



Facultad de Farmacia
Escuela de Química y Farmacia
Farmacopea Chilena

Polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojas de *Buddleja sp.* sometidas a estrés por radiación UV- B y secado.

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico.

Paulina Ignacia Montiel Peña.

**Directora de tesis: MSc. Q.F. Marcela Escobar P.
Co- directora: MSc. Q.F. Georgina Sánchez P.**

2018

A mis padres

y

hermanos

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer a mi Directora de Tesis Profesora Marcela Escobar por apoyarme y acogerme.

A mi Co-directora y directora del laboratorio de fotoquímica profesora Georgina Sánchez, por sus acotaciones y aporte a este trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Farmacopea Chilena por el apoyo recibido y especial cariño a su analista Don Denis.

A Fabián Placencia por ayudarme con el análisis estadístico y a la profesora Gabriela Lobos por la liofilización.

A mis profesores de cátedra, que me entregaron los conocimientos necesarios para aplicarlos en la práctica y presente tesis, además del respeto, amor a la profesión y vocación de servicio.

A mis compañeras de tesis Nicole Araos y especialmente a Yasmín Bernal que fue una excelente compañera, con buena disposición para ayudarme, se agradece infinitamente.

A mis compañeros de cátedra Sailor, Sebastián, Daniela y Maximiliano por todas esas tardes de estudio, estrés y risas. Y todos los compañeros que estuvieron en este hermoso camino.

Especial reconocimiento a mi familia, a mis padres que siempre me han apoyado, por confiar en mí y depositar toda su fe para poder lograr mi objetivo. A mis hermanos Rodrigo y Francisco, y a mi abuela que la perdí en el proceso de mi tesis, un especial cariño para ella, por acompañarme por tantos años. A toda mi familia por apoyarme siempre, a mis primos y tíos, y principalmente a mis tías Isabel, Ximena y Angélica, y mi tío Julio. A mi gatita princesa que también se fue en el término de este proceso y me acompañó en las tardes de estudio, gracias por todo su cariño.

A mi mejor amiga Wilma Zamora que ha estado apoyándome a lo largo de todos estos años, a Daniela Colipí, Richard Díaz, Paulina A., y todos los amigos que han estado conmigo.

Y a todas las hermosas personas que han estado junto a mí, gracias desde lo más profundo de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
Efecto de la radiación UV-B en plantas	9
Familia buddlejaceae	11
<i>Buddleja globosa</i> Hope	11
<i>Buddleja americana</i> L.	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
Objetivos generales	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Reactivos	15
Equipos	15
Métodos	16
Recolección de muestras	16
Identificación de los grupos de tratamientos según dosis de irradiación, tipo de secado y especie	18
Secado y molienda	18

Determinación de humedad (Pérdida por secado)	18
Preparación de extractos madre	19
Determinación de Polifenoles Totales (PFT)	20
Determinación de Capacidad Antioxidante (CAOX)	21
FRAP	21
DPPH	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Recolección y secado	24
Rendimiento del proceso de secado por liofilización y calor seco de <i>Buddleja</i> sp, para controles y muestras irradiadas.	24
Efecto del tipo de secado en el contenido de Polifenoles totales (PFT) y capacidad antioxidante (CAOX) de <i>Buddleja</i> sp	25
Determinación de Polifenoles totales (PFT)	25
Determinación de Capacidad Antioxidante (CAOX)	26
FRAP	26
DPPH	27
Comparación de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en base a variación porcentual con respecto a grupos controles.	28
DISCUSIÓN	30
Efecto de la irradiación en el contenido de polifenoles totales	33
Efecto de la irradiación en la determinación de la capacidad Antioxidante	35
FRAP	35
DPPH	36

CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO 1	45
ANEXO 2	46
ANEXO 3	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Identificación de los grupos de tratamientos según dosis de irradiación, tipo de secado y especie	18
Tabla N°2	Curva de calibrado de Ácido Gálico	20
Tabla N°3	Curva de calibrado de FeSO ₄ ·6 H ₂ O	21
Tabla N°4	Curva de calibrado de Trolox	22
Tabla N°5	Rendimiento del proceso de secado por liofilización y calor seco de <i>Buddleja</i> sp, para controles y muestras irradiadas	24
Tabla N°6	Polifenoles totales de extractos de hojas de <i>Buddleja</i> sp con y sin irradiación postcosecha y posterior secado por Liofilización y calor seco	26
Tabla N°7	Capacidad antioxidante FRAP de extractos de hojas de <i>Buddleja</i> sp con y sin irradiación postcosecha y posterior secado por liofilización y calor seco	27
Tabla N°8	Capacidad antioxidante DPPH de extractos de hojas de <i>Buddleja</i> sp con y sin irradiación postcosecha y posterior secado por liofilización y calor seco.	27
Tabla N°9	Concentración v/s Absorbancia de Ácido Gálico	45

Tabla N°10	Concentración v/s Absorbancia de FeSO ₄ ·6 H ₂ O.	46
Tabla N°11	Concentración v/s Absorbancia Trolox	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1	Hojas de <i>Buddleja globosa</i> Hope (BG), identificadas taxonómicamente	16
Figura N°2	Hojas de <i>Buddleja americana</i> L. (BA), identificadas taxonómicamente	17

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°1	PFT y CAOX de los extractos de hojas de <i>Buddleja</i> sp sin irradiar postcosecha y sin incubación (Grupos C ₀), secada por liofilización o calor seco.	25
Gráfica N°2	Variación porcentual de PFT y CAOX de <i>Buddleja</i> sp con y sin irradiación, secado por calor seco postcosecha con respecto al grupo control C ₀₀ .	28
Gráfica N°3	Variación porcentual de PFT y CAOX de <i>Buddleja</i> sp con irradiación, secado por liofilización postcosecha con respecto al grupo control C ₀₀ .	29
Gráfica N°4	Curva de calibrado Ácido Gálico.	45
Gráfica N°5	Curva de calibrado FeSO ₄ ·6 H ₂ O.	46
Gráfica N°6	Curva de calibrado Trolox.	47

RESUMEN

El uso de plantas del género *Buddleja* puede constituir una importante fuente de antioxidantes, debido a que nos ofrece una matriz rica en compuestos de naturaleza fenólica. Un estudio preliminar realizado por Sáez (2015) en hojas frescas de *Buddleja globosa* Hope irradiadas con UV-B, determinó que hay un incremento de la capacidad antioxidante proporcional al incremento de la dosis de radiación utilizada, indicando que se estimularía la síntesis de estos compuestos fenólicos como defensa antioxidante de la planta. Como continuación de este estudio se sometió hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L., postcosecha a tratamiento de irradiación UV-B, presentando un mayor contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, con comportamientos diferentes dependientes de la especie.

Para realizar este estudio se recolectaron hojas de ambas especies desde jardines de la Región de Valparaíso en las primeras horas de la mañana, transportándolas protegidas de la luz y bajo refrigeración para posteriormente someterlas a distintas dosis de irradiación UV-B y determinar el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante total.

Como resultado final se obtuvo un aumento de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en ambas especies, lo que estaría indicando el efecto positivo de la radiación UV-B. Las muestras de *Buddleja americana* L., especie menos estudiada, obtuvieron una menor concentración de polifenoles y por lo tanto una menor capacidad antioxidante que las hojas de *Buddleja globosa* Hope. Este resultado además se podría considerar como una alternativa tecnológica para mejorar las propiedades benéficas de estas especies de plantas.

SUMMARY

The use of plants from the *Buddleja* genus may constitute an important source of antioxidants, since it offers a matrix full and rich in phenolic compounds. A preliminary study carried out by Saez (2015) in fresh leaves of *Buddleja globosa* Hope irradiated with UV-B, determined that there is an increase in the antioxidant capacity, which is proportional to the dose of radiation used, indicating that it would stimulate the synthesis of these phenolic compounds as an antioxidant defense system of the plant. To continue with the mentioned study, leaves from *Buddleja globosa* H. and *Buddleja americana* L. were subjected to a UV-B irradiation treatment, presenting a higher content of total polyphenols and antioxidant capacity, with different behaviors depending on the species.

For this study, leaves of both species were collected from gardens located in the Region of Valparaíso, transporting them protected from light and under refrigeration for later exposure to different doses of irradiation UV-B, to determine the content of polyphenols and total antioxidant capacity.

As a final result, an increase of the phenolic compounds and antioxidant capacity was obtained in both species, which indicates the positive effects of the UV-B radiation. The samples of the least studied plant, *Buddleja americana* L. showed a lower concentration of polyphenols, and therefore, a lower antioxidant capacity in comparison with *Buddleja globosa* Hope. This result could be a technological alternative to improve the properties of these species.

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad las plantas medicinales son objeto de gran interés, dado que poseen una diversidad de compuestos con importantes actividades biológicas. Estos compuestos son producto del metabolismo secundario que la planta utiliza para su crecimiento, lignificación, pigmentación, polinización y para su defensa o supervivencia (Cisneros-Zevallos, 2003; Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Fraga, et al., 2010).

Producto del metabolismo secundario de las plantas surgen los compuestos fenólicos, que son los principales contribuyentes de su capacidad antioxidante. Su consumo se asocia con la reducción del riesgo de enfermedades degenerativas producidas por los radicales libres (Prior et al., 1998; Bravo, 1998; Wargovich, 2000; Avella et al., 2008; Fraga et al., 2010). En el pasado, esta protección contra diferentes enfermedades se atribuía principalmente al contenido de vitamina C, E y carotenoides (Byers y Guerrero, 1995). Sin embargo, dado que estudios clínicos en humanos indicaron que la suplementación de estos compuestos puros no redujo la incidencia de enfermedades cardíacas, se cuestionó la efectividad de estos antioxidantes para eliminar los radicales libres (Vinson et al., 2001). Desde entonces, los compuestos fenólicos se identificaron como los compuestos con la mayor capacidad antioxidante en frutas y verduras, y varios grupos de investigación destinaron sus esfuerzos para comprender su potencial antioxidante (Heo et al., 2007; Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009; Fraga et al., 2010).

Los polifenoles poseen al menos un anillo aromático y un sustituyente hidroxilo en su estructura química, es decir, un grupo fenólico, que contiene como mínimo uno o más sustituyentes hidroxilo libre o formando parte de otra función: éster, éter, heterósido (Bravo, 1998; Avella et al., 2008; Fraga et al., 2010).

Los polifenoles se clasifican en grupos identificados por el esqueleto básico de los átomos de carbono: C_6 Fenoles simples y benzoquinonas, C_6-C_1 Ácidos fenólicos, C_6-C_2 Ácidos fenilacéticos y acetofenonas, C_6-C_3 Ácidos hidroxicinámicos, derivados fenilpropanoides, cumarinas y cromonas, C_6-C_4 naftoquinonas, $C_6-C_1-C_6$ xantonas, $C_6-C_2-C_6$ estilbenos, antraquinonas, $C_6-C_3-C_6$ flavonoides, $(C_6-C_3-C_6)_n$ taninos condensados, $(C_6-C_1)_n$ taninos hidrolizables, $(C_6-C_3)_n$ ligninas (Bravo, 1998; Quiñones et al., 2012).

La biosíntesis de los polifenoles tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o

tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Dixon y Paiva, 1995; Bravo 1998; Quiñones et al., 2012).

Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shiquímico como de la ruta de los poliacetatos y muchos de los compuestos provenientes de esta ruta tienen dos o más núcleos fenólicos, como son los flavonoides, estilbenos, pironas y xantonas, entre otros (Quiñones et al., 2012).

La presencia de compuestos fenólicos es influenciada por diversas condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia por el espacio del suelo, los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Cisneros-Zevallos, 2003; Vivanco et al., 2005).

Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides, compuestos heterocíclicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se encuentran en las hojas, semillas, tallos y flores de vegetales (Havsteen, 2002). Estos compuestos promueven la supervivencia fisiológica de la planta, protegiéndola de patógenos fúngicos y de la radiación UV-B (Gerhardt et al., 2008; Dolzhenko et al., 2010).

Desde un punto de vista beneficioso, la aplicación de estrés abiótico postcosecha como heridas, fitohormonas, temperatura, luz ultravioleta, composición alterada del gas, choque térmico y estrés hídrico, entre otros, llevan a un aumento en la biosíntesis de los compuestos fenólicos en frutas y verduras frescas (Cisneros-Zevallos, 2003). Estas observaciones aportan un dato importante cuando se desea utilizar las plantas como medicamento fitoterapéutico en forma segura, dado que diferentes perfiles de flavonoides pueden traducirse en distintas actividades farmacológicas (Rugna et al., 2007).

Estudios realizados por Surjadinata y Cisneros-Zevallos (2012) en variedades de zanahorias sometidas a heridas por cortes, mostraron un incremento de 2,5 y 12,4 veces mayor en compuestos fenólicos y capacidad antioxidante respectivamente, después de 4 días de almacenamiento comparado con controles sin estrés. Además, se encontró que existe una relación lineal entre la intensidad de la agresión y el incremento de estos compuestos.

Un estudio de estrés salino en plántulas de Vinal, *Prosopis ruscifolia* G., mostró que al cultivarlas hidropónicamente en solución nutritiva modificada, suplementada con concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 mol L⁻¹ de cloruro de sodio (NaCl), se producía un incremento en la actividad enzimática antioxidante y síntesis de polifenoles en la hojas, para contrarrestar el efecto negativo del estrés oxidativo (Meloni et al., 2008).

Efecto de la radiación UV-B en las plantas

La radiación solar es uno de los principales factores ambientales que afectan la vida en nuestro planeta. Esta radiación controla el funcionamiento de los ecosistemas terrestres y acuáticos tanto a través del control de procesos fotobiológicos (fotosíntesis, fotoperíodo, fototropismos, etc.) como por medio de su acción sobre otros factores ambientales (temperatura, humedad, etc.) y ciclos naturales (ciclos diarios, anuales, hídricos, etc.) que finalmente inciden en la distribución de los organismos (Carrasco-Ríos, 2009).

La radiación que llega a la tierra abarca una amplia gama del espectro electromagnético. La luz o radiación visible comprende longitudes de onda que van de los 400 a los 700 nm y es usada por los vegetales en el proceso de la fotosíntesis. También se le denomina radiación fotosintéticamente activa o PAR (sigla derivada del inglés: Photosynthetic Active Radiation) (Carrasco-Ríos, 2009).

La radiación UV-B es aquella comprendida entre las longitudes de onda 280 y 320 nm. Los otros componentes de la radiación UV son la radiación UV-C, comprendida entre los 200 y 280 nm, y la UV-A entre los 330 y 400 nm. La radiación UV-B induce una serie de daños en los seres fotosintéticos y esta representa el 1,5% del total de la radiación solar (Caldwell et al., 1983; Hollósy, 2002; Zepp et al., 2007).

Aunque representa solo una pequeña fracción del espectro electromagnético, se sabe que la radiación UV-B influye en todos los organismos vivos, incluidas las plantas superiores (Hollósy, 2002; Caldwell et al., 2007; Carrasco-Ríos, 2009). El nivel de radiación UV-B depende de varios factores, como la estación, la hora del día, la latitud, la altitud, la capa de nubes y el espesor de la capa de ozono (Zepp et al., 2007).

“Esta misma radiación solar, la cual ha hecho posible la vida sobre nuestro planeta, puede ser perjudicial en altas intensidades o cuando la proporción de ondas cortas aumenta por sobre determinados límites. Altas intensidades de radiación y cambios

en la composición espectral pueden afectar importantes procesos en los organismos, en particular en los vegetales” (Carrasco-Ríos, 2009).

Durante su evolución las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la exposición directa a la radiación solar UV-B, el efecto más común es la modulación del metabolismo secundario, incluido el aumento de las concentraciones de compuestos fenólicos (Gerhardt et al., 2008) y el aumento de la producción de isopreno, terpenoides y principalmente flavonoides (Dolzhenko et al., 2010).

Otro efecto de la radiación UV-B en los vegetales es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que actuarían no tan solo como radicales destructivos a nivel celular sino también como señales moleculares esenciales para gatillar modificaciones en la expresión de genes y así contrarrestar el efecto de la radiación UV-B sobre las plantas (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Rugna et al., 2007).

La exposición a la radiación solar en zarzaparrilla (*Smilax campestris* Griseb) evaluada por Rugna (2007), mostró comparativamente que extractos metanólicos de hojas de ejemplares plenamente expuestos a la luz solar, presentaron el doble de fenoles totales que los extractos de hojas que desarrollaban en ambientes con escasa radiación solar.

Otros estudios realizados por Andrade-Cuvi (2010) con radiación UV-C (RUVC) *Averrhoa carambola* L. evidenciaron que los frutos recién cosechados tratados con dosis de 13 kJ/m² de RUVC y almacenados por 14 días presentaron un menor crecimiento de mohos, manteniendo una buena calidad comercial; se observó además una acumulación del contenido de polifenoles totales (PFT), flavonoides, y aumento de la actividad antioxidante (CAOX).

El estudio en hojas frescas de *Buddleja globosa* Hope irradiadas con UV-B realizado por Sáez (2015), concluyó que existe una correlación positiva entre el aumento en la capacidad antioxidante de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y del poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) con el aumento del contenido fenólico total, siendo este efecto proporcional al incremento de la dosis de radiación utilizada, indicando que el incremento en la intensidad de la radiación UV-B estimularía la síntesis de compuestos fenólicos que aportan a la defensa antioxidante de la planta. El estrés abiótico postcosecha se puede aplicar a frutas y verduras frescas para inducir la síntesis de metabolitos secundarios, los que estarían relacionados con una mayor propiedad funcional como una mayor actividad antioxidante, propiedad antimicrobiana, actividad fotosintética, morfogénica, potencial de color, entre otras (Cisneros-Zevallos, 2003). La aplicación de radiación UV-B a hojas frescas de *Buddleja globosa* Hope

podría ser considerada una alternativa tecnológica para prolongar la vida útil de este producto y mejorar sus propiedades benéficas pudiendo extenderse esta aplicación a otras especies de *Buddleja* sp y hierbas medicinales de uso tradicional.

Las flores, hojas y raíces de varias especies de *Buddleja* (**familia Buddlejaceae**) se utilizan en la medicina tradicional en varias partes del mundo, dado que, poseen propiedades como: protección hepática, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, antioxidante, hipoglucemiante, neuroprotectora, antimicrobiana, entre otras (Houghton, 1984; Houghton y Hikino, 1989; Houghton et al., 2003, Liao et al., 1999).

En extractos lipofílicos de *Buddleja globosa* (raíces) y *Buddleja myriantha* (tallos), se encontraron actividades inhibitoras de las enzimas lipooxigenasa (5-LOX) y ciclooxigenasa (COX), mientras que las de *Buddleja officinalis* (flores), *Buddleja yunanesis* (tallos) y *Buddleja asiática* (tallos) mostraron actividad inhibitora sólo contra la COX (Liao et al., 1999). Backhouse (2008) documentó la actividad antiinflamatoria vía COX-2 de extractos de *Buddleja globosa*, y atribuyó la actividad a la presencia de verbascósido y luteolina-7-glucósido.

La presencia de algunos ácidos fenólicos como los ácidos clorogénicos, elágico y cafeico y sus derivados, han demostrado un nivel significativo de protección de la mucosa gástrica, debido a las moléculas de adhesión activadas que regeneran y mantienen la pared epitelial, lo que asegura la inhibición del proceso de colitis. Además, flavonoides tales como rutina y quercetina también están involucradas en este proceso (Díaz-Rivas et al., 2015).

La especie ***Buddleja globosa* Hope**, perteneciente a la familia: Buddlejaceae, género: *Buddleja*, especie: *B. globosa*, nombre científico: *Buddleja globosa* Hope comúnmente llamado "matico", "matico chileno", "pañil" o "palguín", es una especie nativa de Chile, Perú y Argentina que se encuentra comúnmente desde la zona central hasta la Patagonia, generalmente en sitios húmedos de forma silvestre y también en casas y jardines para el uso doméstico. Es un arbusto de 1,5 a 3 m de altura, con ramas jóvenes pubescente amarillentas. Las hojas son opuestas, de 3 a 15 cm de ancho, lanceoladas, agudas. La inflorescencia es en mono o bicabezuela, de 1 a 2 cm de diámetro, formando un racimo de 2 a 15 cabezuelas. Sus flores son numerosas, compactas, de colores anaranjados, amarillos y rojos. El fruto es una cápsula subglobosa. Florece desde noviembre a mayo (Backhouse et al, 2008).

Entre los compuestos activos encontrados en *Buddleja globosa* se incluyen flavonoides, esteroides feniletanoides y terpenoides incluyendo iridoides, sesquiterpenos, diterpenos y saponinas (Pardo et al., 1993; Liao et al., 1999; Mensah et al., 2001;

Houghton et al., 2003). El alto contenido de polifenoles y terpenoides en las hojas pueden explicar la actividad terapéutica de esta planta (Liao et al., 1999).

Posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes y analgésicas (Liao et al., 1999). Además, se utiliza en afecciones del aparato digestivo como diarrea, colitis y regeneración de membrana mucosa en caso de úlceras. Se expende en forma de cápsulas, pomadas, ungüentos y otras como compresas, infusiones y polvos (Backhouse et al., 2008; Vogel et al., 2010).

En la medicina folclórica utilizan sus hojas en infusiones para ayudar en la cicatrización de heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras, hemorroides, verrugas y como antiséptico urogenital (Houghton, 1984; Pardo et al., 1993).

***Buddleja americana* L.**, es una especie escasamente estudiada, a pesar de ser una planta ampliamente usada en nuestro país, que al igual que la *Buddleja globosa* Hope, se encuentra en forma silvestre en casas y jardines para el uso domésticos. Houghton en el año 1984 la menciona como arbusto de tamaño mediano, con una amplia distribución que va desde México al sur hasta Chile. Su hábitat principal es México, donde es conocido por una variedad de nombres incluyendo axixquahuitl, cayolizan, tepozán y ziompantle. De estos tepozán es el más comúnmente utilizado.

Considerando que la radiación UV produce aumento de polifenoles fenoles totales y capacidad antioxidante en diversas plantas, frutas y verduras se plantea la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

“Si el estrés por la radiación UV-B aplicado a hojas de *Buddleja globosa* Hope en la postcosecha genera un aumento de polifenoles totales y capacidad antioxidante, este aumento también se producirá en hojas de *Buddleja americana* L. y se mantendría en ambas especies luego de ser secadas por liofilización y calor seco”.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del estrés inducido por la radiación UV-B post- recolección en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L. sometidas a proceso de secado por liofilización y calor seco.

Objetivos específicos:

1. Recolectar, seleccionar y acondicionar hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L. en condiciones que permitan asegurar buena calidad de la muestra.
2. Cuantificar el contenido de polifenoles totales y determinar la capacidad antioxidante en hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L. sometidas a dos dosis de radiación UV-B: 190,8 mJ/cm² y 381,6 mJ/cm² secadas por liofilización o calor seco.
3. Comparar el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L. sometidas a dosis de radiación UV-B y a procesos de secado por liofilización y calor seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Agua destilada.
- Metanol p.a. Merck.
- Reactivo Folin Ciocalteau p.a Merck.
- Ácido acético p.a. Merck.
- Ácido clorhídrico 37% p.a. Merck.
- Ácido gálico p.a. Merck.
- Carbonato de sodio p.a. Merck.
- Acetato de sodio trihidrato p.a. Merck.
- 2, 4, 6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) Fluka.
- Cloruro férrico p.a. Loba Chemie.
- Sulfato ferroso p.a. Merck.
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) p.a. Sigma.
- Ácido 6-Hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) Sigma.

Materiales

- Material fungible de laboratorio.
- Balanza semi-analítica PS 360/C/2, Radwag.
- Balanza analítica AS 220/C/2, Radwag.
- Liofilizador Virtis benchtop K.
- Molinillo eléctrico A11 basic, IKA.
- Tamiz malla #45 (355 µm) ASTM.
- Baño de ultrasonido WVC-D10H, Wiseclaen.
- Estufa de secado Binder.
- Lámpara UV-B TL 40W/12 UV-B Broadband Phototherapy, Philips.
- Radiómetro UVX con sensor UVX- 31 UV-B.
- Baño termorregulado Memmert.
- Centrífuga 5702-R, Eppendorf.
- Vórtex MAXI MIX II, Thermo.
- Espectrofotómetro UV- Vis UV 1800, Shimadzu.
- Cámara desecadora.

Métodos

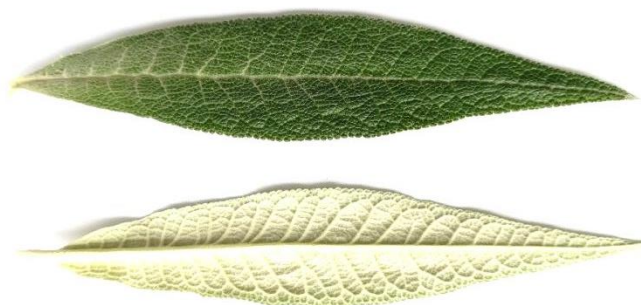
Recolección de muestras

Las muestras utilizadas correspondieron a hojas de especies *Buddleja globosa* Hope y *Buddleja americana* L. (Figura N°1 y 2) recolectadas en el mes de abril, mayo y junio del 2018 desde jardines de la región de Valparaíso, Chile. Las hojas de *Buddleja globosa* Hope se recogieron en la provincia de Valparaíso en 33°01'36.7" Latitud Sur 71°38'18.5" Longitud Oeste y 33°01'47.6" Latitud Sur 71°31'14" Longitud Oeste, y las hojas de *Buddleja americana* L. fueron recolectadas en la provincia de Petorca en 32°26'53.5" Latitud Sur 71°13'37.6" Longitud Oeste y en la provincia de Valparaíso 33°02'26.7" Latitud Sur 71°32'26.3" Longitud Oeste. Recolectadas en las primeras horas de la mañana, transportadas bajo refrigeración y protegidas de la luz al laboratorio de la Farmacopea Chilena, donde se le realizó una limpieza, para posteriormente transportarlas nuevamente protegidas de la luz al laboratorio de fotoquímica de la Facultad de Farmacia.

Las muestras recolectadas se limpiaron y seleccionaron descartando las que estuviesen rotas y decoloradas, generando un pool homogéneo de hojas, las que se distribuyeron en distintos grupos dependiendo de su tratamiento posterior con radiación UV-B y a distintos tipos de secado, lo que se desglosa en la Tabla N°1 y a continuación:

Especie:

- **Figura N°1:** Hojas de *Buddleja globosa* Hope (BG), identificadas taxonómicamente.



- **Figura N°2:** Hojas de *Buddleja americana* L. (BA), identificadas taxonómicamente.



Tipo de secado:

- Liofilización por 72 horas (L).
- Calor seco (40°C) por 36 horas (S).

Tratamiento UV-B:

- C₀: -Control sin irradiación, sin incubación.
- C₀₀: - Control sin irradiación, con incubación de 5 días.
- M₂: -Muestras con irradiación UV-B 190,8 mJ/cm² e incubación de 5 días.
- M₃: -Muestras con irradiación UV-B 381,6 mJ/cm² e incubación de 5 días.

Tabla N°1: Identificación de los grupos de tratamientos según dosis de irradiación, tipo de secado y especie.

Secado	Liofilizado		Calor seco	
Especie	<i>Buddleja globosa</i>	<i>Buddleja americana</i>	<i>Buddleja globosa</i>	<i>Buddleja americana</i>
Tratamiento	Hope	L.	Hope	L.
C ₀	BG-L C ₀	BA-L C ₀	BG-S C ₀	BA-S C ₀
C ₀₀	BG-L C ₀₀	BA-L C ₀₀	BG-S C ₀₀	BA-S C ₀₀
M ₂	BG-L M ₂	BA-L M ₂	BG-S M ₂	BA-S M ₂
M ₃	BG-L M ₃	BA-L M ₃	BG-S M ₃	BA-S M ₃

*BG: *Buddleja globosa* Hope, BA: *Buddleja americana* L., L: liofilizada, S: calor seco, C0: Control sin irradiación, sin incubación, C00: Control sin irradiación, con incubación de 5 días, M2: Muestras con irradiación UV-B 190,8 mJ/cm² e incubación de 5 días, M3: Muestras con irradiación UV-B 381,6 mJ/cm² e incubación de 5 días.

La muestra denominada C₀ fue secada por calor seco o liofilizada inmediatamente, según correspondía; el resto de las muestras fueron incubadas por 5 días en oscuridad a 20°C y 38 - 45% HR, con la finalidad de dar tiempo a la respuesta metabólica de las hojas después de la exposición a radiación UV-B. Una vez finalizado el proceso de incubación, las muestras fueron pesadas y colocadas en bolsas herméticas, un grupo de hojas de cada especie fueron congeladas por un tiempo mínimo de 5 h y posteriormente se liofilizaron y otro grupo de hojas de cada especie fueron secadas en estufa a 40°C.

Para irradiar las muestras se utilizaron 3 lámparas UV-B (TL 40W/12 UV-B Broadband Phototherapy, Philips). La intensidad de la radiación fue medida con radiómetro digital (UVX Radiometer, UVX 31 Sensor, UVP).

Secado y molienda

Las muestras ya secas fueron pulverizadas con molinillo eléctrico. El polvo obtenido se pasó a través de un tamiz de malla #45 (355 µm) y posteriormente almacenadas a 4°C para sus posteriores análisis.

Determinación de humedad (Pérdida por secado).

Tres pesafiltros limpios se pesaron en balanza analítica obteniendo el peso inicial (sin muestra), posteriormente se pesaron en forma exacta entre 0,2 y 0,5 g de muestra y se llevaron a estufa de secado retirando la tapa del pesafiltro por un tiempo de 2 h. Una vez transcurrido el tiempo se obtuvieron los pesos de cada pesafiltro con muestra y se volvió a colocar en estufa de secado sin tapa repitiendo el mismo proceso de secado y pesado con intervalos de 1 h hasta que la diferencia entre 2 pesadas sucesivas no sea mayor al 0,25% del peso de la muestra inicial. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

El porcentaje de humedad fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = ((P_m - P_f) / P_m) * 100$$

En donde:

P_m: Peso de la muestra inicial.

P_f: Peso de la muestra seca.

Preparación de los extractos madres.

Se utilizó el protocolo descrito por ISO 14502-1 (2005).

Se pesó 0,5 g de muestra en tubo Falcon de 50 mL y se adicionó 10 mL de la mezcla metanol:agua (70:30) que previamente fue calentado a 70°C en baño termostático. Se colocaron los tubos en baño a 70°C por 10 min agitando cada 5 min en vórtex. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 4.400 rpm por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y el residuo sólido se sometió un nuevo proceso de extracción. Se juntaron ambos sobrenadantes, se filtró por gravedad y se llevó a un volumen final de 25 mL con la mezcla metanol:agua (70:30). El extracto obtenido (extracto madre) se almacenó a 4°C.

Los extractos se prepararon en triplicado.

Determinación de Polifenoles Totales (PFT)

Para este ensayo se usó el método de Folin- Ciocalteau (FC) (1927) según lo descrito por ISO 14502-1 (2005) en el cual se observa la formación de una coloración azul que presenta una absorbancia a 750 nm, y cuya intensidad es proporcional a la concentración de polifenoles en la muestra.

Se tomó 100 uL de cada extracto madre y se llevó a un volumen final de 10 mL en matraz aforado con agua destilada. De esta dilución se tomó 1 mL en un tubo de ensayo, se adicionó 5 mL de reactivo FC (1:10) incubándose por 8 min protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a la mezcla 4mL de Na₂CO₃ 7,5% p/v y se incubó por 1 h en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación se midió la absorbancia de todas las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Curva de calibrado: Se preparó una solución estándar de ácido gálico (GAE) de 1 mg/mL de la cual se tomó 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL respectivamente y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Cada punto de la curva se realizó utilizando el mismo protocolo de la muestra. Para el blanco se utilizó agua destilada.

Los resultados se expresaron como g de GAE / 100 g de muestra en base seca (b.s.).

Tabla N°2: Curva de calibrado de Ácido gálico.

Punto	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración Ácido gálico (µg/mL)
1	1,0	100	10
2	2,0	100	20
3	3,0	100	30
4	4,0	100	40
5	5,0	100	50

Determinación de Capacidad Antioxidante (CAOX)

- FRAP

Se realizó el protocolo descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones. Se preparó el reactivo FRAP mezclando los siguientes reactivos en proporción 10:1:1 (Buffer Acetato 300 mmol/L, pH 3,6 [3,1 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$ + 16 mL $C_2H_4O_2$ para 1 L de solución]; TPTZ 10 mmol/L en HCl 40 mmol/L; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 20 mmol/L). El reactivo se preparó fresco diariamente, manteniéndose a 37°C en baño termostático.

Se tomó 1 mL del extracto madre y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. La mezcla de reacción se realizó adicionando 600 μ L de agua destilada, 200 μ L de muestra diluida y 6 mL de reactivo FRAP a 37°C al tubo de ensayo. Se incubó en baño termostático a 37°C por 5 min. Se agitó y se monitoreó la cinética de formación del complejo Fe^{+2} - TPTZ en espectrofotómetro UV- Vis por 5 min con intervalos de medición de 0,5 s. La lectura tomada a los 4 min fue seleccionada para la realización de los cálculos. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Curva de calibrado: Se preparó una solución estándar de $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ 2 mM de la cual se tomaron alícuotas entre 0 y 1,4 mL y se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Cada punto de la curva de calibrado se realizó siguiendo el mismo procedimiento de la muestra. Para el blanco se utilizó agua destilada.

Los resultados se expresaron como moles $FeSO_4$ / 100 g de muestra en b.s.

Tabla N°3: Curva de calibrado de $FeSO_4 \cdot 6 H_2O$.

Punto	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración $FeSO_4 \cdot 6 H_2O$ (mM)
1	0,05	5	0,02
2	0,20	5	0,08
3	0,40	5	0,16
4	0,60	5	0,24
5	0,80	5	0,32
6	1,20	5	0,48
7	1,40	5	0,56

- DPPH

Para este ensayo se utilizó la metodología descrita por Sharma y Bhat (2009) con modificaciones. Se preparó una solución de 0,06 mM de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Para ello se pesó aproximadamente 2,36 mg de DPPH por adición y se lleva a volumen final de 100 mL con metanol en matraz de aforo protegido de la luz. El reactivo se preparó fresco diariamente.

Se tomó 200 μ L del extracto madre y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. La mezcla de reacción se realizó adicionando 200 μ L de muestra diluida y 2 mL de reactivo DPPH 0,06 mM en un tubo de ensayo. Se agitó e incubó por 15 minutos en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación se midió la absorbancia de todas las muestras a 517 nm en un espectrofotómetro UV- Vis. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Curva de calibrado: Se preparó una solución estándar de ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) 1 mM. Se pesaron 2,5 mg de Trolox y se llevó a volumen final de 10 mL con metanol en matraz de aforo obteniendo la dilución madre (250 μ g/mL), luego se tomaron 5 ml de esta solución y se llevaron a volumen final de 10 ml con metanol en matraz de aforo obteniendo T_0 (125 μ g/mL); luego se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a concentración 1,953 μ g/mL. Cada punto de la curva se realizó utilizando el mismo protocolo de la muestra. Para el blanco se utilizó metanol.

Los resultados se expresaron como milimoles de Trolox en 100 g de muestra b.s.

Tabla N°4: Curva de calibrado de Trolox.

Punto	Concentración solución madre (μ g/mL)	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración Trolox (μ g/mL)
1	62,5	5,0	10	3,13
2	31,25	5,0	10	1,56
3	15,635	5,0	10	0,78
4	7,8125	5,0	10	0,40
5	3,906	5,0	10	0,20
6	1,953	5,0	10	0,10

Análisis Estadístico

Los valores experimentales obtenidos se presentan como Promedio \pm Desviación Estándar de todas las mediciones. Se realizó el análisis de varianza ANOVA, Mediante el software Statgraphics Centurion XV.

Este programa compara los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, realizando varios métodos estadísticos. Uno de los métodos empleados fue el análisis de la varianza o ANOVA mediante el cual se comprueba si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos, con un nivel de confianza del 95%. Cuando el test ANOVA demuestra la existencia de diferencias estadísticas significativas, se aplica el test de Rangos Múltiples el cual indica qué medias son significativamente diferentes unas de otras, con el propósito de diferenciar un efecto significativo entre las concentraciones de cada ensayo.

RESULTADOS

Recolección y secado

Como resultado de la recolección manual se obtuvo 1.632,4 g de hojas frescas las que se secaron por medio de liofilización o calor seco obteniéndose los rendimientos por grupo que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla N°5: Rendimiento del proceso de secado por liofilización y calor seco de *Buddleja* sp, para controles y muestras irradiadas.

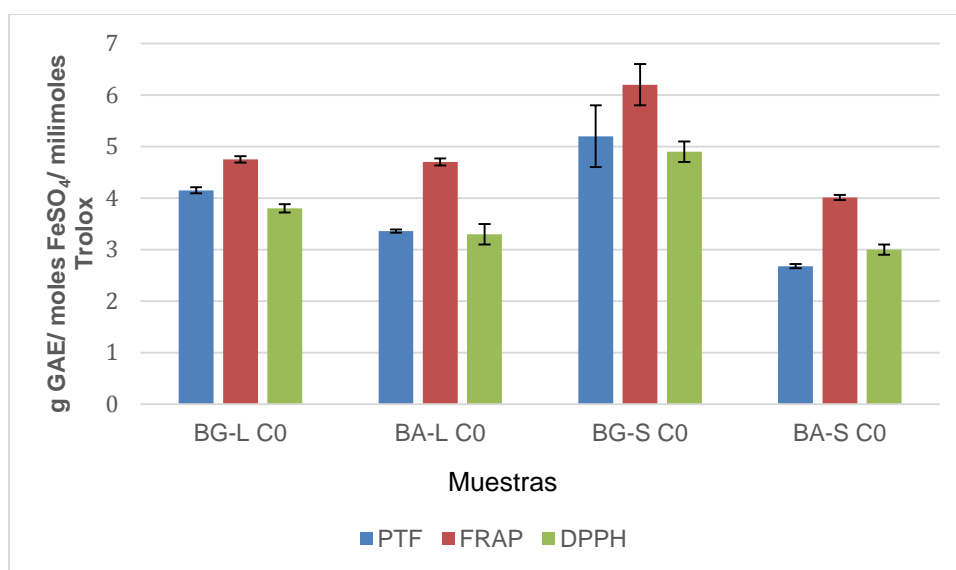
Grupo	Peso hojas frescas (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
BG-L C ₀	257,15	88,53	65,57	34,43
BG-L C ₀₀	242,28	87,05	64,07	35,93
BG-L M ₂	138,81	50,75	63,44	36,56
BG-L M ₃	229,77	86,10	62,53	37,47
BA-L C ₀	150,8	44,05	70,79	29,21
BA-L C ₀₀	97,83	27,18	72,22	27,78
BA-L M ₂	114,26	33,40	70,77	29,23
BA-L M ₃	94,17	28,96	69,25	30,75
BG-S C ₀	50,61	19,31	61,85	38,15
BG-S C ₀₀	50,70	18,35	63,81	36,19
BG-S M ₂	50,09	19,22	61,63	38,37
BG-S M ₃	50,08	19,57	60,92	39,08
BA-S C ₀	23,54	5,54	76,47	23,53
BA-S C ₀₀	23,20	5,20	77,59	22,41
BA-S M ₂	27,41	6,25	77,20	22,80
BA-S M ₃	31,70	7,15	77,44	22,56

La Tabla N°5 muestra que los rendimientos de *Buddleja globosa* Hope (BG) secadas por liofilización o calor seco presentaron resultados muy similares, mientras que para *Buddleja americana* (BA) secada por calor, el rendimiento fue menor que cuando fue liofilizada. Si comparamos las dos especies, BG obtuvo un rendimiento mayor que BA.

Efecto del tipo de secado en el contenido de Polifenoles totales (PFT) y capacidad antioxidante (CAOX) de *Buddleja* sp.

Con el objetivo de comparar el secado en ambas especies se utilizaron las muestras sin irradiación y sin incubación, lo que se resume en el Gráfico N°1.

Gráfico N°1: PFT y CAOX de los extractos de hojas de *Buddleja* sp sin irradiar postcosecha y sin incubación (Grupos C₀), secada por liofilización o calor seco.



El Gráfico N°1 muestra que el contenido de PFT fue mayor para *BG*. Se observa que el tipo de secado influyó en el contenido de PFT siendo mayor en *BG* sometida a calor seco mientras que para *BA* fue mayor al ser liofilizada. La CAOX por FRAP y DPPH fue mayor en *BG* cuando fue sometida a calor seco y menor en *BG* liofilizada, mientras que en *BA* fue mayor al ser liofilizada y menor cuando fue sometida a calor seco.

Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (PFT) en las muestras de *BG* y *BA* sometidas a secado por liofilización o calor seco, se obtuvieron a partir de la interpolación de los datos de absorbancia en la curva de calibrado representada en la Tabla N°9 y en el Gráfico N°4 contenidos en el ANEXO 1.

La Tabla N°6 muestra que el PFT disminuyó en ambas especies liofilizadas y en *BG* sometida a calor seco después de la incubación, mientras que en *BA* hubo un aumento en la muestra sometida a calor seco después de ser incubada. También se puede observar que el contenido de PFT aumentó en muestras liofilizadas y sometidas a calor seco de *BG* y *BA*, aunque en distintas magnitud con la dosis más bajas de irradiancia, disminuyendo a mayor dosis de irradiancia para *BG* liofilizada y *BA* sometida a calor seco.

Tabla N°6: Polifenoles totales de extractos de hojas de *Buddleja* sp irradiada y sin irradiar postcosecha y secadas por liofilización y calor seco.

Polifenoles totales (g de ácido gálico/ 100 g de muestra b.s.)				
Grupos	Liofilizado		Calor seco	
	<i>Buddleja</i> <i>Globosa</i> Hope	<i>Buddleja</i> <i>americana</i> L.	<i>Buddleja</i> <i>globosa</i> Hope	<i>Buddleja</i> <i>americana</i> L.
C₀	4,15±0,06 ^c	3,36±0,03 ^{a, c}	5,2±0,6 ^{a, c}	2,68±0,04 ^c
C₀₀	4,06±0,05 ^{b, c}	3,1±0,1 ^{a, c}	4,86±0,09 ^{a, b, c}	2,8±0,3 ^c
M₂	4,4±0,1 ^{b, c}	3,73±0,05 ^{b, c}	5,7±0,2 ^{a, b, c}	2,9±0,2 ^c
M₃	4,05±0,1 ^{b, c}	3,98±0,03 ^{b, c}	5,7±0,4 ^{a, c}	2,7±0,1 ^c

* a: Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de grupos control (C₀ y C₀₀) b: Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de tratamientos UV-B bajo las mismas condiciones de incubación; c: Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de la misma especie con distinto secado.

Determinación capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CAOX) medida por el método FRAP de las muestras de *BG* y *BA* sometidas a secado por liofilización o calor seco, se obtuvieron a partir de la interpolación de los datos de absorbancia en la curva de calibrado representada en la Tabla N°10 y en el Gráfico N°5 contenidos en el ANEXO 2.

En la Tabla N°7 se puede apreciar que al incubar (C₀₀) la CAOX disminuyó para *BA* liofilizada y *BG* secada por calor seco, y aumenta para *BA* sometida a calor seco. En las muestras incubadas e irradiadas la CAOX aumentó a medida que aumentó la dosis de irradiancia solo para *BA* liofilizada, y para *BG* liofilizada y sometida a calor seco solo aumentó en la primera dosis de irradiancia.

Tabla N°7: Capacidad antioxidante según FRAP de extractos de hojas de *Buddleja* sp irradiada y sin irradiar postcosecha y posterior secado por liofilización o calor seco.

FRAP (moles FeSO ₄ /100 g de muestra en b.s.)				
Grupos	Liofilizado (-L)		Calor seco (-S)	
	<i>Buddleja globosa</i> Hope	<i>Buddleja americana</i> L.	<i>Buddleja globosa</i> Hope	<i>Buddleja americana</i> L.
C₀	4,75±0,06 ^c	4,70±0,07 ^{a, c}	6,2±0,4 ^{a, c}	4,01±0,05 ^{a, c}
C₀₀	4,73±0,05 ^{b, c}	4,15±0,06 ^{a, b, c}	5,2±0,2 ^{a, b, c}	4,6±0,2 ^{a, c}
M₂	5,8±0,2 ^{b, c}	4,69±0,09 ^b	6,8±0,2 ^{b, c}	4,5±0,2
M₃	4,99±0,06 ^{b, c}	5,2±0,1 ^{b, c}	6,61±0,03 ^{b, c}	4,4±0,07 ^c

* **a:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de grupos control (C0 y C00) **b:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de tratamientos UV-B bajo las mismas condiciones de incubación; **c:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de la misma especie con distinto secado.

La CAOX medida por el método DPPH en las muestras de *BG* y *BA* sometidas a secado por liofilización o calor seco, se obtuvieron a partir de la interpolación de los datos de absorbancia en la curva de calibrado representada en la Tabla N°11 y en el Gráfico N°6 contenidos en el ANEXO 3.

En la Tabla N°8 se puede apreciar que la CAOX aumentó en función de la dosis de irradiancia en la *BA* liofilizada y aumento a dosis baja de irradiancia en *BG* sometida a calor seco.

Tabla N°8: Capacidad antioxidante DPPH de extractos de hojas de *Buddleja* sp con y sin irradiación postcosecha y posterior secado por liofilización y calor seco.

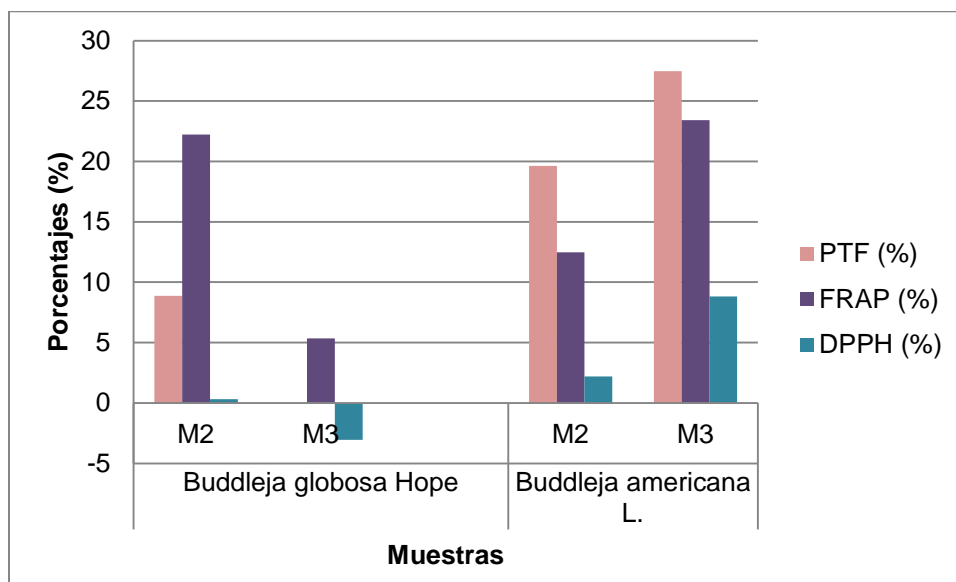
DPPH (milimoles Trolox/ 100 g muestra en b.s)				
Grupos	Liofilizado (-L)		Calor seco (-S)	
	<i>Buddleja globosa</i> Hope (<i>BG</i>)	<i>Buddleja americana</i> L. (<i>BA</i>)	<i>Buddleja globosa</i> Hope (<i>BG</i>)	<i>Buddleja americana</i> L. (<i>BA</i>)
C₀	3,80±0,08 ^c	3,3±0,2 ^{a, c}	4,9±0,2 ^{a, c}	3,0±0,1 ^c
C₀₀	3,9±0,2	3,3±0,1 ^{a, c}	4,02±0,03 ^{a, b}	3,1±0,1 ^c
M₂	3,90±0,07 ^c	3,4±0,2 ^c	4,63±0,03 ^{b, c}	3,10±0,05 ^{a, c}
M₃	3,8±0,1 ^c	3,6±0,3 ^c	4,3±0,3 ^{b, c}	3,04±0,05 ^c

* **a:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de grupos control (C0 y C00) **b:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de tratamientos UV-B bajo las mismas condiciones de incubación; **c:** Comparación estadísticamente significativa (P>0,05) de la misma especie con distinto secado.

Comparación de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en base a variación porcentual con respecto a grupo control incubado (C₀₀).

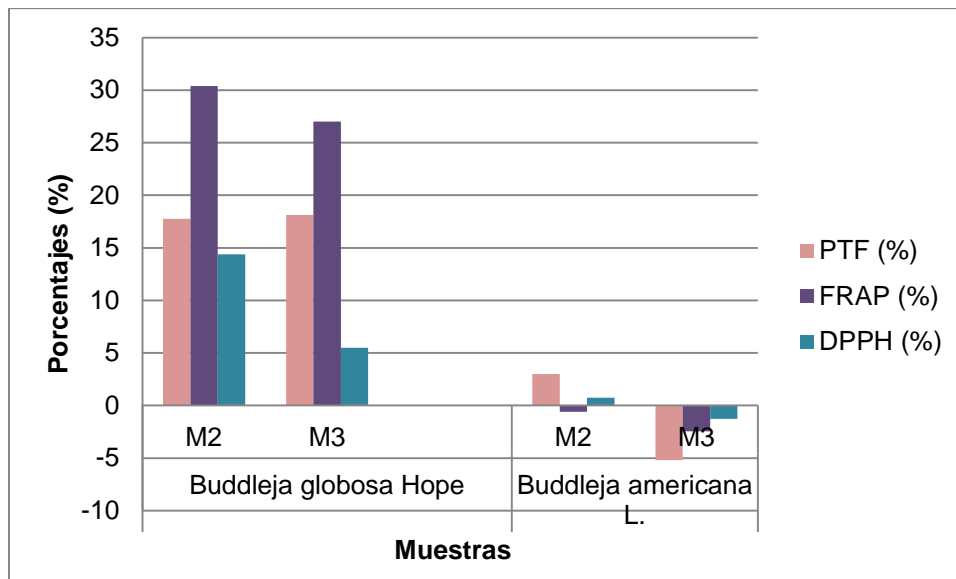
El Gráfico N°2 indica que en la muestras incubadas los PFT aumentaron a la dosis más baja de irradiancia y disminuyeron a la dosis más alta en *BG*, mientras que para la especie *BA*, los PFT aumentaron en función de la dosis de irradiancia. La CAOX según método FRAP aumentó en *BG* a la dosis de irradiancia más baja y disminuyó en la dosis de irradiancia más alta, en cambio en *BA* se observó un aumento en función de la dosis de irradiancia. También se observó aumento de la capacidad antioxidante por DPPH en función de la dosis de irradiación para *BA*.

Gráfico N°2: Variación porcentual de PFT y CAOX de *Buddleja* sp irradiadas, secado por liofilización postcosecha con respecto al grupo control C₀₀.



El Gráfico N°3 muestra que los PFT aumentaron en *BG* al irradiar sin diferencia apreciable entre ambas dosis de irradiancia. En la *BA* los PFT disminuyeron al aumentar las dosis de irradiancia. La capacidad antioxidante según el método FRAP en *BG* aumentó a la menor dosis de irradiancia y disminuyó a la mayor. En *BA* la CAOX disminuyó en función del aumento de la irradiancia. La CAOX según DPPH en *BG* aumento a la dosis más baja de irradiancia y disminuyó a la más alta.

Gráfico N°3: Variación porcentual de PFT y CAOX de Buddleja sp irradiadas, secado por calor seco postcosecha con respecto al grupo control C₀₀.



DISCUSIÓN

Varios estudios comprueban que los compuestos benéficos que se pueden obtener de las plantas varían según condiciones climáticas, estacionales y de estrés, lo que hay que tener en cuenta al momento de estudiarlas.

Un estudio de hojas de *Buddleja globosa* Hope cosechadas entre noviembre (mediados de la primavera) y marzo (final del verano) obtuvieron las concentraciones más altas de polifenoles en las cosechadas en noviembre (Vogel et al., 2010). Un efecto similar se observó en estudios anteriores, donde se mostró que los contenidos más altos de flavonoides y taninos se producían en primavera (Vogel et al., 2001). Estudios equivalentes en *Buddleja globosa* Hope mostraron que las propiedades farmacológicas que se evaluaron en extractos de hojas recolectadas en verano y otoño mostraron diferencias significativas, siendo el extracto de hojas recolectadas en verano el más eficaz respecto a las propiedades tanto analgésicas como antiinflamatorias (Backhouse et al., 2008). Esto también guarda relación con los resultados obtenidos en este estudio, si bien todas las hojas se recolectaron en Otoño, las hojas de *Buddleja globosa* Hope (BG) fueron recolectadas más cercana al verano, en cambio las hojas de *Buddleja americana* L. (BA) fueron recolectadas en meses los meses de abril y mayo, mucho más cercano al invierno, lo que pudo generar variaciones en los resultados.

De las dos especies estudiadas se pudo observar que la BG mostró mayor contenido en polifenoles totales (PFT) y capacidad antioxidante (CAOX) mayor que la BA (Gráfico N°1).

Los procesos de secado aplicados a las dos especies de *Buddleja* en estudio permitieron obtener muestras con agua residual entre un 2,8 y 4% al ser liofilizadas, y 4,8 y 8% cuando se utilizó calor seco, cantidad de agua que permite la conservación de ellas. El contenido de agua en drogas vegetales frescas varía entre un 60 y 80% y el proceso de secado debe reducir este contenido a 0,5-12%, esto es de importancia fundamental para permitir la conservación de las características físicas, químicas y farmacológicas del vegetal por períodos prolongados, ya que al ser removidos de sus condiciones naturales, se altera su equilibrio metabólico promoviendo reacciones que producen pérdida de principios activos por procesos tales como hidrólisis de compuestos activos, descomposición enzimática, fotodegradación de compuestos susceptibles, volatilización y contaminación por hongos y/o bacterias entre otros (Sharapin, 2001).

La especie *Buddleja globosa* Hope (*BG*) arrojó rendimientos de materia seca muy similares e independiente del tipo de secado utilizado: 34,43% para *BG-L* C₀ y 38,15% para *BG-S* C₀, a diferencia de *Buddleja americana* L. (*BA*) que obtuvo un rendimiento de materia seca menor y diferente según el tipo de secado: 29,21% para *BA-L* C₀ y 23,53% para *BA-S* C₀ (Tabla N°5).

El porcentaje de pérdida de agua fue distinta para los distintos grupos de trabajo: 65,57% y 61,85% para *BG-L* y *BG-S* C₀ y 70,79% y 76,47% para *BA-L* y *BA-S* C₀ respectivamente (Tabla N°5).

Tanto la diferencia en rendimiento de materia seca y perdida de agua entre las dos especies, la podemos atribuir a las observaciones al momento de hacer la recolección, las hojas de *Buddleja globosa* Hope son más duras y resistentes a la ruptura que las hojas de *Buddleja americana* L., por lo que podrían ser menos susceptible a la perdida de agua y compuestos volátiles como los aceites esenciales, producto de la exposición al calor.

La liofilización es el proceso más efectivo para reducir la cantidad de agua libre contenida en los vegetales y dado que no expone a éstos a condiciones de calor, reduce el riesgo de degradación de los compuestos termolábiles, preserva la estructura molecular de la planta, y reduce las pérdidas de los componentes responsables del aroma y sabor (Márquez y Freire, 2005; Ramírez-Navas, 2006). Este método de secado preservó algunas características organolépticas como el color en ambas especies de *Buddleja* en estudio.

En *BG* secada por calor seco, se observó una mayor concentración de polifenoles totales (PFT) estadísticamente significativa ($P > 0,05$) en todos los grupos ensayados en comparación con muestras liofilizada. *BA* arrojó un resultado contrario, las hojas liofilizadas mostraron una mayor concentración PFT estadísticamente significativa ($P > 0,05$) en todos los grupos en comparación con las muestras secada por calor seco (Tabla N° 6 y Gráfico N°1). Se puede inferir que el tipo de secado debe ser acorde a las características morfológicas del material vegetal, ya que pueden existir diferencias con respecto a la preservación del contenido de compuestos bioactivos en productos liofilizados o secados por calor seco. Se puede deducir entonces que las hojas de *BA* se vieron afectadas por la temperatura, a diferencia de las hojas de *BG* que se vieron favorecidas, en otras palabras, los procesos enzimáticos de las hojas de la especie *BG* no se detuvieron al aplicar calor seco. La liofilización como comprende una etapa de congelación del agua libre podría implicar la detención de los procesos metabólicos del vegetal.

Los resultados muestran que la especie *BG* posee una mayor CAOX al ser sometida a calor seco determinada por FRAP y DDPH, en cambio la *BA* liofilizada presentó mayor CAOX estadísticamente significativo por FRAP que la sometida a calor seco no mostrando diferencia por DDPH (Tabla N° 7 y 8 y Gráfico N°1).

Un estudio realizado en el fruto grosella negra (*Ribes nigrum*), reveló que el proceso de liofilización aumentó el contenido de compuestos fenólicos (Wu et al., 2010). Otro estudio en pimientos semipicantes (*Capsicum annuum*), mostró que el contenido de polifenoles fue más bajo en los extractos liofilizados, y la capacidad antioxidante determinada por DDPH fue mayor para el fruto fresco que para las muestras liofilizadas (Materska, 2014). Esto demuestra que la liofilización no siempre es el método más adecuado para el secado.

Experimentos llevados a cabo con hojas de *BG* que fueron secadas en distintas condiciones (sombra con temperatura ambiental de alrededor de 25°C, expuestas a pleno sol, secadas en horno a distintas temperaturas 40, 60 y 80°C), mostraron que los contenidos más alto en polifenoles se obtuvieron en las hojas secadas en condiciones ambientales protegidas de la luz solar directa, mientras que las hojas secadas a altas temperaturas (60 y 80°C) presentaron bajos contenido en polifenoles (Vogel et al., 2010). Además, este estudio demostró que el secado en horno a temperaturas crecientes afectó solo el contenido de polifenoles, ya que el mejor efecto de protección antioxidante se obtuvo incluso a la temperatura más alta (80°C), a pesar de que se cree que estas condiciones disminuyen la calidad de las plantas medicinales (Vogel et al., 2010). Los autores del estudio mencionados proponen que probablemente, los polifenoles que no se ven afectados por el secado en horno, son los implicados en el efecto antioxidante sobre los componentes de la membrana, que pueden ser polifenoles lipófilicos más estables, además, las condiciones de estrés no afectan a los polifenoles de la misma manera debido a sus diferentes características físicas y químicas (Vogel et al., 2010). En nuestro estudio la *BG* secada a 40°C obtuvo mejores resultados que la liofilizada, a diferencia de *BA* que, si bien se vio afectada por el secado convencional respecto del contenido fenólico, no así su capacidad antioxidante la que solo disminuyó escasamente según DPPH.

Se usaron dos controles de material vegetal sin irradiar para cada una de las especies: C₀ (grupo control sin irradiar y sin incubar) y C₀₀ (grupo control sin irradiar e incubado por 5 días en oscuridad) a 20°C y 38-45% HR, esto con la finalidad de evaluar el efecto de la cosecha y postcosecha en la estimulación del metabolismo secundario de las hojas.

Las muestras de *BG* y *BA* al ser incubadas en general mostraron una disminución de PFT y CAOx, exceptuando la *BA* sometida a calor seco la cual mostró un aumento en estos dos parámetros. Estos resultados difieren con otros estudios donde se ha registrado un aumento en el contenido de fenoles totales en frutas y vegetales incubados por períodos de hasta 8 días (Du et al., 2012; Surjadinata y Cisneros-Zevallos, 2012). El aumento en polifenoles podría ser atribuido al estrés sufrido al momento de sacarlo de su hábitat natural, lo cual estimularía su metabolismo secundario (Du et al., 2012).

Efecto de la irradiación en el contenido de polifenoles totales

Al evaluar el efecto que tuvo la irradiación en muestras incubadas sometidas a calor seco o liofilización, se pudo observar que en la *BG* liofilizada los PFT aumentaron significativamente ($P > 0,05$) solo en la primera dosis de irradiación, disminuyendo a la dosis más alta de irradiación también de manera significativa ($P > 0,05$). En *BG* secada por calor seco se muestra, un incremento estadísticamente significativo ($P > 0,05$) de PFT a la primera dosis de irradiación la que se mantuvo a la dosis más alta dosis de irradiación. En *BA* liofilizada, se observa un aumento de PFT estadísticamente significativo ($P > 0,05$) al aumentar la dosis de irradiación, mientras que cuando fue sometida a calor seco, si bien hubo un aumento de PFT al irradiar, este es escaso y además disminuye al aumentar la dosis de irradiación (Tabla N°6, Gráfico N°2 y 3). Esto comprueba que el calor seco pudo haber afectado una especie más que la otra por las características propias de la hoja y la liofilización pudo haber tenido algún efecto en los procesos metabólicos de las especies.

Una de las respuestas observadas con mayor frecuencia ante la radiación UV es la biosíntesis de flavonoides y derivados del ácido hidroxicinámico, ya que plantas expuestas a UV-B presentan niveles mejorados de flavonoides intracelulares (Gerhardt et al., 2008; Dolzhenko et al., 2010). La radiación UV-B, involucraría cambios a nivel de la expresión génica, modulación de la actividad enzimática, y biosíntesis y acumulación de compuestos absorbentes de radiación en células epidermales de los vegetales (Dolzhenko et al., 2010; Vera et al., 2014).

La biosíntesis de flavonoides se regula a través de un conjunto complejo de vías enzimáticas que involucran múltiples fotorreceptores (Wade et al., 2001); y los ROS han sido implicadas en esta vía de señalización (Babu et al., 2003). Las plantas perciben y responden a la radiación UV-B a través de un fotorreceptor de radiación UV-B, el UVR8 (UV Resistance Locus 8) el cual desempeña funciones importantes en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, aumento de la producción y acumulación de componentes activos relacionados con la defensa de estas, tales

como flavonoides, alcaloides y lignina; componentes de real importancia en las plantas medicinales (Yang et al., 2018).

La actividad antioxidante de un compuesto fenólico específico está relacionada con el número de grupos hidroxilo disponibles presentes en la estructura química (Rice-Evans et al., 1996), neutralizando radicales libres en función de la concentración que alcanzan, pudiendo además actuar de manera sinérgica o antagónica entre sí (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009), lo que puede dar cuenta de los resultados.

El grado de variación en la concentración de compuestos fenólicos depende en gran medida de las dosis de radiación a las que se sometan las plantas, por ejemplo, dosis moderadas y bajas de radiación pueden causar aumento en la concentración de flavonoides, en cambio altas dosis pueden causar una disminución de estos mismos compuestos (Middleton y Teramura, 1993; Vera et al., 2014). Esto se vio reflejado en algunos resultados de este estudio ya que al aumentar la dosis de radiación no siempre se presentó una mejoría en los resultados, por lo que el estrés por radiación debe ser un factor bien controlado.

Diversos estudios muestran un incremento significativo de PFT producto de la radiación UV-B. Estudios en menta (*Mentha piperita* L.) expuesta a radiación UV-B, arrojan resultados similares a los de este estudio, encontrándose que la composición total de fenoles aumentaba después de la irradiación. Los análisis revelaron la presencia de flavonoides absorbentes de UV-B como eriocitrina, hesperidina y kaempferol 7-O-rutinósido, que aumentaron significativamente en las plantas irradiadas (Dolzhenko et al., 2010). Estudios realizados en plantas de acelga (*Beta vulgaris* var) sometidas a radiación UV-B, mostraron un mayor contenido fenólico respecto a las plantas sin irradiar y con porcentajes de aumento de entre un 35, 50 y 60%, respecto al control (Vera et al., 2014). En albahaca (*Ocimum basilicum* L.) se observó de igual manera que plantas sometidas a radiación UV-B, aumentaron significativamente la concentración fenólica total y prácticamente triplicaron el contenido de eugenol (Schnitzler y Nitz, 2004).

Estudios en plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) expuestas a radiación UV-B mostraron que la radiación UV-B favorece el metabolismo secundario de las plantas, así a una dosis baja y moderada de UV-B (1 y 2 kJ m⁻² d⁻¹) se mejoró el crecimiento de las plantas y el contenido de sustancias del metabolismo secundario, mientras a dosis más alta, (6 kJ m⁻² d⁻¹) el potencial antioxidante y fotosintético se redujo (Heuberger et al., 2004). Esto último guarda estrecha relación con lo mencionado por Middleton y Teramura, (1993) y los resultados obtenidos en el presente estudio,

donde mayor dosis de radiación no necesariamente implica una mejoría en los resultados.

La exposición a la radiación UV-B puede dar diferentes tipos de respuestas, así plantas de papa respondieron a la radiación UV-B desarrollando hojas más gruesas y aumentando en ellas el nivel de flavonoides (Santos et al., 2004). A pesar de que estos estudios se realizan en plantas enteras se correlacionan con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Efecto de la irradiación en la de Capacidad Antioxidante

Los ensayos realizados (FRAP y DPPH) están basados en la transferencia de electrones, estos involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. Estos ensayos fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang et al., 2005). Se diferencian en que el primero evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) y el segundo basa en la premisa de que un donante de hidrógeno es un antioxidante, utilizando un radical DPPH•.

- FRAP:

Al determinar la CAOX por FRAP, la *BG* liofilizada mostró un aumento estadísticamente significativo ($P>0,05$) a la menor dosis de irradiancia y una disminución estadísticamente significativa a las dosis más alta. En *BG* secada por calor seco hubo un incremento estadísticamente significativo ($P>0,05$) de CAOX a ambas dosis de irradiancia, pero levemente mayor a la dosis de irradiancia más baja. En *BA* liofilizada, se observa un aumento estadísticamente significativo ($P>0,05$) al aumentar la dosis de irradiancia y al ser sometida a calor seco hubo una disminución a medida que aumenta la dosis de radiación (Tabla N°7, Gráfico N°2 y 3)

Estudios realizados en acelgas (*Beta vulgaris* var.) donde se midió la capacidad antioxidante bajo la metodología de FRAP y DPPH, las hojas respondieron a las dosis de radiación aplicada aumentando su capacidad antioxidante. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad antioxidante entre los distintos niveles de radiación UV-B. Solo se reflejaron diferencias para las distintas especies de acelga, donde el cultivar de acelga Oriole (nervadura amarilla) aumentó entre un 15 a 19% su actividad antioxidante, en cambio el cultivar SCR 107

(nervadura roja), aparentemente más sensible a este estímulo, aumentó entre un 20 y 24% su actividad con respecto al control (Vera et al., 2014).

Otros estudios realizados en arándanos frescos con el objetivo de evaluar los efectos de la luz PUV (Luz ultravioleta pulsada) en la capacidad antioxidante y actividad enzimática antioxidante, a diferentes períodos de tiempo de irradiación (30, 60, 90 y 120 s) mostró que los arándanos tratados durante 60 s y 90 s tuvieron un FRAP más alto que el grupo de control y los tratados durante 30 s y 120 s hubo una disminución del FRAP, pero solo los arándanos expuesto durante 120 s tuvieron una disminución significativa en comparación con las muestras no tratadas ($P \leq 0,05$) (Güner y Topalcengiz, 2018).

- DPPH:

En la capacidad antioxidante bajo la metodología DPPH *BG* liofilizada y *BA* secada por calor seco no arrojan ningún aumento bajo ninguna dosis de irradiancia. En *BG* secada por calor seco se muestra un incremento estadísticamente significativo ($P > 0,05$) de CAOX a la menor dosis de irradiancia y una disminución estadísticamente significativa a la mayor irradiancia. En *BA* liofilizada se observa un aumento no estadísticamente significativo ($P < 0,05$) de CAOX a medida que aumento la dosis de irradiancia. (Tabla N°8, Gráfico 2 y 3).

Con el objetivo de evaluar el aumento en la capacidad antioxidante medida por DPPH por aplicación de radiación UV-B en dos especies de lechugas “baby” hidropónicas ‘Kristine n RZ’ (verde) y ‘Versai RZ’ (rojo), se emplearon tres tratamientos de radiación UV-B, de 16, 33 y 58 μWcm^{-2} por 30 minutos diarios durante 10 durante días. Las hojas externas se cosecharon manteniendo dos centrales para el segundo periodo de irradiación y posterior cosecha. Se observó una mayor capacidad antioxidante por parte del cultivar ‘Versai RZ’ respecto a ‘Kristine RZ’ en todas las intensidades de radiación UV-B en las dos cosechas, aunque en ambos cultivares se observó un aumento de la capacidad antioxidante (Rivera et al., 2016).

El estudio realizado en arándanos frescos mencionado anteriormente, al medir la CAOX por DPPH al ser tratados con PUV (luz ultravioleta pulsada), por diferentes períodos de tiempo no mostraron diferencias significativas con respecto al control ($P > 0,05$) (Güner y Topalcengiz, 2018).

Los resultados de este estudio muestran que el estrés inducido por la radiación UV-B estimularía la síntesis de compuestos fenólicos que aportarían a la defensa antioxidante de la planta, pero este aumento de la intensidad no siempre es

beneficioso. Un vegetal con un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en teoría debería presentar una mayor actividad antioxidante, sin embargo, esto no siempre ocurre. La capacidad antioxidante de una planta no sólo se debe al aumento de compuestos fenólicos, sino que también, a otros factores tanto cualitativos como cuantitativos; la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes y la presencia de otros compuestos con actividad pro-oxidativa, además de una mezcla de compuestos fenólicos, podría interferir en los potenciales resultados de capacidad antioxidante (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009; Shen et al., 2013).

En este estudio se pudo observar que el tipo de secado influyó en la cantidad de PFT por lo que es un factor muy importante que considerar si se desea utilizar esta planta con fines beneficiosos, por otro lado, se pudo comprobar que la incubación tuvo un efecto negativo en el contenido de polifenoles. El contenido de polifenoles se relaciona con capacidad antioxidante, por lo que el tipo de secado e incubación podrían disminuir las propiedades beneficiosas de las plantas. En este estudio además se pudo visualizar que el contenido de PFT y CAOX aumentó a dosis baja de irradiación lo que se puede considerar un efecto positivo.

Para una correcta utilización de estrés abiótico postcosecha, se hacen necesarios más estudios acerca de los beneficios que estos pueden aportar. En el caso de la radiación UV se hace necesario estudiar no solo los efectos benéficos, sino que también los efectos negativos que pudiese tener esta condición en la generación de compuestos no deseados, esto con el fin de asegurar la inocuidad y la mantención de las características organolépticas y bioactivas deseadas evitando cambios en la calidad de la planta (Cisneros-Zevallos, 2003; Rossi et al., 2009).

CONCLUSIONES

- La incubación de las hojas de *Buddleja globosa* Hope secada por liofilización y calor seco y *Buddleja americana* L. secada por liofilización resultó en una disminución de PTF y CAOX. Las hojas de *Buddleja americana* L. secadas por calor seco, obtuvieron un aumento en las concentraciones producto de la incubación.
- El secado por calor seco de *Buddleja globosa* Hope mostró mayores valores para PFT y CAOX que el secado por liofilización, por lo que sería el mejor método para esta especie. Las hojas de *Buddleja americana* L. liofilizadas obtuvieron mayores concentraciones que las secada por calor seco, por lo que esta especie se vería mucho más afectada por el efecto de la temperatura que *Buddleja globosa* Hope.
- La radiación UV-B aplicada a hojas frescas tanto de *Buddleja globosa* Hope, como *Buddleja americana* L. produce un aumento en el contenido de PFT y CAOX, pero este efecto no es proporcional al incremento de la dosis de radiación utilizada y depende de cada especie.
- *Buddleja americana* L. presenta menores concentraciones de PFT y CAOX que *Buddleja globosa* Hope, información desconocida al inicio de este estudio y podría ser la base de futuras investigaciones.
- La aplicación de radiación UV-B a hojas frescas de *Buddleja sp* podría ser considerada una alternativa tecnológica para mejorar sus propiedades benéficas pudiendo extenderse esta aplicación a otras hierbas medicinales de uso tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade-Cuvi, M. J., Moreno-Guerrero, C., Henríquez-Bucheli, A., Gómez-Gordillo, A., & Concellón, A. (2010). Influencia de la radiación UV-C como tratamiento postcosecha sobre carambola (*Averrhoa carambola* L.) mínimamente procesada almacenada en refrigeración. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(1).

Avella, D. M. G., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del Simposio de Metrología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro.

Babu, T. S., Akhtar, T. A., Lampi, M. A., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2003). Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and Cell Physiology*, 44(12), 1320-1329.

Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C, Farías, M., Goñy, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., Miranda, H. (2008). "Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain". *J. Ethnopharmacol.*, 119: 160– 165.

Benzie, I., Strain, J. (1996). "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay". *Anal. Biochem.* Vol. 239, 1: 70– 76.

Bravo, L. (1998). "Polyphenols Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance". *Nut. Rev.* Vol. 56, 11: 317- 333.

Byers, T., & Guerrero, N. (1995). Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1385S-1392S.

Cadwell, M., Robberecht, R., Flint, S. (1983). "Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants". *Physiol. Plant.* 58, 3: 445- 450.

Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., & Kulandaivelu, G. (2007). Terrestrial ecosystems increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 252-266.

Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 59-76.

Cisneros-Zevallos L. (2003). "The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables". *J Food Sci.* Vol. 68, 5: 1560–1565.

Díaz-Rivas, J. O., Herrera-Carrera, E., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R. & Gallegos-Corona, M. A. (2015). Gastroprotective potential of *Buddleja scordioides* Kunth Scrophulariaceae infusions; effects into the modulation of antioxidant enzymes and inflammation markers in an in vivo model. *J. ethnopharmacol.*, 169, 280-286.

Dixon, R., Paiva, N. (1995). "Stress-induced phenylpropanoid metabolism". *Plant Cell*, 7: 1085-1097.

Dolzhenko, Y., Berteza, C. M., Occhipinti, A., Bossi, S., & Maffei, M. E. (2010). UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha piperita* L.). *J. Photochem. Photobiol. B.*, 100(2), 67-75

Du, W. X., Avena-Bustillos, R. J., Breksa III, A. P., & McHugh, T. H. (2012). Effect of UV-B light and different cutting styles on antioxidant enhancement of commercial fresh-cut carrot products. *Food Chem.*, 134(4), 1862-1869.

Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Molecular aspects of medicine", 31(6), 435-445.

Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). "Determinations in proteins on tyrosine and tryptophane". *J. Biol. Chem.*, 73: 627- 650.

Gerhardt, K. E., Lampi, M. A., & Greenberg, B. M. (2008). The effects of far-red light on plant growth and flavonoid accumulation in *Brassica napus* in the presence of ultraviolet B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1445-1454.

Güner, S., y Topalcengiz, Z. (2018). Efecto de la luz ultravioleta pulsada sobre la carga microbiana natural y las propiedades antioxidantes de los arándanos frescos. *Revista turca de agricultura, ciencia y tecnología de los alimentos*, 6(6), 733-739.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.

Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., & Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem.*, 104(1), 87-92.

Heuberger, H., Praeger, U., Georgi, M., Schirmacher, G., Grasmann, J., & Schnitzler, W. H. (2004, March). Precision stressing by UV-B radiation to improve quality of spinach under protected cultivation. In *VII International Symposium on Protected*

Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition 659 (pp. 201-206).

Hollós, F. (2002). "Effects of ultraviolet radiation on plant cells". *Micron* 33:179-197.

Houghton, P. J. (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *J. Ethnopharmacol.*, 11(3), 293-308.

Houghton, P. J., & Hikino, H. (1989). Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja species*. *Planta Med.*, 55(02), 123-126.

Houghton, P. J., Woldemariam, T. Z., Candau, M., Barnardo, A., Khen-Alafun, O., & Shangxiao, L. (1996). Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. *Phytochemistry*, 42(2), 485-488.

Houghton, P. J., Mensah, A. Y., Iessa, N., & Hong, L. Y. (2003). Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry*, 64(2), 385-393.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 1841-1856.

ISO 14502-1 (2005). "Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent".

Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J. Food Sc.*, 74(9), R107-R113.

Liao, Y., Houghton, P., Hault, J. (1999). "Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation". *J. Nat. Prod.*, 62: 1241- 1245.

Materska, M. (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annum* L.). *Journal of Functional Foods*, 7, 269-277.

Marqués, LG, y Freire, JT (2005). Análisis de la liofilización de frutas tropicales. *Tecnología de secado*, 23 (9-11), 2169-2184.

Meloni, D., & Gulotta, M., & Oliva Cano, M. (2008). El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). *Quebracho - Revista de Ciencias Forestales*, (15), 27-31.

- Mensah, A., Sampson, J., Houghton, P., Hylands, P., Wesbrook, J., Dunn, M., Hughes, M., Cherry, G. (2001). "Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing". *J. Ethnopharmacol.*, 77: 219- 226.
- Middleton, E. M., & Teramura, A. H. (1993). The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant physiology*, 103(3), 741-752.
- Pardo, F., Perich, F., Villarroel, L., & Torres, R. (1993). Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *J. ethnopharmacol*, 39(3), 221-222.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 46(7), 2686-2693.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*, 53(10), 4290-4302.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramírez-Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. Liofilización de alimentos. Volumen n° 6. Editorial ReCiTelA
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rivera, L., Tapia, M., Luchsinger, L., Rodríguez, S., y Escalona, V. (2016). tratamientos precosecha de radiación ultravioleta-b para aumentar la calidad funcional de lechugas "baby" HIDROPÓNICAS. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(2).
- Rossi, L., Watson, D., Escandarani, S., Miranda, A., & Troncoso, A. (2009). La radiación a la mesa. *Revista chilena de infectología*, 26(4), 318-330.
- Rugna, A., Ricco, R., Gurni, A., & Wagner, M. (2007). Efectos de la Radiación Solar sobre la Producción de Polifenoles en ejemplares femeninos de *Smilax Campestris Griseb.-Smilacaceae*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(3), 420.

- Sáez, I., (2015). Efecto de la radiación UV- B en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojas de *Buddleja globosa* Hope. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso, Chile.
- Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J. M., & Salema, R. (2004). Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*, 167(4), 925-935.
- Schnitzler, W. H., & Nitz, G. M. (2004). Effect of PAR and UV-B radiation on the quality and quantity of the essential oil in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). In *VII International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition 659* (pp. 375-381).
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. (2003). "La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas". *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 21: 355-363.
- Shen, Y., Sun, Y., Qiao, L., Chen, J., Liu, D., & Ye, X. (2013). Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed Satsuma mandarin during refrigerated storage. *Postharvest biology and technology*, 76, 50-57.
- Surjadinata, BB, y Cisneros-Zevallos, L. (2012). La biosíntesis de los antioxidantes fenólicos en el tejido de la zanahoria aumenta con la intensidad de la herida. *Química de los alimentos*, 134 (2), 615-624.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chem.*, 113(4), 1202-1205.
- Sharapin, N. (2001). Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia*, 1(3), 197-203.
- Surjadinata, B., Cisneros-Zevallos, L. (2012). "Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity". *Food Chem.*, 134: 615– 624.
- Vera, C., Hinojosa, A., Tapia, M. L., Gonzalez, D., Bustamante, A., Luchsinger, L., & Escalona, V. (2014). Efecto de la radiación UV-B sobre los pigmentos y compuestos funcionales en dos cultivares de acelga "tipo baby". *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 15(2).
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11), 5315-5321.
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. M., & Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 341(2), 68-75.

- Vogel, H., Doll, U., Razmilic, I., & San Martín, J. (2001, July). Domestication studies of matico (*Buddleja globosa* Hope). In *International Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant* 576 (pp. 203-206).
- Vogel, H., Razmilic Bonilla, I., Polanco González, X., & Letelier Muñoz, M. E. (2010). Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in *Buddleja globosa* leaves. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(5).
- Wade, H. K., Bibikova, T. N., Valentine, W. J., & Jenkins, G. I. (2001). Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *The Plant Journal*, 25(6), 675-685.
- Wargovich, M. J. (2000). Anticancer properties of fruits and vegetables. *HortScience*, 35(4), 573-575.
- Wu, R., Frei, B., Kennedy, J. A., & Zhao, Y. (2010). Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries. *LWT-Food Science and Technology*, 43(8), 1253-1264.
- Yang, Y., Liang, T., Zhang, L., Shao, K., Gu, X., Shang, R. & Liu, H. (2018). UVR8 interacts with WRKY36 to regulate HY5 transcription and hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Nature plants*, 4(2), 98.
- Zepp, R. G., Erickson Iii, D. J., Paul, N. D., & Sulzberger, B. (2007). Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 286-300.

ANEXOS

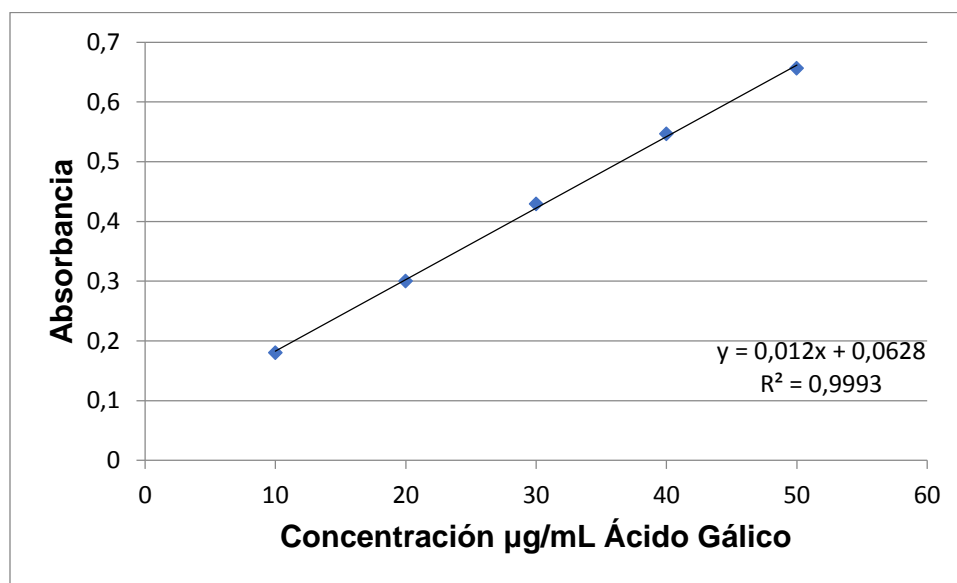
ANEXO 1

Curva de calibrado Ácido Gálico

Tabla N°9: Concentración v/s Absorbancia para Ácido Gálico.

Punto	Concentración (µg/mL)	Absorbancia
1	10	0,1801
2	20	0,3001
3	30	0,4287
4	40	0,5462
5	50	0,6562

Grafico N°4: Curva de calibrado Ácido Gálico.



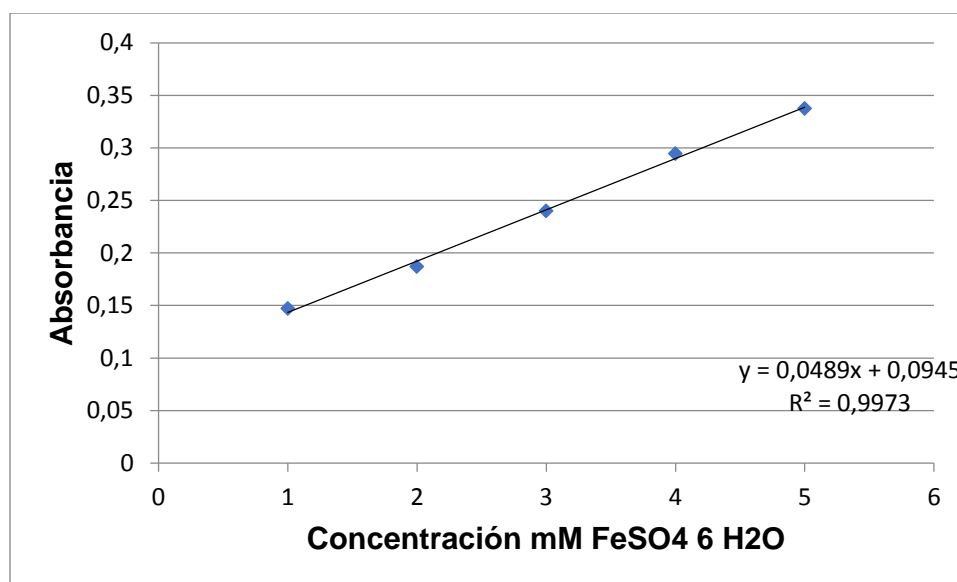
ANEXO 2

Curva de calibrado FeSO₄·6 H₂O.

Tabla N°10: Concentración v/s Absorbancia de FeSO₄·6 H₂O.

Punto	Concentración mM	Absorbancia
1	0,02	0,1469
2	0,08	0,1868
3	0,16	0,2397
4	0,24	0,2944
5	0,32	0,3374

Grafico N°4: Curva de calibrado FeSO₄·6 H₂O.



ANEXO 3

Curva de calibrado Trolox.

Tabla N°11: Concentración v/s Absorbancia de Trolox.

Punto	Concentración (µg/mL)	Absorbancia
1	3,125	0,1250
2	1,5625	0,2456
3	0,7813	0,3161
4	0,3963	0,3483
5	0,1953	0,3586

Grafico N°4: Curva de calibrado Trolox.

