

## **Comportamiento antioxidante y polifenólico de la guaviduca (*Piper carpunya L*) en la extracción seca y húmeda**

Miguel Enríquez\*, Manuel Pérez

Universidad Estatal Amazónica. Departamento de Ciencias de la Tierra. Km. 2½, vía Puyo a Tena (Paso Lateral). Tel. (+593) 32-888-118 / 32-889-118. Código Postal: 160150. Puyo, Ecuador.

\*E-mail address: menriquez@uea.edu.ec

### **RESUMEN**

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en diferentes partes de las plantas, pudiendo ser extraídos de hojas, tallos, flores y/o raíces. Son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles. Los provenientes de especias y condimentos son cada vez más utilizados en la industria de los alimentos y farmacéutica. En el presente trabajo se determinó el comportamiento polifenólico y antioxidante de la Guaviduca, con hojas húmedas y secas, estas especies, provenientes de la región subtropical de la Provincia de Chimborazo, Cantón Pallatanga, por medio de la actividad polifenólica mediante Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante total según FRAP (Ferric ion reducing antioxidant Power) y ABTS (Ácido 2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico). El método de extracción de aceites esenciales utilizado para esta investigación fue la destilación por arrastre con vapor, empleando reflujo con una trampa de Clevenger para separar los aceites más ligeros que el agua. Se determinó cuantitativamente el rendimiento del aceite esencial a partir del peso húmedo y seco de la especie vegetal. Se empleó un diseño Simplex-Lattice para determinar los puntos de medición de actividad antioxidante (proporciones de los aceites esenciales). Se observa un valor elevado de antioxidante en la muestra seca de guaviduca. Este comportamiento puede deberse a la degradación de compuestos activos con actividad antioxidante y a la pérdida de aceites esenciales por el proceso de evaporación durante el secado.

**Palabras clave:** *Guaviduca, aceites esenciales, Folin-Ciocalteu, FRAP, ABTS.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Se puede afirmar que el uso de plantas medicinales nació con el hombre, desde tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX, por ensayo y error, se utilizó los elementos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades y las de sus animales, y así mismo mejorar su estado de ánimo. Las plantas fueron utilizadas desde el origen de la humanidad como fitoterapéuticos para prevenir o sanar lesiones y enfermedades. Desde el año 1649, con la llegada del cristianismo a América, los jesuitas estudiaron las primeras plantas amazónicas y sus utilidades. Los resultados de estas investigaciones fueron publicados en el libro *Shedula Romana* donde informaban sobre *Cinchona officinallis* (quina), de la cual se han obtenido diversos alcaloides fenólicos, entre ellos la quinina, que se ha utilizado durante más de trecientos años para curar la malaria. Para hacer buen uso de las plantas se deben tener conocimientos básicos acerca de los tipos de especies de plantas, de su manejo y utilización, la dosificación y la forma de preparación (Quispe et al., 2017).

Esta especie vegetal, crece en las comunidades cercanas a bosques tropicales tanto de la Amazonía y la región subtropical de la región insular del Ecuador. Posee compuestos bioactivos, entre los que están los polifenoles, representan un conjunto importante, durante los últimos años se realizaron estudios que relacionan esta clase de moléculas con funciones benéficas para la salud humana (De Vargas et al. 2016).

En la medicina tradicional es usada por la población local, como infusión para contrarrestar dolores intestinales, y

como antimicrobiana. Se han realizado diferentes estudios fitoquímicos que han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, dentro de ellos alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, mismos que generan una amplia gama de actividades biológicas y con potencial farmacológico. (Sauñe.; Reynel, 2013).

La metodología más reconocida y aplicada para la determinación del contenido total de polifenoles es el ensayo de Folin-Ciocalteu (Proestos and Varzakas, 2017). Existen otras técnicas para la determinación actividad antioxidante total, entre estas se encuentran el método FRAP (Ferric ion reducing antioxidant Power) reportado por Benzi y Strain (1996) y el ABTS (ácido 2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) informado por Re et al. (1999).

En el presente trabajo se determinó el comportamiento antioxidante y polifenólico de la *Guaviduca (Piper carpunya L)* con la hoja de esta especie proveniente de la región subtropical de la Provincia de Chimborazo (Cantón Pallatanga), por medio de la actividad polifenólica mediante Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante total según FRAP y ABTS, con los resultados posteriormente se utilizara en la planta de producción probando diferentes niveles de extracto de la especie vegetal en la producción de embutidos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización

Se llevó a cabo en los laboratorios de Química y Biología de la Universidad

Estatat Amazónica, ubicada en el Km 2 ½ de la vía Puyo a Tena, paso lateral.

## 2.2. Extracción de principios activos

El material vegetal fue lavado con agua potable, secado en estufa (Barnstead International, E.E.U.U.) con recirculación de aire a una temperatura de 45 °C, pulverizado en molino de cuchillas (Thomas Scientific, E.E.U.U.) y luego tamizado, con el objetivo de garantizar un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, considerado adecuado para la posterior obtención de los extractos (Azwanida, 2015; Ph. Eur., 2017). El extracto de Guaviduca seleccionado se realiza con el método de Extracción Asistida por Ultrasonido (Ultrasound Assisted Extraction – UAE) (Branson Ultrasonics, E.E.U.U.). Para la extracción se utilizó una mezcla etanol: agua en proporción 9:1, con una relación de 250 mL de disolvente por cada 50 g de muestra pulverizada. Las extracciones fueron realizadas por triplicado. Se trabajó a 35 °C durante 1 hora y posteriormente la mezcla fue filtrada a través de un filtro de Gooch y el extracto crudo obtenido fue

concentrado con evaporador rotatorio (Büchi, Alemania) a temperatura de 45°C y presión reducida de 600 mmHg hasta un volumen final de 50 mL.

## 2.2. Determinación de fenoles totales

Para la implementación del ensayo de Folin-Ciocalteu (Proestos and Varzakas, 2017), previamente se construyó una curva de calibración haciendo diluciones sucesivas a partir de una disolución concentrada de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico (estándar de referencia, tabla 1). A partir de esta disolución se prepararon 10 ml de cada una de las disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 5 y 25 mg.L<sup>-1</sup>. Para esta determinación se tomaron 40 µl de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y se añadieron 500 µl de reactivo Folin Ciocalteu. Se dejó en reposo protegido de la luz por 10 minutos. Una vez terminado este tiempo, se añaden 500 µl de disolución de carbonato de sodio al 10%. Se homogeniza y se coloca en oscuridad por 2 horas, para finalizar con la medida de la observancia a 765 nm contra blanco de reactivos.

**Tabla 1.** Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 1 000 mg.L<sup>-1</sup>. Volumen final 10 mL (agua destilada).

Componentes añadidos	Concentración de ácido gálico (mg.L <sup>-1</sup> )				
	5	10	15	20	25
Ácido gálico (uL)	50	100	150	200	250
Reactivo Folin-Ciocalteu (uL)	500	500	500	500	500
Disolución de carbonato de sodio 10% (uL)	500	500	500	500	500

### 2.3. Determinación de actividad antioxidante

**Método FRAP (Ferric ion reducing antioxidant Power):** En este método se mide la reducción de 2,4,6-Tripiridiltriazina Férrica (TPTZ) a un producto coloreado por la actividad de compuestos antioxidantes (Benzi y Strain, 1996).

Se construyó una curva de calibración haciendo diluciones sucesivas a partir de una disolución concentrada de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico (estándar de referencia, tabla 2). A partir de esta disolución se prepararon 10 ml de cada una de las disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido

gálico entre 5 y 25 mg.L<sup>-1</sup>. Para esta determinación se tomaron 80 µl de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y se añadieron 5 mL de disolución de FRAP, se aforó con agua destilada. Se deja reposar, en una estufa a 37°C, por 30 minutos y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm contra blanco.

Para esta determinación se añadieron, en un matraz de 10 mL, donde, 80 µL de muestra, se adicionaron 5 mL de disolución de FRAP. Se dejó reposar, en una cámara oscura a 37 °C, por 30 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm contra blanco.

**Tabla 2.** Curva de Calibración, método DPPH.

Componentes añadidos	Concentración de ácido gálico (mg.L <sup>-1</sup> )				
	5	10	15	20	25
Ácido gálico (uL)	10	20	25	30	35
Disolución FRAP (mL)	5	5	5	5	5

**Método ABTS (Ácido 2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico):** Este se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS•, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox (Re et al., 1999).

Fue construida una curva de calibración haciendo diluciones sucesivas a partir

de una disolución concentrada de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico (tabla 3). A partir de esta disolución se prepararon 10 ml de cada una de las disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 5 y 25 mg.L<sup>-1</sup>.

Para esta determinación se tomaron 40 µL de la muestra y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro. Se adicionaron 2 mL de la disolución del radical y se esperaron 7 minutos. Se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 730,0 nm contra un blanco de etanol.

**Tabla 3.** Preparación de la curva patrón de trolox a partir de una disolución concentrada de 1 000 mg.L<sup>-1</sup>. Volumen final 10 mL (agua destilada).

Componentes añadidos	Concentración de ácido gálico (mg.L <sup>-1</sup> )				
	5	10	15	20	25
Ácido gálico (uL)	20	30	40	50	60
Radical ABTS (mL)	2	2	2	2	2

### 2.5. Métodos estadístico

Se realizó un experimento con dos factores, y 6 muestras para sus análisis:

**Tabla 4.** Factores

FACTORES		
Estado de las Hojas	Niveles	Hojas secas
		Hojas Húmedas
Técnicas de análisis	Niveles	Método Folin-Ciocalteu.
		FRAP (Ferric ion reducing antioxidant Power), ABTS

Se analizó las 2 muestras, obtenidas en seco y húmedo con la variable de salida polifenoles totales y actividad antioxidante. Para el análisis respectivo se usó el Anova de una sola vía con 6 tratamientos, y la prueba de Tukey, aplicando un experimento factorial, con la determinación de intervalos de confianza para la media de la población.

Técnicas de análisis: El análisis estadístico fue desarrollado mediante el software IBM SPSS Versión 21.0.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 4 se muestran los resultados de actividad polifenólica por el método

Folin-Ciocalteu y de actividad antioxidante totales según los métodos de FRAP y ABTS. Se observan valores mayores, en todas las determinaciones, del aceite esencial obtenido de muestras húmedas de hojas de Guaviduca debido a que antes de efectuar la extracción, se realizó una extracción con agua y etanol. Este comportamiento puede deberse a la degradación de compuestos activos con actividad antioxidante y a la pérdida de aceites esenciales por el proceso de evaporación durante el secado.

**Tabla 5.** Actividad poli fenólica por el Método de Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante total por FRAP y ABTS a aceites esenciales de Guaviduca (*Piper carpunya* L) en muestras húmedas y secas.

Aceites esenciales	Técnicas de análisis		
	Folin-Ciocalteu	FRAP	ABTS
	765 nm	593 nm	730 nm
Aceite esencial muestra húmeda (mg/L)	23,72456667	13,26978333	0,314
Aceite esencial muestra seca (mg/L)	19,33716667	9,1035	0,126666667

A continuación, se grafica la actividad polifenólica total mediante Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante según FRAP y ABTS, en los aceites esenciales de Guaviduca (*Piper carpunya* L) en muestras húmedas y secas (figura 1). Se evidencia mayor actividad polifenólica total según

Folin-Ciocalteu (mg equivalente de ácido gálico.L<sup>-1</sup>) en aceites esenciales de Guaviduca (*Piper carpunya* L) en muestras húmedas y secas. La actividad antioxidante total por FRAP presentó mayores valores de actividad que el método ABTS.

**Figura 1.** Actividad polifenólica total según Folin-Ciocalteu (mg equivalente de ácido gálico.L<sup>-1</sup>) y actividad antioxidante total por FRAP y ABTS (mg equivalente de TROLOX.L<sup>-1</sup>) a aceites esenciales de Guaviduca (*Piper carpunya* L) en muestras húmedas y secas.

**Tabla 6.** ANOVA para la Guaviduca

**ANOVA PARA GUAVIDUCA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2835,534	5	567,107	2737,396	,000
Dentro de grupos	6,215	30	,207		
Total	2841,749	35			

El nivel de significación de la prueba es ,000 por lo que se rechaza la hipótesis nula en relación a que son

homogéneos, y se asume la alternativa que es homogéneo. Esto se lo realiza mediante la prueba de Tukey.

Tabla 7. TUKEY para la Guaviduca

Guaviduca						
HSD Tukey <sup>a</sup>						
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
ABTS seca	6	,1267				
ABTS húmeda	6	,3140				
Frap seca	6		9,1035			
Frap húmeda	6			13,2698		
Folin seca	6				19,3372	
Folin húmeda	6					23,7246
Sig.		,979	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

De igual manera todos los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí, en relación a los métodos ABTS seca y ABTS húmeda, ABTS húmeda y Frap seca, Frap húmeda y Folin seca. Es de destacar que Folin húmeda es significativamente diferente a las demás técnicas de análisis.

La medicina tradicional en el Ecuador ha sido sostenida por los pueblos ancestrales de más bajos recursos, quienes han encontrado una alternativa más accesible y de menos costo, de acuerdo a su cosmovisión. En este contexto la Guaviduca ha sido utilizada, por la medicina ancestral, durante decenas de años en diferentes regiones. Muchos compuestos antioxidantes se pueden encontrar en plantas, incluidos fenoles, carotenoides, antocianinas y tocoferoles (Jakubowski, Bartosz, 1997). Cerca del 20% de las plantas conocidas se han utilizado en estudios farmacéuticos, lo que ha tenido un impacto positivo en el sistema de salud, como el tratamiento del cáncer y otras enfermedades nocivas (Naczka and Shahidi, 2006). Las plantas generan

diversos compuestos bioactivos entre ellos polifenoles. Las altas concentraciones de fotoquímicos, que pueden proteger contra el daño de los radicales libres, se acumulan en frutas, verduras y plantas en general (Suffredini et al., 2004). Las plantas que contienen fotoquímicos beneficiosos pueden complementar las necesidades del cuerpo humano actuando como antioxidantes naturales (Boots et al., 2008). Compuestos fenólicos como flavonoides, taninos y ligninas, que se encuentran en las plantas, actúan como antioxidantes con eficacia (Suffredini et al., 2004). El consumo de frutas y verduras se ha relacionado con varios beneficios para la salud, como resultado de propiedades medicinales y alto valor nutricional (Valko et al., 2006). Los antioxidantes controlan y reducen el daño oxidativo en los alimentos al retrasar o inhibir la oxidación causada por las especies reactivas de oxígeno, lo que en última instancia aumenta la vida útil y la calidad de estos alimentos (Ames et al., 1993). El betacaroteno, el ácido ascórbico y muchos

compuestos fenólicos desempeñan papeles dinámicos para retrasar el envejecimiento, reducir la inflamación y prevenir ciertos cánceres (Duthie et al., 1996).

La especie vegetal, utilizada en el presente trabajo fue estudiada antes por Castillo (2014) quien comprobó la actividad antiulcerosa del extracto hidroalcohólico de la Guaviduca (*Piper carpunya*). El genero su investigación en base al Manual de Técnicas de Investigación (CYTED, 1995) a través de la inducción de úlcera gástrica aguda por etanol absoluto al 96%, en ratas (*Rattus Wistar*) hembras, con un porcentaje de inhibición de las úlceras en un 50% en el grupo tratado y de un 46,2% en el grupo testigo con lo que se concluye que el extracto hidroalcohólico de Guaviduca (*Piper carpunya*) posee actividad gastroprotectora, produciendo una protección y recuperación de la mucosa gástrica evidenciándose en el análisis macroscópico de los estómagos.

#### **4. CONCLUSIONES**

La actividad antioxidante se ha reportado que es concomitante con el poder reducto. Las propiedades reductoras están asociadas a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno, de esto se observa que los valores mayores en polifenoles totales y actividad antioxidante por FRAP y ABTS pero no determina significancia aplicando el diseño estadístico, tanto en húmedo como en seco.

El contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante en el aceite

esencial proveniente de las hojas de la Guaviduca, son elevados por los mg de ácido gálico por 100 mL del compuesto, hemos de tener en cuenta la cantidad de disolvente empleado en la extracción y la cantidad de muestra que hemos tomado para realizar el análisis, por lo que estos actúan con los radicales libres y los estabilizan, con lo que pueden ayudar a contrarrestar presencia de enfermedades.

## REFERENCIAS

- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7915–7922. doi: 10.1073/pnas.90.17.7915.
- Benzie I, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 15;239(1):70–6.
- Boots A.W., Haenen G.R., Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol*. 585:325–337. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
- Boada Carlos, (2006). El Choco Biogeográfico. *Revista Ecuador terra incógnita*. 40. Disponible en : [http://www.terraecuador.net/revista\\_40/40\\_choco.htm](http://www.terraecuador.net/revista_40/40_choco.htm)
- Castillo Valdés Erika Yazmín. 2014. Estudio preclínico de la guaviduca (*Piper carpunya*) de propiedades y efecto antiulceroso en ratas wista. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Tesis previa a la obtención del título: Bioquímica-Farmacéutica. 99 p.
- CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). 1995. [http://www.cytcd.org/es/Acciones\\_destacadas](http://www.cytcd.org/es/Acciones_destacadas).
- de Vargas Fabiano, Almeida Patricia, de Boleti Ana Paula, Pereira Maria, de Souza Tatiane, de Vasconcellos Marne, Nunez Cecilia, Pohlit Adrian and Lima Emerson. 2016. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:83. DOI 10.1186/s12906-016-1061-9.
- Duthie S.J., Ma A., Ross M.A., Collins A.R. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*. 56:1291–1295.
- García-Ruiz A., Baenas N., Benítez-González A.M., Stinco C.M., Meléndez-Martínez A.J., Moreno D.A., Ruales J. 2017. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J. Sci Food Agric*. 11. doi: 10.1002/jsfa.8255.
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 29:1297–1301. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00056-3.
- Lizcano Leandro, Siles Maite, Trepiana Jenifer, Hernández Luisa, Navarro Rosaura, Ruiz-Larrea Begoña and Ruiz-Sanz José. 2015. Piper and *Vismia* Species from Colombian Amazonia Differentially Affect Cell Proliferation of Hepatocarcinoma Cells. *Nutrients*, 7, 179-195; doi:10.3390/nu7010179.
- Naczki M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 41:1523–1542. doi: 10.1016/j.jpba.2006.04.002.
- Proestos and Varzakas. 2017. Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation. *Foods*, 6, 28; doi:10.3390/foods6040028.
- Quijano-Abril, M.A.; Callejas-Posada, R.; Miranda-Esquível, D.R. 2006. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical Piper species (Piperaceae). *J. Biogeogr*. 33, 1266–1278.
- Quispe Guillen, Hwang Seung, Wan Zhiqiang, Zuo Guanglei and Lim Soon. 2017. Screening In Vitro Targets Related to Diabetes in Herbal Extracts from Peru: Identification of Active Compounds in *Hypericum laricifolium* Juss. by Offline High-Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 2512; doi:10.3390/ijms18122512.
- Ramírez Amezcua, J.M. 2016. Piper commutatum (Piperaceae), the correct name for a widespread species in Mexico and Mesoamerica. *Mexican Botanical Act*, 116, 9–19.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol*

- Med. 26(9-10): 1231-1237.
- Sauñe F. Angélica y Reynel R. Carlos. (2013). Árboles y Arbustos de Piper (“atico”) del valle de Chanchamayo, p. de unín (Perú) (Auspiciada por APRODES y CED – FDA) Lima: Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Suffredini I.B., Sader H.S., Gonçalves A.G., Reis A.O., Gales A.C., Varella A.D., Younes R.N. 2004. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:379–384. doi: 10.1590/S0100-879X2004000300015.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Zoghbi, Maria das Graças Bichara; Oliveira, Jorge and Guilhon, Giselle Maria Skelding Pinheiro. 2009. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Rev. bras. farmacogn. [online]*. 19(3): 795-804.