



FACULTAD DE INGENIERIA

Carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias

**EVALUACIÓN DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES, Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* A PARTIR DE EXTRACTOS DE
HOJAS DE VERDOLAGA (*PORTULACA OLERACEA L.*) DE LA REGIÓN
PIURA, PERÚ.**

**Trabajo de Investigación para optar el Grado Académico de Bachiller en Ingeniería en
Industrias Alimentarias**

ROSMERY ELIZABETH MENDOZA ALEGRE

DAVID JUAN POMA YAÑEZ

JAIRO JOEL PURIZACA LACHIRA

JHAN CARLOS SULLCARAY BALDOCEDA

Asesor: Best Cuba, Iván Karlos

Lima – Perú

2020

Índice

Introducción	3
1. Justificación.....	4
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. Marco teórico	5
3.1. Radicales Libres	5
3.2. Antioxidantes	6
3.3. Verdolaga (<i>Portulaca oleracea</i> L.).....	10
3.4. Compuestos bioactivos en verdolaga (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	13
3.5. Métodos de extracción	14
3.6. Actividad antioxidante.....	17
3.7. Ensayo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	18
4. Metodología.....	19
4.1. Recolección de materia prima	19
4.2. Secado de la muestra.....	19
4.3. Obtención de extractos.....	20
a) Técnica A (extracción por agitación magnética)	20
b) Técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética)	20
4.4. Determinación de contenido de polifenoles totales.....	21
4.5. Determinación de contenido de flavonoides totales	21
4.6. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	21
4.7. Análisis de datos	22
5.1. Contenido de polifenoles totales.....	22
5.2. Contenido de flavonoides totales.....	23
5.3. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	24
5. Discusión.....	28
6. Conclusiones.....	36
Referencias.....	37
Anexos	44

Introducción

En el contexto actual, la alimentación no solamente satisface necesidades nutricionales, sino también cumple una función nutracéutica y/o funcional. Debido a ello, las investigaciones modernas sobre productos naturales tratan de buscar propiedades de dichos productos que produzcan mejoras en la salud del organismo.

El estrés oxidativo causado por la alteración del equilibrio entre radicales libres y sistemas antioxidantes en el organismo está relacionado a diversas enfermedades tales como las enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas, enfermedades crónicas y cáncer (Delgado & Martínez, 2009). He allí la necesidad de encontrar alimentos que provean considerables cantidades de antioxidantes (Oliveira, 2014).

Los antioxidantes son un gran grupo de compuestos que tienen efectos provechosos para la salud humana (Rojas-Barquera & Narváez-Cuenca, 2009), tal como prevenir enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (Zamora, 2007). Algunas plantas presentan compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentran compuestos con actividad antioxidante (Wang, Cao & Prior, 1996; Sudha, Sangeetha, Indhu & Vadivukkarasi, 2011), tales como los compuestos polifenólicos y terpénicos (metabolitos secundarios), ambos grupos son de amplia distribución en los vegetales (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

En el presente estudio, se seleccionó como material vegetal a la planta comúnmente conocida como verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) en el Perú, la cual es poco valorada y crece de manera silvestre, para realizar una evaluación de su actividad antioxidante *in vitro* tal como es reportado en otros países (Ocampo & Columbus, 2012; Erkan, 2012). En este estudio, se evaluará el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante *in*

vitro mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) expresado por la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀), en las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

1. Justificación

Debido a que en la sociedad actual se presenta de manera más frecuente enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades crónicas, enfermedades no transmisibles y varios tipos de cáncer -todos ellas - relacionados a radicales libres (Delgado & Martínez, 2009; Zorrilla, Eirez & Izquierdo, 2004), se evaluará la actividad antioxidante *in vitro* de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), una planta silvestre del Perú poco valorada que posee compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros, con actividad antioxidante (Sicari, Loizzo, Tundis, Mincione y Pellicano, 2018). El presente estudio permitirá difundir las propiedades de esta planta para uso potencial en la industria alimentaria y/o farmacéutica o ser consumida de forma directa como una fuente vegetal nutritiva y capaz de ayudar a prevenir o reducir la aparición de las enfermedades mencionadas gracias a sus compuestos antioxidantes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar el contenido de compuestos bioactivos (polifenoles y flavonoides totales) y la actividad antioxidante *in vitro* a partir de extractos metanólicos de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el mejor método de extracción (agitación magnética sucesiva vs. ultrasonido seguido de agitación magnética) de compuestos bioactivos a partir de extractos metanólicos de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

- Evaluar la correlación entre el contenido de compuestos bioactivos (polifenoles y flavonoides totales) y la actividad antioxidante *in vitro* en los extractos metanólicos de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

3. Marco teórico

3.1. Radicales Libres

Químicamente, los radicales libres (RL) son átomos o compuestos químicos que presentan en su último orbital uno o más electrones desapareados. Esta condición los hace inestables y muy reactivos; es por ello, que tienden a captar un electrón de otros compuestos químicos que están estables, con el propósito de llenar su orbital más extremo. (Finkel & Holbrook, 2000)

Al momento de que un radical libre capta el electrón que necesita para llegar a ser estable; la otra molécula, de la que fue sustraído el electrón se convierte inmediatamente en una especie reactiva. Debido a ello, es que a los radicales libres se les considera poderosos agentes oxidantes. (Finkel & Holbrook, 2000)

Desde el enfoque molecular, los radicales libres vienen a ser moléculas ubicuitarias y difusibles; es decir que se encuentran en cada célula del organismo y se extienden en él con rapidez. Ello se produce, a través de los distintos mecanismos del metabolismo celular entre los cuales se encuentran la cadena transportadora de electrones y las reacciones de oxidación. (Venereo, 2002)

Los RL se clasifican según el grupo funcional que se encuentra presente en la molécula; estos pueden ser provenientes del bromo, fósforo, cloro, nitrógeno, oxígeno, entre otros. Sin embargo, a nivel fisiológico, los radicales libres más importantes son aquellos que derivan del oxígeno y nitrógeno. (Corrales & Muñoz, 2012)

Además de los radicales libres, existen otras especies muy reactivas, a las cuales no se las considera como un RL, sino como pro-radicales; debido a que, su estructura es base para la formación de radicales libres. Dentro de ellos, se encuentran el oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos. (Venereo, 2002)

Tanto los radicales libres como los pro-radicales pertenecen a las especies reactivas, que se dividen en 2 grupos: las especies reactivas al oxígeno (ERO) y las especies reactivas al nitrógeno (ERN). Ambas tienen importancia a nivel celular, ya que están asociadas a la generación de diversas patologías humanas, como la de modificar macromoléculas celulares (proteínas, lípidos y ADN). (Venereo, 2002)

A continuación, se muestra su clasificación, según el átomo proveniente.

Tabla 1. *Especies Reactivas derivadas del Oxígeno y Nitrógeno.*

	Especies reactivas derivadas de Oxígeno (ERO)	Especies reactivas derivadas de Nitrógeno (ERN)
Radical libre	-Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	
	-Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	-Óxido nítrico (NO^{\cdot})
	-Radical peroxilo (RO_2^{\cdot})	-Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})
	-Radical alcoxilo (RO^{\cdot})	
	-Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	

Nota: Adaptado de “Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito” por Gutiérrez, J. & Morales, J.A., 2004, Med Int Mex, 20, p.288.

3.2. Antioxidantes

Son compuestos que se caracterizan por poseer grupos hidroxilos (OH), los cuales están unidos entre sí, mediante anillos aromáticos. Estas moléculas actúan como sistema de defensas,

retardando o inhibiendo la oxidación de otras sustancias biológicas, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, propensas al ataque de las ERO y las ERN. (Vilaplana, 2007)

Bajos niveles de antioxidantes o aumento en los radicales libres causan estrés oxidativo, un desequilibrio que puede dañar o eliminar las células. El estrés oxidativo está asociado al desarrollo de diversas enfermedades humanas que pueden provocar severas consecuencias para la salud, como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas (como Alzheimer), entre otros. (Venereo, 2002; Halliwell & Whiteman, 2004; Rees, Kennett, Whitelock, & Davies, 2008)

Su clasificación, desde el punto de vista más amplio, se basa en el origen y presencia en el organismo. Siendo estos, los antioxidantes endógenos y exógenos. En el primer grupo se encuentran los bio-sintetizados y en el segundo los que provienen de la dieta. (Mayor, 2010)

Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes que se sintetizan en el organismo se dividen en 2 grupos:

a) Antioxidantes enzimáticos

En él se encuentran: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasa y sulfoxi-metionina-reductasa. (Delgado, Betanzos & Sumaya, 2010)

b) Antioxidantes no enzimáticos

En él se encuentran: glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Coenzima Q) y melatonina. Estos compuestos, también pueden ser obtenidos por la ingesta de alimentos de la dieta; sin embargo, el aporte que otorga es poco significativa, ya que sufren una biodegradación a través del tracto gastrointestinal. (Delgado et al., 2010)

Antioxidantes exógenos

Por otro lado, los antioxidantes exógenos se subdividen en 4 grupos, estos son las vitaminas (ácido ascórbico o vitamina C, alfa-tocoferol o vitamina E), carotenoides (dos tipos: los carotenos como por ejemplo alfa-caroteno, beta-caroteno o pro-vitamina A, licopeno; y las xantofilas como por ejemplo la luteína), polifenoles (flavonoides y no flavonoides) y compuestos organoazufrados. (Delgado et al., 2010)

Cabe resaltar, que los antioxidantes exógenos son de importancia, ya que, al ser obtenido solo mediante la dieta, dependerá del tipo de alimentación de una persona para poder adquirirlas. Su importancia, también, radica en la baja biodisponibilidad de estos. Puesto que el organismo no cuenta con enzimas que los degraden, por muy alta que sea la cantidad de antioxidantes que ingerimos en los alimentos, no se podrán absorber, ni mucho menos ser utilizadas para su principal fin, el de retardar o inhibir la formación de radicales libres. (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez & Radilla, 2015)

Actualmente, los polifenoles son los antioxidantes más estudiados. Ellos se caracterizan por tener en su estructura molecular uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos se sintetizan en las plantas como metabolito secundario, para ser partícipe de las funciones fisiológicas de las plantas y para actuar como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés y otros estímulos. La clasificación de los polifenoles se establece en función de los elementos estructurales que hay en los anillos fenólicos y en base a la cantidad de estos anillos. Los grupos de mayor importancia son los ácidos fenólicos, estilbenos, alcoholes fenólicos, lignanos y los flavonoides (ver Fig.1). (Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012)

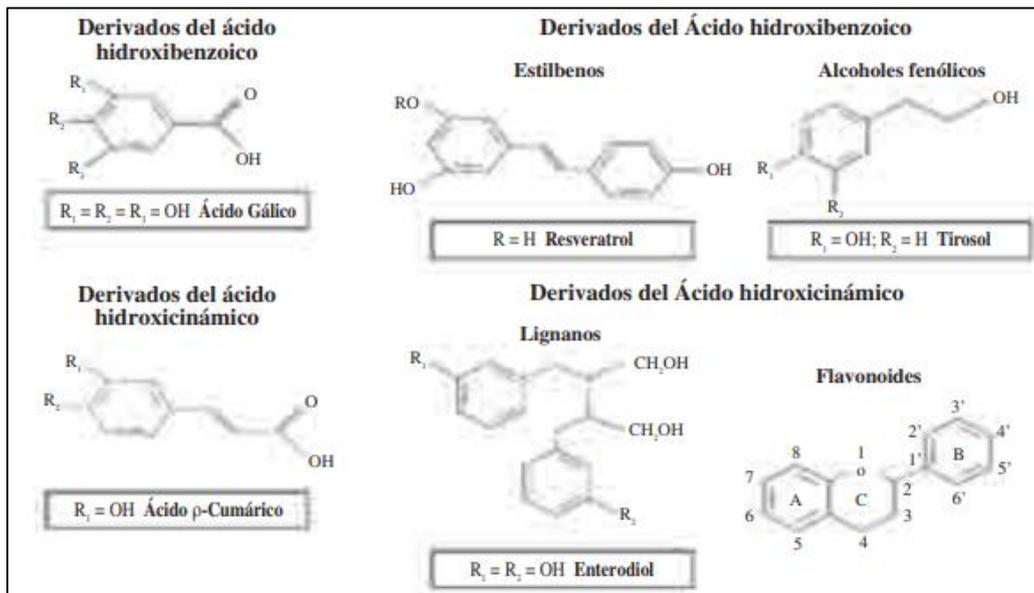


Figura 1. Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles. Adaptado de “Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular” por Quiñones et al, 2012, p. 77

Dentro del grupo de los polifenoles, los que tienen mayor presencia son los flavonoides. Ellos están compuestos por dos anillos fenilo (A y B) y un pirano (anillo C) (ver Fig. 1). Los flavonoides se pueden encontrar de 2 formas, como glicósidos o agliconas flavonoides. Al primero de ellos, se los puede encontrar como O-glicósidos, donde los carbohidratos están unidos por un átomo de oxígeno, o se los puede encontrar como C-glicósidos, donde los carbohidratos están unidos por medio de un enlace C-C (carbono-carbono). (Quiñones et al., 2012)

La clasificación de los flavonoides se realiza en función al estado de oxidación del anillo C (pirano) y de la posición del anillo B. De esa manera, se tienen a 6 grandes familias llamadas flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Ver Fig. 2). (Quiñones et al., 2012)

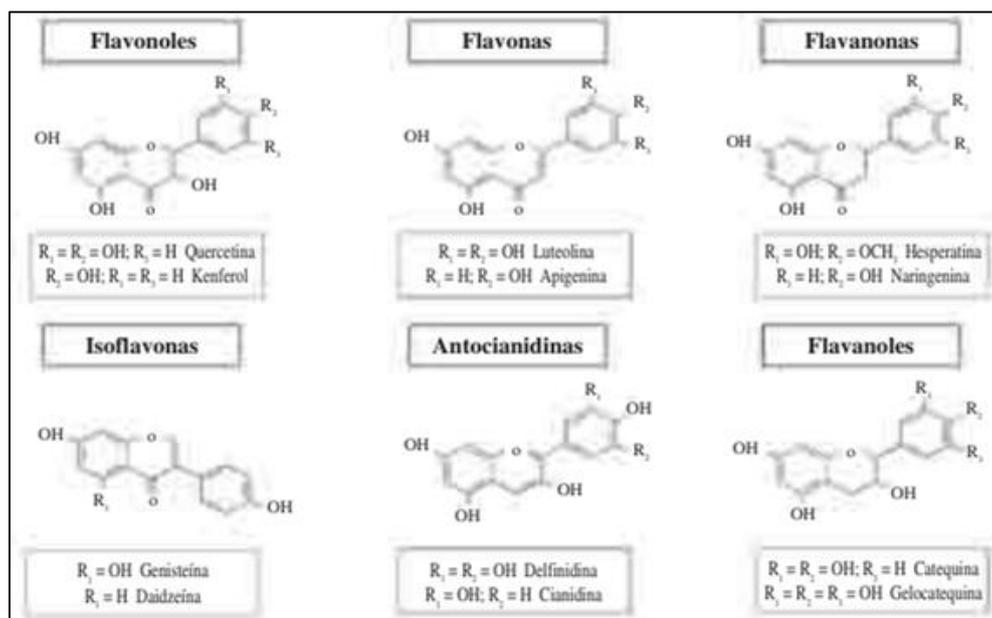


Figura 2. Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Adaptado de “Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular” por Quiñones et al., 2012, p. 77.

3.3. Verdolaga (*Portulaca oleracea* L.)

Esta planta, de origen incierto, es una especie cuya taxonomía es compleja, debido a que presenta variaciones en sus características foliares y de porte, además cambia según las condiciones ambientales y edáficas. Generalmente, la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), posee tallos de color rojizo, hojas verdes subopuestas, flores amarillas y frutos capsulares con gran cantidad de semillas minúsculas de color oscuro (Ver Anexo 1). En la actualidad, se reconoce hasta nueve subespecies, diferenciadas en el tamaño de la semilla y morfología de la testa. (Hernández, 2011)

Hoy en día, México, país que está dando énfasis al estudio de esta planta, ha localizado dos subespecies: *Portulaca oleracea* subsp. *granulato-stellulata* y *Portulaca oleracea* subsp. *Nicaraguensis*. Además, las investigaciones, que muestran los beneficios nutricionales y

medicinales del consumo de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), promueven a su vez el incremento de su consumo. (Montoya, Volke, Trinidad, Villanueva & Sánchez, 2017)

A continuación, la Tabla 2 muestra el valor nutricional de la *Portulaca oleracea* L. Análisis del contenido en 100 gr de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) cruda (planta).

Tabla 2. Valor nutricional de la planta verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) cruda en 100 gr.

Nutrientes	Unidad	Cantidad
Agua	g	92.86
Energía	kcal	20
Proteínas	g	2.03
Grasas	g	0.36
Carbohidratos	g	3.39
Cenizas	g	1.36
Potasio	mg	494
Magnesio	mg	68
Calcio	mg	65
Sodio	mg	45
Fósforo	mg	44
Hierro	mg	1.99
Zinc	mg	0.17
Vitamina C	mg	21
Vitamina B1	mg	0.047
Vitamina B2	mg	0.112
Vitamina B3	mg	0.48

Vitamina B6	mg	0.073
--------------------	----	-------

Nota: Adaptado de USDA, FoodData Central, 2019.

Características Funcionales

a) Fuente de ácidos grasos omega 3

Investigaciones muestran que la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es fuente de ácido linolénico (omega 3) siendo muy importante por su gran aporte en beneficios de la salud, pero también importante para las dietas vegetarianas. (Yan, Aryamanesh, & Wang, 2009).

b) Poder antioxidante

La verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es fuente de antioxidantes, como ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido p-cumarico y ácido ferúlico), flavonoides (apigenina, kaempferol, luteolina, quercetina, isorhamnetina, kaempferol-3-O-glucósido y rutina) (Sicari et al., 2018), ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, así como de glutatión. Estos compuestos ayudan a prevenir numerosas enfermedades como las cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras. (Dkhil, Abdel-Moneim, Al-Quiraishi & Awadallah, 2011).

c) Poder anticancerígeno

En la medicina actual, se ha empleado extractos de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) para evaluar sus efectos contra el cáncer, obteniéndose resultados favorables. El efecto frente a cáncer puede estar asociado a los compuestos inmunoestimulantes que presenta en su composición la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), ya que contiene catecolaminas, noradrenalina y dopamina. La noradrenalina es un modulador del sistema inmunitario que posee propiedades anticancerígenas (Chen, Shi, & Liu, 2003).

La verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) posee polisacáridos que reducen el crecimiento de las células cancerosas del carcinoma cervical, esta sustancia podría ser utilizada como un potencial agente terapéutico contra el cáncer (Zhao et al., 2013).

d) Poder antidiabético

Según un estudio realizado por El-Sayed, 2011 menciona que las semillas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) pueden ser efectivas contra la diabetes tipo 2, esto debido a los ácidos grasos esenciales, polisacáridos y flavonoides que posee, provocando efectos hipoglucémicos, hipolipídicos y reduciendo la resistencia a la insulina.

e) Otras propiedades medicinales

Estudios muestran propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Chan et al., 2000).

3.4. Compuestos bioactivos en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.)

La *Portulaca oleracea* L. está siendo consumida en diversos países, con fines medicinales. Ello se debe, a que se ha demostrado que la planta presenta compuestos bioactivos como: ácidos grasos esenciales, ácidos orgánicos y antioxidantes. Entre los ácidos grasos presentes en la planta están el ácido linolénico (omega 3) y el ácido oleico (omega 9); estos no solo cumplen con una actividad fisiológica, sino que también tienen acción preventiva y terapéutica de enfermedades cardiovasculares (Simopoulos, 2004). Por otro lado, dentro los antioxidantes presentes en la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) destacan los polifenoles como los flavonoides, carotenoides (alfa-caroteno, beta-caroteno), vitamina C, α -tocoferol o vitamina E, entre otros compuestos, los cuales inhiben y/o retardan la oxidación de moléculas biológicas y, por ende, la aparición de enfermedades crónicas, a raíz del estrés oxidativo. (Abdel, Monem & Al-Quraishi, 2013).

En un estudio realizado por Sicari et al., (2018) identificaron los siguientes compuestos fenólicos en extractos metanólicos y etanólicos de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.):

ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido p-cumarico y ácido ferúlico) y flavonoides (apigenina, kaempferol, luteolina, quercetina, isorhamnetina, kaempferol-3-O-glucósido y rutina), siendo la quercetina y el ácido p-cumarico los compuestos más abundantes. Los extractos se identificaron usando cromatografía líquida de alta performance con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

3.5. Métodos de extracción

Existen diferentes técnicas de extracción de compuestos presentes en los alimentos; los cuales se dividen en 2 grupos, los tradicionales y los no convencionales. En el primer grupo se encuentran la extracción con solventes (agitación, maceración, digestión, infusión, percolación, soxhlet), destilación, entre otros; y en el segundo grupo, la extracción asistida por ultrasonido, extracción por fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas, extracción eléctrica entre otros. (Vinatoru, 2001)

a. Extracción con solventes

La extracción por solventes es una técnica tradicional, que tiene como finalidad separar diferentes compuestos solubles que contiene una matriz sólida (pared celular del vegetal) mediante el uso de una matriz líquida (solvente). Es una de las técnicas más usadas para la separación de compuestos bioactivos como los polifenoles, ya que gracias a la propiedad de solubilidad de los solventes con los compuestos de interés pueden llegar a ser muy buenos agentes de extracción. (Yeasmen & Islam, 2015)

Entre las principales ventajas de la extracción con solventes (agitación, maceración, digestión, infusión, percolación, soxhlet) se pueden mencionar los siguientes: se cuenta con una gran variedad de solventes (metanol, etanol, hexano, acetona, cloroformo, agua, etc o la mezcla de algunos), y para el caso de la técnica por agitación magnética no se requiere el uso

de equipos sofisticados, facilidad de instalación y adquisición, bajo costo de instalación. (Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015)

Entre las principales desventajas de la extracción con solventes (agitación magnética, maceración, digestión, infusión, percolación, soxhlet) se pueden mencionar los siguientes: exposición prolongada a ciertos solventes orgánicos como el metanol y acetona que pueden causar algún daño al ser humano y el medio ambiente, largos tiempos de extracción reflejan altos los costos de extracción, se requiere una cantidad regular de solvente, ciertos compuestos bioactivos pueden degradarse por la exposición prolongada a altas temperaturas (digestión, soxhlet). (Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015)

b. Extracción asistida por ultrasonido

Un estudio realizado por Gao & Liu (2005), demostró que la extracción asistida por ultrasonido (EAU) genera mayores ventajas frente a los otros métodos, siendo más eficiente, económica, segura, sencilla y amigable con el ambiente; por lo que sería viable a nivel industrial. Esta técnica que permite extraer, de manera eficiente, componentes de los alimentos reduce el consumo del disolvente usado durante la extracción, además del tiempo empleado, a comparación de otros métodos. (Rostagno, Palma & Barroso, 2003)

Según la aplicación que se realice, se divide en ultrasonido de señal y de potencia. El primero de ellos, que usa señales de baja intensidad, suele usarse para el control de procesos o productos, donde el material a evaluar modifica la señal, haciendo que el equipo utilizado proporcione información sobre el producto. Por otro lado, el ultrasonido de potencia, usa señales de alta intensidad que permite modificar un proceso o producto. (Ulloa, Ulloa, Ramírez & Ulloa, 2013)

La extracción asistida por ultrasonido de potencia promete buenas perspectivas de tecnología para la industria de alimentos. Su principio radica en la penetración del disolvente

sobre las paredes celulares, a partir del uso de una frecuencia más baja y de una mayor potencia, lo que conlleva a cambios físicos y químicos en el medio, a través de la generación y posterior colapso de burbujas de cavitación. (Mulet, Cárcel, Sanjuán & Bon, 2003; Dolatowski, Stadnik & Stasiak, 2007)

Para poder optimizar la extracción asistida por ultrasonido y, por ende, esta sea eficiente es preciso analizar las variables que se controlan en esta técnica, las cuales son el solvente, relación del disolvente-soluto, temperatura, tiempo de extracción, potencia y la duración del ciclo. (Palma & Barroso, 2002)

c. Tabla comparativa de las técnicas de extracción

En la Tabla 3 se muestran las principales características, ventajas y desventajas entre las técnicas de extracción por agitación magnética y extracción por ultrasonido.

Tabla 3. Características principales, ventajas y desventajas entre las técnicas de extracción por agitación magnética y extracción por ultrasonido.

Característica	Extracción por agitación magnética	Extracción por ultrasonido
Técnica de extracción	Tradicional	No convencional
Tiempo de extracción	Prolongados	Cortos
Ventajas	No se requiere el uso de equipos sofisticados	Moderado consumo de energía
	Facilidad de instalación y adquisición	Seguro, fácil manejo, más eficiente y amigable con el ambiente
	Bajo costo de instalación	Cortos tiempos de extracción reflejan menores costos de extracción
Desventajas	Alto consumo de energía Exposición prolongada a ciertos solventes orgánicos	Al ser una técnica de extracción no convencional

como el metanol y acetona que pueden causar algún daño al ser humano y el medio ambiente	el costo de adquisición del equipo es mayor
Largos tiempos de extracción reflejan altos los costos de extracción.	

Nota: adaptado de Vinatoru, 2001; Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015; Gao & Liu 2005; Rostagno et al., 2003.

3.6. Actividad antioxidante

Actividad antioxidante es un término usado para un ensayo individual que refleja la capacidad de interactuar de ciertas sustancias (antioxidantes) con otras (oxidantes) en una reacción química bajo condiciones específicas aplicadas en el ensayo y no es apropiado llamarlo un indicador de la “actividad antioxidante total”. Sin embargo, cuando usamos el término "capacidad" hace referencia a los resultados obtenidos por diferentes ensayos, como “Capacidad secuestradora de radicales peróxido”, “Capacidad reductora del ión férrico”, entre otros (Huang, Ou & Prior, 2005).

La mayor parte de ensayos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante según su modo de reacción se dividen en dos tipos: ensayos basados en transferencia de electrones (ET) y ensayos basados en transferencia de átomos de hidrogeno (HAT).

Tabla 4. *Tipos de ensayos para determinar la capacidad antioxidante in vitro en base a su modo de reacción (ET) O (HAT).*

Clasificación	Ensayo
	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)
	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Ensayos basados en transferencia de electrones (ET)	Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)
	N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)
	Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)
Ensayos basados en transferencia de átomos de hidrogeno (HAT)	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)
	Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)
	Inhibición de la oxidación del ácido linoleico
	Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)

Nota: Adaptado de “The chemistry behind antioxidant capacity assays” por Huang et al. 2005, Journal of Agricultural and Food Chemistry.

3.7. Ensayo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa. Es uno de los pocos radicales que es estable y sobre todo comercialmente disponible capaz de aceptar un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula estable. Este ensayo usado en la espectrofotometría ultravioleta-visible donde el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se absorbe en metanol entre 515 y 519 nm, es uno de los métodos muy utilizados para determinar la actividad antioxidante de compuestos o extractos de un alimento, suplemento o producto nutracéutico. Cuando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) reacciona con el compuesto antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece hasta un color amarillo. La intensidad del desvanecimiento del color violeta dependerá de la concentración del analito. (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995; Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013).

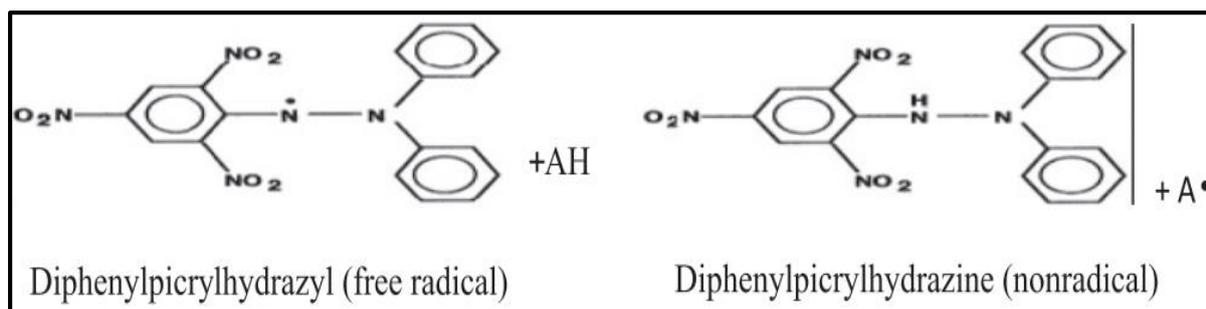


Figura 3. Reacción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con el antioxidante. Adaptado de “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity” por Alam et al., 2013, Saudi Pharmaceutical Journal.

El ensayo del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) reporta sus resultados de diferentes formas, el más común es el valor IC₅₀ (concentración inhibitoria media máxima). Este valor representa la cantidad de antioxidantes que se necesitan para disminuir la concentración inicial del radical DPPH al 50% y es calculado mediante la gráfica de la concentración del extracto contra el porcentaje de inhibición. (Brand-Williams et al., 1995; Deng, Cheng & Yang, 2011)

4. Metodología

4.1. Recolección de materia prima

El material vegetal de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) se recolectó de suelos agrícolas del distrito La Unión, Región Piura, después de la etapa de floración (ver Anexo 2).

4.2. Secado de la muestra

Se deshojó al material vegetal y seleccionaron las hojas de color verde sin manchas marrones, no marchitadas, sin signos de ataques por insectos. Las hojas seleccionadas se lavaron, se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio y secaron con papel absorbente, luego se puso a secar en una estufa a 55 °C hasta llegar a un porcentaje de humedad inferior al 12% (Castro-Vazquez et al, 2016). Las hojas secas fueron molidas con mortero de porcelana y tamizadas (106 μm) para obtener un tamaño de partículas fino y homogéneo. Finalmente, el

polvo de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) se guardó en tubos Falcon de 50 mL cubierto con papel aluminio y almacenado a temperatura de refrigeración (ver Anexo 3).

4.3. Obtención de extractos

La obtención de los extractos se realizó mediante el procedimiento descrito por Ordoñez, Reátegui y Villanueva (2018) con ciertas modificaciones (ver Anexo 4).

a) Técnica A (extracción por agitación magnética)

El extracto por la técnica A se obtuvo por agitación magnética sucesiva en dos etapas de 4 horas cada etapa. 1.25 g de muestra se mezcló con 25 mL de solución de metanol:agua 80:20 (v/v) en un beaker de 100 mL cubierto con papel aluminio y luego se puso sobre el agitador magnético durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo, la mezcla fue filtrada por medio de un papel filtro de paso lento, se colectó el sobrenadante y el residuo fue usado nuevamente para una segunda extracción con 25 ml de metanol:agua 80:20 (v/v) siguiendo las condiciones anteriormente descritas, mezclándose ambos sobrenadantes. La mezcla de sobrenadantes se centrifugó a 4200 rpm por 20 minutos a 4°C, se filtró por medio de papel filtro de paso lento, se guardó en un tubo falcón de 50 ml cubierto con papel aluminio previamente rotulado y finalmente, se almacenó a -20°C hasta la realización de los análisis.

b) Técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética)

El extracto de la técnica S se obtuvo en 2 etapas (ultrasonido + agitación magnética). 1.25 g de muestra se mezcló con 50 mL de solución de metanol:agua 80:20 (v/v) en un beaker de 100 mL, se colocó en el equipo ultrasonido (ultrasonido de potencia 230-240 V, Frecuencia 40 KHz - BRANSON 2800) durante 30 minutos a temperatura ambiente y posterior a ello, en un agitador magnético durante 8 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo la mezcla fue filtrada por medio de un papel filtro de paso lento y se colectó el sobrenadante. El sobrenadante recolectado se centrifugó a 4200 rpm por 20 minutos a 4°C, se filtró por medio

de papel filtro de paso lento, se guardó en un tubo falcón de 50 mL cubierto con papel aluminio previamente rotulado y finalmente, se almacenó a -20°C hasta la realización de los análisis.

4.4. Determinación de contenido de polifenoles totales

Los polifenoles totales (PT) se midieron a través del método Folin-Ciocalteu (Resende, Franca & Oliveira, 2018) con ciertas modificaciones. Se mezcló 1 mL de extracto con 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 10% (v/v) y 4 mL de solución de carbonato de sodio 7.5% (p/v). Luego, se agitó y se dejó en incubación durante 2 horas, en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm. Se elaboró una curva calibración utilizando ácido gálico (ver Anexo 5), a concentraciones que variaron entre 1 a 9 µg/mL. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente por g de materia seca (mg AGE/ g de materia seca).

4.5. Determinación de contenido de flavonoides totales

Los flavonoides totales (FT) se midieron de acuerdo al método de Pereira-Freire, et al. (2018) con algunas modificaciones. A 1 mL de extracto, se añadió 1 mL de cloruro de aluminio al 20% (p/v) y 100 µL de ácido acético al 50% (v/v). La mezcla obtenida se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, y se centrifugó a 4000 rpm por 4 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a 420 nm. Se elaboró una curva de calibración usando quercetina (ver Anexo 6), a concentraciones que varían entre 3.10 a 11.90 µg/mL. Los resultados fueron expresados como mg de quercetina equivalente por g de materia seca (mg QE/ g de materia seca).

4.6. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La actividad antioxidante *in vitro* se determinó usando el método descrito por Escudero, Muñoz, Ortiz, Alvarado y Yañez (2012) con ciertas modificaciones: en primer lugar, se preparó una solución stock de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) disuelto en metanol al 80%. Luego,

se mezclaron 50 μL de muestra y 950 μL de DPPH 0.1 mM (Guija, Inocente, Ponce & Zarzosa, 2015). Se prepararon tres concentraciones de muestra 6.25 mg/ml; 10 mg/mL y 15 mg/mL. Se registraron valores de absorbancias a 515 nm cada 30 segundos durante 30 minutos. Se tomaron lecturas de absorbancias por triplicado para cada concentración de muestra. La actividad antioxidante se expresó en IC_{50} , como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Para obtener el valor de IC_{50} , se graficó las concentraciones de la muestra (mg/mL) versus porcentaje de Inhibición (%Inhibición).

4.7. Análisis de datos

Todos los análisis fueron realizados por triplicado ($n=3$). Microsoft Excel 2016 fue usado para calcular la media, desviación estándar y regresiones lineales. Los datos son presentados como la media \pm desviación estándar (DS) y comparados por un test t-student ($p<0,05$) utilizando SPSS for Windows versión 26.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). La correlación estadística entre las diferentes variables se realizó utilizando el coeficiente de Pearson (r) y los resultados fueron estadísticamente significativos a un $p<0.01$.

Resultados

5.1. Contenido de polifenoles totales

Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (AG), resultando un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9981$ (ver Figura 4).

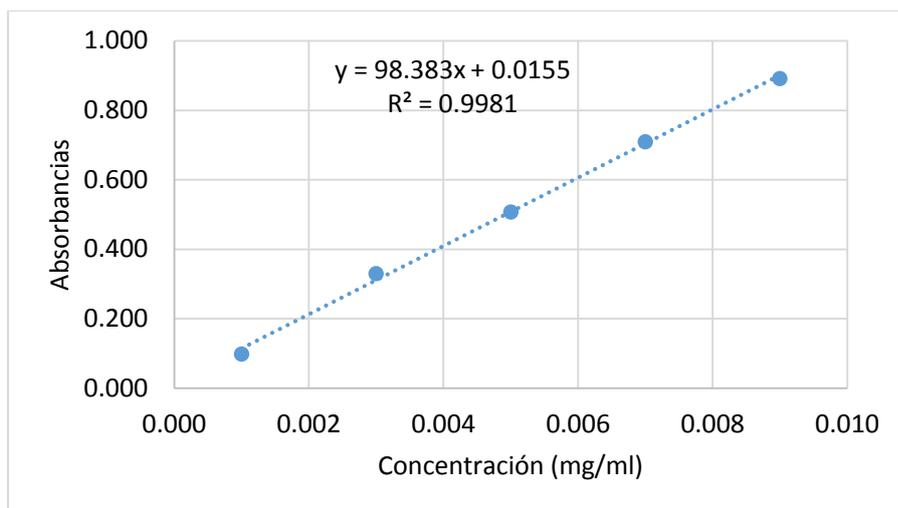


Figura 4. Curva de calibración para determinar polifenoles totales usando ácido gálico como estándar. Elaboración propia.

Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico equivalente por gramo de materia seca de la muestra (mg AGE/ g materia seca). El contenido de polifenoles totales fue de 15.99 ± 0.06 mg AGE/ g materia seca para la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y 12.94 ± 0.08 mg AGE/ g materia seca para la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).

5.2. Contenido de flavonoides totales

Se realizó una curva de calibración con quercetina, resultando un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9935$ (ver Figura 5).

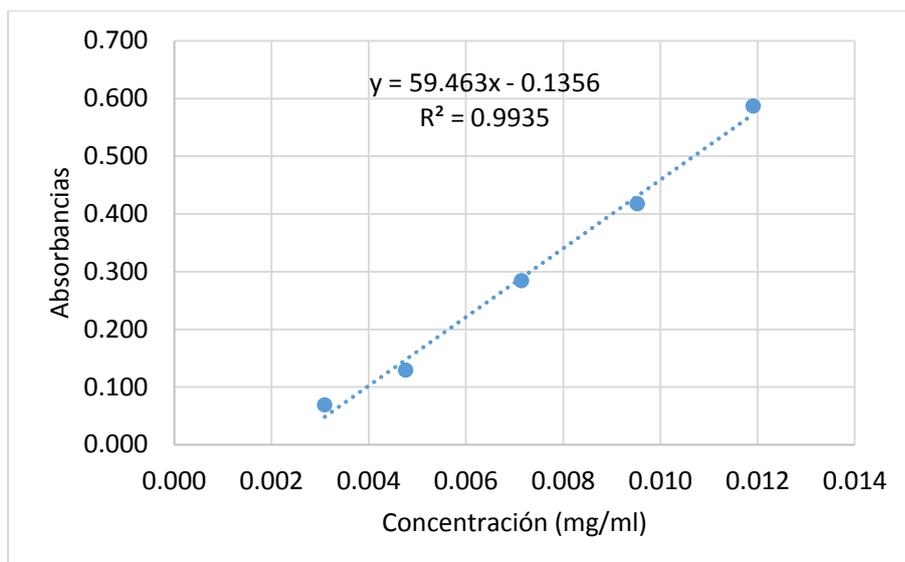


Figura 5. Curva de calibración para determinar flavonoides totales usando quercetina como estándar. Elaboración propia.

Los resultados fueron expresados en mg quercetina equivalente por gramo de materia seca de la muestra (mg QE/ g materia seca). El contenido de flavonoides totales fue de **7.18 ± 0.04** mg QE/ g materia seca para la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y **6.92 ± 0.01** mg QE/ g materia seca para la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).

5.3. Actividad antioxidante *in vitro* por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La actividad antioxidante *in vitro* determinado por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y expresado en valor IC₅₀, se obtuvo de la gráfica de concentraciones de muestra (mg/mL) versus porcentaje de inhibición (% Inhibición).

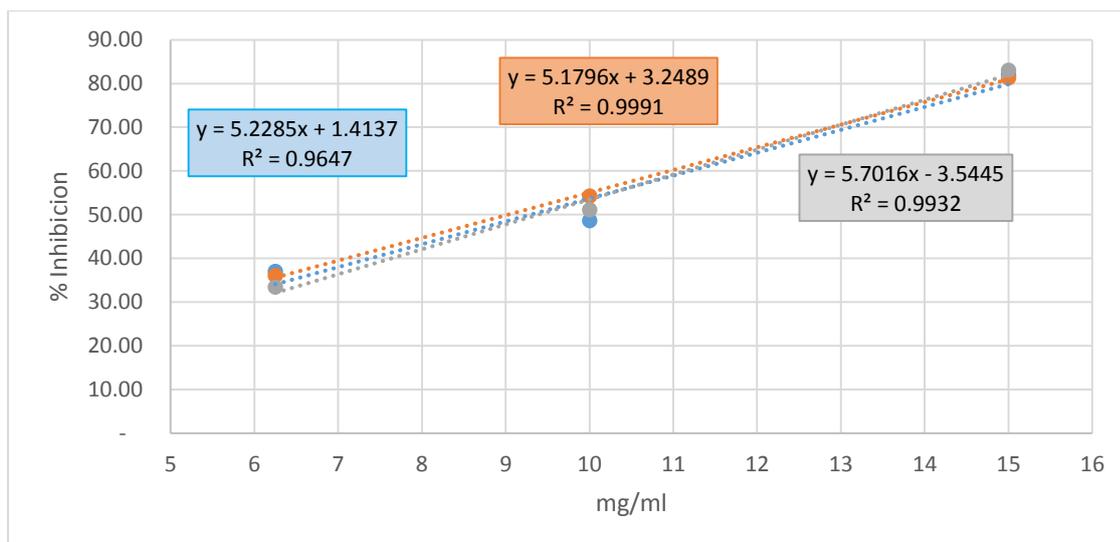


Figura 6. Representación de concentraciones de muestra (mg/mL) vs. porcentaje de inhibición (% Inhibición) para determinar el valor IC₅₀ por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva). Elaboración propia.

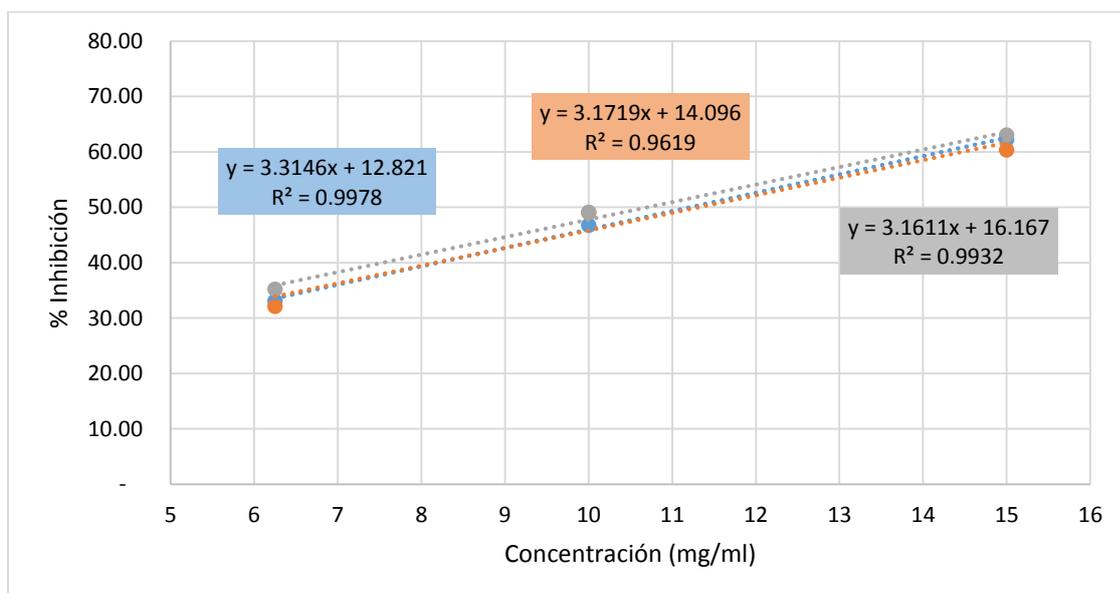


Figura 7. Representación de concentraciones de muestra (mg/mL) vs. porcentaje de inhibición (% Inhibición) para determinar el valor IC₅₀ por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética). Elaboración propia.

Los resultados fueron expresados en IC₅₀, valor que expresa la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Para la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) la actividad antioxidante fue de

9.21 ± 0.26 mg/ml y para la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética) la actividad antioxidante fue de **10.96 ± 0.36 mg/ml**.

Tabla 5. *Resumen de Resultados.*

Extracción	Polifenoles totales (mg AGE/ g m.s.)	Flavonoides totales (mg QE/ g m.s.)	DPPH (IC₅₀ mg/ml)
A*	15.99 ± 0.06 ^a	7.18 ± 0.04 ^a	9.21 ± 0.26 ^a
S**	12.94 ± 0.08 ^a	6.92 ± 0.01 ^a	10.96 ± 0.36 ^a

Nota: Los datos se expresaron como el promedio ± S.D. (n = 3). A* (extracción por agitación magnética sucesiva). S** (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética). Promedios en la misma columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes, p <0,05 (t-student). Elaboración propia.

Se aplicó la prueba de t-student (ver Tabla 6) para evaluar las diferencias en los promedios de las variables (polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante *in vitro*) entre las dos técnicas de extracción usados: técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética), con un nivel de significancia de 0,05. Los resultados del test revelaron que la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética), no presentan diferencias significativas en el contenido de polifenoles y flavonoides totales, así como en la actividad antioxidante *in vitro* mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Tabla 6. *Resultados de Prueba t-student para comparar las variables (polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante in vitro) entre las dos técnicas de extracción.*

		F	Sig.	t
Polifenoles_totales	Se asumen varianzas iguales	,500	,519*	50,312
	No se asumen varianzas iguales			50,312
Flavonoides_totales	Se asumen varianzas iguales	5,776	,074*	10,400
	No se asumen varianzas iguales			10,400
DPPH	Se asumen varianzas iguales	1,789	,252*	-8,390
	No se asumen varianzas iguales			-8,390

Nota: *Nivel de significancia al 0,05.

Además, se realizó un test de correlación de Pearson (ver Tabla 7) entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales con un nivel de significancia de 0,01. Los resultados del test muestran que existe correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales.

Tabla 7. Prueba de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales.

		Polifenoles _totales	Flavonoides _totales	DPPH*
Polifenoles_totales	Correlación de Pearson	1	,980**	-,978**
	Sig. (bilateral)		,001	,001
	N	6	6	6
Flavonoides_totales	Correlación de Pearson	,980**	1	-,937**
	Sig. (bilateral)	,001		,006
	N	6	6	6
DPPH*	Correlación de Pearson	-,978**	-,937**	1
	Sig. (bilateral)	,001	,006	
	N	6	6	6

Nota: *DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). **La correlación es significativa a un $p < 0,01$.

Para una mejor interpretación de la correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales se realizó una gráfica entre los valores IC_{50} y los valores de los compuestos fenólicos evaluados (ver Figura 8).

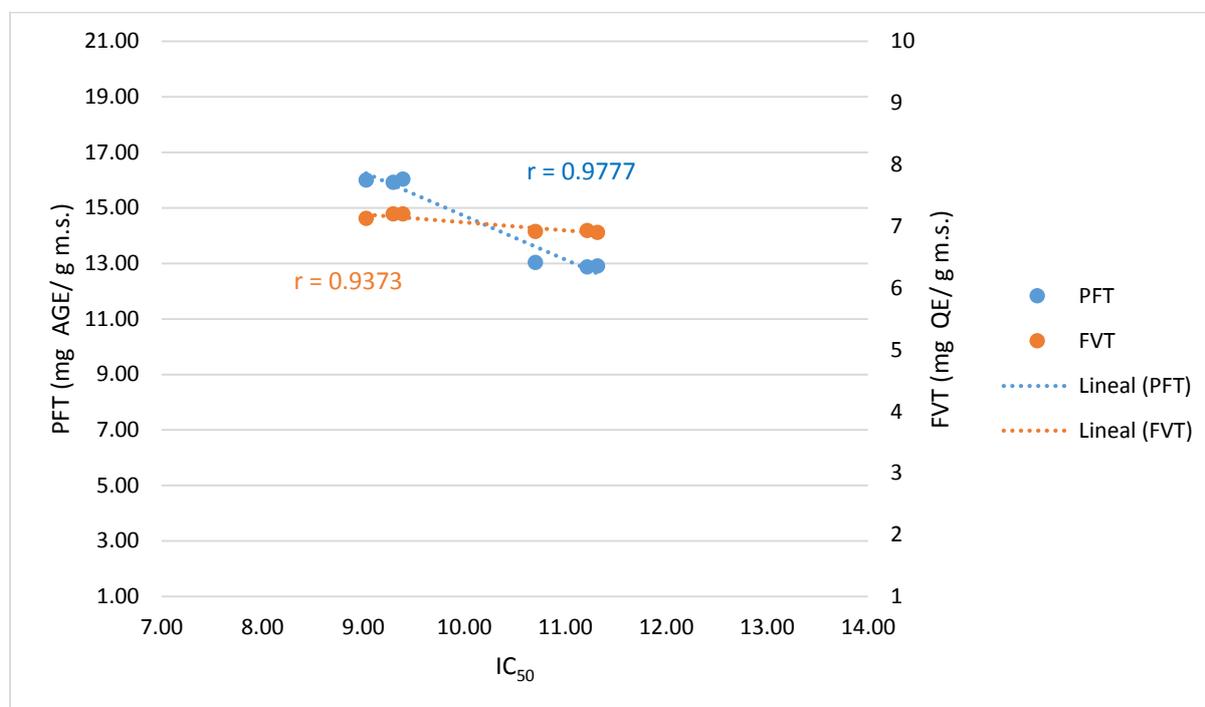


Figura 8. Representación de la correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales. PFT (Polifenoles totales expresados en mg AGE/ g m.s.). FVT (Flavonoides totales expresados en mg QE/ g m.s.). Elaboración propia.

En la Figura 8 se observa que existe correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* (expresado como valores IC_{50}) y el contenido de polifenoles totales ($r = 0.9777$) y flavonoides totales ($r = 0.9373$) en ambas técnicas de extracción realizadas: técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).

5. Discusión

En la Tabla 5 se muestran los contenidos de polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante *in vitro* obtenidos con las extracciones metanólicas de las dos técnicas

utilizadas: técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).

Técnicas de extracción

La técnica A es una técnica de extracción tradicional (agitación magnética sucesiva) mientras que la técnica S es la combinación de dos técnicas: una no convencional (ultrasonido) seguida de una tradicional (agitación magnética). Para evaluar las diferencias en los promedios de las variables (polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante *in vitro*) entre las dos técnicas de extracción utilizadas se aplicó una prueba de t-student. Los resultados (ver Tabla 6) muestran que el nivel de significancia observada en las tres variables es mayor que 0,05 ($0,519 > 0,05$ para polifenoles totales; $0,074 > 0,05$ para flavonoides totales; $0,252 > 0,05$ para la actividad antioxidante *in vitro*), lo cual indica que la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética), no presentan diferencias significativas en sus promedios, entonces es factible la aplicación de cualquiera de las dos técnicas.

Comparándolos desde el punto de vista tecnológico y práctico se recomienda usar la extracción por agitación magnética sucesiva (técnica tradicional) ya que además de ser una de las más utilizadas, extrae un contenido de compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides totales) ligeramente mayor que la técnica S (ultrasonido seguido de agitación magnética). (ver Tabla 5).

Resultados similares se evidenciaron en un estudio realizado por Martínez, Dublán y López (2012), donde se evaluó el mejor método de extracción con metanol para la obtención de compuestos fenólicos totales en dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En dicho estudio, se reportó que el mayor contenido de compuestos fenólicos totales extraídos para ambas variedades se obtuvo con agitación magnética sucesiva (técnica muy similar al presente

estudio) de tres técnicas realizadas (agitación magnética sucesiva en dos etapas de 5 horas cada etapa, agitación con baño de agua y ultrasonido), encontrándose diferencias significativas entre los promedios obtenidos en las tres técnicas. Otro estudio en hojas de *Moringa oleifera* Lam, realizado por Linares et al., (2018) también reportó que se obtienen mayores concentraciones de compuestos fenólicos mediante el método de extracción con agitación magnética de cuatro métodos realizados (agitación magnética, extracción estática, extracción por Soxhlet y extracción asistida por ultrasonido), encontrándose diferencias significativas entre los promedios conseguidos en las cuatro técnicas.

Contenido de Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales en hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) para ambas técnicas de extracción fueron reportados en mg ácido gálico equivalente (AGE)/ g materia seca. Los resultados revelaron que con la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) se obtuvo un contenido ligeramente mayor de polifenoles totales (15.99 mg ácido gálico equivalente (AGE)/ g materia seca) respecto con la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética) con 12.94 mg ácido gálico equivalente (AGE)/ g materia seca. Se compararon los contenidos de polifenoles totales con otros estudios en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.). Los valores reportados en el presente estudio son similares a los 10 mg AGE/ g materia seca reportado por Santiago, Monroy, Cariño, Hernández y Jiménez (2018). Sin embargo, comparados con los 2.44 mg AGE/ g materia seca reportado por Sicari et al. (2018) son muy superiores, pero inferiores a los 326.80 mg AGE/ g materia seca reportado por El Kashef, Soliman, Hassan y Abd-Elhak (2018).

La diferencia entre los valores obtenidos, podría deberse a dos grupos de factores: el método de extracción de los compuestos antioxidantes y las condiciones externas a las que fue sometida la planta hasta el momento del secado (tratamiento de conservación de la muestra

previo a la extracción de los analitos). Dentro del primer grupo de factores del método de extracción de los compuestos antioxidantes, se encuentran los factores principales como método de extracción (dos grandes grupos, los tradicionales como la agitación, maceración, infusión, soxhlet; y los no convencionales como el ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, etc.), tipo de solvente de extracción, tiempo de extracción, relación sólido/solvente, entre otros (Takeuchi et al., 2009), y en el segundo grupo de factores de condiciones externas a las que fue sometida la planta hasta el momento del secado, se encuentran factores como ubicación geográfica, condiciones agronómicas, condiciones ambientales, estado de madurez, tiempo de la cosecha, condiciones de almacenamiento, entre otros (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova, & Sochor, 2015; El Kashef et al., 2018).

Basándonos en los fundamentos previos, se podría decir que la diferencia de los contenidos de polifenoles totales en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) con los resultados de otros estudios se deben principalmente al primer grupo de factores método de extracción de los compuestos antioxidantes (principalmente por el método de extracción y tipo de solvente de extracción). Respecto al factor método de extracción, Santiago et al. (2018) quien reportó un contenido de polifenoles totales similar a nuestro estudio, realizó la extracción por agitación en vórtex. Sicari et al. (2018) quien reportó cantidades de polifenoles totales menores a nuestro estudio, realizó la extracción por agitación en un homogenizador (IKA Ultra-Turrax T25). El Kashef et al. (2018) quien reportó mayor cantidad de polifenoles totales a nuestros contenidos, realizó la extracción por maceración. Respecto al factor solvente de extracción, Santiago et al. (2018) usó etanol al 80%. Sicari et al. (2018) y El Kashef et al. (2018) quienes usaron metanol al 80%, similar a nuestro estudio, reportaron cantidades diferentes respecto al contenido de polifenoles totales. Sin embargo, en el estudio realizado por El Kashef et al. (2018) se determinó el contenido fenólico total en 4 extractos (Metanol 80%, etanol 80%, agua fría y agua caliente), revelando el contenido fenólico total más alto en el extracto de metanol al 80%,

por lo que se podría deducir que el solvente metanol al 80% es más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos totales en hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

Adicionalmente, podemos decir que el contenido de polifenoles totales en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es afectada también por el segundo grupo de factores de condiciones externas a las que fue sometida la planta hasta el momento del secado, entre los factores más influyentes tenemos la ubicación geográfica, condiciones agronómicas, condiciones ambientales y estado de madurez (Skrovankova et al., 2015; El Kashef et al., 2018). Una particular diferencia en nuestro estudio es el factor ubicación geográfica. Debido a que, en nuestro país, aún no existen estudios publicados sobre la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana, se comparó con material vegetal de otros países. Santiago et al. (2018), Sicari et al. (2018) y El Kashef et al. (2018) usaron verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) de México, Italia y Egipto, respectivamente. Otro factor influyente es el de condiciones agronómicas, Santiago et al. (2018), Sicari et al. (2018) y el Kashef et al. (2018) usaron verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) cultivada, mientras que en nuestro país la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) crece de manera silvestre, por lo tanto, las condiciones agronómicas de nuestra verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana son muy diferentes. Otros factores no menos importantes son la condición ambiental (propio de cada país) y estado de madurez en el que se recolectó el material vegetal, pues en el presente estudio estos factores fueron diferentes con los estudios realizados por Santiago et al. (2018), Sicari et al. (2018) y el Kashef et al. (2018).

Comparado nuestra muestra de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana con otras materias primas. Una investigación realizada por Ordoñez et al. (2018) cuyo objetivo fue cuantificar los contenidos de polifenoles totales en hojas y cáscaras de 12 variedades de cítricos obtenidas en la Región Huánuco - Perú, reportó el mayor contenido de polifenoles totales en hojas, para la mandarina Cleopatra con 0.0292 mg AGE/ g materia seca; y en cáscaras, para la

mandarina común con 0.0322 mg AGE/ g materia seca. Se deduce, que el contenido de polifenoles totales (15.99 mg de AGE/ g materia seca) en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es 548 veces mayor que el contenido en hojas de mandarina Cleopatra y 497 veces mayor a la cáscara de mandarina común. En consecuencia, las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) poseen un alto contenido de polifenoles totales comparado con las hojas y cáscaras de 12 variedades de cítricos.

Contenido de Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales en hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) para ambas técnicas de extracción fueron reportados en mg de quercetina equivalente (QE)/ g materia seca. Los resultados revelaron que el contenido de flavonoides totales de la técnica A (7.18 mg de QE/ g materia seca) es muy similar con la técnica S (6.92 mg de QE/ g materia seca).

Se compararon los contenidos de flavonoides totales con otros estudios en verdolaga (*Portulaca oleracea* L.). Los valores reportados en el presente estudio son cercanos a los 8 mg QE/ g peso seco reportado por Santiago et al. (2018), pero muy diferentes a los 44.33 mg QE/ g de m.s. reportados por El Kashef et al. (2018).

Asimismo, se comparó el contenido de flavonoides totales de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana (7.18 mg de QE/g materia seca) con el contenido de flavonoides de una fruta como el noni. Ruíz, Venegas, Chávez y Eustaquio (2010) reportaron valores de 1.91 mg QE/ g de materia seca para las hojas de la planta de noni y de 0.32 mg QE/ g de materia seca para el fruto. Se observa fácilmente que el contenido de flavonoides totales de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es 3.8 veces mayor que el contenido en las hojas de noni y 22.4 veces mayor al de su fruto, con lo cual podemos decir que la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) posee mayor contenido de flavonoides que el fruto y las hojas del noni. También, se realizó la

comparación con otras frutas, tal como la manzana (*Malus domestica*), una de las más populares y reconocidas por su contenido de antioxidantes. En un estudio realizado por Navarro et al. (2010) se reveló que de las tres variedades analizadas (Fuji, Red Delicious y Delicia), el máximo contenido de flavonoides con 1.65 mg QE/ g de materia fresca se encontró en la variedad “Fuji”. Cabe resaltar que el resultado muestra el contenido de flavonoides en materia fresca, por lo cual, su contenido en materia seca podría ser mayor al presentado. Además, es importante mencionar que en dicho estudio se concluyó que no había diferencia significativa entre las tres variedades estudiadas, por lo que este valor se podría considerar como el valor promedio de flavonoides en la manzana y que el valor hallado corresponde tanto a cáscara y pulpa. A partir de este dato, podemos decir que el contenido de flavonoides totales de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es 4.4 veces mayor que la manzana de variedad “Fuji”.

En consideración de lo expuesto anteriormente, podemos decir que la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) posee un contenido de flavonoides mayor al de hojas y fruto de noni, y a su vez al de la manzana, por lo cual el contenido de flavonoides totales de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es mayor en comparación con los frutos mencionados.

Actividad antioxidante *in vitro* mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Por otro lado, los resultados de la Tabla 5 muestran que la actividad antioxidante *in vitro* de los dos extractos metanol:agua 80:20 (v/v) se expresaron en valores de concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀). El valor IC₅₀ representa la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Cuando se necesita una concentración más alta para reducir el 50% de la solución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) significa que la muestra que se está evaluando posee una menor actividad antioxidante y cuando se requiere una menor concentración significa que la muestra evaluada posee alta actividad antioxidante. (Brand-Williams et al., 1995).

Los resultados revelaron que la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) mostró un valor ligeramente menor (9.21 mg/mL) respecto con técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética) con 10.96 mg/mL. Y como se explicó anteriormente, a menor valor IC₅₀, mayor actividad antioxidante. Se deduce, que el extracto metanólico obtenido de la técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) posee mayor actividad antioxidante respecto al extracto metanólico de la técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).

Comparando los valores IC₅₀ de la presente investigación con el estudio realizado por Sicari et al. (2018), quien también usó hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) secas y metanol al 80% como solvente de extracción, reportó un valor IC₅₀ de 53.92 mg/mL. Debido a que nuestros valores IC₅₀ son mucho menores, se deduce, que la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana posee mayor potencial antioxidante comparado con el extracto de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) de Italia.

La diferencia de mayor actividad antioxidante *in vitro* se podría decir que se debe al alto contenido de compuestos fenólicos que posee la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) peruana evaluada en nuestro estudio. Para evaluar si existe correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales se realizó un test de correlación de Pearson a un nivel de significancia de 0,01 (ver Tabla 7). Y efectivamente, los resultados muestran que hay correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de polifenoles y flavonoides totales.

Para reforzar nuestros resultados, algunos estudios revelan que el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides está relacionado con la actividad antioxidante en diversas plantas y su capacidad para eliminar los radicales libres como el radical 2,2-difenil-1-

picrilhidrazilo (DPPH), motivos por el cual los compuestos fenólicos se han convertido en análisis de mucho interés (López, Martínez & Valle, 2003; Alam et al., 2014).

Además, de los polifenoles y flavonoides, la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) también contiene otros compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico más conocido como vitamina C, alfa tocoferol o vitamina E, y compuestos carotenoides como el beta-caroteno. (Dkhil et al., 2011; Abdel et al., 2013). Gracias a estos compuestos antioxidantes, sustancias muy valiosas que poseen la capacidad de proteger al cuerpo de los daños causados por el estrés oxidativo inducido por los radicales libres (Vilaplana, 2007; Alam et al., 2014), las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) podrían ayudar a prevenir o reducir enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, entre otras asociadas con el estrés oxidativo (Venereo, 2002; Halliwell & Whiteman, 2004; Rees et al., 2008)

Por lo tanto, según nuestros resultados, las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) poseen un alto contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y alta actividad antioxidante *in vitro* (en comparación con las materias primas antes mencionadas). Debido a ello, este recurso vegetal plantea una amplia gama de posibilidades para seguir siendo analizado y lograr ser valorada no solo como un alimento nutritivo sino también como una gran fuente vegetal con propiedades antioxidantes.

6. Conclusiones

- Las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) son una importante fuente de compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides), además poseen una alta actividad antioxidante *in vitro* evaluada mediante el método DPPH.

- No se evidenció diferencia significativa entre las dos técnicas de extracción utilizadas: técnica A (extracción por agitación magnética sucesiva) y técnica S (extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética).
- La actividad antioxidante *in vitro* evaluada mediante el método DPPH del extracto metanólico de hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) se correlacionó significativamente con el contenido de polifenoles totales y flavonoides totales.
- Gracias al alto contenido de compuestos antioxidantes (polifenoles totales y flavonoides totales) que poseen las hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), esta fuente vegetal podría ayudar a prevenir o reducir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.
- El presente estudio es la base para seguir investigando los compuestos bioactivos en hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) y así ayudar a difundir su uso en nuestra dieta diaria y la utilización como posible fuente de ingredientes funcionales en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

Referencias

- Abdel, A., Monem, M. & Al-Quraishi S. (2013). The potential role of *Portulaca oleracea* as a neuroprotective agent in rotenone-induced neurotoxicity and apoptosis in the brain of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(3), 203-212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.004>
- Alam, M., Bristi, N. & Rafiqzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143 - 152. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002

- Alam, M., Juraimi A., Rafii M., Abdul-Hamid, A., Aslani, F., Hasan, M., Mohd-Zainudin, M. & Uddin, M. (2014). Evaluation of antioxidant compounds, antioxidant activities, and mineral composition of 13 collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. *BioMed Research International*, 2014:296063. doi: 10.1155/2014/296063
- Ávalos, G. A.; Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. y Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Castro-Vazquez, L., Alañón, M., Rodríguez-Robledo, V., Pérez-Coello, M., Hermosín-Gutierrez, I., Díaz-Maroto, M., Jordán, J., Galindo, M. & Arroyo-Jiménez, M. (2016). Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, 1-12. doi: 10.1155 / 2016/8915729
- Chan, K., Islam, M., Kamil, M., Radhakrishnan, R., Zakaria, M., Habibullah, M., Attas, A. (2000). The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 445-451.
- Chen, J., Shi, Y. & Liu, J. (2003). Determination of noradrenaline and dopamine in Chinese herbal extracts from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1003, 127–132. doi: 10.1016/s0021-9673(03)00786-6
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Corrales, L. & Muñoz M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *NOVA*, 10(18), 213-225.
- Delgado, L., & Martínez, G. (2009). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000100011&lng=es&tlng=es.
- Delgado, L., Betanzos, G. & Sumaya, T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 18(50), 10-15.
- Deng, J., Cheng, W., Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430–1435. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.031.

- Dkhil, M., Abdel, A., Al-Quraishy, S. & Awadallah, S. (2011). Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal Medicinal Plant Research*, 5(9), 1589-1563.
- Dolatowski, Z., Stadnik, J. & Stasiak D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria*, 6(3), 89-99.
- El Kashef, R., Soliman, A., Hassan, H. y Abd-Elhak, N. (2018). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different solvent extracts of Egyptian purslane leaves. *Current Science International*, 7, 616-623.
- El-Sayed, M. (2011). Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 643-651. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.020
- Erkan, N. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. *Food Chemistry*, 133(3), 775-781.
- Escudero, F., Muñoz, A., Ortiz, C., Alvarado, A. & Yañez, J. (2012). Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *Journal of Medicinal Food*, 15(2), 206-215. doi: 10.1089/jmf.2010.0342
- Finkel, T. & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247. doi: <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Gao, M. & Liu, C. (2005). Comparison of Techniques for the Extraction of Flavonoids from Cultured Cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 1461–1463. doi: 10.1007/s11274-005-6809-1
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J. & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15, 57-60.
- Gutiérrez, J. & Morales, J. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Medicina Interna México*, 20, 287-295
- Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture. How should you do it and what does it mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Hernández, S. (2011). La verdolaga, *Portulaca oleracea*, una maleza de alto valor alimenticio ignorada por muchos. [versión electrónica]. *Herbario CICY*, 3, 86.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. doi: 10.1021/jf030723c
- Linares, C., Quiñones, J., Pérez, A., Carvajal, C., Rivas, M., Cid, G., Pérez, L., La Rosa, S., & Capdesuñer, Y. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Bioteología Vegetal*, 18(1), 47-56.
- López, M., Martínez, F. & Valle, C. (2003). The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43, 233-44. doi: 10.1080/10408690390826509
- Martínez, J., Dublán, O. y López, L. (2012). Evaluación de método de extracción para la obtención de compuestos fenólicos totales de *Phaseolus vulgaris* L. *INVURNUS*. 7(1), 37-40.
- Mayor, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
- Montoya, C.O., Volke, V., Trinidad, A., Villanueva, C. & Sánchez, J. (2017). Purslane (*Portulaca oleracea* L.) response to NPK fertilization. *Fitotecnia Mexicana*, 40, 325-332.
- Mulet, A., Cárcel, J.A, Sanjuán, N. & Bon, J. (2003). New Food Drying Technologies - Use of Ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9(3), 215-221.
- Navarro, C., Vera, L., Muñoz, B., Melgoza, P., Lazcano, H., Gómez, C., & Romero, V. (Mayo, 2010). Estudio de la concentración de quercetina en las variedades de manzana (*malus domestica*) fuji, red delicious y delicia. Conferencia presentada en el XII Congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Recuperado de: http://respyn2.uanl.mx/especiales/2010/ee-09-2010/documentos/frutas_y_hortalizas/FH115.pdf
- Ocampo, G., & Columbus, J.T. (2012). Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 63(1), 97-112.
- Oliveira, B. G. (2014). Capacidad antioxidante de *Averrhoa carambola* l. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres (Tesis de maestría). Recuperada de cybertesis de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3943/Oliveira_bg.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Ordoñez-Gómez, E., Reátegui-Díaz, D. & Villanueva-Tiburcio, J. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*, 9, 113-121. doi: 10.17268/sci.agropecu.2018.01.12
- Palma, M. & Barroso, C. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458, 119-130.
- Pasrija, D., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food and bioprocess technology*, 8(5), 935-950. doi: 10.1007/s11947-015-1479-y
- Pereira-Freire, J., Da silva, G., Farias, L., Silva, C., Arcanjo-Medeiros, S., Silva, A., Almondes, S., Lopes, G., Fonseca, N., Rodrigues, V., Da silva, L., Araujo, L., Soares, J. & Pinheiro, P. (2018). *In Vitro* and *Ex Vivo* Chemopreventive Action of *Mauritia flexuosa* Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-12. doi: 10.1155/2018/2051279
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89.
- Rees, M., Kennett, E., Whitelock, J. & Davies, M. (2008). Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biology & Medicine*, 44 (12), 1973-2001. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.016
- Resende, L., Franca, A. & Oliveira, L. (2018). Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) fruit by-products flours: Evaluation as source of dietary fibers and natural antioxidants. *Food Chemistry*, 270, 53–60. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.079
- Rojas-Barquera, D., & Narváez-Cuenca, C. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. *Química Nova*, 32(9), 2336-2340.
- Rostagno, M., Palma, M. & Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128. doi: 10.1016/s0021-9673(03)01184-1
- Ruíz, R., Venegas, C., Chavez, G. & Eustaquio, S. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV - Scientia*, 2(2), 11-22.

- Santiago, Y., Monroy, R., Cariño, R., Hernández, A. y Jiménez, R. (2018). Caracterización físico-química y propiedades antioxidantes de verdolaga (*Portulaca oleracea*) de alto consumo en el estado de Hidalgo, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 210-215.
- Sicari, S., Loizzo, M., Tundis, R., Mincione, A. y Pellicano, T. (2018). *Portulaca oleracea* L. (Purslane) extracts display antioxidant and hypoglycaemic effects. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 39-46. doi: 10.5073/JABFQ.2018.091.006.
- Simopoulos, A. (2004). Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biological Research*, 37(2), 263-277.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673-24706. doi:10.3390/ijms161024673
- Sudha, G., Sangeetha, M., Indhu, R. & Vadivukkarasi, S. (2011). *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum* Aiton). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(2), 137-140.
- Takeuchi, T., Pereira, C., Braga, M., Marostica, M., Leal, P., & Meireles, A. (2009). Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants (ed. 2009). Florida: CRC Press.
- Ulloa, J., Ulloa, P., Ramírez, J. & Ulloa, B. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Fuente Nueva Época*, 4, 1-13.
- USDA-U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2019). Purslane, raw [fdc.nal.usda.gov/]. Recuperado de: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169274/nutrients>
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Vilaplana, M. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos. *OFFARM*, 26, 79-86.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8, 303-313. doi: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, Ronald, (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 44(3), 701-705.
- Yan, G., Aryamanesh, N. & Wang, S. (2009). Purslane – A Potential Vegetable Crop. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/260095334_Purslane_-_A_potential_vegetable_crop

- Yeasmen, N., & Islam, N. (2015). Ethanol as a solvent and hot extraction technique preserved the antioxidant properties of tamarind (*Tamarindus indica*) seed. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(3), 332-337.
- Zamora, D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de Nutrición*, 34(1), 17-26.
- Zhao, R., Gao, X., Cai, Y., Shao, X., Jia, G., Huang, Y., Quin, X., Wang, J. & Zheng, X. (2013). Antitumor activity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides against cervical carcinoma in vitro and in vivo. *Carbohydrate polymers*, 96(2), 376-383. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.023
- Zorrilla, A., Eirez, M., & Izquierdo, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 23(1), 51-57.

Anexos

Anexo 1. Ficha descriptiva de la verdolaga (*Portulaca oleracea* L.)

Ficha descriptiva de la verdolaga (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	
Familia	Portulacáceas
Género	Portulaca
Características	Hierba bastante ramificada, con tallos gruesos, reptantes y carnosos de color rojizo. Hojas sin pecíolo espatuladas y carnosas. Flores pequeñas solitarias o en grupos de color amarillo. Fruto seco con numerosas semillas negruzcas.
Otros nombres	Purslane
Floración	Mayo-Septiembre
Usos	Fresco (como ensalada) Cocido (en guisos)
Ecología	Mala hierba que coloniza suelos alterados con cierta humedad. También se le puede encontrar en caminos y sendas.

FOTOS

Planta completa



Flor



Tallo, Flor
y hojas



Nota: Adaptado de “Verdolaga (*Portulaca oleracea* L.)” por Sánchez, S., 2015. Recuperado de: [https://adene.es/wp-content/uploads/2015/11/VERDOLAGA \(PORTULACA OLERACEA L.\).pdf](https://adene.es/wp-content/uploads/2015/11/VERDOLAGA (PORTULACA OLERACEA L.).pdf). Elaboración Propia.

Anexo 2. VERDOLAGA (*Portulaca oleracea* L.), Región Piura – Perú.



Flor



Nota: Elaboración Propia.

Anexo 3. Secado de hojas de Verdolaga (*Portulaca oleracea* L.).

SECADO DE HOJAS DE VERDOLAGA (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	
Recepción de materia prima	
Deshojado	

Selección



Lavado



**Desinfectad
o**



Secado en Estufa a 55°C



Molido



Tamizado



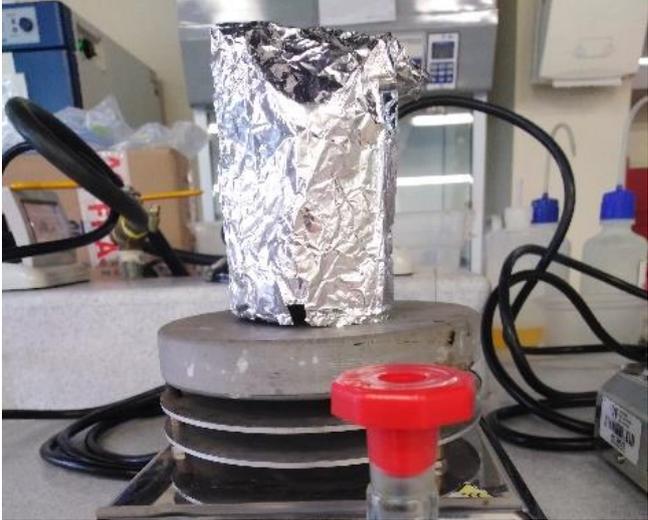
**Almacenad
o**



Nota: Elaboración Propia.

Anexo 4. Etapa de preparación de extractos

<p>Pesado de Muestra</p>	 <p>The first photograph shows a glass vial containing a dark green, granular powder, wrapped in aluminum foil. The second photograph shows a hand pouring a small amount of the same green powder into a clear glass vial on a brown surface.</p>
<p>Preparación de solución metanólica al 80%</p>	 <p>The photograph shows a laboratory bench with several pieces of glassware, including a beaker, a small vial, and a larger vial. A foil-wrapped vial is also visible on the bench.</p>
<p>Mezclado de Muestra con Sol. Metanólica</p>	 <p>The photograph shows a glass vial containing a dark green, granular mixture. The vial is labeled '25 ml' and is placed on a brown surface.</p>

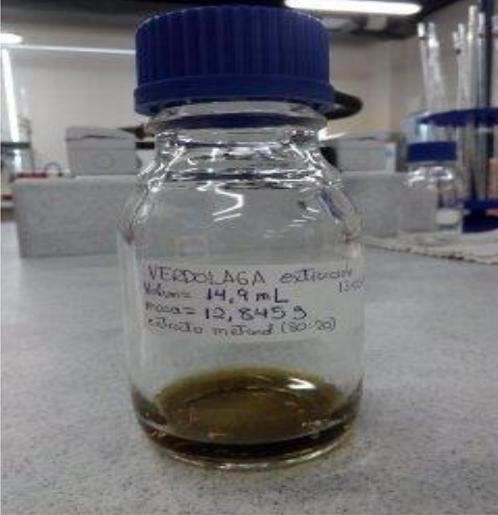
<p>Técnica A</p>	<p>Extracción por agitación magnética sucesiva.</p>
<p>Agitación magnética.</p>	
<p>Agitación magnética.</p>	
<p>Técnica S</p>	<p>Extracción por ultrasonido seguido de agitación magnética.</p>

Ultrasonido



**Agitación
magnética**

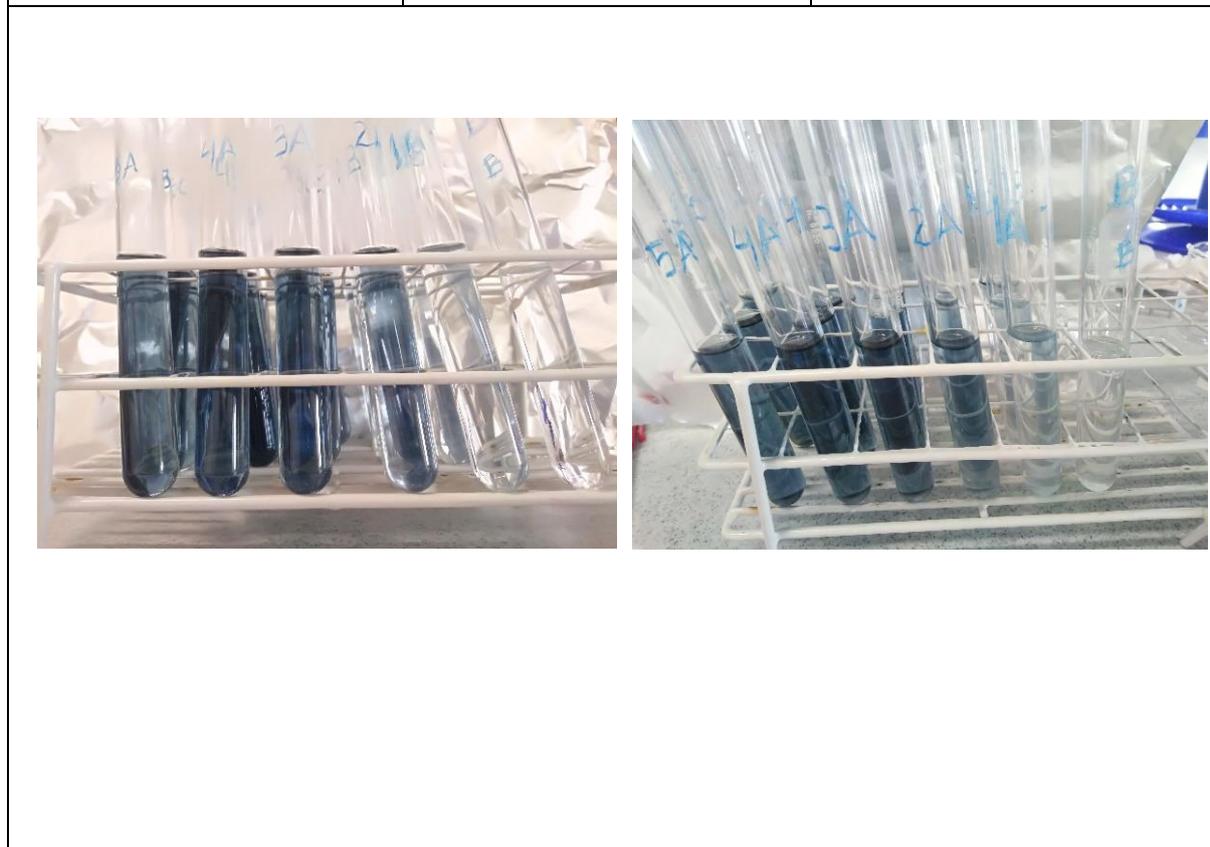


<p>Centrifugado</p>	
<p>Filtrado</p>	
<p>Almacenado</p>	

Nota: Elaboración Propia.

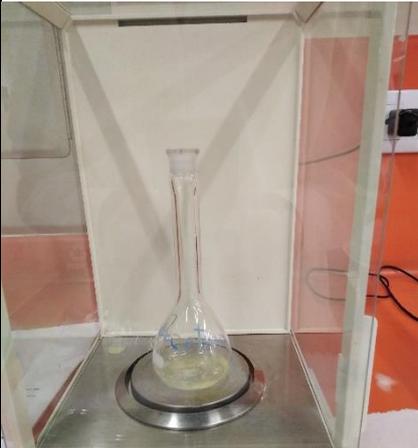
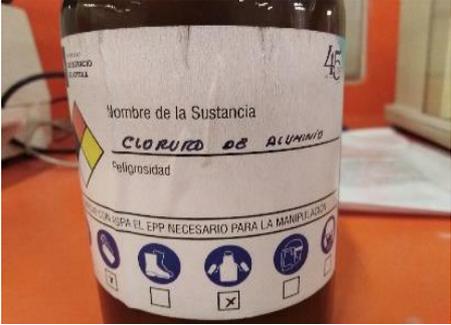
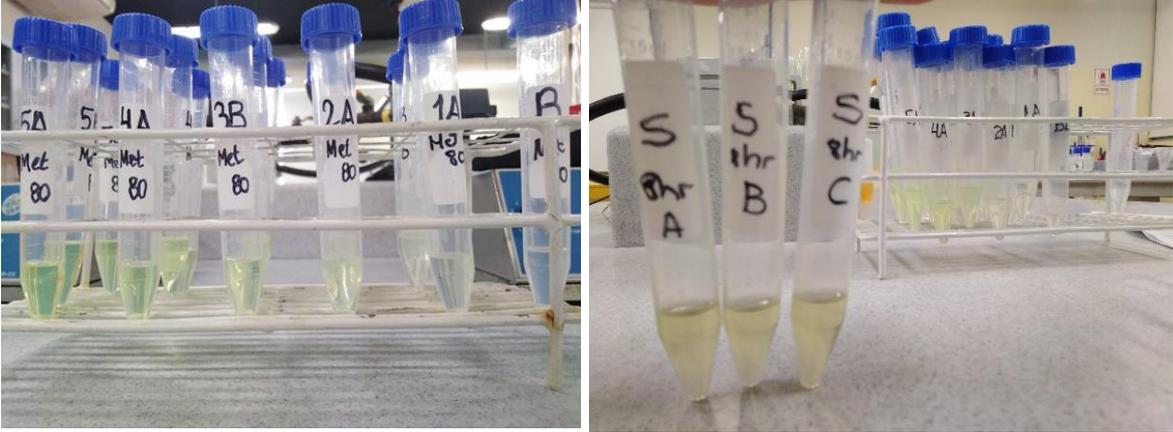
Anexo 5. Reactivos para la determinación de polifenoles totales y curva de calibración con ácido gálico.

Folin C	Ácido Gálico	Carbonato de Sodio
		



Nota: Elaboración Propia.

Anexo 6. Reactivos para la determinación de Flavonoides totales y curva de calibración con Quercetina.

Quercetina	Cloruro de Aluminio	Ácido acético
	 	 <p data-bbox="1129 1025 1366 1160"><i>Fuente:</i> https://images.app.goo.gl/Px6ELkChxetNKE917</p>
		

Nota: Elaboración Propia.