

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**“OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA
POR ULTRASONIDO DE FLAVONOIDES EN CÁSCARAS DE NARANJA
(*Citrus sinensis*) PARA SU APLICACIÓN AGROINDUSTRIAL”**

Autora

Marjorie Rocío Gonzabay Merchán

Tutor

Yasiel Arteaga Crespo PhD.

Puyo- Ecuador

2020

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gonzabay Merchán Marjorie Rocío, con cédula de identidad 2450395559, declaro que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación que tiene como tema “**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE FLAVONOIDEOS EN CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis*) PARA SU APLICACIÓN AGROINDUSTRIAL**”, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como la autora del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniera Agroindustrial.

Puyo, 02 de enero del 2020

Gonzabay Merchán Marjorie Rocío

CI. 2450395559

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Yasiel Arteaga Crespo PhD., con CI: 1757016256, certifico que la egresada **GONZABAY MERCHÁN MARJORIE ROCÍO**, realizó el proyecto de investigación titulado: **“OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE FLAVONOIDES EN CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis*) PARA SU APLICACIÓN AGROINDUSTRIAL”** previo a la obtención del título de Ingeniería Agroindustrial bajo mi supervisión.

Yasiel Arteaga Crespo PhD.
CI: 1757016256

INFORME DEL DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “Optimización de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de flavonoides en cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) para su aplicación agroindustrial”

Autora: Marjorie Rocío Gonzabay Merchán

Unidad de Titulación: Carrera Ingeniería Agroindustrial

Director del proyecto: PhD. Yasiel Arteaga Crespo

Fecha: 02 de enero de 2020.

Introducción y contexto de la investigación:

Las industrias cítricas han crecido ampliamente en los últimos años, con mayor producción en zumos y jugos de naranja, fruta refrescante y dulce con gran contenido nutricional que satisfacen a los consumidores, sin embargo, la producción de esta fruta genera residuos agroindustriales, como la cáscara de naranja que no son aprovechados considerablemente para otras aplicaciones. El presente estudio llevó a cabo la optimización de la extracción asistida por ultrasonido del contenido total de flavonoides (CTF) en cáscaras de *Citrus sinensis* aplicando metodología de superficie de respuesta (MSR). Además, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante del extracto obtenido en las condiciones óptimas de extracción. Del diseño factorial 2^4 empleado se consideraron los factores significativos para la optimización, empleando un diseño central compuesto (CCD) y el CTF como variables de respuesta, y después se determinó el factor de protección solar (FPS) in vitro a diferentes concentraciones. De los hallazgos encontrados se pretende aprovechar los residuos cítricos para extracción de componentes funcionales y su aplicación en las industrias.

Cumplimiento de objetivos:

Los objetivos propuestos se han cumplido, en relación que:

Mediante el diseño factorial 2^4 , las variables de extracción de contenido de flavonoides totales en relación a base seca de cáscaras de naranja, fueron significativos.

En la optimización mediante el diseño central compuesto, se encontró las condiciones óptimas de acuerdo a la metodología de superficie de respuesta y continuamente se determinó el contenido de flavonoides totales del extracto optimizado.

Del contenido de flavonoides totales del extracto optimizado se determinaron la actividad antioxidante determinada a través de los métodos FRAP, ABTS y el factor de protección solar (FPS) in vitro a diferentes concentraciones.

Principales resultados obtenidos:

El diseño factorial 2^4 se determinó con ANOVA, en que las variables de extracción de contenido de flavonoides totales en relación a base seca de cáscaras de naranja mostraron diferencias significativas en relación a: temperatura, tiempo, Relación SL y % Etanol.

La optimización empleada por el diseño central compuesto se encontraron las condiciones óptimas de acuerdo a la metodología de superficie de respuesta fueron: temperatura 60°C,

tiempo de sonicación de 10min, etanol al 90% y una relación de sólido/líquido de 1/60 (m/v). El CTF en el extracto optimizado fue 13,37g equivalentes de quercetina/100g m.s. El CTF del extracto optimizado, mostró actividad antioxidante de 1,41 (\pm 0,07) g equivalentes de trolox /100g m.s, por el método FRAP y 0,12 (\pm 0,002) g equivalentes de trolox /100g m.s, por el método ABTS. Además, se determinó el factor de protección solar (FPS) in vitro a las concentraciones de 20%, 15%, 10% y 5%, que resultó entre 38,08 (\pm 0,13) y 20,28 (\pm 0,78) de las concentraciones del 20% y 5%.

La estudiante Marjorie Rocío Gonzabay Merchán ha mostrado durante el desarrollo de la investigación una elevada dedicación y un alto grado de independencia, sirviendo como guía de los principales elementos a desarrollar en la investigación.

Se destacó la actividad curricular por su rendimiento académico, mostrado durante la investigación interés, motivación en el mismo, lo cual condujo a culminar de forma exitosa el trabajo, cumpliendo con las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, tablas y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,

Yasiel Arteaga Crespo PhD.

CI: 1757016256



Oficio No. 125-SAU-UEA-2020

Puyo, 30 de enero de 2020

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El Proyecto de Investigación correspondiente a la egresada GONZABAY MERCHÁN MARJORIE ROCÍO con C.I. 2450395559 con el Tema: **“OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE FLAVONOIDES EN CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis*) PARA SU APLICACIÓN AGROINDUSTRIAL”**, de la carrera, Ingeniería Agroindustrial. Director del proyecto Dr. Arteaga Crespo Yasiel, PhD, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 3%, Informe generado con fecha 28 de enero de 2020 por parte del director conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.

ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

Urkund Analysis Result

Analysed Document: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA
POR ULTRASONIDO DE FLAVONOI DES EN CÁSCARAS DE
NARANJA (Citrus sinensis) PARA SU APLICACIÓN
AGROINDUSTRIAL.docx (D63116041)

Submitted: 1/28/2020 8:06:00 PM

Submitted By: \${Xml.Encode(Model.Document.Submitter.Email)}

Significance: 3 %

Sources included in the report:

guyusa tesis completo (final) 03-01-2018.docx (D46396736)

Instances where selected sources appear:

8

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación aprueba el proyecto de investigación titulado “**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE FLAVONOIDES EN CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis*) PARA SU APLICACIÓN AGROINDUSTRIAL**”.

Dr. Amaury Pérez PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Lucía García MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Italo Lara MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Dios, mi señor, mi padre todopoderoso, por darme la vida,
por ser mi fortaleza, mi guía, por estar a mi lado siempre
y no dejarme declinar en cada obstáculo.*

*A mis padres; Santa y Pascual por estar presentes en mi vida
y por haberme dado su apoyo incondicional.*

A mi novio Edwin, por su amor y entendimiento.

*A mis compañeros y amigos, que perduraron a mi lado,
aún en situaciones de locuras y temperamentos incomparables.*

*A los docentes y al personal de la UEA, por cada ayuda, consejos, lecciones,
por momentos inmemorables que tendré siempre presente.*

*Y, a aquellas personas quienes se presentaron en mi camino,
mostrándome lo malo y lo bueno que puede ofrecer la vida,
que sin esas vivencias no sería quien soy ahora,*

*porque cada momento es único
y hay que afrontarla siempre con una sonrisa del corazón.*

Crece como un niño.

Mayi GM

DEDICATORIA

Dedico a mis padres; Santa y Pascual, mis pilares fundamentales en la vida, por dedicarme sus consejos, su cariño, su carisma, por haberme dado la confianza desde el primer instante que decidí cumplir mi meta profesional.

A mis hermanos; Antonio, Christian, Aldo, María y Jesús por estar presentes, que al llegar me recibieron siempre con un abrazo, una sonrisa, con sus locuras incomparables, siendo mis motivaciones cada día, mostrándole que los objetivos que nos trazamos si se cumplen con dedicación y perseverancia.

A mi novio Edwin; quien desde el primer instante me ayudó incondicionalmente, quien estuvo en las buenas y en las malas, mostrándome su amor, su cariño, su lealtad, y siempre mostrándome una sonrisa del corazón acompañado entre chistes y locuras, haciendo encender el mío entre risas.

Y, a quienes intentan desmayar, yo les digo si se puede, que paso a paso lograran conquistar al mundo, como yo lograré conquistar mi otra meta, mi gran empresa de responsabilidad ambiental y humano.

Crece como un niño.

Mayi GM

RESUMEN

El presente estudio llevó a cabo la optimización de la extracción asistida por ultrasonido del contenido total de flavonoides (CFT) en cáscaras de *Citrus sinensis* aplicando metodología de superficie-respuesta (MSR). Además, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante del extracto obtenido en las condiciones óptimas de extracción. El efecto de las variables; tiempo de sonicación, temperatura, relación etanol/agua y relación sólido/líquido y las interacciones entre ellas se analizaron a partir de un diseño factorial 2^4 . Se consideraron los factores significativos para la optimización, empleando un diseño central compuesto (CCD) y el CFT como variables de respuesta. Se encontró que un modelo cuadrático fue adecuado, con un valor R^2 ajustado de 0.9792. Las condiciones óptimas propuestas por el modelo de superficie-respuesta fueron: una temperatura de extracción de 60 °C, un tiempo de sonicación de 10 min, relación de etanol/agua de 90/10 (v/v) y una relación de sólido/líquido de 1/60 (m/v). El CFT en el extracto optimizado fue 13,33 (\pm 0.86) g equivalentes de quercetina/100g m.s. La actividad antioxidante determinada a través de los métodos FRAP y ABTS, fue de 1,41 (\pm 0,07)g equivalentes de Trolox/100g m.s y 0,12 (\pm 0,002) g/100g, respectivamente. Además, se determinó el factor de protección solar (FPS) in vitro a las concentraciones de 20%, 15%, 10% y 5%, que resultó entre 38,08 (\pm 0,13) y 20,28 (\pm 0,78). Debido a los hallazgos actuales, los extractos de cáscaras de *Citrus sinensis* se pueden proponer como un componente prometedor para alimentos funcionales, formulación cosmética y farmacéutica.

PALABRAS CLAVES: flavonoides, cáscara de naranja, antioxidantes, factor de protección solar, ABTS, FRAP.

ABSTRACT

The present study carried out the optimization of the ultrasound-assisted extraction of the total flavonoid content (TFC) in *Citrus sinensis* shells by applying response surface methodology (RSM). In addition, the antioxidant activity of the extract obtained was evaluated under optimal extraction conditions. The effect of the variables; sonication time, temperature, ethanol/water ratio and solid/liquid ratio and the interactions between them were analyzed based on a factorial design 2^4 . Significant factors for optimization were considered, using a composite central design (CCD) and TFC as response variables. A quadratic model was found to be adequate, with an adjusted R^2 value of 0.9792. The optimal conditions proposed by the response surface model were: an extraction temperature of 60°C, a sonication time of 10 min, an ethanol/water ratio of 90/10 (v/v) and a solid/liquid ratio of 1/60 (m/v). The TFC in the optimized extract was 13,33 (± 0.86) g quercetin equivalents/100g m.s. The antioxidant activity determined by FRAP and ABTS methods was 1.41 (± 0.07) g/100g and 0.12 (± 0.002) g/100g, respectively. In addition, the sun protection factor (SPF) was determined in vitro at concentrations of 20%, 15%, 10% and 5%, resulting in a range of 38,08 (± 0.13) to 20,28 (± 0.78). Due to current findings, *Citrus sinensis* peel extracts can be proposed as a promising component for functional foods, cosmetic and pharmaceutical formulations.

KEYWORDS: flavonoids, peel orange, antioxidants, sun protection factor, ABTS, FRAP

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.5 OBJETIVOS	3
1.5.1 GENERAL	3
1.5.2 ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO II	4
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1 ANTECEDENTES	4
2.2 BASES TEÓRICAS	5
2.2.1 NARANJA	5
2.2.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN	7
2.2.3 APLICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES EN LA AGROINDUSTRIA	8
2.2.4 MARCO CONCEPTUAL.....	9
CAPÍTULO III	10
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	10
3.1 LOCALIZACIÓN	10
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN	10
3.3 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	11
3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
3.4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	14
CAPÍTULO IV	16
RESULTADOS	16
4.1 INFLUENCIAS DE LOS FACTORES DE ESTUDIO	16
4.2 ANÁLISIS DE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (CCD).	20
4.3 RESULTADOS DEL EXTRACTO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS	25
CAPÍTULO V	26
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
5.1 CONCLUSIONES	26
5.2 RECOMENDACIONES	26

CAPÍTULO VI	28
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N.- 1. Composición química de 100 gr de naranja dulce (Citrus sinensis)	5
Tabla N.- 2. Contenido de flavonoides en frutos inmaduros de Citrus sinensis variedad Valencia.....	7
Tabla N.- 3. Contenido de flavonoides totales en cáscara de naranja variedad Valencia. ...	7
Tabla N.- 4. Ecuación para factor de protección solar.	14
Tabla N.- 5. Nivel de variables seleccionadas en el diseño factorial y metodología superficie-respuesta.....	14
Tabla N.- 6. Unidades experimentales del diseño factorial 2^4 con sus variables independientes (A, B, C y D) y sus resultados de CFT.....	16
Tabla N.- 7. ANOVA del diseño factorial 2^4	17
Tabla N.- 8. CCD a partir de las variables independientes (A, B, C y D) y resultados de CFT.....	20
Tabla N.- 9. Resumen de la evaluación de los cuatro modelos polinomiales analizados en la optimización de CFT en cáscaras de Citrus sinensis.....	21
Tabla N.- 10. ANOVA para el modelo cuadrático.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N.- 1. Ubicación geográfica de la Universidad Estatal Amazónica.....	10
Figura N.- 2. Efecto de los factores significativos y no significativos sobre la extracción de compuestos flavonoides totales en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	17
Figura N.- 3. Diagrama de Pareto de los efectos de las variables de la extracción de CFT.	18
Figura N.- 4. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de CFT en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	18
Figura N.- 5. Efectos de cada variable de extracción de CFT.....	19
Figura N.- 6. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de CFT en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	21
Figura N.- 7. Interacción de temperatura y tiempo sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	23
Figura N.- 8. Interacción de temperatura y relación SL sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	23
Figura N.- 9. Interacción de temperatura y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	23
Figura N.- 10. Interacción de tiempo y relación SL sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	24
Figura N.- 11. Interacción de tiempo y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	24
Figura N.- 12. Interacción de relación SL y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de <i>Citrus sinensis</i>	24
Figura N.- 13. Factor de protección solar a diferentes concentraciones.	25

ÍNDICE DE IMAGEN

Imagen N.- 1. Selección y corte de las naranjas dulces.....	31
Imagen N.- 2. Cáscaras de naranja cortadas sin zumo y sin gajos, ni semillas.	31
Imagen N.- 3. Secado de las cáscaras de naranja en estufa a 65°C por 24 horas.	31
Imagen N.- 4. Cáscaras de naranja secas.	31
Imagen N.- 5. Molienda de las cáscaras de naranja secas.	31
Imagen N.- 6. Materia seca de las cáscaras de naranja.....	31
Imagen N.- 7. Peso de la masa de 1g.	32
Imagen N.- 8. %etanol-Agua a diferentes concentraciones.....	32
Imagen N.- 9. Extracción de compuestos flavonoides en el equipo de baño ultrasónico...	32
Imagen N.- 10. Filtración del extracto extraído.....	32
Imagen N.- 11. Extractos de los 21 tratamientos.....	32
Imagen N.- 12. Extracción y filtración de los CFT optimizados.....	32
Imagen N.- 13. Extractos de CFT optimizados.	32
Imagen N.- 14. Extracto óptimo de CFT con 6 repeticiones.....	33
Imagen N.- 15. Equipo Espectrofotómetro para cuantificación de los CFT.	33
Imagen N.- 16. Preparación de reactivos ABTS y FRAP.	33
Imagen N.- 17. Cuantificación de antioxidantes y factor de protección solar contra su propio blanco.....	33

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Los cítricos son los cultivos más abundantes a nivel mundial, siendo procesado apenas un tercio de su total. Su producción de naranjas, limones, mandarinas y toronjas representan aproximadamente el 98% de la cosecha industrializada, siendo la naranja, la fruta más apetecible con 82% del total de la producción (Marín, Soler Rivas, Benavente García, Castillo, & Pérez Alvarez, 2007).

A nivel nacional en la industrialización agroindustrial de la naranja se obtiene zumos, jugos, producción de mermeladas y en las industrias químicas se obtiene aceites esenciales u otros componentes bioactivos, y de estos procesos se utiliza el 50% para elaboración de productos y del 50% restante se generan gran cantidad de desechos que es representado por cáscaras, semillas y gajos (Marín et al., 2007).

La naranja tiene gran contenido nutricional: vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, C y E, proteínas, azúcares, fibra, sales minerales y compuestos bioactivos: carotenoides, polifenoles, ácidos orgánicos, pectinas y flavonoides que son relevantes para la salud. En estos compuestos bioactivos predomina los compuestos flavonoides que contiene actividad biológica; antibacteriana, anticancerígenas, antitumorales, antiviral, antioxidantes, etc. (Gómez Manrique, 2018; Kawaii et al., 2000).

Por tal motivo, el aprovechamiento de los residuos de cáscaras de naranja en la agroindustria contrarresta la contaminación ambiental y genera la producción de compuestos bioactivos para aplicaciones en productos alimentarios y no alimentarios.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Ecuador las industrias cítricas ejercen su desarrollo a base de producción de zumos y jugos, pulpas, mermeladas, de la naranja, que es la principal materia prima en que se utiliza el 40% - 50% de zumo y lo restante corresponde a gajos- cáscara (albedo y flavedo) (Pérez Nájera, Lugo Cervantes, Gutiérrez Lomelí, & Del Toro Sánchez, 2013). Estos residuos agroindustriales generalmente son desechados en efluentes u otras zonas generando contaminación ambiental, y en algunos casos son aprovechados, reciben tratamientos, se generan para otros usos no alimentarios o en otros casos no se identifican sustancias de interés alimentario o no se dispone de la tecnología necesaria para nuevos procesos (Londoño Londoño, 2011; Restrepo Duque et al., 2012; Vargas Corredor & Pérez Pérez,

2018). La selección de la alternativa adecuada para nuevos procesamientos de productos, permite conocer de los residuos; composición, cantidad que se genera, composición organoléptica y nutricional, y rendimiento. La alternativa como la extracción de compuestos bioactivos debe tener un procedimiento establecido con las herramientas necesarias para minimizar los problemas técnicos de extracciones convencionales (Vargas Corredor & Pérez Pérez, 2018).

1.3 JUSTIFICACIÓN

Los residuos cítricos de la naranja generados en las agroindustrias son fuentes de varios compuestos, como: agua, azúcares, fibra, proteínas, vitaminas, ácidos orgánicos, aceites esenciales, sales minerales, incluyendo compuestos bioactivos; carotenoides, flavonoides y pectinas (Gómez Manrique, 2018). Algunos de estos compuestos son utilizados para alimentación animal, biocombustibles o en algunos casos los compuestos bioactivos son extraídos para otras aplicaciones, pero pocos son elaborados para el consumo humano a partir de estos compuestos o residuos como la cáscara de naranja (Restrepo Duque, Rodríguez Sandoval, & Manjarrés Pinzón, 2011).

Las cáscaras de naranja contienen compuestos bioactivos, como: flavonoides, polifenoles, carotenoides y pectinas, componentes de gran importancia en la agroindustria (Restrepo Duque et al., 2011), siendo la corteza de naranja un residuo aprovechable para el desarrollo de productos con valor agregado, y de esto se obtienen compuestos bioactivos como los flavonoides que son de origen natural, extraídos con métodos de menor costo y en corto período, con múltiples beneficios; en las industrias menor contaminación ambiental con rendimiento económico y; en el consumo humano genera propiedades biológicas y nutritivas.

1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las condiciones óptimas para la extracción de flavonoides en cáscara de naranja para aplicación agroindustrial?

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GENERAL

Optimizar condiciones de extracción asistida por ultrasonido de flavonoides totales en cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) para su aplicación agroindustrial.

1.5.2 ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de las variables de extracción sobre el contenido de flavonoides totales.
- Determinar las condiciones óptimas de extracción asistida por ultrasonido de flavonoides totales a partir de la metodología de superficie-respuesta.
- Comprobar la validez del modo superficie-respuesta a partir de los resultados experimentales.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 ANTECEDENTES

Los cítricos datan su origen hace 20 millones de años, entre estos el naranjo tiene su origen del continente asiático meridional de China a India, que desde entonces ha sufrido modificaciones de selección natural e hibridaciones, evolucionando hasta cultivarse en grandes extensiones (Yuste Pérez, 2007). Las variedades se extendieron por la cultura árabe a Europa, la naranja amarga desde el siglo X y la naranja dulce en el siglo XV-XVI y desde entonces los europeos cultivaron los frutales por todo el mundo, en los continentes de América, África y Oceanía.

Los cítricos en el paso del tiempo se han estudiado y descubierto sus propiedades nutricionales y compuestos bioactivos. Uno de los descubrimientos de los compuestos bioactivos fueron los flavonoides, que fue descubierto en 1930 por Albert Szent-György PhD, bioquímico húngaro que ganó el premio Nobel por descubrimiento de la vitamina C. Szent-György aisló una sustancia de la cáscara de limón, la citrina que tenía en su funcionalidad regular la permeabilidad de los capilares. A partir de esto, los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (permeabilidad) y vitamina C (flavonoides con propiedades similares a esta vitamina). Posteriormente, no se pudo comprobar que los flavonoides fueran vitaminas, sus denominaciones fueron eliminadas y adoptadas al término flavonoides en 1950 (Martínez Flórez, González Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002; Ochoa M & Ayala A, 2004).

Desde entonces se han realizado otros estudios de identificación y extracción de flavonoides en cítricos, como; naranja, lima, limón, toronja, mandarina, y a esto la determinación de su actividad biológica. El proceso de extracción conlleva a una metodología determinada, en: condiciones, solventes, obteniendo sus respectivos resultados en rendimiento y composición (Londoño Londoño, 2011).

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 NARANJA

2.2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El naranjo pertenece a la familia *Rutácea*, al género *Citrus*, de la especie *sinensis*. El naranjo tiene presencia en toda la planta un aceite esencial que le da su olor característico, es un árbol espinoso de peciolos alados, sus hojas están situadas en espiral y simple con una forma elíptica, sus flores son normales de color rosáceo o blanco, dependiendo su variedad, su fruto que es la naranja, es una baya que consta de gajos en su interior, con pulpa de colores amarillentos anaranjados y semillas cubierto por una cáscara color anaranjado en su interior blanco y glándulas de aceites esenciales. El naranjo produce después de 5-6 años de su plantación, se desarrolla en clima cálido-templado con una temperatura óptima de 23°C-24°C, en suelos fértiles, profundos y permeables (Santiago Castro, 2014). La naranja en su estructura físico- químico del zumo y de la corteza contiene: vitaminas C, B1, B2, B3, B5, B6 y E, sales minerales, ácidos orgánicos, pectina y compuestos bioactivos como: flavonoides, polifenoles, carotenoides, etc., (Gómez Manrique, 2018; Restrepo Duque et al., 2011; Santiago Castro, 2014; Yuste Pérez, 2007).

Tabla N.- 1. Composición química de 100 gr de naranja dulce (*Citrus sinensis*)

Componente	Contenido gr	Contenido mg
Agua	98	
Proteínas	0,7	
Grasas	0,1	
Hidratos de carbono	9	
Fibra	0,7	
Cenizas	0,5	
Calcio		19
Fósforo		22
Hierro		0,4
Tiamina		0,08
Riboflavina		0,03
Niacina		0,3
Ácido ascórbico		60

Fuente: (Durán Ramírez, 2009; García Serrano, 2000)

2.2.1.2 PRODUCCIÓN DE NARANJA

A nivel mundial se cultivan naranjas, siendo Brasil el mayor productor de 22 millones de Toneladas, más del 35% de producción de naranjas. La producción de naranja en Ecuador se adapta a las regiones del país, a climas subtropicales, teniendo así diversas variedades de la fruta, representando entre los 25 cultivos más importantes del país.

En Ecuador, en el 2016 se alcanzó una producción cerca de 150 mil toneladas métricas. Las provincias de la Región Costa con mayor producción son: Manabí 86000 toneladas y Los Ríos 57000 toneladas (Ulloa, 2012), en la Región Sierra la provincia de Bolívar fue de mayor producción con 21047 toneladas métricas de naranjas (ESPAC, 2016). Actualmente, la producción de naranja tiene una superficie de cultivo de 55953 hectáreas, entre que la provincia de Bolívar se destaca con 10639 hectáreas de cultivo (Armas Valdiviezo, 2012; Santiago Castro, 2014). El consumo per cápita del fruto es de 4,14 Kg, en que se aprovecha sólo el 50% y el 50% restante que son cáscaras, semillas, gajos, son desperdiciados (Albán Villagómez & Freire Marin, 2009).

2.2.1.3 VARIEDADES DE NARANJA

Las variedades de la naranja dulce (*Citrus sinensis*) en su existencia de mayor importancia son de tres tipos: navel, valencia y sanguínea, en que se dividen en 21 variedades. En Ecuador la variedad más conocida es la valencia, que se diferencia en sus características de sabor-dulzor, tamaño, textura, color y cantidad de semillas (Yances Astudillo, 2018). De esta variedad se clasifican, en:

Valencia común: esta variedad es la mayor producida a nivel mundial, y por tal motivo en Ecuador es la más cultivada. Sus características propias son de tamaño mediano, piel gruesa-firme, textura lisa, contiene entre cuatro a seis semillas, con gran cantidad de zumo. Además, la naranja valencia tiene tolerancia a cambios climáticas hasta llegar a adaptarse a ello (Armas Valdiviezo, 2012; Yances Astudillo, 2018).

California o Washington navel: esta variedad se identifica por la forma del ombligo, por su contenido nula de semillas y poco zumo. Su maduración es temprana y con facilidad de recolección. No es recomendable para realizar jugos (Armas Valdiviezo, 2012; Yances Astudillo, 2018).

Parson Brown: esta variedad es poca cultivada en el país, en sus características tiene una textura rugosa y compacta, con corteza media gruesa, y bastante zumo de calidad (Armas Valdiviezo, 2012).

2.2.1.4 COMPUESTOS FLAVONOIDES DE NARANJA

En la estructura físico-químico del zumo y corteza de la naranja se encuentran los compuestos flavonoides, que se distinguen en su composición, que a estos pertenecen los más principales: hesperidina, neohesperidina, naringina, narirutina (Geronazzo, Blanco, & Robin, 2002; Restrepo Duque et al., 2011).

Tabla N.- 2. Contenido de flavonoides en frutos inmaduros de *Citrus sinensis* variedad Valencia.

Variedad del fruto	Diámetro de cáscara (mm)	Flavonoides (mg/100gr de peso seco)			
		Hesperidina	Narirutina	Naringina	Neohesperidina
Valencia	20	23,050 ± 575	946 + 54	88 ± 4	76 ± 2
	40	7,050 ± 325	577 + 29	56 ± 3	51 ± 1

Fuente: (Geronazzo et al., 2002).

Tabla N.- 3. Contenido de flavonoides totales en cáscara de naranja variedad Valencia.

Parte del fruto	Contenido de Flavonoides Totales*
Cáscara de naranja	7,2

Fuente: (Ghasemi, Ghasemi, & Ali Ebrahimzadeh, 2009).

*mg de quercetina equivalente/gr de extracto en polvo.

2.2.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

2.2.2.1 EXTRACCIÓN ASISTIDO POR ULTRASONIDO

El método de extracción de asistido por ultrasonido (EAU), es un método alternativo de extracción que reemplaza a métodos convencionales. Es una técnica más barata con uso de instrumentales más baratos. El método consta de vibraciones mecánicas de 1-16 khz, frecuencias superiores para el oído humano, pues al aplicarlo en un medio líquido, se generan ciclos de expansión, formando presiones negativas y burbujas que al crecer colapsan entre sí formando cavitación. La cavitación es formada cuando la burbuja no puede la energía del ultrasonido, que por la presión implosiona y genera una compresión de gases que de inmediato aumenta temperatura y presión en la estructura sólida, incrementando la penetración del solvente y liberando los productos intracelulares ocasionado por la rotura de las paredes de la célula en el material sólido. Las características que presenta son menor tiempo de extracción, con diferentes temperaturas y mayor rendimiento (Londoño Londoño, 2011; Ya Qin et al., 2008).

El método de EAU en los últimos tiempos se ha utilizado ampliamente en extracción de fotoquímicos; como pectina, flavonoides, alcaloides, polisacáridos, aceites, fenoles, polifenoles de partes de plantas y frutos (Ya Qin et al., 2008).

La extracción de compuestos flavonoides se realiza previamente con preparación de disolventes, teniendo en su característica general su solubilidad en agua y etanol, de carácter fenólico y su absorción en UV, que por sus sistemas aromáticos y conjugados son visibles del espectro. Estos compuestos son insolubles en éter, permitiendo desengrasar un material antes de su extracción (Rangel G, 2010). En la investigación que realizaron (Khan, Abert Vian, Fabiano Tixier, Dangles, & Chemat, 2010) en EAU de polifenoles en cáscaras de naranja, realizaron la sonicación con determinado procedimiento utilizando material vegetal de 2cm² en disolvente de etanol: agua (20, 50, 80%), ejecutando las variables de temperatura (10, 25, 40°C) y potencia de baño ultrasónico (50, 100, 150 W), determinando su efecto en un diseño central compuesto mediante un análisis de superficie- respuesta (Londoño Londoño, 2011).

2.2.3 APLICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES EN LA AGROINDUSTRIA

Los flavonoides son compuestos bioactivos que actualmente las industrias alimenticias se dedican a la extracción de estos compuestos por sus efectos; antimicrobianos, antiviral, anticarcinogénica, antioxidantes que presenta ante otros productos, reduciendo el uso de agentes antioxidantes sintéticos, como el Hidroxitolueno butilado (BHT) y el Hidroxianisol butilado (BHA) que tienen efectos cancerígenos (Londoño Londoño, 2011; Pérez Nájera et al., 2013; Sánchez, Murillo, & Méndez, 2010). Los flavonoides proporcionan propiedades similares de los sintéticos, siendo efectivos como suplementos dietéticos y aditivos alimenticios con beneficios para la salud (Ochoa M & Ayala A, 2004). Los flavonoides tienen diversas aplicaciones, como:

- ∞ **Capacidad antioxidante en alimentos:** Los antioxidantes permiten alargar la vida útil de los productos alimentarios basándose en la mezcla de un producto con extractos naturales que inhiban la oxidación (Ochoa M & Ayala A, 2004).
- ∞ **Pigmentos:** Como uso de pigmentos naturales en bebidas logrando mejorar el aspecto del producto, siendo agradable al consumidor, manteniendo estabilidad con un proceso de copigmentación (Ochoa M & Ayala A, 2004).

- ∞ **Edulcorantes y saborizantes:** En mezcla de varios flavonoides se puede obtener un sabor salado o dulce, como las chalconas y dihidrochalconas derivados de los flavonoides de naringina y neohesperidina que contienen un dulzor de 2000 veces mayor de la sacarosa (Ochoa M & Ayala A, 2004).
- ∞ **Alimentos funcionales:** Los compuestos flavonoides al contener actividad biológica, como: antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, etc., proporcionan interés de producir alimentos con compuestos adecuados para prevención de enfermedades (Ochoa M & Ayala A, 2004).
- ∞ **Factor de protección solar:** su uso se realiza para protección de la piel, contra la radiación UV, UVA, UVB, con componentes bioactivos seguros y estables para la defensa natural del cuerpo humano (Mejía Giraldo, Atehortúa, & Puertas Mejía, 2014). Los productos con FPS contienen agentes de protección que absorben o reflejan la radiación UV en la piel y así, hay protección de los efectos nocivos de la radiación solar (Saewan & Jimtaisong, 2013).

2.2.4 MARCO CONCEPTUAL

Compuestos bioactivos: compuestos activos extra nutricionales producidos en la naturaleza presentes en diversas cantidades en algunos alimentos. Algunos poseen efectos beneficiosos (Kris Etherton et al., 2002).

Flavonoides: son pigmentos naturales de origen vegetal, con efectos antioxidantes y protectores (Martínez Flórez et al., 2002).

Hidroxianisol butilado (BHA) y Hidroxitolueno butilado (BHT): antioxidantes sintéticos utilizado para preservación de alimentos o productos de origen vegetal. Son solubles en aceites e insolubles en agua (Delgado, Palacio, & Aperador, 2015).

UV: es la radiación compuesta por el espectro de luz ultravioleta de 100 a 400 nm (Cabrera & López, 2006).

UVA: es la radiación de 320 a 400 nm no filtrada por la capa de ozono que pertenece al 95% de UV con efectos dañinos en la piel del 20% (Cabrera & López, 2006).

UVB: radiación no filtrada por la capa de ozono que corresponde al 5% de la radiación UV con efectos dañinos en la piel del 80%. La longitud de onda varía entre 280 a 320 nm (Cabrera & López, 2006).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 LOCALIZACIÓN

El desarrollo de la siguiente investigación se realizó en la Provincia Pastaza, Ciudad Puyo, en la Universidad Estatal Amazónica en el Laboratorio de Química situado en el Departamento de Ciencias de la Tierra.



Fuente: (Google-Earth).

Figura N.- 1. Ubicación geográfica de la Universidad Estatal Amazónica.

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

En el presente estudio se utiliza las siguientes modalidades:

Bibliográfica. -La investigación bibliográfica se realizó en base a libros, artículos científicos y otras publicaciones del tema propuesto, en base a la materia prima a utilizar, a los compuestos flavonoides a extraer, y el método de extracción asistida por ultrasonido definido, con el propósito de ampliar, conocer, profundizar en el tema propuesto.

Experimental. – Consiste en el diseño experimental factorial 2^4 que se empleó, definiendo las condiciones de las variables de tiempo, temperatura, sólido/líquido y relación etanol: agua ejecutando los resultados de superficie- respuesta en diseño central compuesto (CCD).

Descriptiva. – Se empleó los análisis correspondientes obtenidos del diseño central compuesto (CCD), determinando las mejores condiciones del experimento, obteniendo óptimos resultados.

3.3 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal que se utilizó es la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) que previamente se secó en una estufa a 65°C por 24 horas y pulverizó a un tamaño inferior a 0,5 mm, obteniendo en polvo la materia prima. Las naranjas se obtuvieron de las comunidades aledañas de la Provincia de Pastaza. El contenido de humedad de la muestra vegetal fue de 6%, valor utilizado para expresar los resultados en masa seca.

3.3.1.2 MÉTODOS

3.3.1.2.1 ESPECTROFOTOMETRÍA

El método que se utilizó para determinar el contenido total de flavonoides es por espectrofotometría, utilizando el método de Jia et al. (1999) basado en la formación de un complejo flavonoide-aluminio, con algunas modificaciones. La mezcla analítica (0,5mL) de la disolución de extracto se mezcló con agua destilada (2mL) y posteriormente con disolución de NaNO₂ (5%, 0,15mL). Después de 6 minutos, se añadió la solución de AlCl₃ (10%, 0,15mL) y se dejó reposar durante 6 minutos más, luego, se añadió una disolución de NaOH (4%, 2mL) a la mezcla. Inmediatamente, se añade agua destilada para llevar el volumen final a 5mL. Luego, la mezcla se mezcló adecuadamente y se dejó reposar durante 15 minutos. La intensidad del color rosa se mide a 510nm (Guimarães et al., 2010). Y los cálculos se realizaron a partir de la siguiente expresión:

$$y = 0,9186x - 0,0003 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

y: Es la absorbancia de la muestra a partir del cual se calculará la concentración de CFT.

x: Representa al contenido de flavonoides totales (CFT) a determinar.

3.3.1.2.2 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)

Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido con el uso de un instrumento modelo Bransonic Ultrasonic Bath, Serie CPXH. Se utilizaron

disoluciones de Etanol-Agua diluido como disolvente de extracción. Se colocaron aproximadamente 1 g de muestra en un Erlenmeyer 300mL y se añadió la disolución de Etanol-Agua a la concentración del experimento. Después de someterse a sonicación en las condiciones definidas en el diseño para cada experimento, las mezclas se filtraron a través del papel No. 4 de Whatman en condiciones de vacío y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 4°C hasta su uso. Todos los análisis se llevaron a cabo los días posteriores a la extracción para evitar cualquier cambio en las muestras debido al almacenamiento prolongado.

3.3.1.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante elimina los radicales libres, se realizó utilizando los métodos ABTS y FRAP, empleados por su simplicidad de medición, sus ensayos de rapidez y sus resultados reproducibles (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

MÉTODO ABTS (ÁCIDO 2,2- AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN)- 6-SULFÓNICO)

El radical ABTS se preparó mezclando en partes iguales disoluciones de ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. La disolución se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical, la cual fue diluida con etanol al 99% para obtener una absorbancia de 0,873. Para la preparación del persulfato de potasio se pesaron 0,0662g del mismo y se enrazó con agua destilada en un matraz de 100mL. El ABTS se preparó a partir de 0,384g disuelto en 10mL de agua destilada. La curva de calibración se realizó a partir de la preparación, a un intervalo de concentración de 0 a 0,16 mg/L, de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) y los resultados fueron expresados en mmol eq. TROLOX/100g de masa seca a partir de la ecuación:

$$C = \frac{A}{17,618} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde A en la absorbancia de la muestra.

MÉTODO FRAP (PODER DE REDUCCIÓN ANTIOXIDANTE DE HIERRO III).

Se tomaron 100 µL de cada extracto y se colocaron en un matraz aforado de 10 mL al cual se le adicionaron 5 mL de disolución de FRAP recientemente preparado. Se enrasó con agua destilada y se dejó a 37 °C durante 30 minutos. La lectura se registró a una longitud de onda de 593 nm contra el blanco (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

El reactivo FRAP se preparó mezclando 2,5 ml de disolución 2,4,6-piridil -s-triazina (TPTZ) con 2,5 de disolución de cloruro de hierro III y 25 mL de tampón acetato. Para la preparación de la disolución de TPTZ se pesaron 0,03g de reactivo los cuales fueron colocados en un matraz aforado de 10 mL y enrazado con ácido clorhídrico 40 mM. Para la preparación del tampón acetato se disolvieron 0,0061g de acetato de sodio en 200 ml en agua destilada, se añadió ácido clorhídrico 40 Mm hasta que la mezcla alcanzo un pH 3,5, posteriormente se enraza con agua destilada a 250 mL. La preparación de la disolución de cloruro de hierro (III) se disolvieron 0,1352g en 25 mL en agua destilada (Thaipong *et al.*, 2006). La curva de calibración se realizó a partir de la preparación, en un intervalo de concentración de 0,1 a 1 mg/L, de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilico) y los resultados fueron expresados en µmol eq. TROLOX/g de masa seca a partir de la ecuación:

$$C = \frac{A}{0,1879} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde A en la absorbancia de la muestra.

3.3.1.2.4 FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)

La actividad fotoprotectora del extracto metanólico se evaluó mediante el cálculo de FPS; el FPS se determinó mediante el método espectrofotométrico desarrollado por (Mansur, Rodrigues Breder, Ascencao Mansur, & Azulay, 1986), utilizando la región UV-B, considerada como la región de mayor incidencia durante el día en que las personas están expuestas por más tiempo, de esta manera se ha informado que en las clasificaciones de SPF, los valores de FPS a 2–12, 12-30 y ≥ 30 se considera que tienen actividad protectora solar mínima, moderada y alta respectivamente. A continuación, se muestra la longitud de onda utilizadas para determinar el FPS con la siguiente ecuación:

Tabla N.- 4. Ecuación para factor de protección solar.

Longitud de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fuente: (Mansur et al., 1986)

$$FPS = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda)I(\lambda)A(\lambda)$$

Ecuación 4

3.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en dos etapas. La primera mediante un diseño factorial a dos niveles, cuatro factores (2^4) que son 16 experimentos y 5 experimentos centrales, con un total de 21 experimentos. Los cuatro variables estudiadas son: tiempo de sonicación, temperatura, relación sólido-líquido (SL) y porcentaje de etanol: agua, sobre la extracción de flavonoides totales. Los factores significativos y no significativos son analizados mediante los efectos en papel normal (Gráfica de Daniel).

En una segunda etapa, las variables significativas se analizaron empleando un Diseño Central Compuesto (CCD), (metodología de superficie respuesta) y el efecto de las interacciones de las variables independientes en la respuesta (Al-Dhabi, Ponmurugan, & Jeganathan, 2017) para identificar los niveles óptimos de las variables independientes. El nivel de los factores del diseño para la metodología superficie respuesta (bajo y alto) en variables independientes codificadas y no codificadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla N.- 5. Nivel de variables seleccionadas en el diseño factorial y metodología superficie-respuesta.

Variable independiente	Nivel variable codificado		
	Símbolo	Bajo	Alto
		-1	1
Temperatura (°C)	A	30	60
Tiempo de sonicación (min)	B	10	30
Sólido/Líquido (m/v)*	C	1/20	1/60
Relación Etanol- Agua (v/v)	D	50/50	90/10

Fuente: Elaboración propia.

*g de muestra /ml de agua

Se utilizó ANOVA para evaluar la importancia de la influencia de las variables independientes y las interacciones ($p < 0,05$). Además, el gráfico de Pareto y el límite de Bonferroni se emplearon para reforzar la selección de los factores significativos (Anderson & Whitcomb, 2016). Acorde a los resultados las variables fueron seleccionadas para la optimización del proceso de extracción. La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), la significación (p) para el modelo y las pruebas de falta de ajuste.

3.4.1.1 VERIFICACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Para la validación del modelo, se determinaron los valores de los coeficientes de determinación R^2 ajustado experimental y el R^2 predicho. Se obtendrá la validez de cada serie experimental y se evaluó la adecuación del modelo mediante análisis de varianza (ANOVA) (DiNardo, Brar, Subramanian, & Singh, 2019; Sousa, Júnior, & de Souza Buarque, 2019). Las condiciones óptimas para la extracción de flavonoides en cáscaras de naranja a partir de las variables independientes, tiempo de sonicación, temperatura, relación sólido-líquido y relación etanol- agua se obtuvo a partir de la ecuación predictiva de la metodología superficie respuesta. La actividad antioxidante se determinó después de la extracción de compuestos flavonoides en condiciones óptimas. Los valores experimentales y predichos se compararon para determinar la validez del modelo.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 INFLUENCIAS DE LOS FACTORES DE ESTUDIO

En el diseño factorial 2^4 empleado se estudiaron los efectos de las variables: temperatura, tiempo, relación sólido- líquido y relación etanol-agua, obteniendo las unidades experimentales a extraer asistida por ultrasonido de los compuestos flavonoides totales (CFT) del polvo de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*). Los valores de cada unidad experimental se muestran en la tabla 5. Los CFT estuvieron entre 0,1 y 0,1g equivalentes de quercetina/ 100g, calculado en relación a la masa seca de acuerdo a cada condición experimental (tabla 6).

Tabla N.- 6. Unidades experimentales del diseño factorial 2^4 con sus variables independientes (A, B, C y D) y sus resultados de CFT.

	A	B	C	D	CFT
Unidad Exp	Temp (°C)	Tiempo (min)	SL (m/v)	EtOH/H ₂ O (v/v)	g de quercetina /100g m.s.
1	30	30	60	50	4,42642
2	30	10	20	50	4,15653
3	30	10	20	50	4,33233
4	45	20	40	70	6,72709
5	60	30	60	90	13,6165
6	60	10	20	90	6,65683
7	45	20	40	70	6,72844
8	30	10	60	90	15,0669
9	30	10	60	90	15,7449
10	60	30	20	50	4,18549
11	45	20	40	70	7,19170
12	45	20	40	70	7,39201
13	60	30	60	90	13,7927
14	30	30	20	90	2,44779
15	60	10	60	50	8,06611
16	60	10	20	90	6,36301
17	30	30	20	90	2,30605
18	45	20	40	70	7,55213
19	30	30	60	50	4,32642
20	60	30	20	50	4,29549
21	60	10	60	50	8,50598

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados experimentales del diseño factorial fueron analizados por ANOVA apreciando la estimación de los efectos de las variables y las interacciones entre ellas. Las

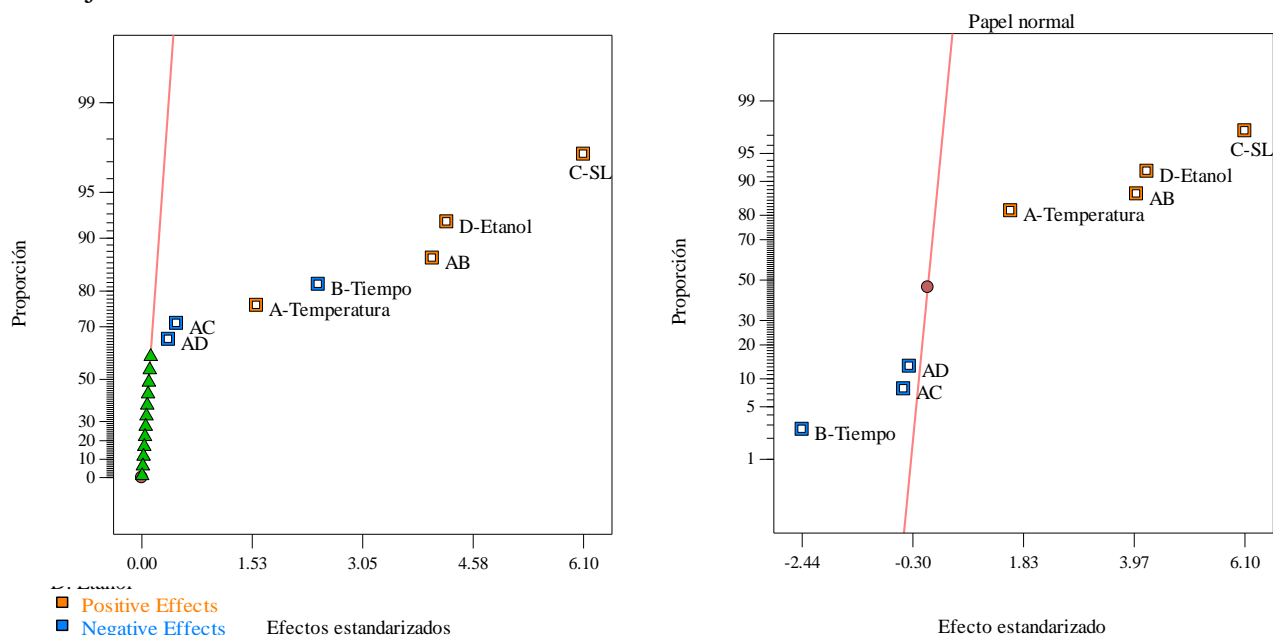
variables estudiadas: temperatura, tiempo, relación SL y %etanol fueron significativos ($p < 0,05$) (tabla 7).

Tabla N.- 7. ANOVA del diseño factorial 2⁴.

Variables	SC	GL	MC	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	319.47	7	45.64	462.40	< 0.0001	significativo
A-Temperatura	10.04	1	10.04	101.73	< 0.0001	
B-Tiempo	23.76	1	23.76	240.68	< 0.0001	
C-SL	148.86	1	148.86	1508.18	< 0.0001	
D-%etanol	70.98	1	70.98	719.17	< 0.0001	
AB	64.37	1	64.37	652.19	< 0.0001	
AC	0.92	1	0.92	9.34	0.0092	
AD	0.54	1	0.54	5.50	0.0355	
Residual	1.28	13	0.099			
Falta de ajuste	0.29	1	0.29	3.47	0.0872	no significativo
Error puro	1.00	12	0.083			
Total	320.75	20				

Fuente: Elaboración propia.

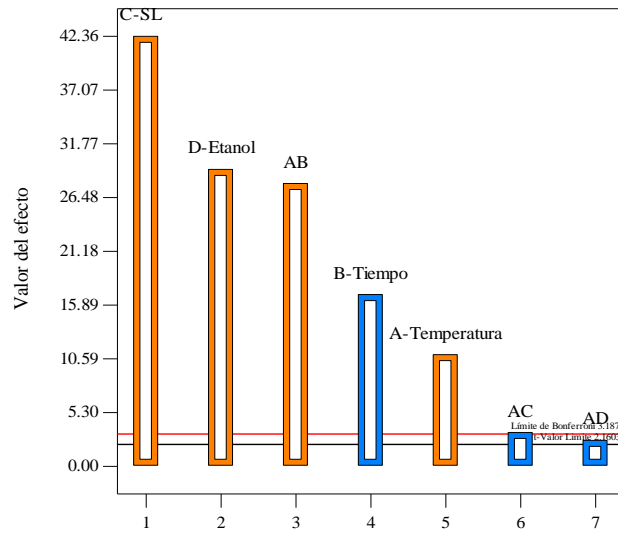
En las figuras de papel probabilístico normal, se observaron los efectos no significativos siguiendo una distribución normal con media igual a cero y varianza constante, es decir que los efectos negativos forman una línea recta, mientras que los efectos positivos aparecen alejados de la línea de normalidad.



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 2. Efecto de los factores significativos y no significativos sobre la extracción de compuestos flavonoides totales en cáscara de *Citrus sinensis*.

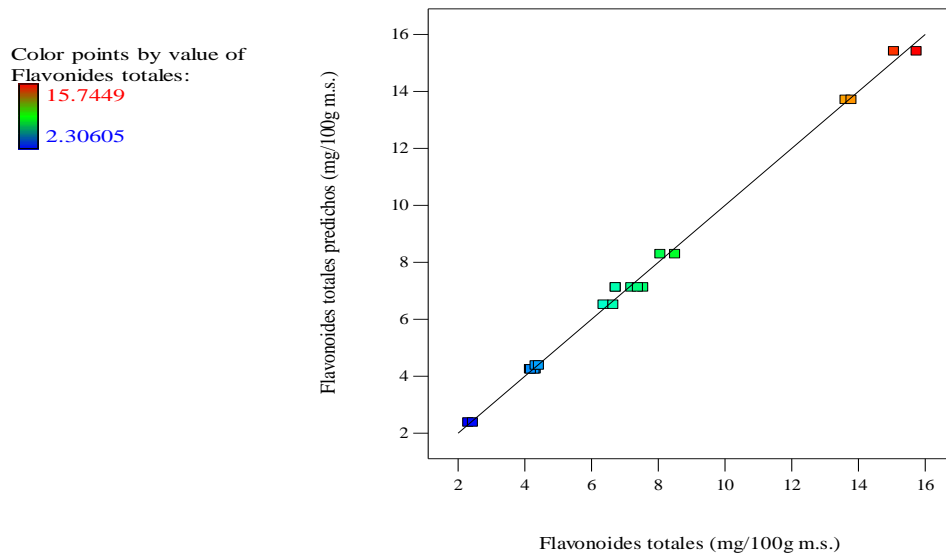
En el gráfico de Pareto (figura 3), se muestran las variables de extracción; relación SL, %etanol, interacción tiempo- temperatura y temperatura que se encuentran encima del límite de Bonferroni con efectos positivos, indicando que son factores significativos, pero la variable tiempo muestra efectos negativos. Las interacciones de las variables temperatura-relación SL y temperatura-%etanol no tienen influencia en la extracción. Los resultados de las variables significativas fueron seleccionados para la optimización de extracción de CFT.



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 3. Diagrama de Pareto de los efectos de las variables de la extracción de CFT.

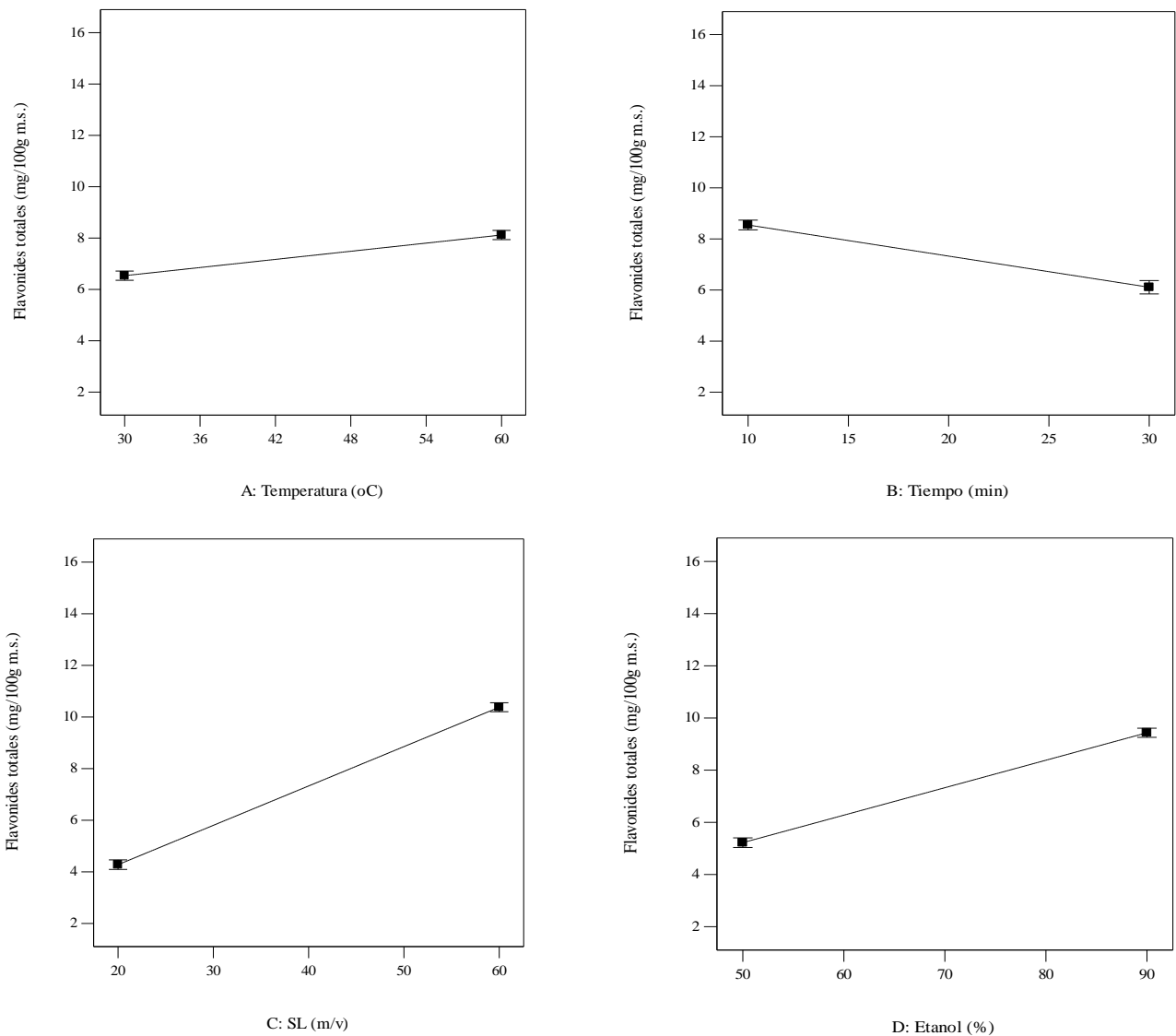
En el modelo factorial se obtuvo un buen ajuste de R^2 0,9960, R^2 Predicho 0,9915 y R^2 Ajustado 0,9938, obteniendo una cantidad mayor de CFT de 15,7449.



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 4. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de CFT en cáscara de *Citrus sinensis*.

En la EUA de los CFT, cada variable tuvo su efectos positivos y negativos, interfiriendo de alguna manera la cantidad de extracción de CFT. En la figura 5: temperatura, relación SL y %etanol al paso de su condición estimado hubo mayor extracción de los CFT, mientras que el tiempo mostró negativamente su extracción. (Li et al., 2019) menciona que la temperatura de extracción es un parámetro vital, los efectos de las temperaturas de 30°C a 60°C hace que aumente gradualmente la extracción y esto pasa por la difusión y solubilidad de los flavonoides en el agua, pero una temperatura mayor podría degradar algunos compuestos termo sensibles. En cambio, el tiempo de sonicación durante 30 min, hizo que disminuyera la extracción. Los flavonoides en la materia prima no podrían extraerse completamente si el tiempo de extracción es demasiado corto, sin embargo, si el tiempo de extracción es demasiado largo podría degradar los compuestos bioactivos.



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 5. Efectos de cada variable de extracción de CFT.

4.2 ANÁLISIS DE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE

RESPUESTA. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (CCD).

La optimización tuvo como objetivo encontrar la mejor combinación de los cuatros variables independientes que influyeron significativamente, maximizando el proceso de extracción de los CFT (tabla 8).

Tabla N.- 8. CCD a partir de las variables independientes (A, B, C y D) y resultados de CFT.

Unidad Exp	A	B	C	D	Experimental	Predicho
	Temp (°C)	Tiempo (min)	SL (m/v)	EtOH/H ₂ O (v/v)		
1	30	30	20	50	3,53	3,04
2	30	10	60	50	8,85	8,41
3	60	30	60	50	9,84	9,47
4	30	20	40	70	6,31	6,4
5	45	30	40	70	5,93	6,05
6	45	20	40	70	7,25	7,19
7	45	20	40	70	6,73	7,19
8	30	10	20	50	4,33	4,61
9	45	10	40	70	8,83	8,33
10	30	30	60	90	6,73	6,3
11	30	30	20	90	2,31	2,49
12	60	30	20	90	5,39	5,38
13	45	20	40	70	7,19	7,19
14	45	20	40	70	6,73	7,19
15	60	30	60	90	11,62	12,12
16	60	10	20	90	6,36	6,5
17	60	20	40	70	8,92	7,98
18	45	20	40	70	7,39	7,19
19	45	20	60	70	10,82	9,82
20	30	10	60	90	13,07	13,53
21	45	20	20	70	4,84	4,55
22	30	30	60	50	4,33	4,97
23	60	10	60	90	15,08	15,12
24	60	30	20	50	4,30	4,61
25	60	10	60	50	8,07	8,67
26	45	20	40	90	8,46	8,66
27	30	10	20	90	7,93	7,85
28	60	10	20	50	1,97	1,94
29	45	20	40	50	5,20	5,71
30	45	20	40	70	7,33	7,19

Fuente: Elaboración propia.

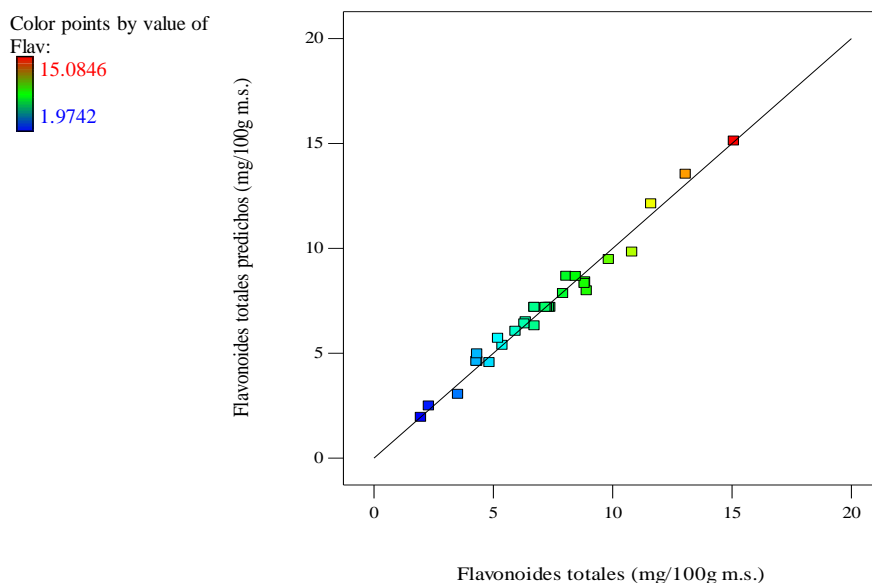
La evaluación de los cuatro modelos polinomiales fueron analizados, seleccionando el modelo cuadrático sugerido que fue significativo con una desviación estándar 0,53, además, tuvo un R^2 ajustado de 0,9683 y R^2 predicho a diferencia de los otros modelos (tabla 9).

Tabla N.- 9. Resumen de la evaluación de los cuatro modelos polinomiales analizados en la optimización de CFT en cáscaras de *Citrus sinensis*.

Modelo	Std. Dev	R^2	R^2 Adj	R^2 Predicho	
Lineal	1,48	0,7833	0,7486	0,6164	
2FI	0,52	0,9841	0,9692	0,9056	
Cuadrático	<u>0,53</u>	<u>0,9792</u>	<u>0,9683</u>	<u>0,9211</u>	<u>Sugerido</u>
Cúbico	0,59	0,9905	0,9606	-0,6971	

Fuente: Elaboración propia.

La distribución de los puntos confirma la capacidad del modelo cuadrático con un valor de R^2 0,9792, R^2 predicho 0,9211 y R^2 ajustado 0,9683. Interpretando que el 97,92% se atribuyó a las variables estudiadas de la extracción de los flavonoides totales. El valor predicho del modelo cuadrático y los valores obtenidos en laboratorio fueron comparados (figura 6).



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 6. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de CFT en cáscara de *Citrus sinensis*.

Para el CCD, se implementó el ANOVA para analizar la significancia de las variables. Las variables: temperatura, tiempo, relación SL, %etanol y sus interacciones mostraron ser significativos, con p valor <0,05. La falta de ajuste en el ANOVA resultó ser no significativo con un p valor >0,05, indicando que el modelo es adecuado para representar los datos experimentales con un nivel de confianza del 95% (tabla 9).

Tabla N.- 10. ANOVA para el modelo cuadrático.

Variab les	SC	GL	MC	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	248.43	10	24.84	89.48	< 0.0001	significativo
<i>A-Temperatura</i>	<i>11.17</i>	<i>1</i>	<i>11.17</i>	<i>40.23</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>B-Tiempo</i>	<i>23.41</i>	<i>1</i>	<i>23.41</i>	<i>84.32</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>C-SL</i>	<i>125.07</i>	<i>1</i>	<i>125.07</i>	<i>450.48</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>D-%etanol</i>	<i>39.07</i>	<i>1</i>	<i>39.07</i>	<i>140.73</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AB</i>	<i>17.94</i>	<i>1</i>	<i>17.94</i>	<i>64.62</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AC</i>	<i>8.58</i>	<i>1</i>	<i>8.58</i>	<i>30.89</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>AD</i>	<i>1.74</i>	<i>1</i>	<i>1.74</i>	<i>6.27</i>	<i>0.0215</i>	
<i>BC</i>	<i>3.49</i>	<i>1</i>	<i>3.49</i>	<i>12.57</i>	<i>0.0022</i>	
<i>BD</i>	<i>14.39</i>	<i>1</i>	<i>14.39</i>	<i>51.84</i>	<i>< 0.0001</i>	
<i>CD</i>	<i>3.57</i>	<i>1</i>	<i>3.57</i>	<i>12.86</i>	<i>0.0020</i>	
Residual	5.28	19	0.28			
<i>Falta de ajuste</i>	<i>4.83</i>	<i>14</i>	<i>0.34</i>	<i>3.85</i>	<i>0.0722</i>	<i>no significativo</i>
<i>Error puro</i>	<i>0.45</i>	<i>5</i>	<i>0.089</i>			
Total	253.71	29				

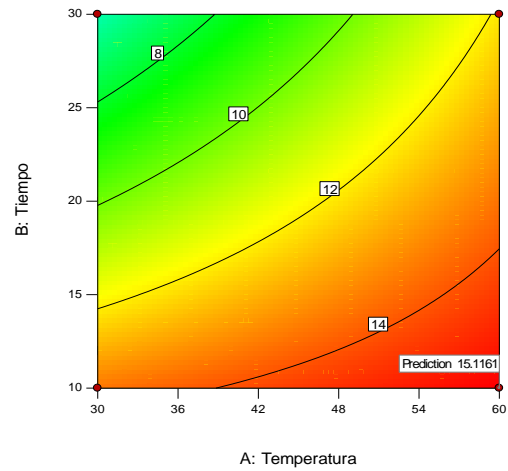
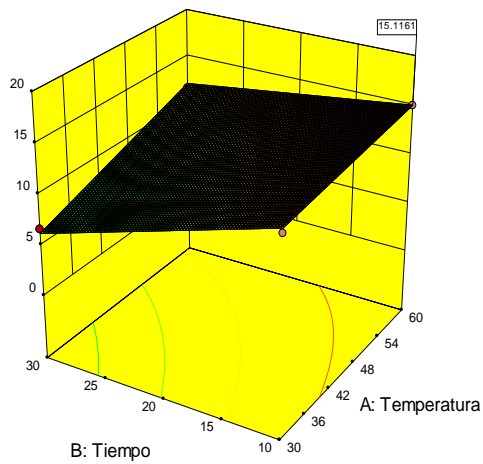
Fuente: Elaboración propia.

La ecuación en términos reales puede considerarse para hacer predicciones sobre las variables en el intervalo considerado para cada factor. La ecuación es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Flavonoides} = & 5.68647 - 0.26328A - 6.34532E-003B - \\ & 0.013975C + 0.071790D + 7.05935E-003AB + 2.44043E- \\ & 003AC + 1.09987E-003AD - 2.33497E-003BC - \\ & 4.74242E-003BD + 1.18075E-003CD \end{aligned}$$

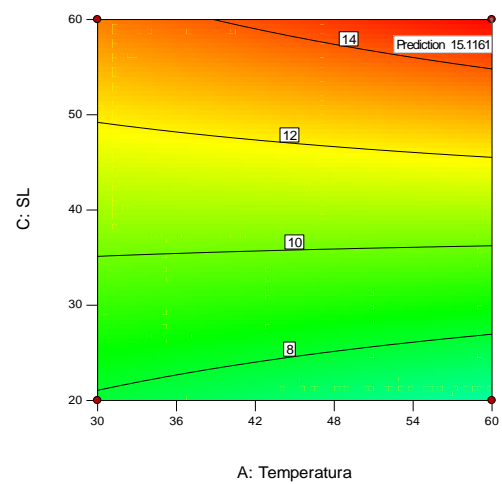
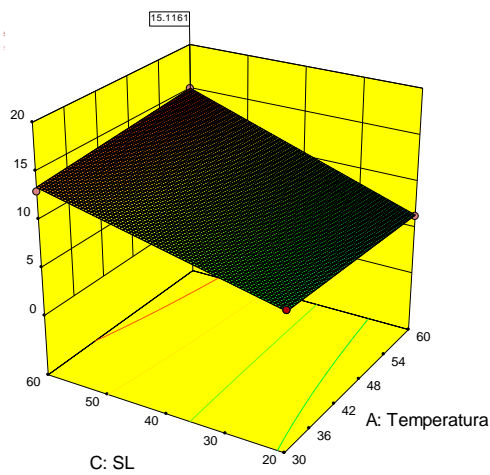
Ecuación 5

El modelo codificado se usó para generar gráficos de superficie, en el análisis las interacciones de las variables sobre el rendimiento de los compuestos flavonoides. Las interacciones estudiadas de temperatura, tiempo, relación SL y %etanol se muestran en las figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12. El CFT predicho del modelo fue de 15,1161 g equivalente de quercetina/100g m.s.



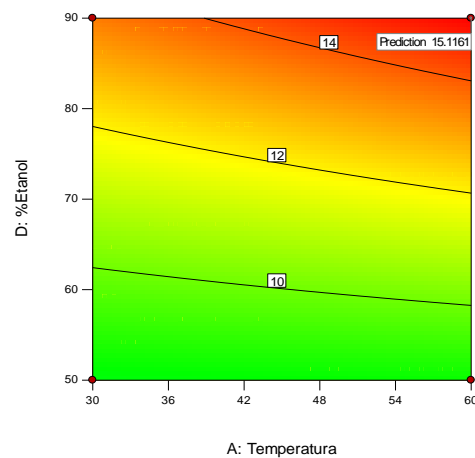
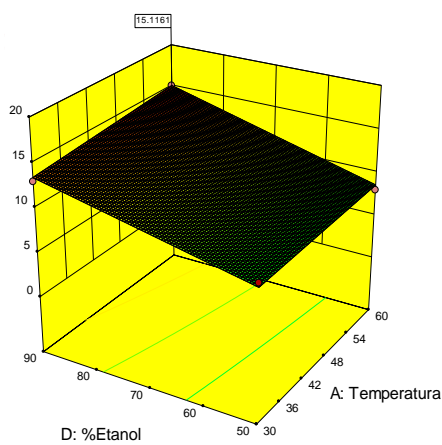
Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 7. Interacción de temperatura y tiempo sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.



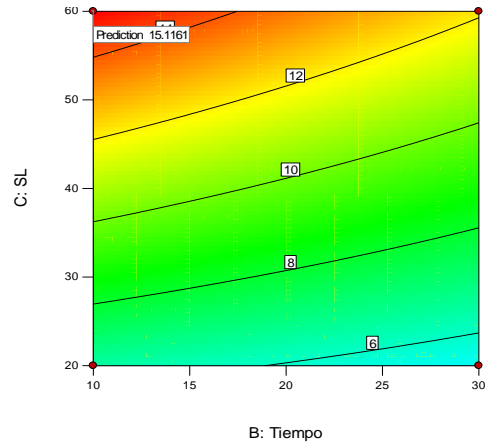
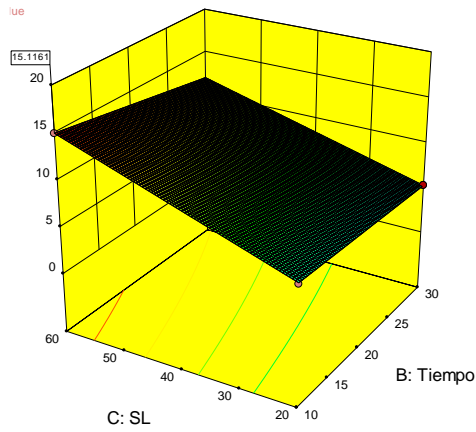
Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 8. Interacción de temperatura y relación SL sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.



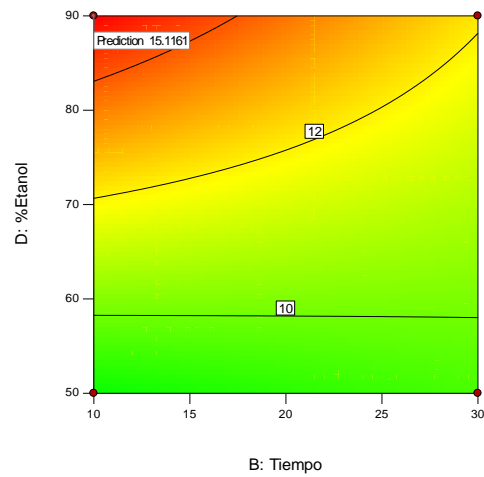
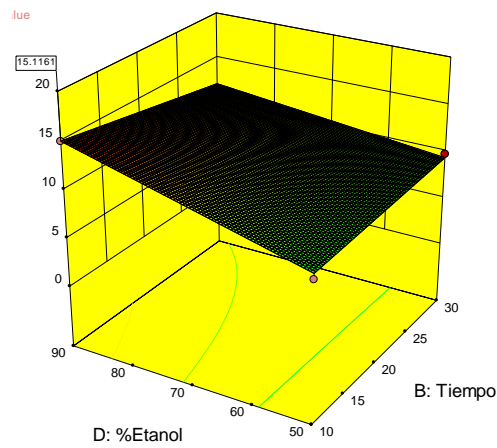
Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 9. Interacción de temperatura y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.



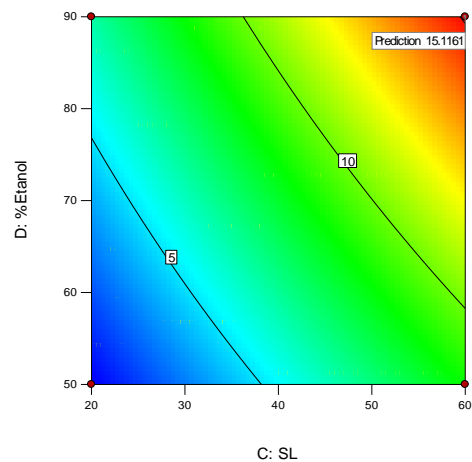
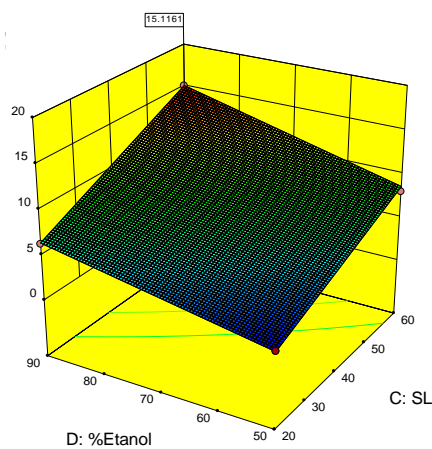
Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 10. Interacción de tiempo y relación SL sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 11. Interacción de tiempo y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.



Fuente: Elaboración propia.

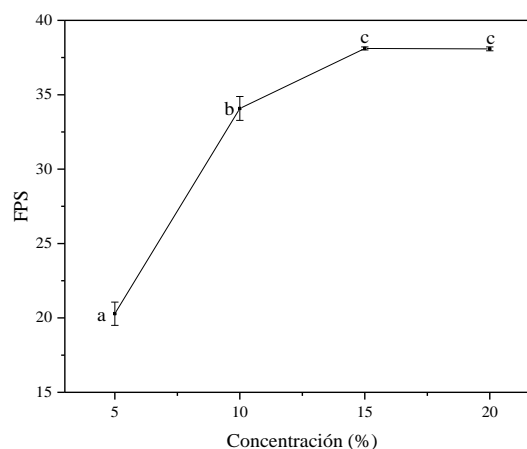
Figura N.- 12. Interacción de relación SL y %etanol sobre la extracción de flavonoides en cáscara de *Citrus sinensis*.

4.3 RESULTADOS DEL EXTRACTO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

Las condiciones óptimas encontradas del modelo fueron de: temperatura 60°C, tiempo 10 min, relación SL 60mL y %EtOH 90%. El CFT en el extracto optimizado fue 13,37g equivalentes de quercetina/100g m.s., a diferencia del predicho o valor teórico de 15,11g equivalentes de quercetina/100g m.s., obteniendo una diferencia de 12%.

Del extracto optimizado se midió la actividad antioxidante por ABTS y FRAP, obteniendo los resultados de 0,12 ($\pm 0,002$) g equivalentes de trolox /100g m.s. y 1,41 ($\pm 0,07$) g/100g o 5,65 ($\pm 0,26$) mmol/100g respectivamente. En otras investigaciones en variedades de cítricos, (Ordoñez Gómez, Reátegui Díaz, & Villanueva Tiburcio, 2018), demostraron que en la cáscara de naranja obtuvieron una actividad antioxidante de 182 $\mu\text{g/mL}$ o 0,0182 g/100 mL por ABTS. (Guo et al., 2003) mencionan una antioxidante de 5,69 ($\pm 0,26$) mmol/100g en cáscara de naranja realizado por el radical FRAP.

En cambio, se determinó también el Factor de protección solar (FPS), que en 1997 la Asociación Europea de Artículos de Tocador y Perfumería (COLIPA), clasificó sus productos; de FPS 15-25 con protección alta y FPS 30-50 protección extrema, así demostrando que los FPS mayores obtenidos al 20% de concentración fue 38,08 ($\pm 0,13$) y al 15% de concentración fue 38,11 ($\pm 0,10$) (figura 13), se encuentran apto para su uso y que ejercerán el objetivo de protección en la piel (Azcona Barbed, 2003). Los compuestos flavonoides son fotoprotectores atribuido por su capacidad de activación de enzimas y de propiedades antioxidantes e inhiben de oxidasas, protegiendo de los rayos UV (Saewan & Jimtaisong, 2013).



Fuente: Elaboración propia.

Figura N.- 13. Factor de protección solar a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- ✓ Las variables de extracción de CFT mediante el diseño factorial, en base seca de cáscaras de naranja, fueron significativos en relación a: temperatura, tiempo, Relación SL y %etanol.
- ✓ En la optimización mediante el CCD, se encontró las condiciones óptimas de acuerdo a la metodología de superficie-respuesta, validadas experimentalmente. El CFT obtenido fue 13,37g equivalentes de quercetina/100g m.s. Este valor resultó superior a reportado por otras variedades de la misma especie. El CFT obtenido se puede aplicar en alimentos funcionales por su gran contenido bioactivo.
- ✓ La actividad antioxidante determinada a través de los métodos ABTS y FRAP fue: 0,12 ($\pm 0,002$) g equivalentes de trolox /100g m.s. y 1,41 ($\pm 0,07$) g/100g o 5,65 ($\pm 0,26$) mmol/100g respectivamente. Los valores obtenidos resultaron superiores a diferencia de lo reportado por otros estudios de la misma especie. La actividad antioxidante obtenida es ideal para aplicación en conservación de productos alimentos que inhiban la oxidación.
- ✓ El factor de protección solar (FPS) que fue realizado in vitro, prevalecen a las concentraciones de 20% y 15% que resultó entre 38,08 ($\pm 0,13$) y al 15% fue 38,11 ($\pm 0,10$), que no existe diferencia entre los dos valores, escogiendo el FPS de 38,11 ($\pm 0,10$). Los flavonoides con FPS son considerados fotoprotectores atribuido por sus propiedades antioxidantes y protección solar que ejerce en la piel, su aplicación es recomendada para industrias farmacéuticas y/o cosmetológica.

5.2 RECOMENDACIONES

- ◆ Realizar el proceso de extracción de compuestos flavonoides considerando factores de la materia prima (ejemplo. Madurez del fruto, variedades, tiempo de vida útil, etc.). El conjunto de nuevas informaciones obtenidas podría ser relevante para mejorar y estandarizar los métodos de recolección de la especie.
- ◆ Emplear otros métodos de extracción no convencionales en la materia prima para posterior uso de consumo, y que los reactivos utilizados en su extracción no generen alteración en su composición físico-químico.

- ◆ Determinar los tipos de compuestos flavonoides que se encuentran en la especie *Citrus sinensis*, empleando otro método de cuantificación, como HPLC.
- ◆ Elaborar productos agroindustriales con los compuestos flavonoides extraídos y estudiar sus características físico-químicas y sensoriales.
- ◆ Considerar próximas investigaciones de la actividad antioxidante vinculando al daño oxidativo inducido por radiación UV para conocer las aplicaciones finales que se puede presentar para el extracto final.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 206-213.
- Albán Villagómez, D., & Freire Marin, D. (2009). *Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja citrus sinensis provenientes del proceso agroindustrial en la provincia de Bolívar*. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2597>
- Anderson, M., & Whitcomb, P. (2016). *RSM Simplified – Optimizing Process Using Response Surface Methods for Design of Experiments*.
- Armas Valdiviezo, A. d. C. (2012). *Diseño de una Planta Modular para la Elaboración de Licor de Naranja en el Cantón Caluma*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/21112>
- Azcona Barbed, L. (2003). Protección solar. Actualización. *Elsevier. Farmacia Profesional*, 17 (5), 66-75. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13047981>
- Cabrera, C., & López, M. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*, 29 (7), 291-298. <http://scielo.isciii.es/pdf/onco/v29n7/03.pdf>
- Delgado, A. E., Palacio, O., & Aperador, W. (2015). Efecto de Butil Hidroxitolueno (BHT) en la Estabilidad Oxidativa de un Lubricante a Base de Aceite de Ajonjolí. *Información Tecnológica*, 26 (4), 81-88. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v26n4/art11.pdf> doi:10.4067/S0718-07642015000400011
- DiNardo, A., Brar, H. S., Subramanian, J., & Singh, A. (2019). Optimization of microwave-assisted extraction parameters and characterization of phenolic compounds in Yellow European Plums. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 256-267.
- Durán Ramírez, F. (2009). Naranja dulce (Citrus sinensis Osbeck), Análisis del jugo, Comparación del color y Tamaño de los frutos. In G. L. Editores (Ed.), *Manual de cítricos: especies, variedades, cultivos, injertos* (21 ed., pp. 8-26). Bogotá, Colombia. (Reprinted from: D'vinni S.A).
- ESPAC. (2016). Provincia Bolívar. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*, 36. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion%20ESPAC%202016.pdf
- García Serrano, C. R. (2000). Frutales de clima templado- Cítricos. In G. OCEANO (Ed.), *Enciclopedia Práctica de la Agricultura y de la Ganadería* (pp. 637-647). Barcelona, España.
- Geronazzo, H., Blanco, S., & Robin, J. H. (2002). Contenido de glucósidos de flavonoides en frutos inmaduros de Citrus aurantium y Citrus sinensis del noroeste Argentino. *Instituto de Investigaciones para la Industria Química* 13 (3) 49-53.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ali Ebrahimzadeh, M. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22 (3), 277-281.
- Gómez Manrique, A. (2018). Visión general del aprovechamiento de residuos cítricos como materia prima de biorrefinerías. *Cuadernos del Tomás*, 10, 153-168. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6573031>
- Google-Earth (Cartographer). Puyo. Retrieved from <https://earth.google.com/web/@-1.46866183,-77.99750162,946.99733435a,488.90971791d,35y,-27.16293702h,68.49986562t,0r/data=ChcaFQoNL2cvMTFjbGdieGJqNhgBIAEoAg>

- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J., João Sousa, M., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 99-106. doi: 10.1016
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, *23*, 1719–1726.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., . . . Furukawa, H. (2000). Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of Citrus Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48* (9), 3865-3871. doi: <https://doi.org/10.1021/jf000100o>
- Khan, M. K., Abert Vian, M., Fabiano Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, *119*, 851-858. doi: 10.1016
- Kris Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., . . . Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, *113* (9), 71 - 88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566142?dopt=Abstract> doi:10.1016 / s0002-9343 (01) 00995-0
- Li, J., Wu, C., Li, F., Yu, R., Wu, X., Shen, L., . . . Zeng, W. (2019). Optimization of ultrasound-assisted water extraction of flavonoids from *Psidium guajava* leaves by response surface analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 1-9. doi: 10.1080/10826068.2018.1466158
- Londoño Londoño, J. A. (2011). Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides. In C. U. Lasallista (Ed.), *Perspectivas y avances de investigación* (pp. 395-416). Colombia. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/78>.
- Mansur, J., Rodrigues Breder, M. N., Ascencao Mansur, M. C., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*, *61*, 121-124.
- Marín, F., Soler Rivas, C., Benavente García, O., Castillo, J., & Pérez Alvarez, J. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Elsevier. Food Chemistry*, *100*, 736-741. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.040
- Martínez Flórez, S., González Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, *17* (6), 271-278.
- Mejía Giraldo, J. C., Atehortúa, L., & Puertas Mejía, M. Á. (2014). Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, *12* (4), 272-281. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144i.pdf>
- Ochoa M, C. I., & Ayala A, A. A. (2004). Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, *6* (2), 93-104.
- Ordoñez Gómez, E. S., Reátegui Díaz, D., & Villanueva Tiburcio, J. E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*, *9* (1), 113-121.
- Pérez Nájera, V., Lugo Cervantes, E., Gutiérrez Lomelí, M., & Del Toro Sánchez, C. L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, *15* (3), 18-22.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4290-4302.

- Rangel G, A. P. (2010). Cuantificación de flavonoides (Catequinas) en cáscara de naranja variedad criolla (*Citrus sinensis*) producida en Norte de Santander. *Alimentech Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 8 (2), 34-43.
- Restrepo Duque, A. M., Arredondo Velásquez, A., Morales, C., Tamayo Mesa, M., Benavides Paz, Y. L., Bedoya Mejía, V., & Vélez Argumedo, C. (2012). Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en el desarrollo de cáscaras de naranja mínimamente procesadas fortificadas con potasio, sodio, y vitaminas B1, B6 y B91. *Engineering and Technology*, 1 (1), 8-16.
- Restrepo Duque, A. M., Rodríguez Sandoval, E., & Manjarrés Pinzón, K. (2011). Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + Limpia*, 6 (2), 47-57.
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (9), 129-141. doi: 10.7324/JAPS.2013.3923
- Sánchez, W., Murillo, E., & Méndez, J. J. (2010). Potencial antioxidante de residuos agroindustriales de tres frutas de alto consumo en el Tolima. *Scientia et Technica Año XVII*, 46, 138-143.
- Santiago Castro, J. T. (2014). *Obtención y caracterización físicoquímica, microbiológica y organoléptica de residuos fibrosos de naranja (Citrus sinensis) obtenidos a 50°C y su incorporación en un sistema alimenticio*. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León. Retrieved from http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/12220.pdf
- Sousa, M. S. B., Júnior, J. M. L., & de Souza Buarque, D. (2019). Optimization of the Extraction of Polyphenols and Antioxidant Capacity from *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth Fruit by Response Surface Methodology *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*: IntechOpen.
- Ulloa, E. (2012). *Caracterización del sistema de producción de naranja (Citrus Aurantium L.), en la parroquia las Mercedes, cantón las Naves, provincia Bolívar*. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda. Retrieved from <http://dspace.ueb.edu.ec/handle/123456789/1010>
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14 (1), 59-72.
- Ya Qin, M., Xing Qian, Y., Zhong Xiang, F., Jian Chu, C., Gui Hua, X., & Dong Hong, L. (2008). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5682-5690.
- Yances Astudillo, S. (2018). *Importancia de la producción de naranja en Caluma y el impacto que tiene en los festivales del cantón: análisis cultural turístico*. Universidad San Francisco de Quito, Quito. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7935>
- Yuste Pérez, M. P. (2007). Cítricos In I. B. S.A (Ed.), *Biblioteca de la Agricultura* (pp. 243-244). Barcelona, España.

ANEXOS

Anexo 1: Tratamiento previo de las cáscaras de naranja.



Imagen N.- 1. Selección y corte de las naranjas dulces.



Imagen N.- 2. Cáscaras de naranja cortadas sin zumo y sin gajos, ni semillas.



Imagen N.- 3. Secado de las cáscaras de naranja en estufa a 65°C por 24 horas.



Imagen N.- 4. Cáscaras de naranja secas.



Imagen N.- 5. Molienda de las cáscaras de naranja secas.



Imagen N.- 6. Materia seca de las cáscaras de naranja.

Anexo 2: Extracción Asistida por Ultrasonido



Imagen N.- 7. Peso de la masa de 1g.



Imagen N.- 8. %etanol-Agua a diferentes concentraciones.



Imagen N.- 9. Extracción de compuestos flavonoides en el equipo de baño ultrasónico.



Imagen N.- 10. Filtración del extracto extraído.



Imagen N.- 11. Extractos de los 21 tratamientos.

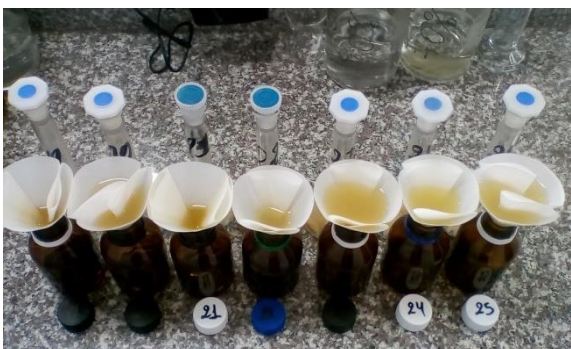


Imagen N.- 12. Extracción y filtración de los CFT optimizados.



Imagen N.- 13. Extractos de CFT optimizados.

Anexo 3: Cuantificación de CFT en Equipo Espectrofotómetro



Imagen N.- 14. Extracto óptimo de CFT con 6 repeticiones.



Imagen N.- 15. Equipo Espectrofotómetro para cuantificación de los CFT.

Anexo 4: Cuantificación de Antioxidantes (ABTS, FRAP) y FPS en Equipo Espectrofotómetro



Imagen N.- 16. Preparación de reactivos ABTS y FRAP.



Imagen N.- 17. Cuantificación de antioxidantes y factor de protección solar contra su propio blanco.