,435 a 0,15 µg/mL para cuantificar el ABTS^{•+} remanente. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como mg de trolox / gr de material vegetal liofilizado.

Medición de capacidad antioxidante por captación de DPPH[•]

La capacidad de captación de DPPH[•] se evaluó cuantificando el DPPH[•] remanente a 518 nm (Prior et al., 2005). Se preparó una solución al 0,003 % (m/V) de DPPH[•] en etanol y se midió la absorbancia (100% de DPPH[•]). Para el análisis de las muestras se utilizaron 970 µL de solución de DPPH[•] a los cuales se agregaron 30 µL de solución de extracto (0,016 g/ml). La mezcla se incubó durante 20 minutos a 25 °C, se centrifugó 10 minutos y se registró la absorbancia del sobrenadante. El DPPH[•] remanente se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ remanente} = \frac{\text{Abs muestra} \times 100}{\text{Abs 100\% DPPH}^{\bullet}}$$

Paralelamente se realizó el mismo procedimiento y se construyó una curva de calibración con ácido ascórbico de concentración decreciente de 5 a 0,55 µg/mL para registrar el DPPH[•] remanente (Lantzouraki et al., 2015). Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como equivalente de ácido ascórbico por gramo de material vegetal liofilizado.

Análisis estadísticos

Los resultados se analizaron utilizando análisis de varianza y test de Tukey para determinar diferencias significativas. Se utilizó el software InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS y DISCUSIONES

Rendimiento de las extracciones realizadas con enzimas

En la **Gráfico 1** se observan los resultados de la masa total de extracto liofilizado obtenida luego de la extracción asistida con Viscozyme L. comparada con los extractos controles. La especie Sr mostró una solución gelatinosa luego del proceso extractivo en ambas soluciones (enzimática y control), lo cual impidió el filtrado de la misma y como consecuencia fue desestimada para todas las determinaciones propuestas. De las nueve especies restantes, ocho (Mr, Sa, Rr, Pc, Ml, Sh, Uu y Eh) registraron un aumento en la masa de extracción luego del tratamiento enzimático. La especie Lm no mostró incremento en la masa de extracción al ser tratada con enzimas. Las especies (Mr, Sa, Rr, Pc y Uu,) mostraron más de un 20% de aumento en el rendimiento de extracción con respecto a sus controles.

El agregado del complejo enzimático de pectinasa-hemicelulasa (Viscozyme L.) ayuda a disgregar la pared celular vegetal y a liberar compuestos asociados a esta. Se realizaron diez extracciones asistidas por enzima (una para cada especie vegetal) y para cada una de estas se realizó un control en las mismas condiciones de extracción, pero sin el agregado del complejo enzimático.

En otras investigaciones, se observó que la adición de enzimas pectinolíticas aumentó sustancialmente la extracción de jugo por prensado en frío de tres variedades de mora (Granada et al., 2001). El uso de estas enzimas también aumentó el rendimiento de extracción en manzanas (Nogueira et al., 2009). El aumento de la masa está relacionado con el mayor grado de desintegración de los tejidos vegetales que lleva a producir un aumento de liberación de compuestos de ocurrencia natural asociados a la pared celular (Prerna et al., 2015).

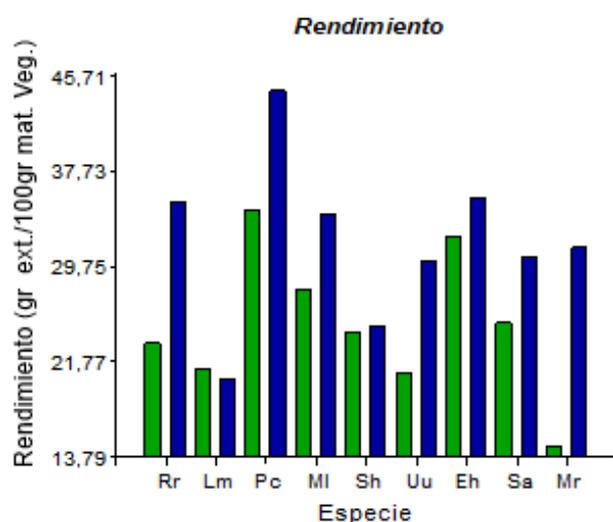


Gráfico 1: Masa total de extracto seco obtenidos por tratamiento con Viscozyme L. (azul) comparado con el control sin enzima (verde).

Evaluación de los perfiles cromatográficos de los extractos.

Se realizó un análisis utilizando cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos obtenidos como indicador de las modificaciones que se pudieran producir a consecuencia del tratamiento enzimático. Se corrieron con diferentes fases móviles y como medio revelador se utilizó luz UV a 254 nm y 365 nm. En términos generales, el análisis de los perfiles cromatográficos permitió observar la aparición y desaparición de compuestos en los extractos obtenidos por asistencia enzimática con respecto a sus controles.

En la **Figura 7** se puede visualizar la cromatografía desarrollada con acetonitrilo: agua (90:10) y revelada con luz UV a 254 nm. Las especies Mr, Rr, Sh, Uu y Eh mostraron diferencias en la composición del E_{ENZ} con respecto al E_C . Estos se visualizan claramente por la aparición de nuevos compuestos a niveles de R_f de 0,40; 0,30; 0,40 y 0,70 y en la especie Eh se visualizan a R_f de 0,25 y 0,60 (flechas amarillas) respectivamente en los E_{ENZ} de estas especies que no se observan en sus extractos controles. Por otro lado, se observó la desaparición de compuestos en E_{ENZ} de las especies: Lm, MI y Sh a valores de R_f de 0,3; 0,2 y 0,25 respectivamente.

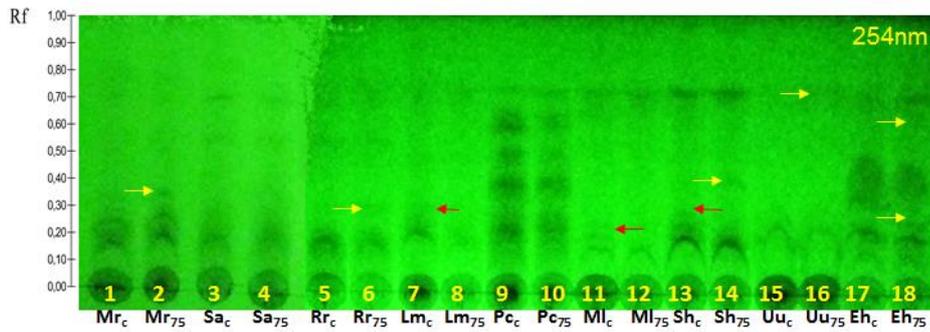


Figura 7: Revelado con luz UV 254nm, siembra 50 µg. Fase móvil acetonitrilo: agua (90:10). Calles impares (E_C); calles pares (E_{ENZ}). Flechas amarillas: aparición de compuestos; Flechas rojas desaparición de compuestos

En el revelado de la misma placa con luz UV a 365 nm se observó la aparición y desaparición de otros compuestos con valores de R_f diferentes de los que se observó a 254 nm (**Figura 8**). Se puede visualizar la aparición de compuestos en la especie Eh a nivel de R_f de 0,6. También se observaron desapariciones de compuestos en las especies Rr y Lm a niveles de R_f de 0,9 en los dos casos.

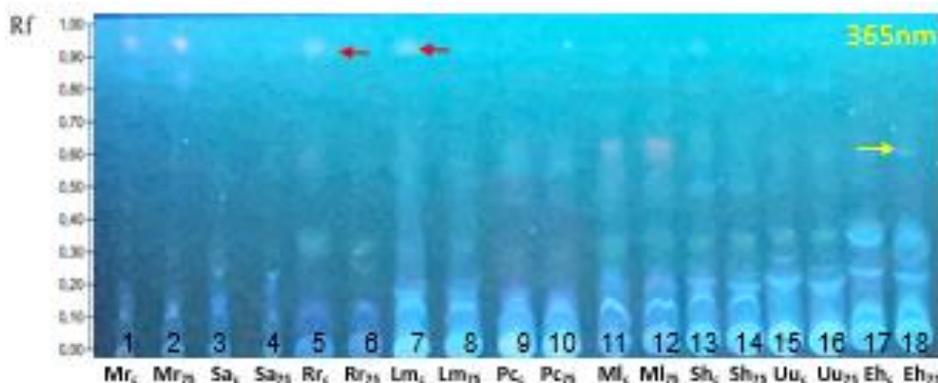


Figura 8: revelado con luz UV 365 nm, siembra 50 µg Fase móvil acetonitrilo : agua (90:10). calles impares (E_C); calles pares (E_{ENZ}). Flechas amarillas: aparición de compuestos; Flechas rojas desaparición de compuestos

El complejo enzimático Viscozyme L posee una mezcla de actividades carbohidrolasa que incluyen arabinasa, celulasa, β-glucanasa, hemicelulasa y xilanas. Este complejo enzimático actúa produciendo la hidrólisis de la pared celular y de esta manera puede producir la liberación de compuestos asociados a esta (como por ejemplo antioxidantes) que aparecen en el extracto enzimático y no se observan en el control. Por otro lado, algunos compuestos

extraídos pueden estar asociados a azúcares en la forma de glicósidos y ser susceptibles de ser alterados por las enzimas utilizadas. Esto podría explicar la desaparición de compuestos en al E_{ENZ} que se ven en el E_C . Por ejemplo, Zheng H. et al. 2020 observaron que en la extracción de *Solidago chilensis* asistida con Viscozyme L. los niveles de rutina obtenidos se redujeron en comparación con el extracto sin enzima. Las otras fases móviles utilizadas, las cuales son más apolares, no mostraron una buena resolución de los perfiles cromatográficos lo cual no permitió observar la presencia de diferencias entre los extractos ni entre los métodos de extracción y por lo tanto no se muestran en este trabajo.

Desarrollo de una nueva autografía basada en la reducción del cobre (II) (CUPRAC)

Para poder desarrollar un ensayo autográfico es indispensable lograr una inmovilización estable de la reacción química sobre la placa de CCD durante el tiempo necesario para la formación del producto y contar con un sistema revelador reactivo/producto que permita visualizar claramente un cambio de color cuando se produce la reacción de interés. Este cambio de color debe permitir diferenciar sobre la placa zonas en las cuales la reacción química no se ha producido respecto de aquellas zonas en las cuales actuó el agente reductor. Los ensayos autográficos requieren, un cambio de color que pueda ser observable a simple vista, por lo tanto, los reactivos o el producto de la reacción deben poseer una longitud de onda de absorción característica en el rango visible. En este contexto, se intentó llevar adelante sobre la placa cromatográfica un ensayo que utiliza el complejo neocuproína-cobre como cromóforo (**Figura 3**). En presencia de un reductor, el cromóforo celeste neocuproína-Cu(II) es reducido a neocuproína-Cu(I) de color amarillo. Para la puesta a punto del ensayo se utilizó como control positivo TROLOX ya que es el antioxidante de referencia más utilizado en los ensayos espectrofotométricos.

Elección de condiciones de aplicación de los reactivos sobre la placa:

Se evaluaron dos formas de aplicar los reactivos sobre la placa cromatográfica:

- (a) por rociado directo de una solución reveladora.
- (b) por inmovilización de los reactivos en gel de agarosa y posterior inmersión en solución de cobre.

a) _ En primer lugar se evaluó la aplicación por rociado directo, para ello se diagramó un ensayo utilizando siembras (0,5 μ L) de soluciones de TROLOX de concentración decrecientes

(10; 2; 1; 0,5; 0,2 y 0,1 mg/mL). Por lo tanto, las masas de TROLOX depositadas sobre la placa cromatográfica fueron de 5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 y 0,05 μg respectivamente.

Se diagramaron tres secuencias variando la cantidad de neocuproína (NC) en concentraciones decrecientes con el fin de observar el límite de detección. La secuencia 1 fue la que mayor concentración de neocuproína contenía y los experimentos 2 y 3 se redujeron en un 30 y un 50% respectivamente, mientras que el resto de los reactivos se mantuvieron en la misma concentración que la secuencia 1.

Secuencia 1: 1,7 mL de CuCl_2 (12,79 mM) + 1,7 mL de NC (7,5 mM) + 1,7 mL de NH_4Ac (1 M) pH 7.

Secuencia 2: 1,7 mL de CuCl_2 (12,79 mM) + 1,2 mL de NC (7,5 mM) + 1,7 mL de NH_4Ac (1 M) pH 7.

Secuencia 3: 1,7 mL de CuCl_2 (12,79 mM) + 0,85 mL de NC (7,5 mM) + 1,7 mL de NH_4Ac (1 M) pH 7.

En esta primera parte del ensayo se observó que el mejor resultado se obtuvo aplicando el experimento 1, la cual contiene la mayor concentración de neocuproína.

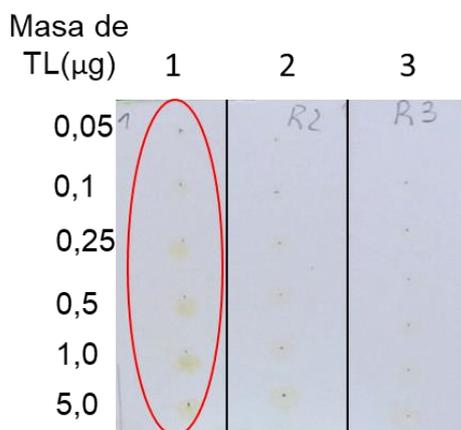


Figura 9: Revelado de autografía de CUPRAC por rociado sobre la placa: secuencia 1, secuencia 2 y secuencia 3. TL: TROLOX. Se resalta en rojo la secuencia que produjo mejores condiciones visuales de revelado.

La secuencia 1 permitió observar puntos amarillos en un fondo blanco. Dado que no pudo detectarse el límite de sensibilidad inferior, se amplió el rango de masa de TROLOX sembrada a menores concentraciones. Por lo tanto, se realizó una nueva secuencia sembrando por

duplicado en cada placa 5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 y 0,0125 μg y aplicando la secuencia 1 se observó que el límite de detección fue 0,025 μg (**Figura 10**).

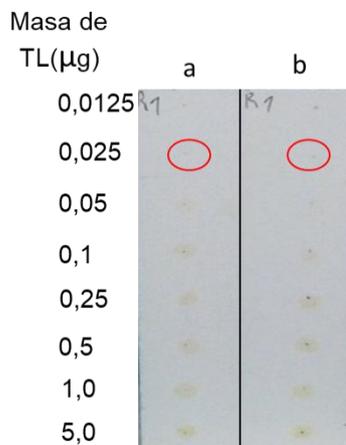


Figura 10: Límite de detección de la autografía de CUPRAC revelada por rociado directo. TL: TROLOX. Se resalta en rojo el punto de menor concentración visible.

A pesar de que pudo visualizarse un límite de detección de 0,025 μg los puntos amarillos observados fueron débiles. Para subsanar este inconveniente se decidió ampliar el estudio e inmovilizar el sistema en un gel de agarosa. Las autografías por inmovilización en gel fueron utilizadas satisfactoriamente por diferentes investigadores para llevar adelante reacciones químicas (Zampini et al., 2010) y enzimáticas (Micheloni et al., 2018).

Para esto se diagramaron 3 nuevas secuencias utilizando placas de 16 cm^2 tal como se detallan a continuación. En todos se utilizó agarosa como agente inmovilizante y se la disolvió a 80°C en microondas.

Secuencia 1: se disolvieron 13,28 mg de agarosa en 2,35 mL de solución que contenía 1,175 mL CuCl_2 de concentración 12,79 mM y 1,175 mL de NC de concentración 7,5 mM. La solución se volcó de forma homogénea sobre la placa y luego se la sumergió durante 1 minuto en una solución de NH_4Ac . (1 M) pH 7.

Secuencia 2: se disolvieron 13,28 mg de agarosa en 2,35 mL de solución que contenía 0,78 mL de CuCl_2 (12,79 mM) + 0,78 mL de NC (7,5 mM) + 0,78 mL NH_4Ac . 1 M. Luego toda la solución se distribuyó de forma homogénea sobre la placa.

Secuencia 3: 13,28 mg de agarosa se disolvieron en 2,35 mL NH₄Ac (1 M), esta solución se volcó sobre la placa y luego de solidificar se la sumergió durante 1 minuto en una solución que contenía 10 mL de Cl₂Cu (12,79 mM) + 10 mL de NC (7,5 mM).

Se observó que la secuencia 3 fue la que mostró mejor diferenciación entre el color de halo y el color de fondo con un límite de detección de 0,025 µg, similar al obtenido por rociado directo (Figura 11).

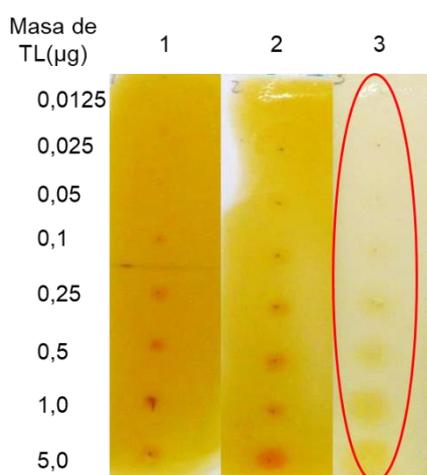


Figura 11: Autografía para CUPRAC revelada por inmovilización de los reactivos en gel de agarosa. Se indica en rojo la secuencia que presentó mejor contraste entre el fondo y el color de reacción.

Por lo tanto, el protocolo definitivo fue el siguiente:

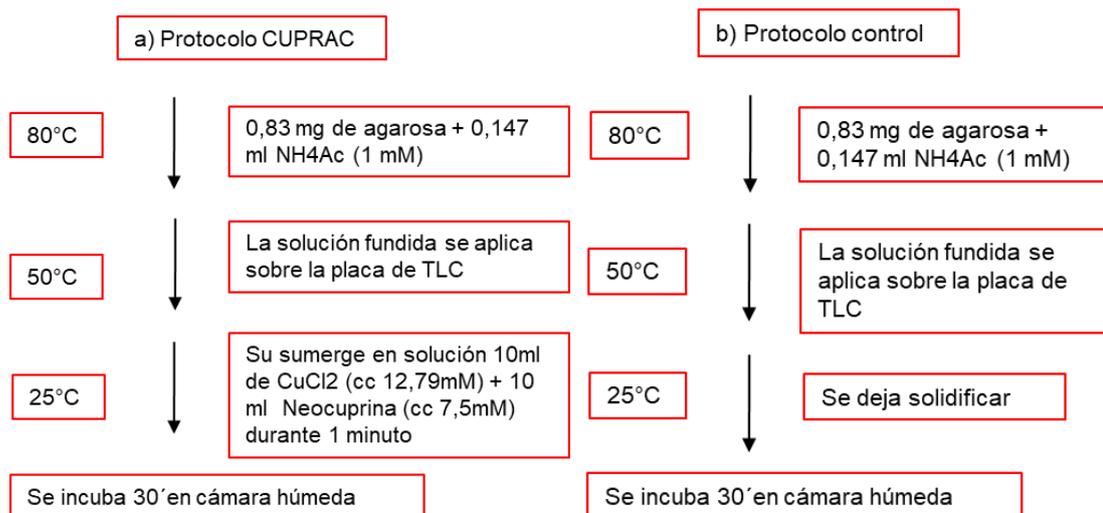


Figura 12: a) protocolo definitivo CUPRAC b) protocolo control.

Además, se desarrolló un protocolo control (**Figura 12 b**) con la finalidad de asegurar que las manchas amarillas observadas no se producían por reacciones inespecíficas entre los extractos y agarosa disuelta en acetato de amonio.

El análisis autográfico se muestra en la (**Figura 13**) donde se analizaron los extractos obtenidos con y sin asistencia enzimática. Las especies Uu (calle 15 y 16) y Eh (calle 17 y 18) mostraron que los extractos generados por tratamiento con Viscozyme L. (calles pares) Rf aproximado 0,65 (flechas amarillas) presentaron zonas amarillas (positivas) que no estaban presentes en los extractos sin el tratamiento enzimático (calle 15 y 17). Por otro lado, comparando las calles 7 y 8 (especie Lm) se pudo observar en la calle 8 una disminución en intensidad de los halos en las zonas de Rf 0 y 0,3 luego del tratamiento enzimático, el mismo efecto, pero con menor intensidad se observa cuando se comparan las calles 9 y 10 para la especie Pc en la zona de Rf 0 a 0,5. Esto indicaría que el tratamiento enzimático alteró el extracto disminuyendo la capacidad reductora de Cu (II).

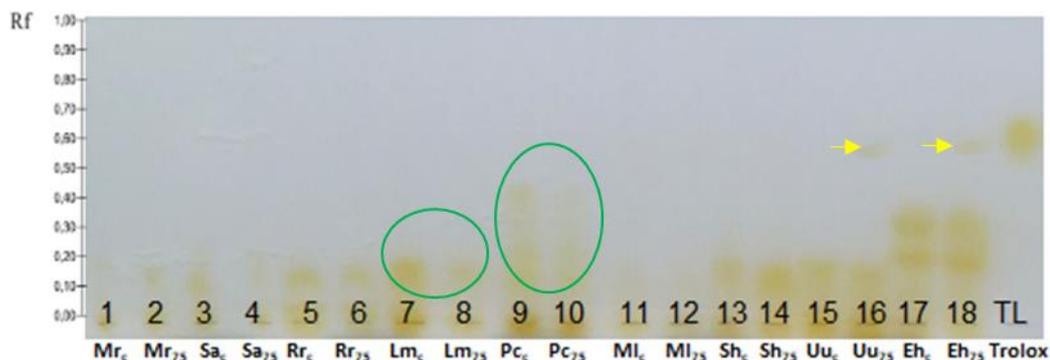


Figura 13: Autografía para CUPRAC. Siembra 50 µg. Fase móvil acetonitrilo : agua (90:10); calles impares extractos controles (Ec); calles pares extractos obtenidos con el complejo enzimático (E75).

En la **Figura 14** se muestra el resultado del protocolo autográfico de control. En la misma se puede visualizar que en la calle 16 y 18 con un valor de Rf de 0,65 no se observan manchas amarillas lo que nos permite sugerir que las manchas observadas en el mismo valor de Rf en la Figura 14 fueron producidas por la reducción del cobre (II) por compuestos presentes en los extractos. Lo mismo puede observarse para casi todas las otras calles en las que se detectó capacidad reductora en el test y una desaparición del color amarillo. En la Figura 15 se observa una leve coloración amarillenta en las calles 9 y 10 que fue detectada por la cámara fotográfica y no visualmente. Si bien está presente es de menor intensidad que la actividad detectada en la placa de ensayo. Esto nos permite sugerir la presencia de alguna reacción inespecífica entre los componentes del extracto y los reactivos produciendo esta coloración. Posteriores estudios deben llevarse a cabo por un análisis de los parámetros de luminiscencia (L^* ; b^* y a^*) para cuantificar el color amarillo neto entre la placa control y la placa de reacción de CUPRAC en ambas calles.

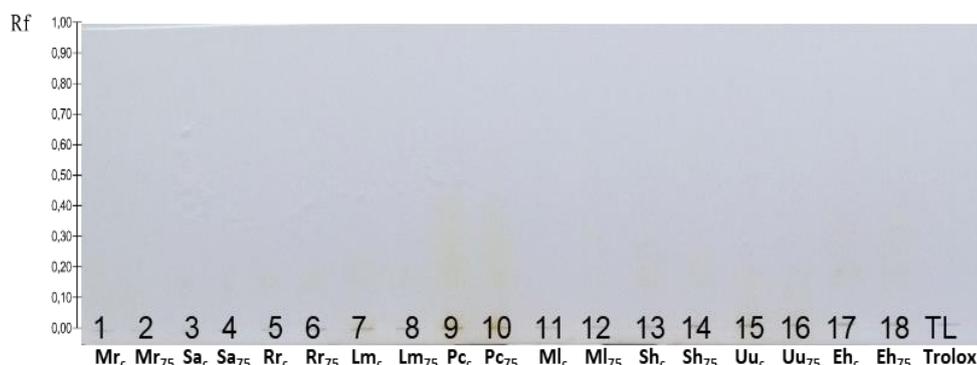


Figura 14: Autografía control. Siembra 50ug. Fase móvil acetonitrilo : agua (90:10); calles impares extractos controles (Ec); calles pares extractos obtenidos con el complejo enzimático (E75).

Autografía revelada con ensayo de ABTS

En la **Figura 15** se puede observar el resultado de la autografía de captación de radical ABTS^{•+}. Los compuestos detectados por esta técnica ejercen su acción antioxidante transfiriendo electrones o hidrógenos al radical ABTS^{•+} (azul), generando ABTS (incoloro) y como consecuencia se genera un halo blanco. En la calle 14, correspondiente al extracto de Sh₇₅, se observaron halos blancos con valores de Rf de 0,20 y 0,40 que no están presentes en el extracto control "Sh_c", (calle 13). Por otro lado, en el extracto Eh_c (calle 17), mostró un halo con un Rf de 0,45 (flecha color rojo) que no se observó en Eh₇₅.

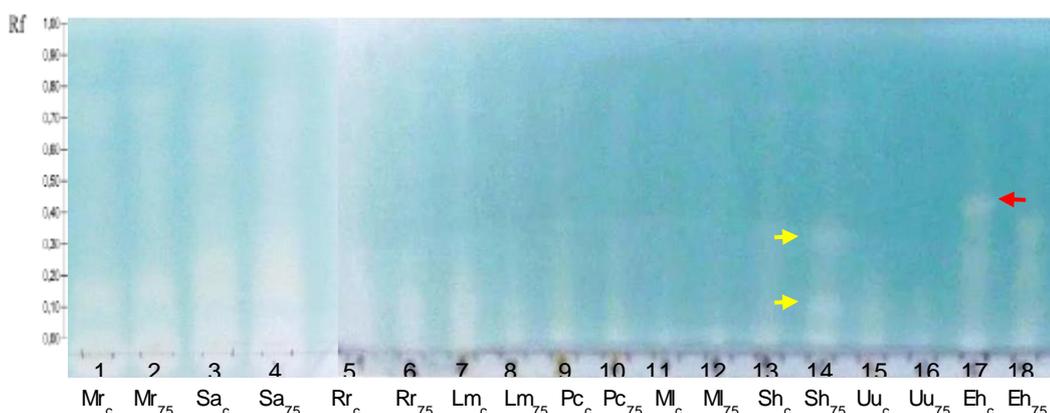


Figura 15: Placa revelada con ensayo de ABTS^{•+}. Sembrada con 50 µg de cada uno de los extractos y corrida con fase móvil acetonitrilo: agua (90:10), Los números impares son las calles donde se sembraron los extractos controles (E_c) mientras que los números pares son aquellos extractos tratados con el complejo enzimático (E_{ENZ}).

También se puede observar que la autografía de ABTS^{•+}, permitió visualizar compuestos que están solo presentes en Sh₇₅ a un valor de Rf de 0,2 y al mismo valor de Rf no se visualizan diferencias en las placas reveladas con UV (**Figura 16**). En este caso la autografía de ABTS^{•+} sirvió como medio revelador.

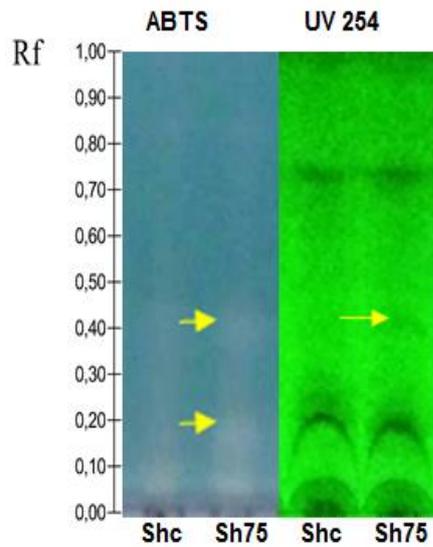


Figura 16: Autografía revelada con ABTS⁺⁺ capta la aparición de nuevos compuestos que no se observaron con luz UV a 254 nm.

Autografía revelada con ensayo de DPPH

En la (Figura 17) se puede visualizar la autografía de DPPH[•] en los extractos obtenidos. Se puede observar la aparición de un halo blanco (calle 16, flecha amarilla) a Rf 0,6 correspondiente al extracto de Uu₇₅ que no se observó en el extracto control Uu_c (calle 15). Además, se observó la disminución de la capacidad antioxidante en la especie Pc visualizado en la placa por una disminución en la intensidad de los halos blancos de la calle 10 "Pc₇₅", en la zona comprendida en los valores de Rf de 0 a 5, con respecto a la calle 9 "Pc_c" (llave naranja). El efecto contrario se observa para la especie Sh (calle 13 y 14). Se puede visualizar en la zona que tiene un valor de Rf 0,3 una serie de compuestos que generan halos que tienen mayor intensidad en Sh₇₅ con respecto al control (circulo verde). Esto sugirió que el tratamiento enzimático en esta especie mejoró la recuperación de metabolitos antioxidantes. El mismo efecto se observa con menos intensidad en la especie MI (calle 11 y 12) Rf 0,6 (circulo verde).

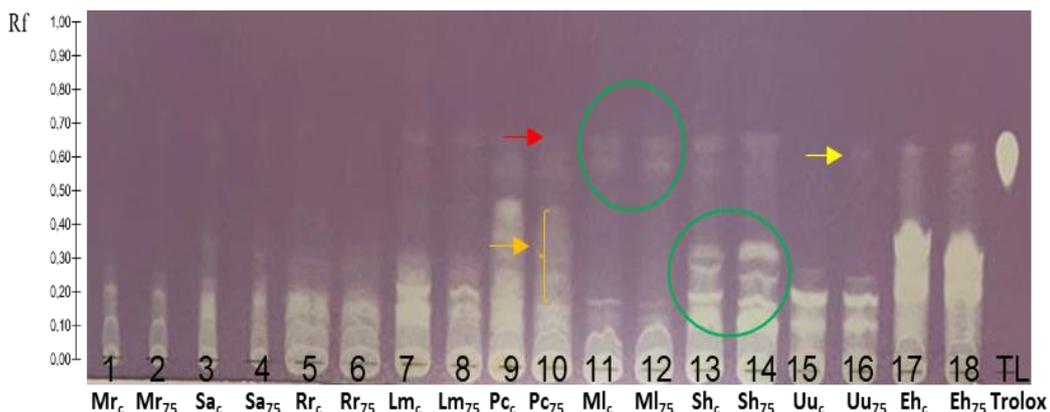


Figura 17: autografía DPPH•. Siembra (masa en µg) Fase móvil: acetonitrilo : agua (90:10); calles impares: EC; calles pares: EENZ.

En la **Figura 18** se puede visualizar el análisis integrado de las autografías. Se observo con un valor de Rf 0,4 un halo blanco en la autografía de ABTS^{•+} (calle 2) correspondiente al extracto de Sh obtenido por asistencia enzimática. Otras series de compuestos, visualizados por halos blancos, se observan en las calles 1 y 2 con un Rf de 0.35 en la autografía de DPPH. Además, en la región de Rf comprendida entre 0,2 y 0,4 no se observan manchas amarillas en la autografía de CUPRAC. Esto permitiría sugerir que los compuestos que se encuentran en esta zona en las autografías de DPPH• y ABTS^{•+} no ejercen su efecto antioxidante transfiriendo electrones debido a que no se observaron efectos positivos en la autografía de CUPRAC.

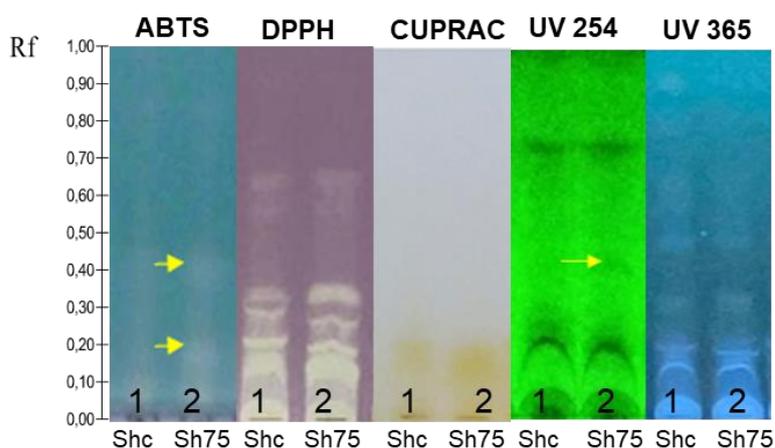


Figura 18: autografías ABTS^{•+}, DPPH• y CUPRAC. Reveladas a 254 y 365 nm. FM acetonitrilo : agua (90:10); siembra de 50 µg de cada uno de los extractos. Calle 1 “Shc” y calle 2 “Sh75”.

En la **Figura 19** se pudo observar para la especie Uu (calle 2) tratada con Viscozyme L., a un valor de Rf de 0,6 un halo blanco el cual indica que esta especie presenta actividad antirradicalaria para DPPH[•]. Al mismo valor de Rf, pero en la autografía de CUPRAC no se visualiza una mancha amarilla, lo que indica que los responsables de la actividad antirradicalaria observada no pueden reducir el Cu(II). Al igual que en el caso anterior de la especie Sh, se sugiere que los compuestos en esta zona tienen actividad antioxidante por transferencia de H. Esto subraya la importancia de utilizar metodologías complementarias en búsqueda de actividad antioxidante en mezclas complejas.

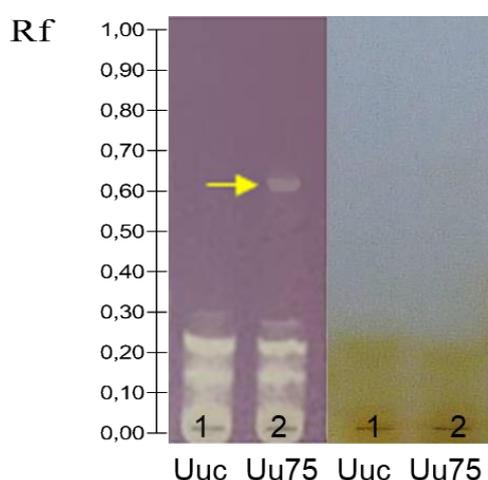


Figura 19: Autografía DPPH[•] y CUPRAC. Siembra de 50 µg de cada uno de los extractos. Fase móvil acetónitrilo : agua (90:10). Calle 1 Uu c, Calle 2 Uu 75

Autografía para inhibidores de polifenol oxidasa

En la **Figura 20** se puede visualizar los resultados de la autografía de la enzima polifenol oxidasa (PPO). Se observó, la aparición de un halo tenue en la calle 6, perteneciente a la especie Rr en el tratamiento con Viscozyme L. a un valor de Rf 0,30 (flecha amarilla). El extracto control Rr_c mostró un halo de menor dimensión y similares características que el presentado en el tratamiento enzimático con un valor de Rf de 0,40. Esto sugiere que el tratamiento con Viscozyme ha alterado la composición del extracto.

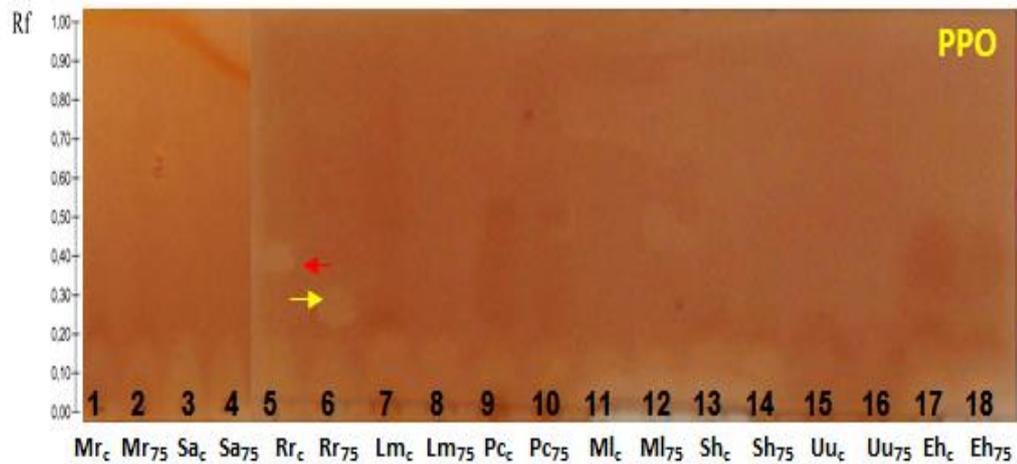


Figura 20: Autografía PPO. Siembra (400 µg) Fase móvil acetonitrilo : agua (90:10); calles impares (Ec); calles pares (EENZ).

Ensayos cuantitativos de capacidad antioxidante

En el **Gráfico 2** se observan los valores obtenidos para polifenoles totales. En cinco de las nueve muestras la extracción de polifenoles fue mayor estadísticamente en los extractos tratados con enzimas comparados con los extractos controles (especies Rr, Pc, Uu, Eh y Mr). El agregado de pectinasas y celulasas al proceso de molienda de frutas en la preparación de jugos frutales aumento en un 90% la cantidad de compuestos fenólicos extraídos (Nogueira et al., 2003). Landbo y Meyer (2004) concluyeron que el rendimiento de extracción de antocianinas dependía de la cantidad de enzima agregada en el proceso de extracción, la temperatura y el tiempo del proceso de extracción.

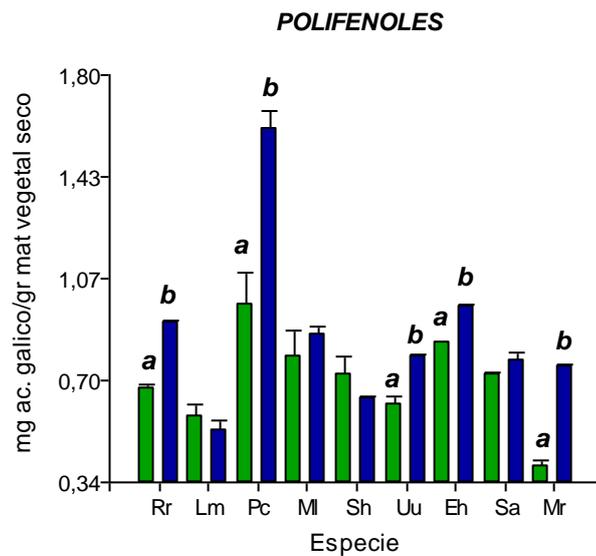


Gráfico 2: Contenido de polifenoles promedio. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por g de materia seca para EENZ (azul) y Ec (verde). Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre EENZ y Ec para una misma especie ($p < 0,05$).

El análisis de las diferencias de las medias de la actividad antirradicalaria mediada por transferencia de electrón o hidrogeno (Munteanu y Apetrei, 2021) se muestra en el **Gráfico 3** (a). En los valores obtenidos para la captación de DPPH, las especies Rr, Eh, Sh y Mr mostraron un aumento estadísticamente significativo en la actividad captadora de DPPH luego de la extracción mediada por enzimas carbohidrolasas. Mushtaq et al. (2015) reportaron que la extracción asistida por enzimas y fluidos supercríticos en piel de granada mejoraron significativamente la recuperación de capacidad antioxidante. Las especies Lm y Sa mostraron el efecto contrario, es decir el extracto control tuvo mayor capacidad captadora de DPPH que el extracto obtenido con Viscozyme L. y el efecto fue significativo. En el **Gráfico 3** (b) se observan los resultados de la captación de ABTS⁺. En este caso, el 89 % de las especies extraídas con Viscozyme L. mostraron mayor recuperación de metabolitos antioxidantes con respecto a los extractos controles, solo en las especies Pc, Uu, Eh, Sa y Mr el efecto fue estadísticamente significativo.

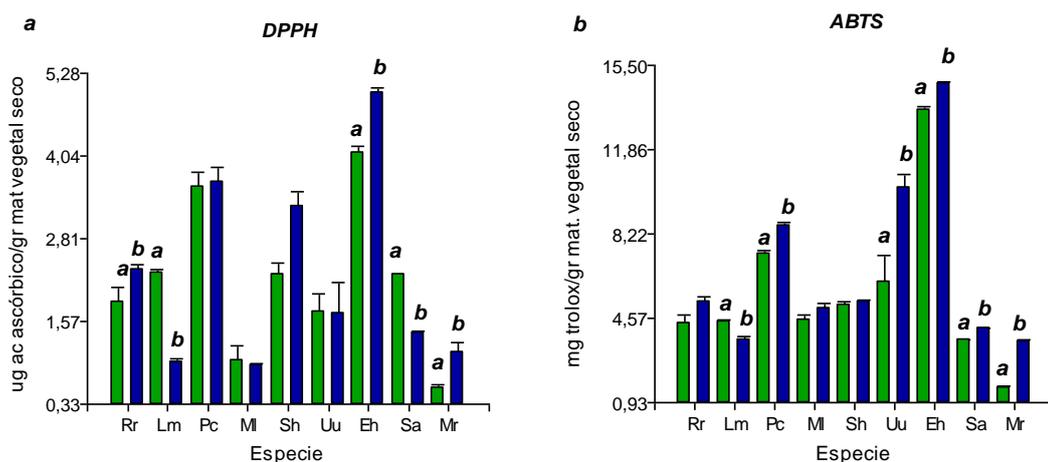


Gráfico 3: actividad antirradicalaria medida por transferencia de electrón o hidrógeno (ABTS** y DPPH*), para EENZ (azul) y Ec (verde). Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre EENZ y Ec para una misma especie ($p < 0,05$).

En el **Gráfico 4** se observan los resultados de la capacidad antioxidante mediada por transferencia de electrón (CUPRAC). En 5 especies (Rr, Pc, Uu, Eh y Mr) se observaron diferencias significativas entre EENZ y Ec. En las especies Rr, Pc y Mr, el efecto de la asistencia enzimática en la extracción mostró importantes diferencias.

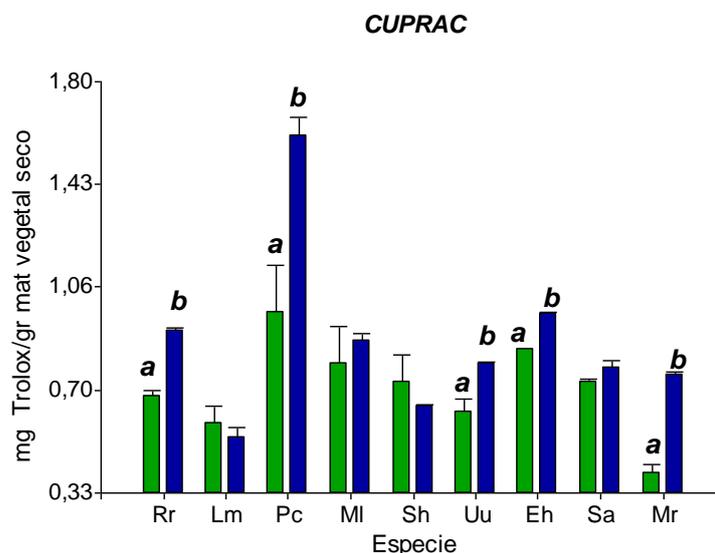


Gráfico 4: actividad antioxidante medida por transferencia de electrón (CUPRAC), EENZ (azul) y Ec (verde). Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre EENZ y Ec para una misma especie ($p < 0,05$).

El estudio cuantitativo integrado de los ensayos de los antioxidantes (ABTS, CUPRAC y DPPH) mostro que el efecto del Viscozyme L. en la asistencia enzimática fue muy superior para el 22 % de las especies estudiadas (Mr y Eh) debido a que mostraron importantes diferencias significativas entre los extractos enzimáticos y los extractos controles. Además, se observó un efecto intermedio en las especies Rr, Pc, Sa y Uu. El efecto del tratamiento enzimático en la extracción no fue importante en la recuperación de los metabolitos antioxidantes para la especie Lm y Ml, en la primera especie (Lm) el resultado del extracto control supero al resultado del extracto enzimático mientras que en la segunda (Ml) no se observaron diferencias significativas en ambos tratamientos en ninguno de los ensayos antioxidantes.

CONCLUSIONES

La asistencia enzimática incrementó la masa de extracto obtenido en la mayoría de las especies estudiadas, fundamentalmente en Mr, Sa, Rr, Pc y Uu.

La utilización de enzimas alteró la composición de los extractos. Cinco especies (Mr, Rr, Sh, Uu y Eh) mostraron aparición de compuestos que no estaban presente en los controles, mientras que cuatro de ellas (Lm, Ml, Sh y Rr) mostraron desaparición de compuestos luego del proceso extractivo asistido por enzimas carbohidrolasas.

El efecto de la asistencia enzimática sobre la recuperación de capacidad antioxidante medida por los métodos utilizados en esta tesis fue dependiente de la especie en estudio. Las especies Pc, Eh y Mr mostraron un incremento de recuperación luego del tratamiento con enzima. Especialmente las dos primeras presentaron altos valores de capacidad antioxidante comparadas con el resto lo que las hace interesantes candidatas para continuar su estudio.

Se desarrolló un nuevo método autográfico que permite detectar de manera rápida y sencilla compuestos antioxidantes que ejercen su acción por reducción, diferenciándose de las autografías antioxidantes reportadas (DPPH[•] y ABTS^{•+}) que detentan compuestos antioxidantes que ejercen su acción por un mecanismo mixto (reducción/transferencia de hidrogeno).

El análisis integrado de las tres autografías antioxidantes permitió detectar compuestos positivos para ABTS^{•+} y DPPH[•] y negativos para CUPRAC en las especies Sh y Uu diferenciando de esta manera su mecanismo de acción ya en el análisis separativo preliminar.

BIBLIOGRAFÍA

- _ Akar, Z., & Burnaz, N. A. (2019). A new colorimetric method for CUPRAC assay with using of TLC plate. *LWT*, 112, 108212.
- _ Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- _ Astley S. (2003). Dietary antioxidants past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 93-98.
- _ Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- _ Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes—A review. *Molecules*, 19(9), 14821-14842.
- _ Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., Saad, Z., & Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(6), 507-513.
- _ Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- _ Blainski, A., Lopes, G. C., Palazzo de Mello, J. C. (2013). Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L.
- _ Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- _ Bush, R.K., Taylor, S.L., Hefle, S.L. (1998). Adverse reactions to food and drug additives. *Allergy: principles and practice*, 2, 1183-1198.
- _ Buta, J.G. y Moline, H.E. Prevention of browning of potato slices using polyphenol oxidase inhibitors and organic acids. *J. Food Quality*, 2001, 24, 271-282.

- _ Camargo, A. C., Regitano d' Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food chemistry*, 212, 395-402.
- _ Carciochi, R. A., D'Alessandro, L. G., Vauchel, P., Rodriguez, M. M., Nolasco, S. M., & Dimitrov, K. (2017). Valorization of agrifood by-products by extracting valuable bioactive compounds using green processes. In *Ingredients extraction by physicochemical methods in food* (pp. 191-228). Academic Press.
- _ Chen, C., Pearson, A.M., Gray, J.I. (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43(3), 177-183.
- _ Dar, N. G., Hussain, A., Paracha, G. M., & Akhter, S. (2015). Evaluation of different techniques for extraction of antioxidants as bioactive compounds from citrus peels (industrial by products). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 15(4), 676-682.
- _ Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2014). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84.
- _ Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 9(2), 14-32.
- _ Dueñas, M., Hernandez, T., & Estrella, I. J. F. C. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101(1), 90-97.
- _ Fuchs, J. (1998). Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7), 848-873.
- _ García, P., & Furlan, R. L. E. (2015). Multiresponse optimization applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26(4), 287-292.
- _ Ghasemzadeh A., Jaafar, H., Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiberofficinale* Roscoe). *Molecules*, 15(6), 4324-4333.
- _ González, A. M., Presa, M. F., & Lurá, M. C. (2003). Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Revista Fabricib*, 7, 117-122.

- _ Granada, G. L., Vendruscolo, J. L., Treptow, R. O., 2001. Caracterizacáo química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp. L.). *Current Agricultural Science and Technology*, 7(2).
- _ Gutteridge, J. M. (1994). Free radicals and aging. *Reviews in Clinical Gerontology*, 4(4), 279-288.
- _ Hassan, A. M. S. (2012). TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 23(4), 405–407.
- _ Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbylpalmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry*, 71(2), 229-233.
- _ Ito, N., Fukushima, S., Haqlwara, A., Shibata, M., Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70(2), 343-352.
- _ Jiang, S., & Penner, M. H. (2015). Selective oxidation of enzyme extracts for improved quantification of peroxidase activity. *Analytical biochemistry*, 476, 20-25.
- _ Jukanti, A. (2017). Polyphenol Oxidase (s): Importance in Food Industry. In *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants* (pp. 93-106). Springer, Singapore.
- _ Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., & Biró, C. (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinicachimicaacta*, 364(1-2), 61-66.
- _ Landbo, A.K., Meyer, A.S., 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 503-513.
- _ Lantzourakia D. Z., Sinanogloub, V. J., Zoumpoulakisc P., Proestosa C. (2015). Comparison of the Antioxidant and Antiradical Activity of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) by Ultrasound-Assisted and Classical Extraction.
- _ Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2008). Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. *European Food Research and Technology*, 228(1), 153-158.
- _ Lopez, J. B., Rojano, B., Lasso, C., Sánchez, I. (2008). Evaluacáo genotóxica y citotóxica del isoespintanol en cultivos de linfocitos humanos. En 2008 Tercer Congreso Colombiano de Biotecnología-Segundo Seminario Internacional de Bionegocios. Cartagena, Colombia.
- _ Ly, T.N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., y Yamauchi, R. Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *J.Agr. Food Chem*, 2005, 53, 8183–8189.

- _ Micheloni 2014. Búsqueda de extractos naturales y modificados con capacidad antioxidante. Tesis de maestría Universidad Tecnológica Nacional Regional Rosario.
- _ Micheloni y Farroni 2017. Desarrollo de una nueva autografía para detectar inhibidores de peroxidasa. Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- _ Micheloni, O. B., Farroni, A. E., García, P., & Furlan, R. L. (2018). Rapid autographic method for detection of enzymatic browning inhibitors based on enzyme immobilization. *Food chemistry*, 269, 638-643.
- _ Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- _ Moon, K. M., Kim, C. Y., Ma, J. Y., & Lee, B. (2019). Xanthone-related compounds as an anti-browning and antioxidant food additive. *Food Chemistry*, 274, 345-350.
- _ Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.
- _ Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- _ Nogueira, A., Santos, L. D., Wiecheteck, F. V. B., Guyot, S., & Wosiacki, G. (2009). Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. *Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, 9(3).
- _ Odhav B., Beekrum S., Akula U. and Baijnath H. (2007). Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 430-435.
- _ Organización de las Naciones Unidas (2018). Objetivos de Desarrollo Sostenible. <https://onu.org.gt/objetivos-de-desarrollo>.
- _ Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Çelik, S. E. & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
- _ Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- _ Prerna, N., Eldho, V., Charanjit, K., 2015. Optimization of enzymatic maceration for extraction of carotenoids and total phenolics from sweet pepper using surface response methodology. *Indian Journal of Horticulture*, 72 (4), 547552.

- _ Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- _ Ramallo, I. A., Zacchino, S. A., & Furlan, R. L. E. (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*, 17(1), 15–19.
- _ Ramallo, I. A., Sierra, M. G., & Furlan, R. L. (2012). Discovery of β -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, 8(1), 112-117.
- _ Ramallo, I. A., Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2015). Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26(6), 404–412.
- _ Rapoport, E. H., Marzocca, A., & Drausal, B. S. (2009). Malezas comestibles del cono sur y otras partes del planeta (No. 635.1/ 8). INTA.
- _ Rhee, I. K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1–2), 217–223
- _ Rioja Antezana, A. P., Vizaluque, B. E., Aliaga-Rossel, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodiumquinoa. *Revista Boliviana de Química*, 35(5), 168-176.
- _ Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Sáez, J., Schinella, G., Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, 15(1), 173-181.
- _ Rojano, B. A., Zapata Vahos, I. C., Alzate Arbeláez, A. F., Mosquera Martínez, A. J., Cortés Correa, F. B., Gamboa Carvajal, L. (2011). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (açai colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(2), 6213-6220.
- _ Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18(3), 209–212.
- _ Salazar, M. O., Micheloni, O., Escalante, A. M., & Furlan, R. L. E. (2011). Discovery of a β -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15(3), 713–719.

- _ Sánchez-Moreno, C., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2002). LDL oxidizability indexes in measurement of antioxidant activity in selected Spanish wines. *Nutrition research*, 22(4), 507-517.
- _ Schmeda-Hirschmann G., Feresin G., Tapia A., Hilgert N. and Theoduloz C. (2005). Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(8), 1357-1364.
- _ Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232*, 1-44.
- _ Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.
- _ Toivonen, P. M., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology*, 48(1), 1-14.
- _ Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- _ Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- _ Vinson J., Su X., Zubik L., y Bose P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49(11), 5315-5321.
- _ Wang, M. Y., West, B. J., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., Anderson, G. (2003). *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, (23), 1127-41.
- _ Wangthong, S., Tonsiripakdee, I., Monhaphol, T., Nonthabenjawan, R., & Wanichwecharungruang, S. P. (2007). Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor.
- _ Yang, J., Meyers, K.J., Vander Heide, J., & Liu, R.H. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *J. Agri. Food Chem.*, 2004, 52, 6787–6793.

_ Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS+ immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1159-1163. *ection. Biomedical Chromatography*, 21(1), 94–100.

_ Zheng, H. Z., Kwon, S. Y., & Chung, S. K. (2020). Viscozyme L aided flavonoid extraction and identification of quercetin from *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 63(3), 197-201.