



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Evaluación de la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*

Trabajo de Titulación, modalidad de Proyecto de Investigación previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Narcisa Anabel Mera Ortiz

Tutor: MSc. Yunys Pérez Betancourt

Ambato – Ecuador

Noviembre -2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. Yunys Pérez Betancourt

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.

Ambato, 05 de octubre del 2018



MSc. Yunys Pérez Betancourt

C.I. 175647274-0

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Narcisa Anabel Mera Ortiz manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Narcisa Anabel Mera Ortiz

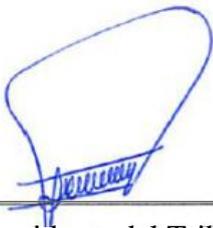
C.I. 180453464-0

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los suscritos Profesores 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 de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Danae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9



Dra. Cristina Alexandra Arteaga Almeida
C.I. 050281765-3

Ambato, 30 de octubre del 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso de este proyecto de investigación 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 proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Narcisa Anabel Mera Ortiz

C.I. 180453464-0

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, que es amor infinito.

A la memoria de mi abuelito Manuel, por su legado y cariño.

A mis padres, por guiarme en el camino. Siempre quise ser su orgullo.

*A mi ñaño, para quien traté de ser un buen ejemplo. Gracias por acompañarme
siempre.*

A mi abuelita Rosita.

A mis tíos.

Los amo

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por haber aportado en mi formación profesional y personal.

A mi tutor, MSc. Yunys Pérez por el tiempo y ayuda que me ha brindado en la realización de este trabajo.

A mis profesores, Dra. Sandra Horvitz, Dr. Orestes López y Mg. Dolores Robalino por su apoyo en el desarrollo de mi tesis. A la Dra. Nahir Dugarte, por la confianza que siempre depositó en mí.

A la Mg. Danae Fernández y Dra. Cristina Arteaga por las revisiones realizadas.

A mis amigos y amigas, gracias por los momentos que hemos compartido, por escucharme y por creer que puedo llegar lejos.

A todos quienes en su momento fueron parte de mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	i
Aprobación del tutor.....	ii
Declaración de autoría del trabajo de titulación.....	iii
Aprobación del tribunal de grado.....	iv
Derechos de autor.....	v
Dedicatoria.....	vi
Agradecimiento.....	vii
Índice de contenidos general.....	viii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
EL PROBLEMA	3
1.1 Tema de investigación	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5

2.1.1	Propiedades medicinales de las plantas.....	5
2.1.2	Liposomas	5
2.1.3	<i>Greigia mulforddi</i>	6
2.1.3.1	Clasificación taxonómica.....	6
2.1.4	Actividad antioxidante.....	7
2.1.4.1	Polifenoles y actividad antioxidante.....	8
2.1.4.2	Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	8
2.1.4.3	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.2	Hipótesis.....	11
2.2.1	Hipótesis nula	11
2.2.2	Hipótesis alternativa	11
2.3	Señalamiento de variables de la hipótesis	11
2.3.1	Variable independiente	11
2.3.2	Variable dependiente	11
CAPÍTULO III.....		12
MATERIALES Y MÉTODOS		12
3.1	Recolección de material vegetal.....	12
3.2	Preparación del material vegetal	12
3.3	Obtención de extractos vegetales	12
3.4	Determinación de sólidos solubles totales (SST).....	12
3.5	Determinación del rendimiento de sólidos extraídos	13
3.6	Cuantificación de polifenoles totales (método Folin – Ciocalteu).....	13
3.7	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante (método del radical 2,2-diphenil-1-1picrylhydrazyl, DPPH)	14
3.8	Optimización del proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante.....	14
3.9	Obtención del extracto vegetal con variables óptimas	16

3.10	Concentración del extracto vegetal	16
3.11	Obtención de liposomas	16
3.12	Determinación <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo	17
3.12.1	Aislamiento de levadura	17
3.12.2	Determinación de las concentraciones oxidantes de peróxido de hidrógeno	17
3.12.3	Condiciones de estrés a analizar	18
3.12.4	Determinación de la capacidad de los liposomas y extracto de <i>G. mulfordii</i> para promover una respuesta antioxidante	19
3.13	Análisis estadístico	19
CAPÍTULO IV		20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		20
4.1	Análisis y discusión de resultados	20
4.1.1	Optimización del proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante	20
4.1.3	Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	26
4.1.4	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo	29
4.2	Verificación de hipótesis	42
4.2.1	Hipótesis nula	42
4.2.2	Hipótesis alternativa	42
CAPÍTULO V		43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		43
5.1	Conclusiones	43
5.2	Recomendaciones	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		45
ANEXOS		52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Factores, niveles y respuestas del diseño experimental para la optimización de variables del proceso de extracción.....	15
Tabla II. Descripción de las combinaciones del diseño experimental para la optimización de variables del proceso de extracción.....	15
Tabla III. Modelos de regresión para rendimiento de sólidos, polifenoles y DPPH....	20
Tabla IV. Valores óptimos para las condiciones de extracción y respuestas esperadas.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. <i>Greigia mulfordii</i>	7
Figura II. Diagramas de Pareto de las variables respuesta del proceso de optimización.....	21
Figura III. Gráficas de interacciones de las variables respuesta del proceso de optimización.....	22
Figura IV. Gráficas de superficie de respuesta para las variables del proceso de optimización.....	21
Figura V. Gráficas de cajas y bigotes de las variables respuesta a diferentes tiempos de extracción.....	24
Figura VI. Gráficas de cajas y bigotes de la actividad antioxidante in vitro del extracto y liposomas.....	28
Figura VII. Curvas efecto del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura VIII. Curvas efecto de la vitamina C en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura IX. Curvas efecto de extracto y liposomas de <i>G. mulfordii</i> en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura X. Curvas dosis-respuesta en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	41

RESUMEN

El extracto etanólico de *G. mulfordii*, obtenido mediante un proceso de optimización de extracción de compuestos fenólicos se microencapsuló en liposomas y se evaluaron sus actividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Los liposomas se prepararon mediante la técnica de secado por aspersión utilizando lecitina de soya y lactosa. La actividad antioxidante *in vitro* se determinó mediante el contenido de compuestos fenólicos y capacidad de inhibición de DPPH. La capacidad antioxidante *in vivo* se evaluó a través de la supervivencia celular de *S. cerevisiae* sometida a diferentes niveles de estrés con peróxido de hidrógeno. Se encontró que el contenido de compuestos fenólicos está relacionado con la capacidad de inhibición del radical DPPH y estos efectos alcanzan sus valores máximos al someter a ebullición por 1 h a la mezcla solvente- material vegetal en relación 22,65 ml: 1g, utilizando etanol al 70 % como solvente. Los liposomas presentan un contenido de polifenoles más bajo que el extracto etanólico y una actividad antioxidante por método DPPH que no fue concluyente. Se encontró que la microencapsulación del extracto etanólico de *G. mulfordii* en liposomas mejora su capacidad antioxidante, superando a la actividad de la vitamina C. La actividad antioxidante del extracto y liposomas es dosis – dependiente y el mayor efecto para todas las condiciones de estrés se alcanza a 500 mg /L de liposomas.

Palabras clave: Actividad antioxidante, *Greigia mulfordii*, extractos vegetales, liposomas, microencapsulación.

ABSTRACT

Greigia mulfordii ethanolic extract obtained from extraction of phenolic compounds, was microencapsulated in liposomes. Its antioxidant activities were evaluated *in vitro* and *in vivo*. Liposomes were prepared by the spray-drying technique using soy lecithin and lactose. Antioxidant activity was determined *in vitro* by the content of phenolic compounds and DPPH inhibition capacity. Antioxidant capacity was evaluated *in vivo* through *S. cerevisiae* cell survival, using hydrogen peroxide to induce different stress levels. Results show that phenolic compounds content is related to the inhibition capacity of DPPH radical and these effects reach their maximum values when the solvent:vegetable mixture in relation 22.65 ml: 1g is boiled for 1 h using 70% ethanol as solvent. The liposomes have a lower polyphenol content compared to the ethanolic extract, antioxidant activity by DPPH method was not conclusive. It was found that *G. mulfordii* ethanolic extract microencapsulation in liposomes improves its antioxidant capacity, surpassing the activity of vitamin C. The antioxidant activity of the extract and liposomes is dose-dependent and the greatest effect for all stress conditions was reached with 500 mg / L of liposomes.

Key words: Antioxidant activity, *Greigia mulfordii*, plant extracts, liposomes, microencapsulation.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii* es la línea de partida en el estudio de su posible uso como principio activo en una formulación comercial. *G. mulfordii* es una planta nativa del Ecuador de la cual no se ha encontrado referencia sobre sus posibles propiedades medicinales.

El estrés oxidativo se genera como resultado de un desequilibrio entre las defensas antioxidantes y la generación de especies reactivas, ocasionando daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Peláez, 2016), desencadenando múltiples enfermedades, entre ellas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales, enfermedad de Alzheimer, entre otras (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013).

Las plantas son fuente de compuestos biológicamente activos conocidos como fitoquímicos, entre ellos se destacan los compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerosas, antidiabéticas, neuroprotectoras, entre otras (Subhaswaraj, Sowmya, Bhavana, Dyavaiah, & Siddhardha, 2017). Por sus propiedades, las plantas reducen el riesgo de enfermedades que tienen origen en el estrés oxidativo (Roostae, Barzegar, Sahari, & Rafiee, 2017), la capacidad antioxidante de un extracto vegetal se la ha asociado con su contenido de compuestos fenólicos (Castangia et al., 2015).

De esta forma los productos derivados de plantas se proyectan como una fuente natural de compuestos bioactivos que no presentan la toxicidad ni efectos cancerígenos que se han reportado para algunos antioxidantes comerciales (Roostae et al., 2017).

Considerando que los antioxidantes derivados de las plantas son muy sensibles a las condiciones ambientales tales como la radiación UV, oxígeno, temperatura, entre otros, la microencapsulación de estos compuestos en liposomas surge como una

alternativa para preservar sus actividades biológicas (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017). Además, la microencapsulación en liposomas modifica la bioactividad de extracto (Hasan et al., 2014), de modo que los liposomas actúan como sistemas de transporte que facilitan la captación celular de los compuestos bioactivos (Bonechi et al., 2018).

Para evaluar la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *G. mulfordii*, primero, se establecieron las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes a partir de las brácteas florales, posteriormente, con el extracto optimizado se prepararon liposomas mediante la técnica de secado por aspersión. Finalmente se comparó la actividad antioxidante de los liposomas y extracto a través de la cuantificación de polifenoles, inhibición de DPPH y capacidad de promover una respuesta antioxidante en *S. cerevisiae* sometida a estrés con peróxido de hidrógeno.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LIPOSOMAS OBTENIDOS A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Greigia mulfordii*.

1.2 Justificación

Las enfermedades no transmisibles (ENT), también conocidas como enfermedades crónicas, cobran la vida de 41 millones de personas anualmente, lo que equivale al 71% de las muertes en el mundo. Entre las ENT, las enfermedades cardiovasculares son las que causan la mayor parte de muertes, seguidas del cáncer y de la diabetes (Organización Mundial de la Salud, 2018). En el Ecuador entre las principales causas de muerte se encuentran: la diabetes, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades hipertensivas (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2016).

Se sabe que el estrés oxidativo está relacionado con un gran número de enfermedades en las que destacan las enfermedades mencionadas (Alam et al., 2013; Peláez, 2016).

Es conocido que existen en el mercado algunos antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado (BHT) cuyo uso ha sido limitado debido a su toxicidad y efectos cancerígenos (Roostae et al., 2017)

Por las razones mencionadas ha surgido durante los últimos años la necesidad de los consumidores de usar antioxidantes que sean de origen natural, ante esto, existe una tendencia a nivel del mercado de buscar antioxidantes naturales especialmente de plantas debido a su contenido de compuestos bioactivos, como los polifenoles, para orientarlos al desarrollo de formulaciones de compuestos antioxidantes.

Es por ello, que es necesario realizar un análisis fitoquímico que asegure que el principio activo extraído de una planta no cause reacciones adversas en la salud del consumidor.

Este proyecto es innovador ya que no se han reportado investigaciones previas sobre la actividad antioxidante de compuestos extraídos de *Greigia mulfordii* ni del efecto que podría tener su encapsulación en liposomas. Este trabajo constituirá una base para posteriores aplicaciones en formulaciones farmacológicas, en cuyo caso se generaría un impacto económico positivo para las comunidades indígenas que habitan las zonas en las cuales esta planta es nativa.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Establecer las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de *Greigia mulfordii*.

1.3.2.2 Obtener liposomas a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii* mediante la técnica de secado por aspersión.

1.3.2.3 Comparar la actividad antioxidante *in vitro* de liposomas y del extracto etanólico de *Greigia mulfordii* a través del método DPPH y cuantificación de polifenoles.

1.3.2.4 Comparar la actividad antioxidante *in vivo* de liposomas y del extracto etanólico de *Greigia mulfordii* utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Propiedades medicinales de las plantas

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos ancestrales por sus propiedades curativas, siendo la base de la medicina tradicional, en la cual destacan las infusiones y otras preparaciones caseras.

Desde la antigüedad, las plantas y sus productos derivados han sido una buena fuente de compuestos biológicamente activos, comúnmente conocidos como fitoquímicos, entre ellos, los compuestos fenólicos y polifenólicos son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, cardioprotectivas, anticancerosas, antimutagénicas, antidiabéticas, antiespasmódicas, antihelmínticas, quimiopreventivas y neuroprotectivas (Subhaswaraj, Sowmya, Jobina, et al., 2017).

Los antioxidantes derivados de plantas son moléculas que pueden restringir la oxidación de lípidos, proteger a las células del daño oxidativo y reducir el riesgo de algunas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, esos compuestos son sensibles a las condiciones ambientales a modo radical (por ejemplo, radiación UV, temperatura, oxígeno, digestión, etc), ante esto, surge la encapsulación, específicamente los liposomas como alternativa que ha sido implementada ampliamente para preservar compuestos bioactivos como los polifenoles (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017).

2.1.2 Liposomas

Los liposomas son partículas esféricas con uno o múltiples membranas concéntricas en las cuales una fracción del solvente puede ser encapsulado, se forman a partir de lípidos polares y su composición básicamente incluye fosfatidilcolina y fosfatidiletanolaminas, a menudo contienen lípidos cargados negativamente (Gortzi, Lallas, Chinou, & Tsaknis, 2008).

La lecitina ha sido ampliamente utilizada en la elaboración de liposomas (Gibis, Zeeb, & Weiss, 2014; Roostae et al., 2017), es una fuente natural de fosfolípidos, los cuales por sus propiedades anfífilas en presencia del agua permiten la formación de los sistemas de membrana cerrados llamados liposomas (Arsić, Vidovic, & Vuleta, 1999).

El liposoma es uno de los métodos más efectivos de encapsulación por su capacidad para incorporar sustancias hidrofílicas, hidrofóbicas y anfífilas. (Bonechi et al., 2018), además, cubren a los compuestos encapsulados protegiéndolos de las condiciones externas adversas, como el pH, oxígeno, luz, enzimas y digestión en el estómago, mejorando su biodisponibilidad, bioactividad y la liberación en blancos particulares (Hasan et al., 2014). Por lo mencionado, los liposomas son adecuados como sistemas de administración en sistemas biológicos y aseguran una buena captación celular (Bonechi et al., 2018), han sido utilizados como vesículas de liberación de fármacos y para aplicaciones médicas, como vacunación y terapia génica (Gibis et al., 2014), además, varios compuestos antioxidantes extraídos de plantas han sido encapsulados en liposomas (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017; Sinico et al., 2005).

2.1.3 *Greigia mulfordii*

Los primeros indicios de *Greigia mulfordii* datan del año 1949 cuando fue descrita por el Dr. Lyman Bradford Smith quien colectó esta planta en Colombia (Foster, 1951).

G. mulfordii es una especie nativa de Ecuador y Colombia (Enciclopedia of life, 2014), es una hierba arrosetada, silvestre propia del bosque montañoso y páramo.

Localmente, en Oyacachi, una comunidad indígena quichua del Ecuador se la conoce como “piñuelo” y forma parte de las especies silvestres comestibles de la comunidad que consume los frutos maduros de esta planta (Baéz et al., 2000).

No se ha encontrado información sobre su composición, propiedades medicinales o algún estudio similar.

2.1.3.1 Clasificación taxonómica

Según el catálogo de la GBIF (Global Biodiversity Information Facility, 2017) la clasificación taxonómica de *Greigia mulfordii* es la siguiente:

Reino: Plantae

Filum: Tracheophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Género: Greigia

Especie: *Greigia mulfordii* L.B.Sm.



Figura I. *Greigia mulfordii*

(Simbaña, 2017)

2.1.4 Actividad antioxidante

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son especies químicas que pueden ser radicales y no radicales y por su inestabilidad actúan como agentes oxidantes (Fernández, Villaño, Troncoso, & García Parrilla, 2006). Algunas ROS son generadas de forma endógena en el proceso metabólico normal (por ejemplo, la respiración celular y B-oxidación de ácidos grasos) y por la exposición a pro-oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno y metales pesados) (Estruch, 2000).

El estrés oxidativo se genera como resultado de un desequilibrio entre las defensas antioxidantes y la generación de ROS (Peláez, 2016). Al parecer bajas concentraciones de ROS son necesarias en la célula para la transducción de señales celulares en procesos como proliferación, apoptosis, inflamación y respuesta inmune, sin embargo, el exceso de estas ROS puede causar daño oxidativo al ADN, lípidos y proteínas, lo que produce un desequilibrio oxidativo del sistema antioxidante, que puede provocar la muerte celular o aceleración del envejecimiento celular y enfermedades relacionadas con la edad (Peláez, 2016). Los radicales libres son responsables de causar un gran número de enfermedades, incluido el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, los trastornos neuronales, la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedades de Parkinson, enfermedad hepática inducida por alcohol, colitis ulcerosa, envejecimiento y arterioesclerosis (Alam et al., 2013).

Los antioxidantes combaten al estrés oxidativo pudiendo actuar de dos formas: como antioxidantes primarios, reaccionando con los radicales libres de manera directa dando lugar a un nuevo radical menos reactivo que el radical libre original o como

antioxidantes secundarios potenciando otros sistemas antioxidantes, como algunas enzimas (Pérez-Jiménez, 2011). En consecuencia, los antioxidantes protegen al cuerpo humano contra el estrés oxidativo y enfermedades relacionadas, por tanto se los puede considerar como aditivos promotores de la salud (Roostae et al., 2017).

2.1.4.1 Polifenoles y actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos son los más abundantes en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras diferentes conocidas hasta hoy, son metabolitos secundarios de plantas que intervienen en varios procesos como: crecimiento, pigmentación, atraer a polinizadores y brindar resistencia contra patógenos, predadores y condiciones de estrés ambiental, mejorando así la supervivencia de la planta (Peláez, 2016).

La estructura de los polifenoles consta de anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados, suelen aparecer en formas conjugadas, con uno o más restos de azúcar unidos al grupo hidroxilo o directamente al anillo aromático, también pueden estar asociados a otros compuestos (Pérez-Jiménez, 2011).

Se ha mencionado que los compuestos fenólicos, debido a su actividad antioxidante son capaces de disminuir el riesgo a serios problemas de salud (Roostae et al., 2017). La importancia de los componentes fenólicos radica en la presencia de los grupos hidroxilo que son los que probablemente tengan una concesión directa con la actividad antioxidante (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017). Se ha reportado que los polifenoles son antioxidantes debido a su capacidad de donar electrones y también para formar complejos con iones de metales pesados, sin embargo, durante las últimas décadas, se ha establecido que su modo de acción es mucho más complicado de lo esperado, los polifenoles podrían estar involucrados también en la modulación de la expresión génica y la interacción con las vías de señalización celular, ya que los efectos fisiológicos de estos compuestos pueden extenderse más allá de la modulación del estrés oxidativo (Peláez, 2016).

2.1.4.2 Actividad antioxidante *in vitro*

Existe una variedad de métodos para evaluar la capacidad *in vitro* de un compuesto, como el método DPPH, ABTS, ORAC, entre otros. La determinación del contenido de polifenoles se ha asimilado en muchos trabajos como parte de los métodos de

capacidad antioxidante dada la relación de los polifenoles con la actividad antioxidante.

El método Folin- Ciocalteu ha sido utilizado ampliamente para la determinación de polifenoles, se basa en una reacción de óxido reducción entre compuestos reductores y el reactivo Folin-Ciocalteu, de modo que se produce un transferencia de electrones en medio alcalino reduciendo el complejo fosfomolibdico/fosfotúngstico a un cromógeno azul que se mide por colorimetría (Piña, 2011).

El método DPPH utiliza la molécula 1, 1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), un radical libre estable, que al mezclarse con una solución de un sustrato que puede donar un átomo de hidrógeno da lugar a una forma reducida de DPPH causando la pérdida de su color violeta original, para evaluar el potencial antioxidante de las muestras se controla el cambio de la densidad óptica de los radicales de DPPH a una longitud de onda de 517 nm (Fernández et al., 2006).

El método DPPH y la determinación de polifenoles han sido utilizados en otros estudios para determinar la capacidad antioxidante de compuestos de plantas sin microencapsular y microencapsulados en liposomas (Castangia et al., 2015; Dag & Oztop, 2017; Ganji & Sayyed-Alangi, 2017; Roostae et al., 2017).

Es necesario considerar que ciertos polifenoles que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro* no necesariamente la tendrán *in vivo* y que el DPPH es un radical ajeno al organismo, por tanto, no tiene un significado biológico (Fernández et al., 2006), es por ello, que ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* deben completarse con ensayos *in vivo* y con estudios sobre el posible efecto prooxidante a dosis elevadas ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante (Pérez-Jiménez, 2011).

2.1.4.3 Actividad antioxidante *in vivo* usando *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que ha sido usada como modelo eucariótico en estudios de biología molecular y celular y en ensayos de identificación de antioxidantes naturales. Varias características hacen que *S. cerevisiae* sea un modelo en la investigación (Mager & Winderickx, 2005; Outeiro & Giorgini, 2006):

- Su fácil manejo y crecimiento rápido.

- Varios procesos se conservan en levaduras y en organismos eucarióticos superiores, incluidos los mamíferos, como la replicación del ADN, la recombinación, el plegamiento de proteínas, la división celular, el metabolismo y el transporte intracelular.
- Su genoma está completamente secuenciado y casi el 30 % de los genes asociados a enfermedades humanas conocidas tienen ortólogos de levadura.

El peróxido de hidrógeno ha sido usado comúnmente como modelo de promotor de estrés oxidativo. Este compuesto normalmente se forma durante la respiración aeróbica y también después de la exposición a varios factores ambientales. Genera daños por estrés oxidativo y sirve como molécula de señalización en la regulación de varios procesos biológicos (Veal, Day, & Morgan, 2007).

Los organismos aeróbicos poseen varios mecanismos para neutralizar los radicales libres generados en el metabolismo, las células tienen sistemas complejos enzimáticos y no enzimáticos (captadores químicos) para prevenir el daño oxidativo causado por ROS, se puede mencionar una primera línea de protección celular contra el daño oxidativo en donde se encuentran las enzimas captadoras de radicales libres (como las superóxido dismutasas y catalasas) y una segunda línea de defensa formada por inhibidores no enzimáticos de entre los cuales el glutatión (GSH) es el más importante (Peláez, 2016).

Las superóxido dismutasas (SOD) son las principales enzimas involucradas en la protección contra el daño oxidativo en organismo aeróbicos, son una familia de metaloproteínas que tienen diferentes cofactores metálicos (Peláez, 2016), *S. cerevisiae* posee dos formas de esta enzima localizadas en el citoplasma y en la mitocondria (Estruch, 2000). La enzima catalasa se encarga de eliminar el H₂O₂ al catalizar su reducción a H₂O y O₂ (Peláez, 2016). En el caso de las peroxidasas, éstas actúan mediante la reducción de peróxidos orgánicos e inorgánicos a alcoholes con la ayuda de tioles de cisteína del sitio activo, por lo tanto, los donantes de electrones para tioles son esenciales para la actividad de peroxidasas (Herrero, Ros, Bellí, & Cabisco, 2008).

Varios estudios se han realizado utilizando *S. cerevisiae* como modelo *in vivo* para identificar antioxidantes naturales extraídos de fuentes vegetales (Baba et al., 2015;

Frassinetti, Gabriele, Caltavuturo, Longo, & Pucci, 2015; Gibis et al., 2014; Silva et al., 2005). El modelo de levadura también se ha empleado para estudiar los mecanismos moleculares de acción de los polifenoles y para identificar proteínas y targets implicados en la respuesta al estrés oxidativo de la levadura (Martorell et al., 2011).

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis nula

Los liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *G. mulfordii* no tienen actividad antioxidante.

2.2.2 Hipótesis alternativa

Los liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *G. mulfordii* sí tienen actividad antioxidante.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variable independiente

Encapsulación del extracto etanólico de *G. mulfordii* en liposomas.

2.3.2 Variable dependiente

Actividad antioxidante

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de material vegetal

Las brácteas florales de *Greigia mulfordii* se colectaron al oeste del Cerro Teligote, específicamente en el sector de Pisquiurco (1°22'26.6"S; 78°33'34.8"O; 3378 m.s.n.m.), cantón San Pedro de Pelileo, provincia de Tungurahua, sierra central de los Andes ecuatorianos. Un total de 40 brácteas florales provenientes de 20 individuos fueron colectadas y guardadas en fundas de papel y luego transportadas al laboratorio de la Unidad Operativa de Investigación en Ciencia e Ingeniería en Alimentos (UODIDE-ICIA) de la FCIAL, para su respectivo procesamiento. Un espécimen botánico como colección de referencia está depositado en el Herbario Misael Acosta Solís (AMAS), Ecuador.

3.2 Preparación del material vegetal

El material vegetal se lavó con agua destilada y se secó a 60 °C en un horno con circulación forzada de aire (Gander, China), posteriormente se procesó en un molino de martillos (Webwer Bros & White, Hamilton). El material vegetal en polvo fue almacenado en fundas plásticas herméticas.

3.3 Obtención de extractos vegetales

El material vegetal y solvente se llevaron a ebullición con agitación, en una plancha de calentamiento a 125 °C y 500 rpm. La mezcla obtenida se centrifugó a 3000 gravedades durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en botellas color ámbar y se almacenó a -20 °C. Se realizó el proceso por triplicado.

La concentración de etanol en el solvente, relación material vegetal: solvente y tiempo de ebullición fueron las variables consideradas para optimizar la extracción de compuestos con actividad antioxidante.

3.4 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Se colocaron aproximadamente 4 g de extracto en el determinador de humedad (Mettler Toledo, Suiza), con el porcentaje de humedad obtenido se determinó el porcentaje de sólidos solubles totales (% SST) y luego los gramos de sólidos solubles totales contenidos en el extracto.

$$\% SST = 100\% - \% humedad \quad [\text{Ec.1}]$$

$$SST (g) = Masa de extracto (g) \frac{\% SST}{100} \quad [\text{Ec.2}]$$

3.5 Determinación del rendimiento de sólidos extraídos

Una vez que se determinaron los sólidos solubles totales, se determinó el rendimiento de sólidos extraídos expresado en porcentaje:

$$\% Rendimiento sólidos extraídos = \frac{SST (g)}{MV (g)} * 100 \quad [\text{Ec.3}]$$

En donde, MV (g) representa los gramos de material vegetal empleados para preparar el extracto.

3.6 Cuantificación de polifenoles totales (método Folin – Ciocalteu)

Se aplicó el método Folin- Ciocalteu en placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Denmark) (Bobo-García et al., 2015). Se colocó con pipetas multicanal (Thermo Scientific, Finlandia; Labnet, USA) en cada pocillo 20 ul de extracto diluido o de solución estándar con 100 ul de Folin- Ciocalteu (Merck, Alemania) diluido en proporción 1:4 en agua destilada, la placa se llevó a agitación por 60 segundos. Después de 4 minutos se agregó 75 ul de solución de carbonato de sodio (Merck, Alemania) (100g/L), la mezcla se agitó durante 1 minuto y se dejó en reposo expuesta a la luz durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 750 nm en el lector multiplaca (Fisher Scientific, Finlandia).

Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de ácido gálico (Fisher Scientific, China) a concentraciones 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L.

Para determinar la absorbancia del blanco reactivo se colocaron 20 ul de agua en lugar de extracto o solución estándar, éste valor se restó de las lecturas de extractos y estándares. El proceso se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico/ g de extracto seco.

3.7 Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante (método del radical 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl, DPPH)

Se aplicó el método DPPH en placa de 96 pocillos (Bobo-García et al., 2015). Se colocaron con pipetas multicanal en cada pocillo 20 ul de extracto diluido o de solución estándar, con 180 ul de DPPH (Sigma-Aldrich, USA) disuelto en metanol-agua (80:20) a una concentración de 150 umol/L y se agitó por 60 segundos. Se incubó la placa durante 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente, se leyó la absorbancia a 515 nm a 25 °C en el lector multiplaca (Fisher Scientific, Finlandia).

Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 umol/L.

Se preparó un control que representa al DPPH total presente en la reacción siguiendo el proceso mencionado, sustituyendo los 20 ul de extracto diluido por agua destilada.

Se realizó un blanco con 20 ul de agua y 180 ul de metanol (Scharlab S.L., España) al 80 %, ésta absorbancia se restó de las absorbancias de muestras y estándares.

Los resultados se expresaron en umol equivalentes de trolox/ g de extracto seco. Para llegar a éste valor, primero se determinó el % de inhibición de DPPH (Ec.4), se realizó la curva de calibración con % de inhibición de DPPH Vs. uM trolox y mediante la ecuación de regresión lineal se determinó el contenido de umol trolox/g de extracto seco.

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = \left[1 - \left(\frac{Abs_{muestra} - Abs_{control}}{Abs_{control}} \right) \right] * 100 \quad [\text{Ec.4}]$$

3.8 Optimización del proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante

La optimización de la extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de las brácteas florales de *G. multifidii* se realizó a escala de laboratorio (utilizando un volumen de solvente de 100 ml en todos los casos) y constó de dos fases:

Fase 1: Se aplicó un diseño factorial 3^2 de superficie de respuesta como se describe a continuación:

Tabla I

Factores, niveles y respuestas del diseño experimental para la optimización de variables del proceso de extracción

Factor	Nivel
Relación material vegetal: disolvente	1:15 (-1)
	1:20 (0)
	1:25 (1)
% de etanol del disolvente	30 (-1)
	50 (0)
	70 (1)
Respuestas experimentales	% Rendimiento de sólidos extraídos Polifenoles totales Actividad antioxidante por DPPH

-1 indica nivel bajo, 0 nivel medio y 1 nivel alto

Tabla II

Descripción de las combinaciones del diseño experimental para la optimización de variables del proceso de extracción

Combinación	Material vegetal: disolvente	% de etanol del solvente	Descripción	Mezcla para preparación del extracto
1	-1	-1	1:15 - 30%	6,7 g MV en 100 ml etanol al 30%
2	-1	0	1:15 - 50%	6,7 g MV en 100 ml etanol al 50%
3	-1	1	1:15 - 70%	6,7 g MV en 100 ml etanol al 70%
4	0	-1	1:20 - 30%	5 g MV en 100 ml etanol al 30%
5	0	0	1:20 - 50%	5 g MV en 100 ml etanol al 50%
6	0	1	1:20 - 70%	5 g MV en 100 ml etanol al 70%
7	1	-1	1:25 - 30%	4 g MV en 100 ml etanol al 30%
8	1	0	1:25 - 50%	4 g MV en 100 ml etanol al 50%
9	1	1	1:25 - 70%	4 g MV en 100 ml etanol al 70%

MV hace referencia al material vegetal.

Fase 2: Una vez obtenidas las mejores condiciones para el proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante respecto a las variables relación material vegetal: disolvente y porcentaje de etanol del disolvente, se analizó la variable tiempo, considerándose tres niveles: 30 minutos, 60 minutos y 90 minutos.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción respecto a las tres variables se procedió a preparar un extracto vegetal a mayor escala.

3.9 Obtención del extracto vegetal con variables óptimas

Para obtener el extracto vegetal se consideraron las variables óptimas de relación material vegetal: disolvente, porcentaje de etanol del disolvente y tiempo de ebullición.

La mezcla de material vegetal y solvente se llevó a ebullición, manteniendo temperatura y agitación constante con una plancha de calentamiento y con un agitador vertical (Fisher Scientific, USA). El tiempo de extracción fue tomado a partir de la aparición de la primera burbuja de ebullición. La mezcla se dejó enfriar y se pasó por un lienzo, el extracto fue almacenado en botellas color ámbar a 4 °C. Se realizó el proceso por triplicado.

Para caracterizar el extracto se determinó el rendimiento de sólidos extraídos, polifenoles totales y actividad antioxidante con DPPH, siguiendo la metodología descrita desde el punto 3.4 al 3.7.

3.10 Concentración del extracto vegetal

El extracto obtenido bajo condiciones óptimas se colocó en el balón del rotaevaporador (IKA, USA) y se calentó a baño María a 65 °C con rotación constante de 210 rpm a una presión de 0,5 bares. El proceso se mantuvo hasta evidenciar la evaporación total del etanol, obteniéndose un volumen aproximado de 200 ml de extracto concentrado.

Se determinó el porcentaje de sólidos solubles totales, rendimiento de sólidos extraídos, polifenoles totales y actividad antioxidante con DPPH, siguiendo la metodología descrita desde el punto 3.4 al 3.7.

3.11 Obtención de liposomas

Los sólidos totales contenidos en el extracto concentrado se mezclaron con fosfatidilcolina (Inti S,A. Lecitina de soya) y lactosa monohidratada (Merck KGaA), en proporción de 0,5 g y 1 g de por cada gramo de sólidos totales, respectivamente, (López & Gómez, 2008). La mezcla se calentó hasta 70 °C con agitación constante en una plancha de calentamiento, posteriormente, se redujo el tamaño de partículas con el homogeneizador (M TOPS SR 30 M, República de Korea). La formulación de

liposomas se llevó al Spray Dryer (Buchi, Suiza), se programó una temperatura de entrada de 120 °C y una de salida de 85 °C, se colocó la manguera de absorción del Spray Dryer en la mezcla, manteniéndola con agitación durante todo el proceso.

Se preparó un blanco de liposomas compuesto únicamente de lactosa monohidratada y fosfatidilcolina, bajo las mismas proporciones y condiciones ya mencionadas.

De los liposomas se determinó el porcentaje de sólidos solubles totales, polifenoles totales y actividad antioxidante con DPPH, siguiendo la metodología descrita desde el punto 3.4 al 3.7.

Con la finalidad de comparar el efecto de la encapsulación en liposomas del extracto respecto al extracto solo, se analizó la actividad antioxidante *in vivo* utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

3.12 Determinación *in vivo* de la actividad antioxidante usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo

Se utilizó el método propuesto por Peláez (2016) para evaluar el efecto antioxidante de liposomas y del extracto de *Greigia mulfordii*.

3.12.1 Aislamiento de levadura

Se aislaron levaduras a partir de un sobre de levadura comercial de panadería (Levapan, Ecuador) mediante estría compuesta en medio PDA (Merck, Alemania), con incubación a 28 °C durante 72 horas, luego, se la conservó en refrigeración a 4 °C.

3.12.2 Determinación de las concentraciones oxidantes de peróxido de hidrógeno

Se tomó una colonia de *S. cerevisiae* y se inoculó en 5 ml de medio YPD [2% (w/v) glucosa (comercial), 1% (w/v) extracto de levadura (Conda, España) y 2% (w/v) peptona (BD, España)] manteniéndose en incubación durante 6 h a 28 °C y 100 rpm, posteriormente, se tomaron 5 ul de una dilución 1/10 del cultivo incubado y se inocularon en un tubo con medio YPD manteniéndose en incubación durante 18 horas a 28 °C y 100 rpm. Concluidas las 18 horas de incubación el cultivo celular se centrifugó a 2700 g por 20 minutos a temperatura ambiente, se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4, se diluyó en el mismo buffer hasta una densidad óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,1 y se dejó reposar durante 30 minutos a 28 °C. Se

añadió peróxido de hidrógeno (Ecuaquímica, Ecuador) a varias concentraciones y se incubó a 28 °C durante 1 hora en la oscuridad y sin agitación, después, se centrifugó a 2700 g por 20 minutos a temperatura ambiente, se realizó un lavado con PBS, el pellet se resuspendió en 3ml de medio YPD y se sembraron 250 ul de cada cultivo por triplicado en una placa de 96 pocillos. El proceso se repitió tres veces.

La placa de 96 pocillos se llevó a incubación a 28 °C en el lector multiplaca (Fisher Scientific, Finlandia) controlándose el crecimiento mediante la D.O.₆₀₀ durante 24 h a intervalos de 20 minutos con agitación antes de cada lectura.

Se determinó la “razón de crecimiento” a diferentes tiempos de incubación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de crecimiento} = \frac{D.O_{600 \text{ nm de la curva a analizar}}}{D.O_{600 \text{ nm de la curva control}} \quad [\text{Ec. 5}]$$

Las gráficas Razón de crecimiento Vs. tiempo se denominan “Curvas efecto” y permiten determinar mediante el análisis estadístico el efecto que ejerce el peróxido de hidrógeno y los agentes antioxidantes a evaluarse.

La curva de crecimiento control para este caso es la correspondiente al crecimiento de levadura sin peróxido de hidrógeno.

3.12.3 Condiciones de estrés a analizar

En base a las razones de crecimiento obtenidas del paso anterior se definieron dos concentraciones de peróxido de hidrógeno: una concentración baja y concentración un alta.

El efecto de los agentes antioxidantes [Vitamina C (Life, Ecuador), blanco de liposomas, liposomas y extracto de *G. mulfordii*] se analizó ante las condiciones de estrés descritas a continuación:

Condición de estrés nulo: Se aplicó la metodología establecida en el punto 3.12.4, la única diferencia fué que no se sometió a estrés por peróxido de hidrógeno. La curva control fue la correspondiente al crecimiento de levadura sin agentes antioxidantes.

Condición de estrés bajo y alto: Se aplicó la metodología establecida en el punto 3.12.4. La curva control fue la correspondiente al crecimiento de levadura sometida a

la concentración de peróxido de hidrógeno correspondiente y sin agentes antioxidantes.

En las tres condiciones de estrés el control positivo fue la vitamina C y los resultados se analizaron estadísticamente en base a la razón de crecimiento [Ec. 5] de las curvas efecto.

3.12.4 Determinación de la capacidad de los liposomas y extracto de *G. mulfordii* para promover una respuesta antioxidante

Se empleó la metodología establecida en el punto 5.12.2, la única diferencia fue la adición de diferentes concentraciones de los agentes antioxidantes después de la inoculación de la levadura (diluida 1/10) en medio líquido YPD, para continuar con el proceso ya descrito.

3.13 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por lo menos por triplicado. Las pruebas estadísticas se desarrollaron utilizando el programa STATGRAPHICS. Se realizó un diseño factorial 3^2 para la optimización de las variables del proceso de extracción de compuestos vegetales. Cuando fue necesario comparar diferencias entre pares de medias se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor seguido de una prueba Tukey, con un nivel de significancia p de 0,05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Optimización del proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante

Establecer las mejores condiciones para la extracción de compuestos con actividad antioxidante de *Greigia mulfordii* permite estandarizar el proceso y determinar la relación existente entre los factores de estudio y las respuestas experimentales.

Se realizó un diseño factorial de superficie de respuesta 3^2 , en el cual se analizó la influencia del contenido de etanol en el solvente y relación solvente: material vegetal sobre el porcentaje de sólidos, contenido de polifenoles extraído y sobre la actividad antioxidante en DPPH.

A continuación se muestran los modelos de regresión cuadráticos obtenidos para las tres variables respuesta:

Tabla III

Modelos de regresión para rendimiento de sólidos, polifenoles y DPPH

Modelo de regresión	R ²
% RSE = 3,307 + 1,109*A - 0,166* B- 0,027*AA + 0,002* A* B+ 0,001*BB	87,503 %
Polifenoles = -33,034 + 10,131*A - 1,654*B- 0,312*AA + 0,049*A*B + 0,017*BB	96,055 %
DPPH = -178,362 + 59,159*A- 10,353* B- 1,686* AA + 0,287*A* B + 0,118* BB	97,381 %

R²=Coeficiente de determinación. A= relación solvente: material vegetal; B= contenido de etanol en el solvente; AA= (relación solvente: material vegetal)²; BB = (contenido de etanol en el solvente)².

Los coeficientes de determinación para el contenido de polifenoles y actividad antioxidante con DPPH son los que muestran un grado de correlación más alto entre los valores experimentales obtenidos y los esperados.

En base a la Figura II, la actividad antioxidante por DPPH depende significativamente de la relación solvente: material vegetal, contenido de etanol en el solvente, de sus

variables cuadráticas y de la combinación relación solvente: material vegetal, contenido de etanol en el solvente. El porcentaje de rendimiento de sólidos extraídos depende de los parámetros mencionados a excepción de la combinación relación solvente: material vegetal y del contenido de etanol en el solvente. En la extracción de polifenoles totales únicamente la relación solvente: material vegetal no influye de manera significativa. En todos los casos la influencia cuadrática de la relación solvente: material vegetal afecta negativamente al rendimiento de sólidos extraídos, contenido de polifenoles y actividad antioxidante por DPPH, mientras que en los casos en que la relación solvente: material vegetal tiene influencia, ésta es positiva, concordando con otro estudio en el cual las variables mencionadas tiene el mismo efecto sobre el rendimiento de sólidos extraídos de la fracción apolar de hojas del árbol de mango (*Mangífera indica* L.) (Acosta, Salomón, Sevilla, & Nuevas, 2016).

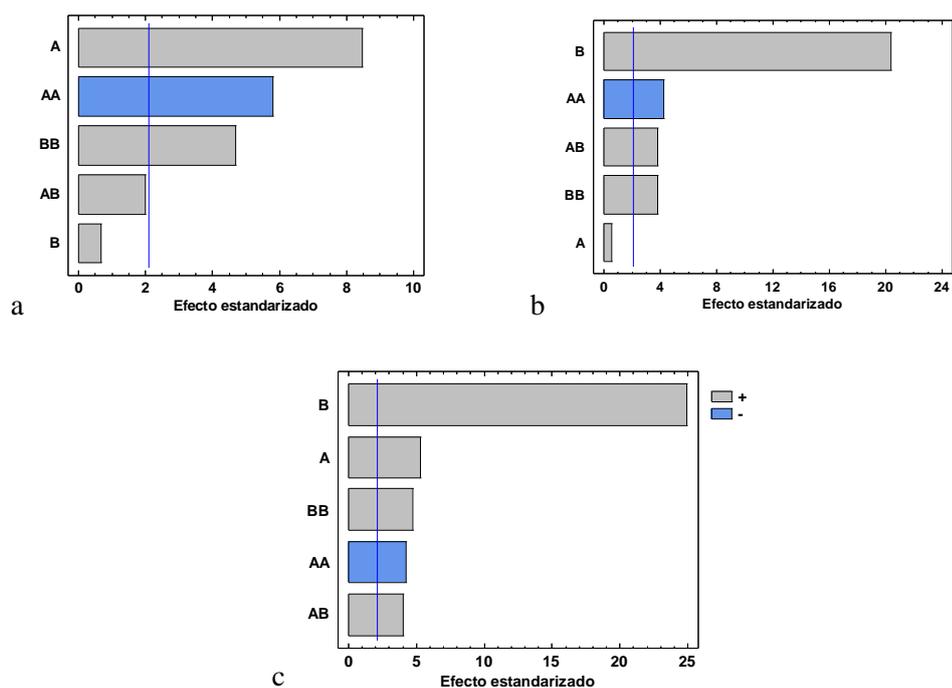


Figura II. Diagramas de Pareto de las variables respuesta del proceso de optimización. Diagrama de Pareto estandarizado para % rendimiento de sólidos extraídos a; contenido de polifenoles b; actividad antioxidante por DPPH c. Los gráficos de Pareto muestran los efectos en orden decreciente de importancia, cada barra representa el efecto estandarizado (equivalente al estadístico t para cada efecto). Las barras que sobrepasen la línea azul corresponden a los efectos que son estadísticamente significativos con un 95% de confianza. Barras azules indican influencia negativa, barras grises indican influencia positiva. A= relación solvente: material vegetal; B= contenido de etanol en el solvente; AA= (relación solvente: material vegetal)²; BB = (contenido de etanol en el solvente)². Resultados obtenidos a tiempo de extracción 60 minutos.

En los gráficos de interacciones se observa que los valores más altos de % de rendimiento de sólidos, polifenoles totales y actividad antioxidante por DPPH se alcanzan si la extracción se realiza con etanol al 70 % y con una relación solvente: material vegetal cercana a 25:1.

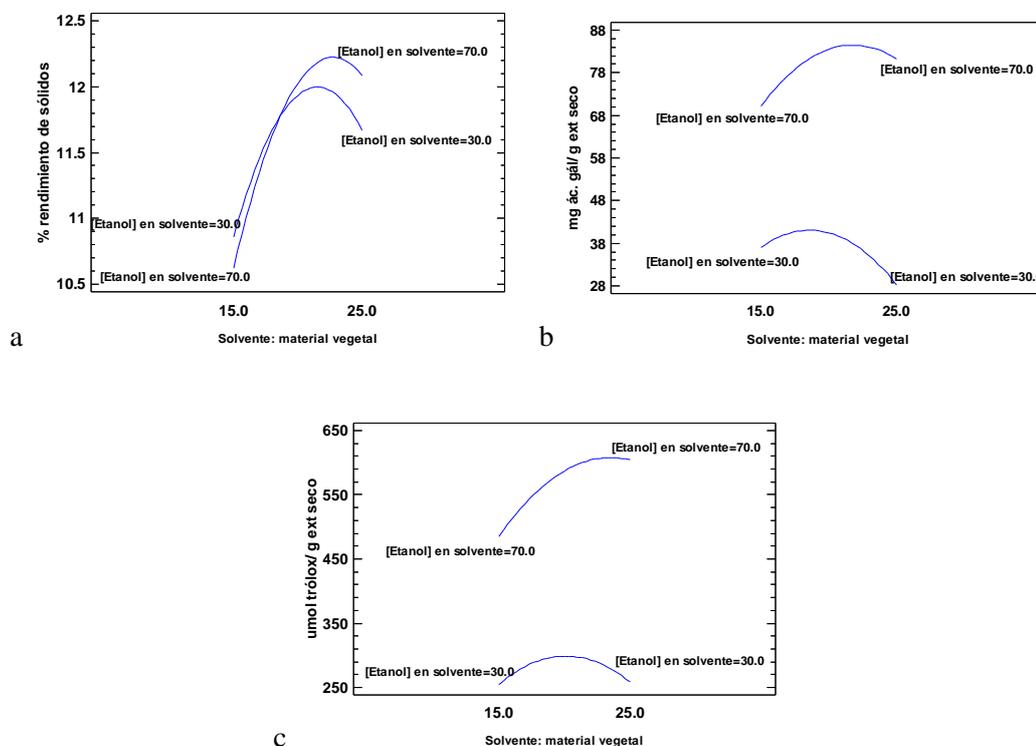


Figura III. Gráficas de interacciones de las variables respuesta del proceso de optimización. Gráfica de interacción para % rendimiento de sólidos extraídos a; contenido de polifenoles b; actividad antioxidante por DPPH c. Resultados obtenidos a tiempo de extracción 60 minutos.

De los gráficos de superficie de respuesta se deduce que el porcentaje de rendimiento de sólidos no tiene relación con el contenido de polifenoles extraídos ni con actividad antioxidante analizada por DPPH. Los polifenoles parecen ser responsables de la actividad antioxidante analizada por DPPH, dado que los patrones de respuesta son similares en ambos casos, coincidiendo con lo mencionado por algunos autores, que han reportado que la actividad antioxidante está usualmente asociada a las estructuras fenólicas o polifenólicas (Castangia et al., 2015).

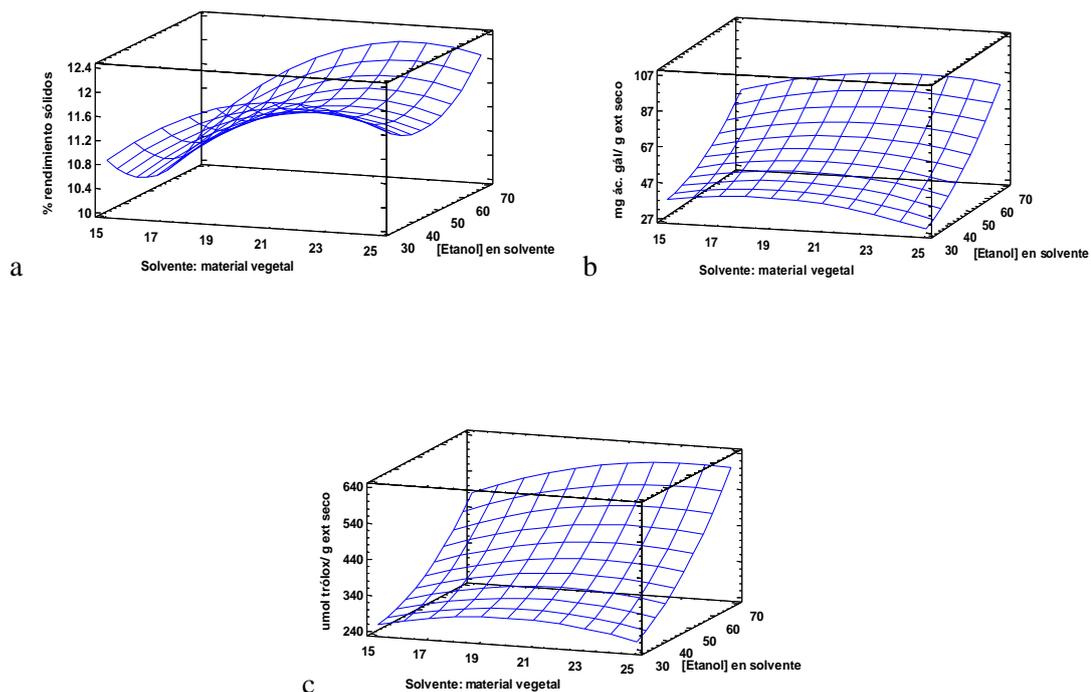


Figura IV. Gráficas de superficie de respuesta para las variables del proceso de optimización. Gráfica de superficie de respuesta para % rendimiento de sólidos extraídos a; contenido de polifenoles b; actividad antioxidante por DPPH c. Resultados obtenidos a tiempo de extracción 60 minutos.

Del modelo de optimización de respuestas se obtuvieron los siguientes valores óptimos tanto de las condiciones de extracción como de las variables respuesta esperadas.

Tabla IV

Valores óptimos para las condiciones de extracción y respuestas esperadas

Variable	Valor óptimo
Solvente: material vegetal (ml:g)	22,647
% etanol del disolvente	70,000
% Rendimiento sólidos extraídos	12,225
Polifenoles (mg ác. gál /g extracto seco)	84,264
DPPH (umol trólox/g extracto seco)	606,670

Resultados obtenidos a tiempo de extracción 60 minutos.

Una vez que se han optimizado las variables relación solvente: material vegetal y % de etanol del disolvente, es necesario optimizar la variable tiempo de extracción. Trabajando con las condiciones óptimas encontradas se realizaron extracciones a tres tiempos: 30, 60 y 90 minutos. Las variables respuesta obtenidas se muestran a continuación:

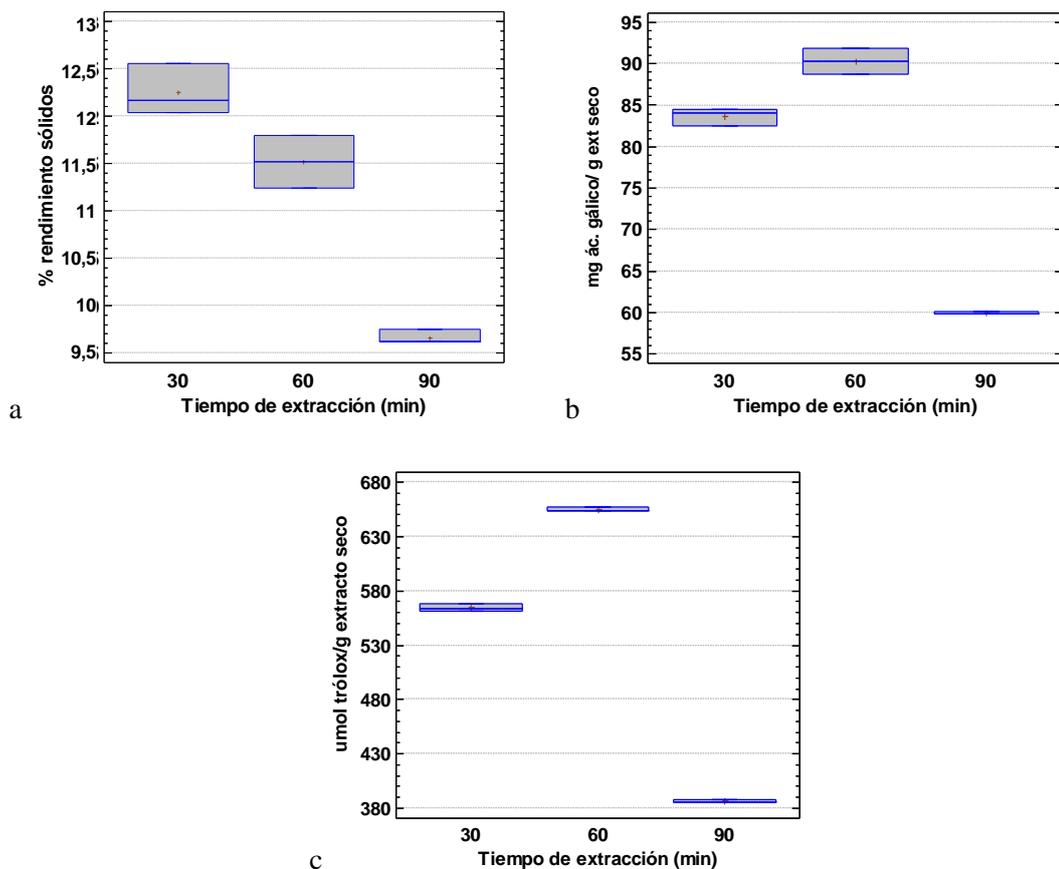


Figura V. Gráficas de cajas y bigotes de las variables respuesta a diferentes tiempos de extracción. Gráfica de caja y bigotes para % rendimiento de sólidos extraídos a; contenido de polifenoles b; actividad antioxidante por DPPH c. La cruz de color rojo indica la localización de la media de cada muestra. Al analizar los valores obtenidos para las tres variables respuesta (ANOVA simple y prueba Tukey 95%) se encontró que todos poseen diferencia significativa.

De la Figura V, se establece que el mejor tiempo de extracción es 60 minutos ya que el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante mediante DPPH son las máximas alcanzadas. Se confirma lo reportado por Dai & Mumper (2010) que asegura que la recuperación de los compuestos fenólicos de los materiales vegetales también está influenciada por el tiempo y que largos tiempos de extracción aumentan las posibilidades de oxidación de compuestos fenólicos disminuyendo su rendimiento en los extractos.

Al comparar los valores esperados (ver tabla IV) de la optimización de las variables relación solvente: material vegetal y % de etanol del disolvente con los obtenidos al mejor tiempo de extracción correspondiente a 60 minutos, se encontró que el porcentaje de rendimiento de sólidos, el contenido de fenoles totales y la actividad

antioxidante por DPPH alcanzaron valores de 11,51%, 90,32 mg ác. gálico/ g extracto seco y 662,73 μmol trólox/g de extracto seco respectivamente, siendo valores superiores a los esperados a excepción del porcentaje de sólidos extraídos que fue menor al pronosticado, sin embargo, como ya se vio en la Figura IV, la actividad antioxidante no depende del porcentaje de rendimiento de sólidos extraídos.

Las variables fueron optimizadas tomando en cuenta que no existe un procedimiento de extracción universal adecuado para la extracción de todos los compuestos fenólicos vegetales y que el rendimiento de la extracción química depende del tipo de disolventes con polaridades variables, tiempo de extracción, relación muestra / disolvente, así como la composición química y las características físicas de las muestras (Dai & Mumper, 2010), respecto a este último punto, no se analizó la influencia del secado, ni de la reducción de tamaño de partícula del material vegetal.

Respecto al solvente, se ha mencionado que la selección del disolvente adecuado afecta la cantidad y la tasa de polifenoles extraídos (Dai & Mumper, 2010). En la mayoría de experimentos, el disolvente más habitual es el etanol absoluto o mezclas de etanol: agua en diferentes proporciones, se menciona que en cereales es necesaria la combinación de al menos dos mezclas de extracción con diferente polaridad para conseguir una extracción óptima de antioxidantes (Pérez-Jiménez, 2011). El etanol es otro buen disolvente para la extracción de polifenoles y es seguro para el consumo humano (Dai & Mumper, 2010), conjuntamente con el agua son unos de los solventes más utilizados para extraer compuestos polares tales como compuestos fenólicos ya que tienen buena polaridad (Alam et al., 2013).

La relación solvente: material vegetal 22,65:1, encontrada como óptima concuerda con Cacace & Mazza (2003) que mencionan que una relación creciente de solvente: sólido funciona positivamente para mejorar los rendimientos de compuestos fenólicos.

En resumen, la extracción óptima de compuestos con mayor contenido de polifenoles, actividad antioxidante por método DPPH y rendimiento de sólidos se da utilizando etanol al 70% y una relación solvente: material vegetal 22,65:1 sometidos a 1 h de ebullición.

Bajo las condiciones óptimas se preparó un extracto vegetal a mayor escala (3 L), a partir del cual se concentraron los sólidos obtenidos para posteriormente preparar

liposomas. A continuación se muestran los resultados de las determinaciones de actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* tanto del extracto concentrado como de los liposomas.

4.1.3 Actividad antioxidante *in vitro*

El extracto vegetal obtenido en condiciones óptimas y a mayor escala alcanzó una actividad antioxidante por DPPH de $776,416 \pm 3,603$ μmol trólox/ g de extracto seco, un contenido de fenoles totales de $89,510 \pm 3,213$ mg ácido gálico/ g de extracto seco y un porcentaje de rendimiento de sólidos de $14,70 \pm 0,621$ % (ver figura VI), superando la actividad antioxidante por DPPH y el porcentaje de rendimiento de sólidos obtenidos en el proceso de optimización (ver figura V). El contenido de polifenoles del extracto etanólico de *G. mulfordii* es similar a los 91,2 mg ácido gálico/ g de extracto seco contenidos en el extracto etanólico de las raíces de regaliz (*Glycyrrhiza glabra L.*) (Castangia et al., 2015). Sin embargo, es bajo comparado con los 166 mg ácido gálico/ g de extracto seco del extracto etanólico de la cáscara y mesocarpio de granada (*Punica granatum*) (Marín, Alemán, Sánchez-Faure, Montero, & Gómez-Guillén, 2018), con el contenido de los extractos de hojas de ecotipos de *Ugni molinae* que varían entre 363,5 hasta 462,4 (extractos etanólicos) y entre 85,2 hasta 158,7 mg de ácido gálico/ g de extracto seco (extractos de acetato de etilo) (Piña, 2011) y con los 276,61 mg de ácido gálico/ g de extracto seco del extracto acuoso de las hojas maduras de *Blepharocalyx salicifolius* (Habermann et al., 2016).

La capacidad antioxidante equivalente en trolox (TEAC) determinada por DPPH del extracto de *G. mulfordii* equivale a $776,416$ μmol trólox/ g de extracto seco que supera a los valores reportados para los extractos acuosos que contienen 30 μmol trólox/ g de extracto seco para la ortiga (*Urtica dioica*), 120 μmol trólox/ g de extracto seco para *Xanthium spinosum* y 350 μmol trólox/ g de extracto seco para el cedrón (*Aloysia triphylla*) (Dadé, Fioravanti, Schinella, & Tournier, 2009), por otro lado, es inferior a los $1019,10$ μmol trólox/ g de extracto seco reportados para extracto hidroalcohólico de nogal (*Juglans Neotropica*) (Hurtado, Jurado, Ramos, & Calixto, 2015).

El DPPH es un radical libre estable que permite determinar la capacidad de los extractos de plantas para captar radicales libres mediante la donación de un electrón o de un hidrógeno, lo que indica que los extractos con una actividad donante de

electrones más alta pueden captar la cadena de radicales y transformar los radicales libres en productos más estables (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017). Se ha mencionado que la actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo (Fernández et al., 2006) de igual forma, de los anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados presentes en su estructura (Pérez-Jiménez, 2011). Sin embargo, cabe destacar que la capacidad antioxidante evaluada por DPPH depende del tipo de polifenoles presentes en el extracto a evaluar y que no necesariamente un alto contenido de polifenoles desencadena una buena capacidad antioxidante, así por ejemplo, un polifenol que tiene x número de hidroxilos puede reaccionar con x moléculas de DPPH (Piña, 2011).

Posteriormente, el extracto vegetal fue concentrado con la finalidad de evaporar el etanol utilizado en la extracción. Se observó que al concentrar el extracto su contenido de equivalentes trólox y de ácido gálico disminuyen drásticamente (ver figura VI), esto podría deberse a que muchos compuestos fenólicos se hidrolizan y oxidan fácilmente, se ha mencionado que al preparar un extracto los largos tiempos de extracción aumentan las posibilidades de oxidación (Dai & Mumper, 2010), por lo tanto es posible que la cantidad de tiempo que duró la concentración del extracto (aproximadamente 2 h) haya causado la oxidación de compuestos, considerando también, que durante ese tiempo el extracto permaneció expuesto a la luz y se sabe que estos compuestos son sensibles a condiciones ambientales como radiación UV, temperatura e incluso al oxígeno (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017).

Los métodos para determinar la actividad *in vitro* han sido ampliamente utilizados. Con el método Folin-Ciocalteu se han determinado polifenoles en extractos de plantas (Castangia et al., 2015; Ganji & Sayyed-Alangi, 2017; Roostaei et al., 2017) y en liposomas (Dag & Oztop, 2017). De la misma forma el método DPPH se ha usado en extractos y liposomas (Castangia et al., 2015; Dag & Oztop, 2017; Ganji & Sayyed-Alangi, 2017).

Con el extracto concentrado se prepararon liposomas, utilizando en su formulación lecitina de soya y lactosa. El contenido de polifenoles de los liposomas es más bajo que el del extracto concentrado, por otro lado no se puede considerar como válida la actividad antioxidante cuantificada a través del método DPPH para liposomas, dado que a diferentes diluciones de la muestra (ubicadas dentro del rango de validez del

método) se obtuvieron resultados dispersos con una desviación estándar de 31,539 μmol trólox/ g de extracto seco. Se ha mencionado que muchos ensayos de capacidad antioxidante están limitados por las propiedades del compuesto a analizar, tales como hidrofiliidad o hidrofobicidad, que gobiernan la solubilidad del compuesto a analizar en el medio de reacción del ensayo, en este punto, para que se pueda medir la capacidad de inhibición de DPPH de una muestra, ésta debe ser soluble en metanol al 60 % o en metanol absoluto (Wu et al., 2011). Dado que los liposomas están formados de una o varias bicapas lipídicas que protegen a los compuestos activos es probable que las bicapas no se solubilicen y no permitan la salida de los compuestos de modo que su capacidad para inhibir DPPH no se pueda determinar.

Se aplicaron los métodos Folin- Ciocalteu y DPPH a liposomas vacíos determinándose que su contenido de fenoles totales es nulo y que no ejerce actividad antioxidante contra el radical DPPH, contradiciendo a algunos autores que afirman que la lecitina tiene actividad antioxidante (Arsić et al., 1999; Roostae et al., 2017).

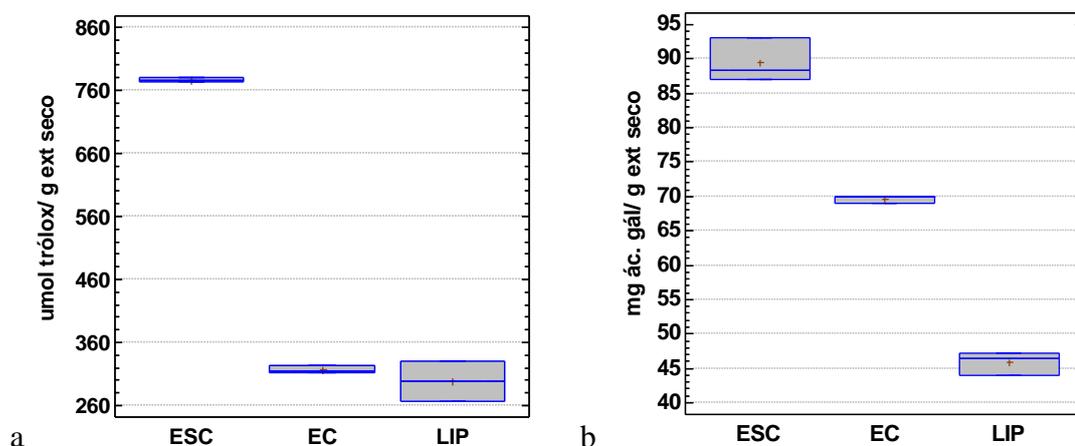


Figura VI. Gráficas de cajas y bigotes de la actividad antioxidante in vitro del extracto y liposomas. Actividad antioxidante por DPPH a; contenido de polifenoles b. Donde ESC= extracto sin concentrar, EC= extracto concentrado y LIP = liposomas. La cruz de color rojo indica la localización de la media de cada muestra. Al analizar los valores obtenidos (ANOVA simple y prueba Tukey 95%) se encontró que para la actividad antioxidante por DPPH, no existe diferencia significativa entre EC y LIP, mientras que los contenidos de polifenoles de ESC, EC y LIP son significativamente diferentes.

Si bien se ha determinado el contenido de polifenoles, este método no es suficiente para conocer la composición detallada del extracto. Es probable que los polifenoles que se hayan extraído del material vegetal sean compuestos de pesos moleculares bajos o medios, dado que éstos se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos

y acuoso-orgánicos, ya que los compuestos con un elevado peso molecular tienden a quedarse unidos al material vegetal (Pérez-Jiménez, 2011). El extracto vegetal posiblemente es una mezcla de compuestos fenólicos de pesos moleculares bajos o medios solubles en el solvente etanol: agua (70:30) y que a su vez pueden estar asociados con otros componentes de la planta tales como carbohidratos y proteínas, además de otras sustancias no fenólicas ácidos orgánicos y grasas (Dai & Mumper, 2010).

Considerando que no existe un consenso sobre los métodos y los procedimientos de para determinar la actividad antioxidante, existe una dificultad para comprar resultados entre sí, sin embargo se ha recomendado que la actividad antioxidante no se concluya en base a un único modelo de prueba. En este caso se encontró que la actividad antioxidante por DPPH depende de los polifenoles presentes en el extracto, sin embargo, el método DPPH no es una especie radical de significado biológico (Fernández et al., 2006) y se ha encontrado que estructuras polifenólicas que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tienen *in vivo*, además, en el método Folin-Ciocalteu otros componentes del extracto, que no sean polifenoles pueden interferir en la cuantificación de compuestos fenólicos totales como es el caso de aminas aromáticas, azúcares a niveles elevados, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, proteínas, entre otros (Dai & Mumper, 2010; Pérez-Jiménez, 2011). Por lo expuesto, Wu et al. (2011) recomienda que se analice la capacidad antioxidante en un sistema de células vivas y con antioxidantes fisiológicamente relevantes.

4.1.4 Actividad antioxidante *in vivo* usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo

El método utilizado para medir la capacidad antioxidante del extracto etanólico y liposomas de *G. mulfordii* se basa en el análisis de la razón de crecimiento de *S. cerevisiae*, este parámetro permite identificar si el agente estudiado tiene un efecto antioxidante cuando es significativamente superior a 1 y pro-oxidante cuando está significativamente por debajo de 1. La razón de crecimiento con valor 1 en la curva efecto es equivalente a la curva de crecimiento control.

Se evaluaron concentraciones entre 0,25 mM a 10 mM de peróxido de hidrógeno como agente oxidante. La curva efecto generada (ver figura VII) mostró una disminución

inicial drástica de las razones de crecimiento que está relacionada directamente a la duración de la fase de adaptación, posteriormente, las razones de crecimiento tienden a estabilizarse e incrementar sus valores debido a que la levadura entra a la fase de crecimiento exponencial, los valores máximos de las razones de crecimiento que tienden a estabilizarse representan a la fase estacionaria del crecimiento de *S. cerevisiae*.

Las concentraciones de H₂O₂ desde 0,25 mM a 3 mM mostraron que al aumentar la concentración del agente oxidante las razones de crecimiento van disminuyendo y la fase de crecimiento y estacionaria tardan más en alcanzarse, sin embargo, desde la concentración 4 mM no existe un efecto lógico, encontrándose equivalencias entre la razón de crecimiento mínima alcanzada por 1mM y 10 mM y la generada por 3 mM, 4 mM y 10 mM. Estos resultados pueden tener explicación en base a una respuesta funcional análoga de la levadura a la respuesta SOS bacteriana (Fu, Pastushok, & Xiao, 2008)

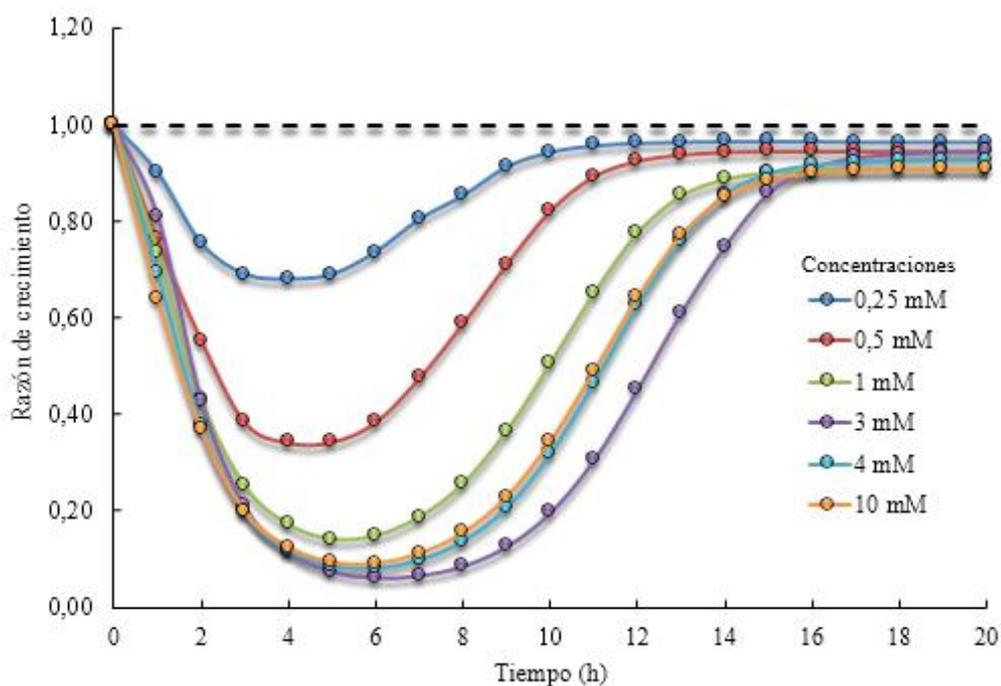


Figura VII. Curvas efecto del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de *S. cerevisiae*. La razón de crecimiento se obtuvo al dividir la $D. O_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sometida a H₂O₂ (1 h) para la $D. O_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sin H₂O₂ (control). Al analizar las razones de crecimiento mínimas alcanzadas (ANOVA simple y prueba Tukey 95%), se encontraron diferencias significativas entre el control (razón de crecimiento =1) y las correspondientes a las concentraciones de H₂O₂ y diferencias significativas entre las razones de crecimiento mínimas alcanzadas por las concentraciones de H₂O₂ a excepción de dos grupos con efectos homogéneos (grupo 1 [1mM y 10 mM] y grupo 2 [3mM, 4 mM y 10 mM]).

Considerando estos resultados, se seleccionaron las concentraciones 0,5 mM y 3 mM de H₂O₂ para simular condiciones de estrés bajo y alto ya que sus razones de crecimiento están más distanciadas y muestran fases de crecimiento más marcadas.

En varios ensayos se ha reportado el uso de peróxido de hidrógeno como modelo promotor del estrés oxidativo (Castangia et al., 2015; Peláez, 2016; Wu et al., 2011).

La generación de ROS tiene dos orígenes, un endógeno y un exógeno (Wu et al., 2011). Según la metodología de este ensayo, en la levadura debe darse una generación endógena de ROS como parte de los procesos metabólicos normales entre ellos la respiración aeróbica (Estruch, 2000), dado que el crecimiento de *S. cerevisiae* se desarrolló en condiciones de aireación. Por otro lado, la levadura fue incubada por 1 h en un medio de cultivo con peróxido de hidrógeno lo que representa una fuente de origen externo de ROS.

Si bien, bajas concentraciones de ROS son necesarias en la célula para la transducción de señales celulares en procesos tales como proliferación, apoptosis, inflamación y respuesta inmune, un desbalance entre las defensas antioxidantes y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y / o nitrógeno (ROS / RNS) genera estrés oxidativo (Dai & Mumper, 2010).

Cuando una célula está sometida al estrés oxidativo se desarrollan mecanismos de defensa que pueden ser enzimáticos (primera línea de protección) y no enzimáticos (segunda línea de protección) (Peláez, 2016). Entre los enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa, peroxirredoxina, tioredoxina y tioredoxina reductasa (Wu et al., 2011) que neutralizan las especies reactivas, por otro lado, los sistemas de defensa no enzimáticos comprenden compuestos antioxidantes como la albúmina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina (Fernández et al., 2006). Se pueden considerar dos grupos de enzimas: un grupo (incluyendo superóxido dismutasas, catalasas y peroxidases) actúan directamente desintoxicando ROS y el otro grupo (que incluye sistemas de tioredoxina y glutaredoxina) actúan como reguladores redox de los tioles protéicos (Herrero et al., 2008)

De la Figura VII, se puede deducir que los mecanismos de defensa no fueron suficientes para proteger a la célula del estrés oxidativo, ya que se observó una disminución drástica de las razones de crecimiento como consecuencia de una muerte y/o detención del crecimiento celular. Dai & Mumper (2010) aseguran que las ROS, particularmente H₂O₂ son potentes reguladores de la replicación celular, guardando relación con Wu et al. (2011), quien menciona que en circunstancias en las que los sistemas antioxidantes celulares no son adecuados, se usan cambios fisiológicos como la detención del ciclo celular para proteger a la célula, siendo ésta una característica conservada de la levadura en respuesta a diferentes formas de estrés oxidativo. Además, se ha mencionado que si las defensas del estrés oxidativo no son suficientes, las especies reactivas producen daño oxidativo a biomoléculas como a componentes celulares (Fernández et al., 2006) causando daño al ADN, lípidos y proteínas, lo que puede provocar la muerte celular (Peláez, 2016).

Varios mecanismos se han reportado en las células ante situaciones de estrés, como: inducción de proteínas de estrés, modificación de la composición de la membrana y la represión de la traducción mediante la regulación de la expresión génica correspondiente a través de vías de transducción de señales desencadenadas por estrés (Takagi, 2008). Respecto a la inducción de estrés, específicamente con H₂O₂, Godon et al. (1998) llevaron a cabo una caracterización de todo el genoma de un estímulo inducible por H₂O₂ en *S. cerevisiae* y encontraron 167 proteínas expresadas diferencialmente, siendo las proteínas relacionadas directamente con la defensa antioxidante celular, la maquinaria de traducción, las proteasas y el metabolismo de los carbohidratos, algunas de las funciones celulares afectadas. Las enzimas metabólicas también se incluyen como dianas sensibles a H₂O₂ y al parecer ocurre una posible ralentización de la glucólisis (Peláez, 2016).

Para determinar la capacidad antioxidante de los liposomas y extracto de *G. mulfordii* en levadura sometida a condiciones de estrés se utilizó el método propuesto por Peláez (2016), quien realizó modificaciones a la metodología planteada inicialmente por Wu et al. (2011), ambos autores trabajaron con cepas certificadas de levadura. En este trabajo se controla el crecimiento de la levadura a tiempo real después de que ha sido incubada 18 h con el posible agente antioxidante y sometida por 1 h al agente oxidante, al lavar las levaduras con PBS se evita la interacción que podría darse entre los agentes

antioxidantes y oxidantes e incluso con los componentes del medio de cultivo (Peláez, 2016).

Se encontró que los liposomas del extracto etanólico de *G. mulforddi* muestran una actividad antioxidante superior al extracto etanólico sin microencapsular y a la vitamina C utilizada como control (ver figuras VIII y IX).

La vitamina C fue evaluada a tres concentraciones 0,25 mM, 0,5 mM y 2 mM, en tres niveles de estrés. Cuando la levadura no está sometida a condiciones de estrés, las concentraciones de vitamina C 0,25 mM y 0,5 mM presentan un efecto antioxidante significativo. Ante condiciones de estrés bajo el único efecto significativo encontrado es el correspondiente a la concentración 2 mM que actúa como pro-oxidante. En condiciones de estrés alto ninguna concentración de vitamina C ejerce efecto.

En este trabajo se observó que a la condición de estrés nulo, el extracto a 150 mg/L tiene una actividad equivalente a la vitamina C 0,5 mM (razones de crecimiento máximas sin diferencia significativa), mientras que a todos los niveles de estrés los liposomas superan a su respectivo efecto protector de la vitamina C, concordando con lo reportado en la bibliografía ya que los compuestos fenólicos se consideran poderosos antioxidantes y han demostrado ser antioxidantes incluso más potentes que la vitamina C (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley, & Pridham, 1995; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996), también Peláez (2016) ha encontrado razones de crecimiento del extracto de cacao (cercasas a 3) que superan a la actividad antioxidante de la vitamina C (cercana a 2,5).

Las células tienen sistemas antioxidantes no enzimáticos y uno de ellos es la vitamina C (Wu et al., 2011) que reacciona y neutraliza a los radicales libres (especialmente a los radicales peroxilo) transformándose en el radical dehidroascorbato que es menos reactivo que los radicales que existían antes, existen sistemas enzimáticos intracelulares que regeneran el dehidroascorbato a su forma original, utilizando NADH o GSH como poder reductor (Pérez-Jiménez, 2011). Se ha descrito que en el H₂O₂ oxida al ascorbato para producir dehidroascorbato y agua, siendo el dehidroascorbato relativamente estable y menos tóxico (Wu et al., 2011)

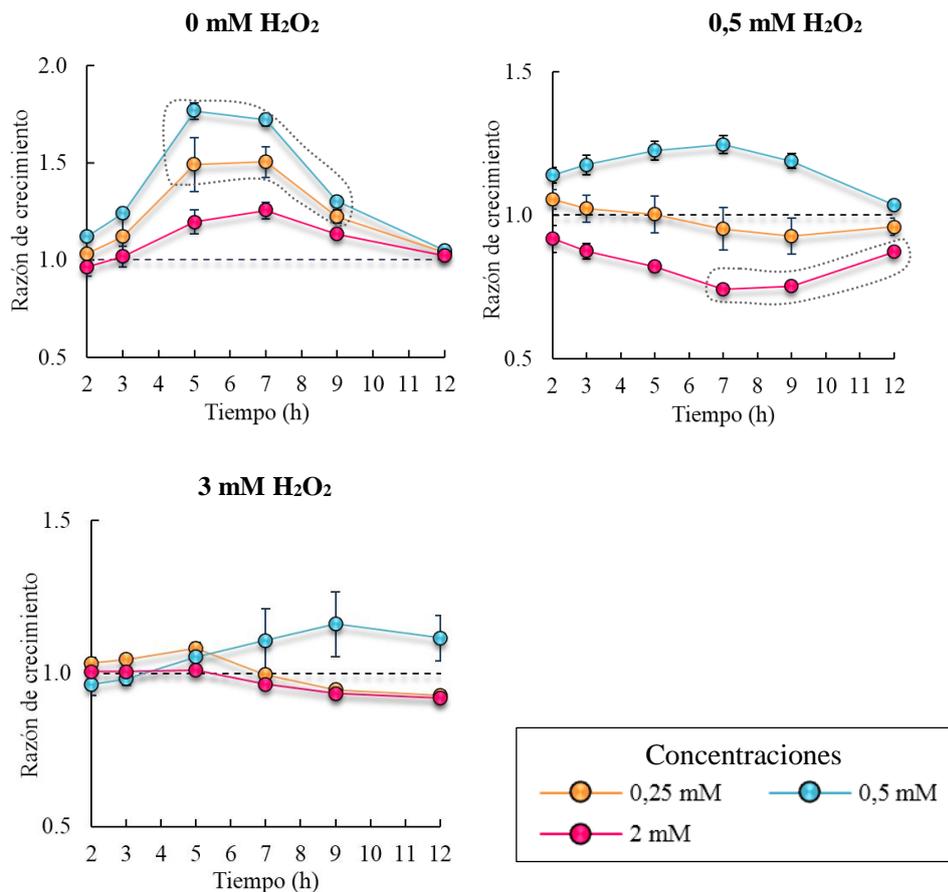


Figura VIII. Curvas efecto de la vitamina C en el crecimiento de *S. cerevisiae*. La razón de crecimiento se obtuvo al dividir la $D_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sometida a la vitamina C (18 h) y al H_2O_2 (1 h) para la $D_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sometida a la vitamina C (18 h) y sin H_2O_2 (control). Las barras de error representan las desviaciones estándar. Los puntos encerrados por las líneas entrecortadas presentan diferencia significativa respecto a la curva control (razón de crecimiento =1) según un ANOVA simple y prueba Tukey 95%.

La capacidad del ascorbato para provocar actividad antioxidante intracelular podría deberse a que durante el período de tratamiento con ascorbato, la levadura podría acumular el antioxidante ya que se ha demostrado que esto ocurre en otras células eucariotas (Welch et al., 1995), de modo que, el ascorbato acumulado intracelularmente puede jugar un papel protector en la exposición al oxidante. Catani et al. (2001) demostraron que varios genes estaban regulados positivamente por el ascorbato, tales respuestas de expresión génica dieron como resultado la protección celular contra el daño oxidativo, en ese caso, inducido por UV.

A pesar de lo mencionado, la actividad antioxidante del ácido ascórbico se observó únicamente en la condición de estrés nulo, lo que no concuerda con Wu et al. (2011) que encontró que bajo condiciones de estrés inducido por peróxido de hidrógeno el ascorbato es capaz de inducir resistencia en *S. cerevisiae*, también Peláez (2016)

encontró que a condición de estrés 0,5 mM y 4 mM de H₂O₂ la vitamina C genera efectos antioxidantes significativos con razones de crecimiento máximas superiores a 1,5 y 2, respectivamente.

Las concentraciones evaluadas de extracto y liposomas fueron 0,1 mg/L, 4 mg/L, 150 mg/L y 500 mg/L ante condiciones de estrés nulo, bajo (0,5 mM H₂O₂) y alto (3 mM H₂O₂) (ver figura IX).

Cuando la levadura no está sometida a condiciones de estrés, las concentraciones de liposomas 500 mg/L, 150 mg/L, 4 mg/L y 0,1 mg/L ejercen un efecto antioxidante significativo, en contraste con 150 mg/L, la única concentración de extracto etanólico que ejerce actividad antioxidante. Las razones de crecimiento más altas se alcanzaron con liposomas 500 mg/L.

Ante condiciones de estrés bajo, las concentraciones de liposomas 500 mg/L, 150 mg/L ejercen un efecto antioxidante significativo y la concentración 4 mg/L ejerce un efecto pro -oxidante. En este caso ninguna concentración de extracto etanólico posee actividad antioxidante, al contrario, las concentraciones 500 mg/L, 150 mg/L y 0,1 mg/L presentan actividad pro -oxidante.

En condiciones de estrés alto, las concentraciones de liposomas 500 mg/L, 150 mg/L ejercen un efecto antioxidante significativo y la concentración 4 mg/L ejerce un efecto pro -oxidante. Ninguna concentración de extracto etanólico posee actividad antioxidante, más bien, las concentraciones 500 mg/L, 150 mg/L y 0,1 mg/L presentan actividad pro -oxidante.

La tendencia de las concentraciones de extracto y liposomas que tienen efecto antioxidante o pro-oxidante se mantiene para las dos condiciones de estrés.

Para las tres condiciones de estrés evaluadas se encontró que a las mismas dosis el extracto de *G. mulforddi* encapsulado en liposomas ejerce un efecto antioxidante mayor y en algunos casos ejerce un efecto antioxidante en lugar del pro-oxidante producido por el extracto, este suceso se ha reportado también en otras investigaciones. Se sabe que la actividad antioxidante del extracto durante su microencapsulación se modifica ya que como liposoma adquiere nuevas características fisicoquímicas, la estructura, tamaño, estabilidad y propiedades de las superficies, que causan un efecto

en su biodistribución (Gortzi et al., 2008), por tanto, son estas propiedades las que definen la eficiencia de los liposomas como transportadores de compuestos bioactivos.

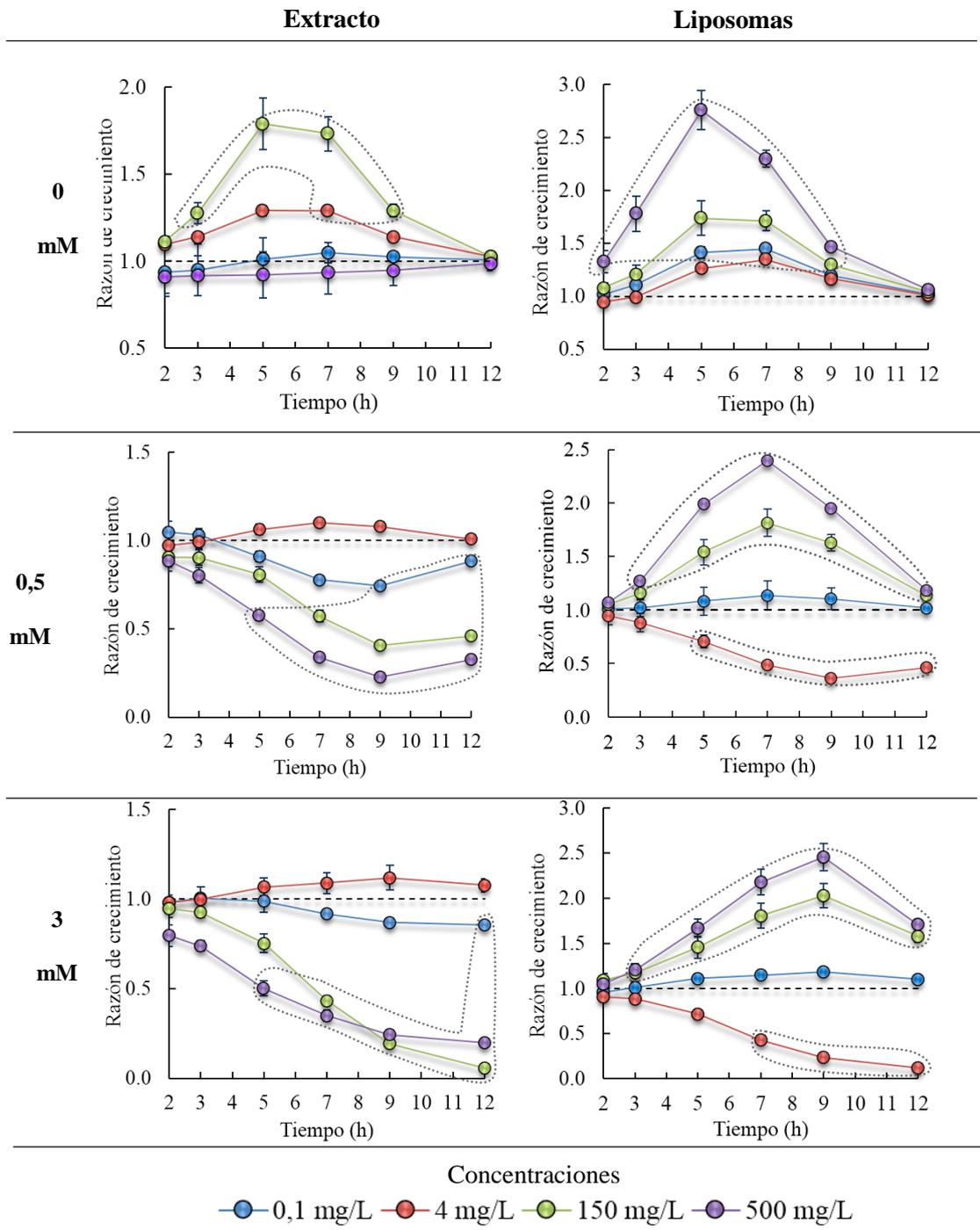


Figura IX. Curvas efecto de extracto y liposomas de *G. mulfordii* en el crecimiento de *S. cerevisiae*. La razón de crecimiento se obtuvo al dividir la $D. O_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sometida al agente antioxidante (18 h) y al H_2O_2 (1 h) para la $D. O_{600\text{ nm}}$ de la curva de crecimiento sometida al agente antioxidante (18 h) y sin H_2O_2 (control). Las barras de error representan las desviaciones estándar. Los puntos encerrados por las líneas entrecortadas presentan diferencia significativa respecto a la curva control (razón de crecimiento =1) según un ANOVA simple y prueba Tukey 95%.

Los liposomas mejoran el transporte y la biodisponibilidad de sus compuestos activos encapsulados haciéndolos más accesibles a la célula que el extracto solo. Se ha encontrado que los liposomas simulan el comportamiento de las membranas celulares lo que los hace útiles en el desarrollo de fármacos que puedan dirigirse a membranas con una composición específica (Taylor, Davidson, Bruce, & Weiss, 2005), además, muchas actividades como las interacciones de unión y endocitosis se han visto influenciados por carga de la superficie de los liposomas (Miller, Bondurant, McLean, McGovern, & O'Brien, 1998).

El hecho que los liposomas generen una actividad antioxidante mientras que el extracto sin microencapsular genera una actividad pro-oxidante tendría explicación en que los liposomas cambian la toxicidad de los componentes encapsulados (Arsić et al., 1999), probablemente la incubación de la levadura con liposomas y con extracto generan diferentes compuestos biodisponibles para la levadura, si bien los componentes microencapsulados son los mismos que el extracto solo, los antioxidantes naturales presentan una baja solubilidad e incapacidad para atravesar la membrana celular (Bonechi et al., 2018), en este punto, interviene los liposomas como vesículas esféricas de una sola bicapa (unilamelares) o de más de una bicapa (multilamelares) (Gibis et al., 2014) que por su anfifilicidad (Arsić et al., 1999) son capaces de transportar moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y anfifílicas (Bonechi et al., 2018), de modo que las sustancias hidrofóbicas son incorporadas en las bicapas lipídicas, mientras que los compuestos hidrofílicos se disponen en el interior, formando un núcleo acuoso y como los compuestos fenólicos del extracto son compuestos polares, se localizan dentro de la parte acuosa (Roostae et al., 2017). Por otra parte el tamaño de los compuestos tiene un efecto directo en la absorción de compuestos, se ha observado en algunos ensayos que los compuestos más pequeños tienen una mayor concentración en sangre y por tanto son los que se absorben mejor y tienen más probabilidades de alcanzar el órgano diana (Peláez, 2016). Es posible que sean los polifenoles de menor tamaño los que sean absorbidos por la levadura y generen un efecto antioxidante.

Los liposomas presentan una ventaja, la liberación controlada de compuestos, se ha reportado que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la interacción con las bicapas y su localización dentro de los liposomas, de modo que la velocidad de liberación de los compuestos hidrofílicos (localizados dentro de la región acuosa de los liposomas) puede verse disminuída (Roostae et al., 2017). La liberación

lenta puede estar asociada a la interacción entre las bicapas y los compuestos fenólicos del extracto debido a la formación de enlaces hidrógeno entre la zona polar de los fosfolípidos y los grupos OH de esos compuestos (Rafiee, Barzegar, Sahari, & Maherani, 2017).

La formulación utilizada en este trabajo para la elaboración de los liposomas incluye lecitina de soya y lactosa. La lecitina de soya es una mezcla de fosfatidilcolina - etanolamina e inositol como componentes principales y está clasificada como un ingrediente alimenticio seguro, dado que es biodegradable, biocompatible y no tóxico (Gibis et al., 2014), por lo tanto, es de uso seguro en las levaduras. Además, se han encontrado reportes que afirman que la lecitina tiene un potencial como antioxidante que depende directamente del contenido de fosfolípidos (Arsić et al., 1999; Roostae et al., 2017), otro estudio afirma que la lecitina tiene actividad antioxidante ya que retarda la oxidación lipídica al captar los radicales libres y convertir los hidroperóxidos en productos estables, también tiene un efecto sinérgico con los compuestos fenólicos, porque al donar un átomo de hidrógeno del grupo amino de los fosfolípidos regenera al compuesto fenólico oxidado (Roostae et al., 2017). Los fosfolípidos de soya son capaces de interactuar con las membranas celulares, cambiando la composición de sus ácidos grasos, por tanto, podrían actuar como ingredientes activos (Marín et al., 2018).

Aunque ciertos reportes aseguran que la lecitina ejerce una actividad antioxidante, en este trabajo se analizó la capacidad antioxidante de liposomas vacíos (a una dosis equivalente a las probadas para liposomas) ante las condiciones de estrés establecidas y en ningún caso se encontró que tienen un efecto antioxidante, por el contrario en varios casos se encontró que su actividad es más bien pro-oxidante y al parecer su actividad es dosis-dependiente (resultados no mostrados). En consecuencia, las bicapas lipídicas de los liposomas no tienen actividad antioxidante por sí solas y ejercen un efecto antioxidante únicamente por su interacción con los compuestos antioxidantes encapsulados.

Se sabe que los compuestos fenólicos son los responsables de la capacidad antioxidante, si bien los mecanismos de acción de estos compuestos todavía no se han dilucidado completamente (Peláez, 2016) se han sugerido varios mecanismos. Se ha evidenciado que la estructura de los polifenoles determina su capacidad antioxidante (Siquet, Paiva-Martins, Lima, Reis, & Borges, 2006), los polifenoles poseen

estructuras con anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados y sustituyentes hidroxilo a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante (Pérez-Jiménez, 2011), ya que una de las principales características de los polifenoles es donar hidrógeno o electrones a los radicales libres, lo que conduce a la formación de moléculas estables (Ganji & Sayyed-Alangi, 2017). Los compuestos fenólicos podrían estar incorporados en las bicapas lipídicas de la membrana y actuar como donantes de hidrógeno, lo que lleva a la estabilización de radicales libres y evita la formación de radicales lipídicos (Dani et al., 2008), además de modificar la estructura y fluidez de los lípidos de membranas (Piña, 2011). Según lo reportado, los polifenoles ejercen un efecto antioxidante mediante tres mecanismos: eliminando especies radicales (ROS y/o RNS) , suprimiéndolas al inhibir algunas enzimas o trazas de metales implicados en la producción de radicales libres y como defensa antioxidante reguladora o protectora (Dai & Mumper, 2010). Se ha mencionado que algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes , como la geniesteína, una isoflavona que potencia la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la SOD (Donma & Donma, 2005).

Los efectos fisiológicos de los polifenoles pueden ir más allá de la modulación del estrés oxidativo, se ha demostrado que podrían interactuar con las cascadas de señalización celular que regulan la actividad de los factores de transcripción y por lo tanto, afectan la expresión de los genes (Peláez, 2016), los polifenoles modulan la actividad de una amplia gama de enzimas y receptores celulares y de esta manera, tienen otras acciones biológicas específicas para prevenir y tratar enfermedades (Dai & Mumper, 2010).

Se han observado efectos sinérgicos mutuos entre diferentes compuestos fenólicos o con otros antioxidantes no fenólicos (Vinson, Su, Zubik, & Bose, 2001) haciendo referencia que una combinación de antioxidantes fenólicos u otros ejerce un mejor efecto antioxidante que el compuesto individual puro (Dai & Mumper, 2010).

Si bien los polifenoles son responsables de una variedad de efectos positivos, en este estudio se encontró que las concentraciones 500 mg/L, 150 mg/L y 0,1 mg/L de extracto y únicamente la concentración 4 mg/L de liposomas, en todos los casos a condiciones de estrés bajo y alto tienen un efecto pro-oxidante, a diferencia de la

vitamina C que únicamente tuvo un efecto pro-oxidante a la concentración 2 mM a condición de estrés bajo.

La actividad pro-oxidante encontrada en las dosis altas 500 mg/L, 150 mg/L de extracto (estrés bajo y alto) concuerda con otros estudios que han reportado que la actividad de ciertos antioxidantes no se incrementa linealmente con el incremento de su concentración, incluso en altos niveles de adición pueden tener un efecto pro-oxidante (Gortzi et al., 2008; Peláez, 2016). A condiciones de estrés bajo y alto, los liposomas a concentración baja 4 mg/L tiene un efecto pro-oxidante respecto a la actividad antioxidante a concentraciones altas 150 y 500 mg/L y la concentración 0,1 mg/L de extracto tiene un efecto pro-oxidante en contraste con 4 mg/L de extracto que no tiene actividad, estos resultados sugieren que tanto liposomas como extracto tienen efecto dosis- dependiente (ver figura X), tal efecto ha sido encontrado en el estudio de la actividades biológicas de extractos vegetales (Hsu, 2006; Luqman, Srivastava, Kumar, Maurya, & Chanda, 2012)

Se encontró un efecto pro-oxidante solamente bajo condiciones de estrés bajo y alto, lo que podría tener explicación en reportes que señalan que algunos antioxidantes fenólicos pueden iniciar un proceso de autooxidación y actuar como prooxidantes en ciertas condiciones, en lugar de terminar una reacción en cadena de radicales libres al reaccionar con un segundo radical, el radical fenoxi también puede interactuar con el oxígeno y producir quinonas ($P = O$) y anión superóxido ($O_2 \cdot^-$), los iones de metales de transición también podrían inducir actividad prooxidante. Algunas condiciones que favorecen a la autooxidación de los compuestos fenólicos son, por ejemplo, un pH alto con altas concentraciones de iones de metales de transición y moléculas de oxígeno presentes (Ann E. Hagerman et al., 1998). Respecto a la vitamina C, hay que tener en cuenta que las mezclas de ascorbato de hierro y de cobre estimulan el daño de radicales libres al ADN, lípidos y proteínas in vitro, así mismo, estas mezclas pueden inactivar rápidamente distintas enzimas antioxidantes, como la catalasa (Pérez-Jiménez, 2011). No se tiene conocimiento sobre posible presencia de metales de transición en el medio de cultivo.

Paradójicamente, las actividades prooxidativas de los polifenoles se han relacionado con efectos anticancerosos (Peláez, 2016). Algunos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos naturales exhiben un efecto diferencial en el cáncer frente a las

células normales, pudiendo inhibir la formación y el crecimiento de tumores por inducción de detención del ciclo celular y apoptosis, otros estudios *in vitro* también sugieren que los efectos antiproliferativos de algunos antioxidantes polifenólicos en las células cancerosas se deben en parte a sus acciones prooxidantes, sin embargo, se ha propuesto que esta propiedad oxidativa depende de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de prueba ya que la presión parcial de oxígeno en un sistema de cultivo celular (160 mmHg) es mucho más alta que en la sangre o los tejidos (<40 mmHg), por tanto, no está claro si puede darse un mecanismo similar *in vivo* (Dai & Mumper, 2010).

Hay que considerar que al igual que ocurre con otros compuestos antioxidantes, la ingesta de polifenoles se debe mantener dentro de unos rangos para que sus posibles efectos beneficiosos no se transformen en negativos para la salud ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante (Pérez-Jiménez, 2011), por eso es útil estudiar las relaciones dosis- respuesta (ver figura X).

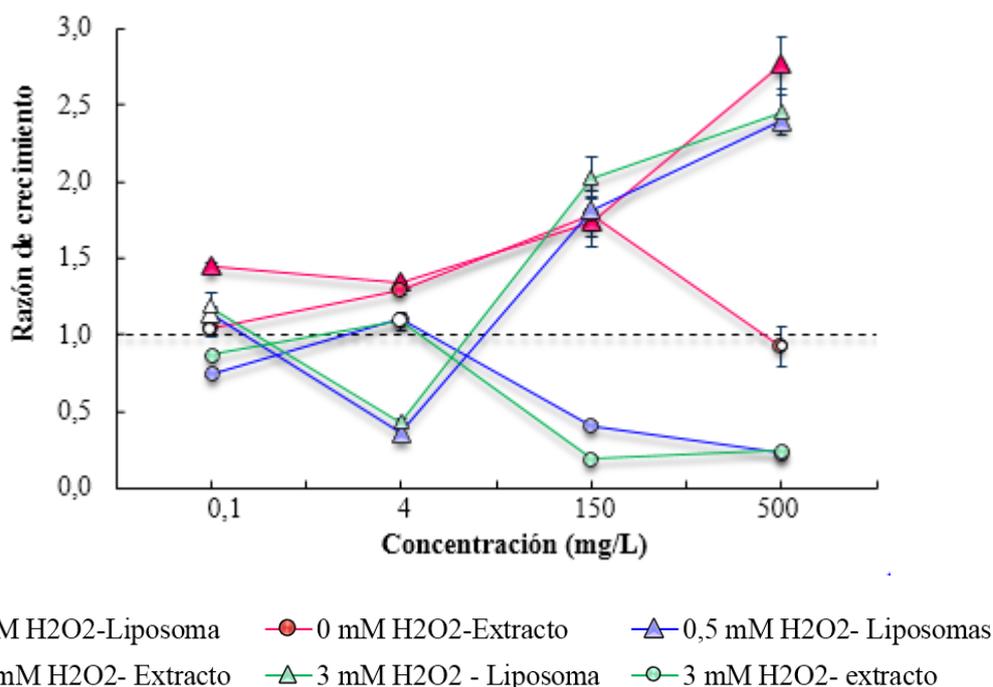


Figura X. Curvas dosis-respuesta en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Las curvas se construyeron tomando en cuenta el valor más alto en el caso de un efecto antioxidante y el valor más bajo en el caso de un efecto pro-oxidante. Los puntos de color blanco no presentan diferencia significativa respecto a la curva control (razón de crecimiento =1) según un ANOVA simple y prueba Tukey 95%. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

En consecuencia, en este trabajo se ha observado que el extracto de *G. mulfordii* modifica sus propiedades con la encapsulación en liposomas incrementando su capacidad antioxidante al aumentar la supervivencia celular de *S. cerevisiae*, probablemente debido a que los liposomas actúan como sistemas de administración que aseguran la captación celular de los compuestos del extracto que de otro modo no serían accesibles para la levadura.

Los resultados encontrados son útiles como primer análisis del efecto que el extracto y liposomas de *G. mulfordii* podrían tener en eucariotas superiores dado que *S. cerevisiae* es un modelo eucariótico, sin embargo estos resultados no pueden extrapolarse a los seres humanos, siendo necesarios más estudios que evalúen la capacidad antioxidante y los posibles efectos secundarios de *G. mulfordii*.

4.2 Verificación de hipótesis

4.2.1 Hipótesis nula

Los liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *G. mulfordii* no tienen actividad antioxidante. Se rechaza.

4.2.2 Hipótesis alternativa

Los liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *G. mulfordii* sí tienen actividad antioxidante. Se acepta la hipótesis alternativa ya que en el ensayo *in vivo* se observó que los liposomas ejercen una actividad antioxidante en contraste con el extracto sin microencapsular.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se evaluó la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*, encontrando que los liposomas presentan un contenido de polifenoles menor al extracto sin microencapsular, sin embargo, su capacidad antioxidante en *S. cerevisiae* es superior al extracto, superando incluso a la actividad de la vitamina C.
- Se establecieron las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de *Greigia mulfordii*, siendo 1 h el tiempo al que se debe someter a ebullición la mezcla solvente - material vegetal en una relación 22,65 ml: 1g, utilizando etanol al 70 % como solvente.
- Se obtuvieron liposomas a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*, lecitina de soya y lactosa mediante la técnica de secado por aspersión, encontrándose que el extracto microencapsulado es el responsable de la actividad antioxidante mas no los ingredientes utilizados en la formulación del liposoma.
- Se comparó la actividad antioxidante *in vitro* de liposomas y extracto, encontrando que el extracto etanólico de *Greigia mulfordii* microencapsulado en liposomas tiene un contenido de polifenoles más bajo que el extracto etanólico sin microencapsular y una actividad antioxidante en el método DPPH que no es concluyente ni comparable debido posiblemente a problemas en la solubilidad de la bicapa lipídica de los liposomas.
- Se comparó la actividad antioxidante *in vivo* de liposomas y extracto, encontrando que la microencapsulación del extracto etanólico de *Greigia mulfordii* en liposomas le otorga, ya sea, una actividad antioxidante que antes no tenía o un incremento de la misma. El efecto antioxidante de los liposomas y extracto en *S. cerevisiae* tiene una relación dosis –dependiente, siendo la concentración 500 mg /L de liposomas la que ejerce una actividad antioxidante más alta para todas las condiciones de estrés.

5.2 Recomendaciones

- Utilizar cepas de *S. cerevisiae* certificadas para evitar las posibles variaciones entre levaduras aisladas tradicionalmente.
- Realizar un análisis más detallado de la composición del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*.
- Separar el extracto etanólico de *Greigia mulfordii* en fracciones y analizar su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* por separado.
- Determinar la actividad antioxidante *in vivo*, en *S. cerevisiae* utilizando agentes oxidantes diferentes al peróxido de hidrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J., Salomón, S., Sevilla, I., & Nuevas, L. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango) Use of ultrasound for extraction of the apolar fraction in leaves of *Mangifera indica* L. (mango tree). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3). Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Ann E. Hagerman, *, Ken M. Riedl, G. Alexander Jones, Kara N. Sovik, Nicole T. Ritchard, Paul W. Hartzfeld, and, & Riechel, T. L. (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. <https://doi.org/10.1021/JF970975B>
- Arsić, I., Vidovic, S., & Vuleta, G. (1999). Influence of liposomes on the stability of vitamin A incorporated in polyacrylate hydrogel. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(4), 219–225. <https://doi.org/10.1023/A:1005449529462>
- Baba, S. A., Malik, A. H., Wani, Z. A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., & Ashraf, N. (2015). Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *South African Journal of Botany*, 99, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.194>
- Baéz, S., Fjeldså, J., Krabbe, N., Males, M., Navarrete, H., & Resl, R. (2000). Oyacachi: la gente y la biodiversidad. *Historia*, (January).
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & 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>
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., ... Magnani, A. (2018). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry*, 233(November 2017), 55–63.

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.11.003>

- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1), 240–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>
- Castangia, I., Caddeo, C., Manca, M. L., Casu, L., Latorre, A. C., Díez-Sales, O., ... Manconi, M. (2015). Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries. *Carbohydrate Polymers*, 134, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.037>
- Catani, M. V., Rossi, A., Costanzo, A., Sabatini, S., Levrero, M., Melino, G., & Avigliano, L. (2001). Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage, 85, 77–85.
- Dadé, M. M., Fioravanti, D. E., Schinella, G. R., & Tournier, H. A. (2009). Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(6), 529–539.
- Dag, D., & Oztop, M. H. (2017). Formation and Characterization of Green Tea Extract Loaded Liposomes. *Journal of Food Science*, 82(2), 463–470. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13615>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M. D., Henriques, J. A. P., & Eleutherio, E. (2008). Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4268–4272. <https://doi.org/10.1021/jf800752s>
- Donma, M. M., & Donma, O. (2005). Phytonutrients and children: The other side of the medallion. *Food Research International*, 38(6), 681–692. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2005.02.002>
- Enciclopedia of life, (eol). (2014). *Greigia mulfordii*. Retrieved from http://eol.org/data_objects/30244886
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 469–486. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00035-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00035-8)

- Fernández, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *American Journal of Medicine, The*, (June), 1–17.
- Foster, M. B. (1951). *The BROMELIAD SOCIETY BULLETIN*. Orlando, Florida. Retrieved from <http://journal.bsi.org/V01/5/>
- Frassinetti, S., Gabriele, M., Caltavuturo, L., Longo, V., & Pucci, L. (2015). Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1), 35–41. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0453-6>
- Fu, Y., Pastushok, L., & Xiao, W. (2008). DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 908–926. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00126.x>
- Ganji, S., & Sayyed-Alangi, S. Z. (2017). Encapsulation of ginger ethanolic extract in nanoliposome and evaluation of its antioxidant activity on sunflower oil. *Chemical Papers*, 71(9), 1781–1789. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0164-1>
- Gibis, M., Zeeb, B., & Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.014>
- Global Biodiversity Information Facility, (GBIF). (2017). *Greigia mulfordii* L.B.Sm. Retrieved from <https://www.gbif.org/species/2693957>
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., ... Labarre, J. (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22480–22489. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22480>
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2008). Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European Food Research and Technology*, 226(3), 583–590. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0592-1>
- Habermann, E., Imatomi, M., Pontes, F. C., Gualtieri, S. C. J., Habermann, E., Imatomi, M., ... Gualtieri, S. C. J. (2016). Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. *Brazilian Journal of Biology*, 76(4), 898–904. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.03815>

- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., ... Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1–2), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.007>
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(11), 1217–1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hsu, C.-Y. (2006). Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biological Research*, 39(2), 281–288. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000200010>
- Hurtado, P., Jurado, B., Ramos, E., & Calixto, M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans Neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 81(3).
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, (INEN). (2016). Estadísticas Vitales. Registro de nacidos vivos y defunciones 2016. Ecuador. Retrieved from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/2017/Presentacion_Nac_y_Def_2017.pdf
- López, O., & Gómez, M. (2008). Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia.*, 42. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152008000300010
- Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A. K., & Chanda, D. (2012). Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2012, 519084. <https://doi.org/10.1155/2012/519084>
- Mager, W. H., & Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.004>
- Marín, D., Alemán, A., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C.

- (2018). Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels. *Food Chemistry*, 245, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.141>
- Martorell, P., Forment, J. V, de Llanos, R., Montón, F., Llopis, S., González, N., ... Ramón, D. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J Agric Food Chem*, 59(5), 2077–2085. <https://doi.org/10.1021/jf104217g>
- Miller, C. R., Bondurant, B., McLean, S. D., McGovern, K. A., & O'Brien, D. F. (1998). Liposome–Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. *Biochemistry*, 37(37), 12875–12883. <https://doi.org/10.1021/bi980096y>
- Organización Mundial de la Salud, (OMS). (2018). Enfermedades no transmisibles. Retrieved August 23, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Outeiro, T. F., & Giorgini, F. (2006). Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnology Journal*, 1(3), 258–269. <https://doi.org/10.1002/biot.200500043>
- Peláez, A. (2016). *Validación funcional de extractos polifenólicos de cacao mediante ensayos in vivo con organismos modelo*. Universidad de Valencia, España.
- Pérez-Jiménez, J. (2011). *Metodología para la Evaluación de Ingredientes Funcionales Antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos*. Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10486/1671>
- Piña, Y. (2011). Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz. Retrieved from <http://www.tesis.uchile.cl/handle/2250/112101>
- Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*, 220, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B.

- (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375–383. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7633567>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933–956. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743980>
- Roostae, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Rafiee, Z. (2017). The enhancement of pistachio green hull extract functionality via nanoliposomal formulation: studying in soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3620–3629. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2822-2>
- Silva, C. G., Herdeiro, R. S., Mathias, C. J., Panek, A. D., Silveira, C. S., Rodrigues, V. P., ... Eleutherio, E. C. A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52(3), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.008>
- Simbaña, W. (2017). Plantas de los remanentes del cerro Teligote. Ecuador: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos - Herbario Misael Acosta Solís (AMAS), Universidad Técnica de Ambato (UTA).
- Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., ... Fadda, A. M. (2005). Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(1), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.06.005>
- Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima, J. L. F. C., Reis, S., & Borges, F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*, 40(4), 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>
- Subhaswaraj, P., Sowmya, M., Bhavana, V., Dyavaiah, M., & Siddhardha, B. (2017). Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Croton caudatus* in *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2728–2736. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2709-2>
- Subhaswaraj, P., Sowmya, M., Jobina, R., Sudharshan, S., Dyavaiah, M., & Siddhardha, B. (2017). Determination of antioxidant potential of *Acacia nilotica* leaf extract in oxidative stress response system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5247–5253.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.8409>

- Takagi, H. (2008). Proline as a stress protectant in yeast: Physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(2), 211–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1698-5>
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(7–8), 587–605. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>
- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, *26*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5315–5321. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714322>
- Welch, R. W., Wang, Y., Crossman, A., Park, J. B., Kirk, K. L., & Levine, M. (1995). Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(21), 12584–12592. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7759506>
- Wu, M. J., O'Doherty, P. J., Fernandez, H. R., Lyons, V., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *11*(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x>

ANEXOS

Anexo A. Resumen del proceso experimental

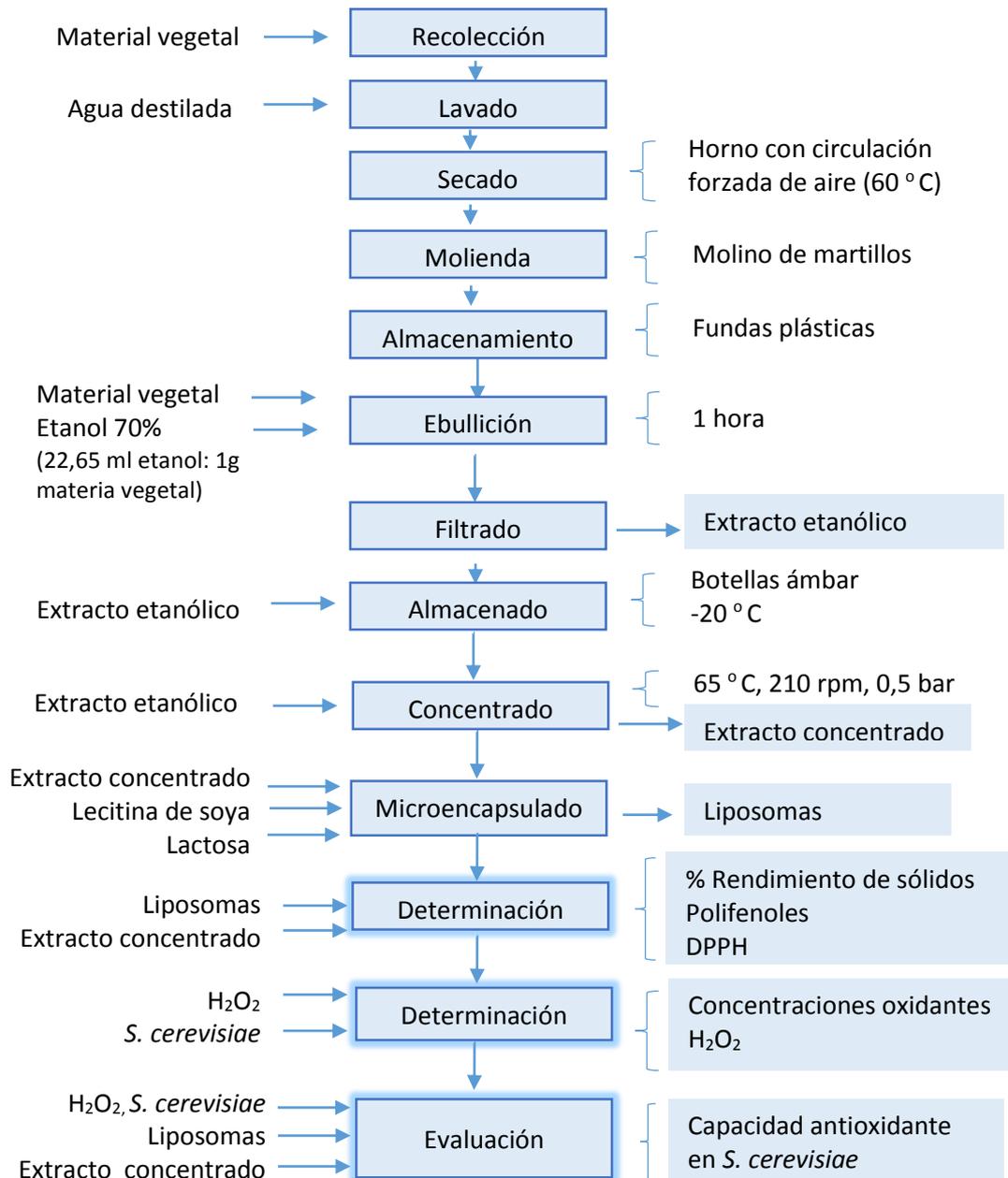


Figura XI. Flujograma de fase procedimental.

Anexo B. Curvas de calibración

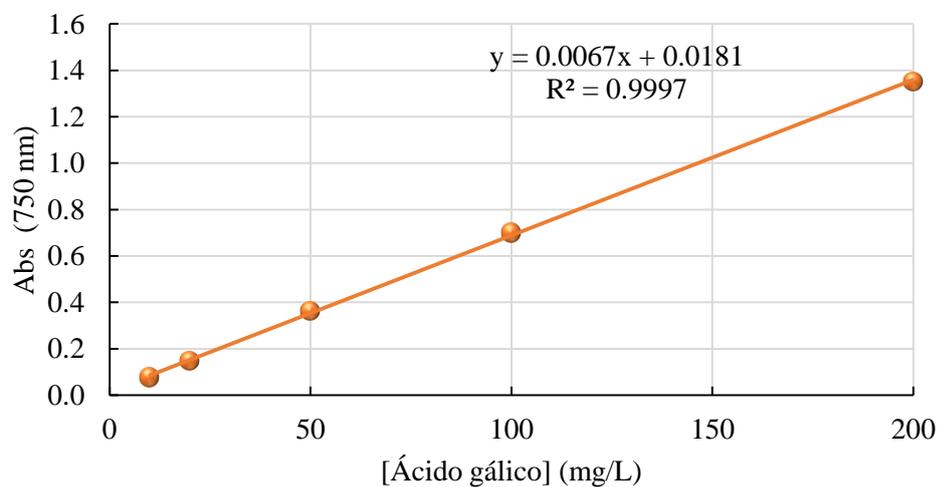


Figura XII. Curva de calibración para determinar el contenido de polifenoles

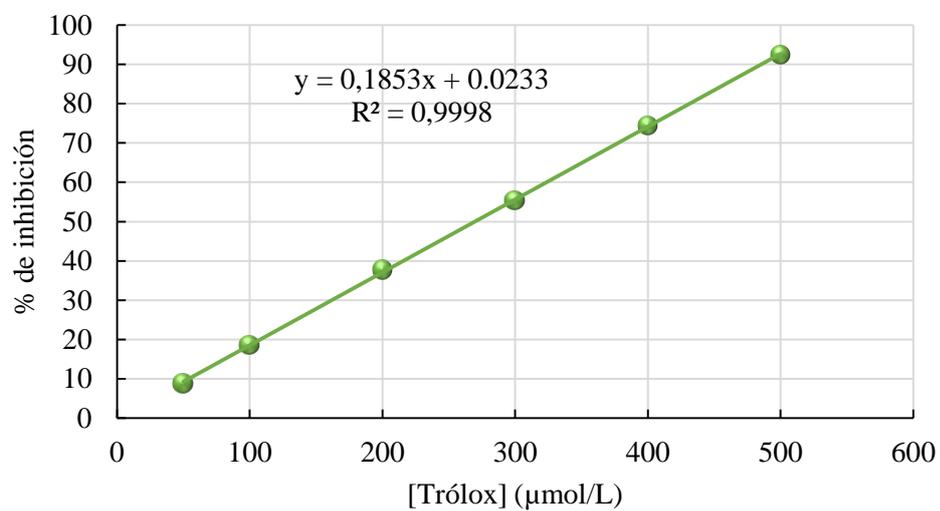


Figura XIII. Curva de calibración para determinar la actividad antioxidante mediante inhibición de DPPH.