

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA

“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (MOTILÓN) MEDIANTE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA”

AUTOR

Jhoselin Lizeth García Bosquez

DIRECTOR

PhD. Luis Ramón Bravo Sánchez

PUYO – ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Jhoselin Lizeth García Bosquez, con cédula de identidad 1501014458, declaro que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación, que tiene como tema “**Optimización de la extracción de antocianinas de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (motilón) mediante metodología de superficie de respuesta**”, 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 el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Jhoselin Lizeth García Bosquez

CI. 1501014458

**CERTIFICADO DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

Por medio del presente, Luis Ramón Bravo Sánchez con CI: 1757041452 certifico que Jhoselin Lizeth García Bosquez egresada de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Estatal Amazónica, realizó el proyecto de investigación titulado: **“Optimización de la extracción de antocianinas de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (motilón) mediante metodología de superficie de respuesta”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial bajo nuestra supervisión.

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez PhD.

INFORME DEL DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “Optimización de la extracción de antocianinas de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (motilón) mediante metodología de superficie de respuesta”

Autor (a): Jhoselin Lizeth García Bosquez

Unidad de Titulación: Carrera Ingeniería Agroindustrial

Director del proyecto: PhD. Luis Ramón Bravo Sánchez

Fecha: 25 junio del 2019

Introducción y contexto de la investigación:

La planta *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg. pertenece a la familia *Phyllanthaceae*. Es una especie de los bosques andinos del Ecuador, Colombia y Perú. En Ecuador hay alrededor de diez especies de *Hieronyma*, y por lo general todas son conocidas por el nombre común "motilón". Son consideradas como importantes árboles maderables utilizados en construcción, muebles, contrachapado, etc. Los frutos de esta especie poseen antocianinas, que pueden ser importantes para la industria alimentaria por su posible empleo como colorantes naturales y por sus propiedades antioxidantes. Su inocuidad también ha sido demostrada.

Cumplimiento de objetivos

Los objetivos han sido cumplidos satisfactoriamente. El método analítico desarrollado y validado resultó confiable pues cumplió con los parámetros de desempeño analítico fundamentales, además se demostró mediante el diseño Box-Behnken Desing que los factores no significativos para la extracción de CAT, en frutos de *H. macrocarpa*, fueron relación etanol-agua, temperatura y tiempo de extracción, mientras que el pH resultó significativo. El extracto obtenido bajo las condiciones óptimas presentó un contenido de antocianinas totales de $2968,69 \pm 11034,2$ mg /100g, lo cual es inferior a lo informado para otras especies; en cuanto a su actividad antioxidante, se presentó mediante los métodos ABTS y FRAP, valores de 59,8546 mmol/100g y 297,939 μ mol/g, respectivamente, superiores a los reportados para otras especies.

Principales resultados obtenidos

El proyecto de investigación demostró que dentro del desarrollo analítico fue necesario determinar la longitud de onda de máxima absorción para las mediciones de absorbancia correspondientes a antocianinas totales. Para ello se registró un espectro en el intervalo de 400 a 580 nm, cuya máxima absorción resultó ser 520 nm. El pH, fue el factor significativo ($p < 0,05$) mientras la relación que resultó no significativa ($p > 0,05$) en la extracción de contenido de antocianinas fue la interacción, tiempo-temperatura, temperatura-relación etanol: agua.

La estudiante Jhoselin Lizeth García Bosquez ha demostrado dedicación, e independencia durante el desarrollo del proyecto de 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:

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez
C.I. 1757041452

AVAL

Quien suscribe **LUIS RAMÓN BRAVO SÁNCHEZ** docente de la Universidad Estatal Amazónica avalan el Proyecto de investigación:

Título: “Optimización de la Extracción de Antocianinas de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (Motilón) mediante metodología de superficie de respuesta”.

Autora: Jhoselin Lizeth García Bosquez.

Certificamos haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Investigación y consideramos cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de investigación para que sea presentado ante la Coordinación de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial como forma de titulación como Ingeniero Agroindustrial, y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que a si conste, firmamos la presente a los dos días del mes de abril del 2019

Atentamente,

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez

C.I. 1757041452

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación aprueba el proyecto de investigación titulado “**Optimización de la Extracción de Antocianinas de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg (Motilón) mediante metodología de superficie de respuesta**”.

Dr. Manuel Pérez Quintana

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MSc. Franklin Villafuerte Carrillo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MSc. Cristian Abad Basantes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Me faltarán páginas para expresar todo lo que siento y lo agradecida que estoy con Dios por bendecirme infinitamente, con mis padres Jimmy García y Edelina Bosquez por ser el sustento y la guía en mi camino, mis hermanos Cinthya García y Ariel García por el apoyo moral que día a día me brindan, a mi abuela materna Fidelia Albán que con su incomparable amor siempre ha sido mi soporte y a mi adorada tía Delma Bosquez cómplice, amiga en todas mis aventuras.

Quiero agradecer a mis tutores Dr. Luis Bravo, Dr. Yasiel Arteaga y al Dr. Mateo Radice por saber encaminarme durante la elaboración de mi proyecto de titulación, además de su enorme paciencia.

Además quiero agradecer a mi querido amigo Iván Silva, por todos los momentos compartidos durante mi vida universitaria, que los guardare siempre en mi corazón.

A la Sra. Fabiola Rugel, su esposo el Sr. Ángel Robayo y su hijo Esteban Robayo quienes fueron los facilitadores de la materia prima con la cual se realizó el proyecto de titulación.

Al Dr. David Neil quien identificó la planta motilón la cual se usó para el proyecto de titulación.

DEDICATORIA

Todo este esfuerzo lo dedico primero a Dios por darme sabiduría, a mis padres por la paciencia, los consejos, el amor que siempre me brindan, ya que sin ellos no hubiera logrado ser todo lo que soy ahora.

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

RESUMEN

Mediante este estudio se pudo evaluar el efecto que tienen las distintas variables de extracción: temperatura, tiempo de extracción, pH y relación etanol-agua, en cuanto a la combinación óptima que permitió encontrar las mejores condiciones de extracción asistida por ultrasonidos de compuestos antociánicos de los frutos de *H. macrocarpa*. Las condiciones óptimas propuestas, por el modelo de superficie de respuesta, fueron la temperatura de extracción 35,75 °C, tiempo 14,51 min, pH de 1,18 en una relación etanol-agua de 82:18. El extracto optimizado de frutos de *H. macrocarpa* mostró un contenido total de antocianinas de $16204,51 \pm 1610,9$ mg/ 100 g de masa seca. Además, dicho extracto presentó una capacidad antioxidante considerable determinada por dos métodos analíticos de evaluación de dicha actividad: ABTS (59,85 mmol / 100 g de masa seca) y FRAP (29,79 mmol / 100 g de masa seca).

PALABRAS CLAVE

Hieronyma macrocarpa Müll. Arg, superficie de respuesta, extracción asistida por ultrasonido, actividad antioxidante.

ABSTRACT AND KEYWORDS

ABSTRACT

Through this study it was possible to evaluate the effect of the different extraction variables: temperature, extraction time, pH and ethanol-water ratio, in terms of the optimal combination that will allow to find the best conditions of ultrasound-assisted extraction of anthocyanin compounds from the fruits of *H. macrocarpa*. The optimal conditions proposed, by the response surface model, were the extraction temperature 35.75 ° C, time 14.51 min, pH of 1.18 in an ethanol-water ratio of 82:18. The optimized fruit extract of *H. macrocarpa* showed a total anthocyanin content of 16204.51 ± 1610.9 mg / 100 g of dry mass. The optimized fruit extract of *H. macrocarpa* presented a considerable antioxidant capacity determined by two analytical methods for the evaluation of this activity: ABTS (59.85 mmol / 100 g of dry mass) and FRAP (29.79 mmol / 100 g of dry mass).

KEYWORDS

Hieronyma macrocarpa Müll. Arg, response surface, ultrasound-assisted extraction, antioxidant activity.

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Problema de Investigación. –..... | 2 |
| 1.2. Objetivo General. | 2 |
| 1.3. Objetivos Específicos. | 2 |
| CAPÍTULO II | 3 |
| 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 3 |
| 2.1 HIERONYMA MACROCARPA (MOTILÓN) | 3 |
| 2.2. COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS EN HIERONYMA MACROCARPA. | 3 |
| 2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. | 4 |
| 2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN COMPUESTOS FENÓLICOS. | 5 |
| 2.5. ESPECTROFOTOMETRÍA | 5 |
| 2.6. COLORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. ANTOCIANINAS. | 6 |
| CAPÍTULO III | 7 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 3.1 LOCALIZACIÓN | 7 |
| 3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 7 |
| 3.2.1. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS | 7 |
| 3.2.2 TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN | 7 |
| 3.2.3. EXTRACCIÓN | 8 |
| 3.2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS | 8 |
| 3.2.5. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO PARA LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS | 8 |
| 3.2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 9 |
| 3.2.7 VERIFICACIÓN DEL MODELO | 10 |
| 3.2.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 11 |
| 3.2.8.1. ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES ABTS (ÁCIDO 2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN)-6 SULFÓNICO)..... | 11 |
| 3.2.8.2. PODER DE REDUCCIÓN DEL ION FERROSO (FRAP)..... | 12 |
| CAPÍTULO IV | 13 |
| 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 13 |
| 4.1.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA VISIBLE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS | 13 |

| | | |
|--|--|----|
| 4.1.2 | FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS. | 15 |
| 4.1.3 | CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO OBTENIDO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS | 20 |
| 4.1.4. | VALIDACION DEL MODELO PREDICHO | 21 |
| CAPÍTULO V | | 23 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 23 |
| 5.1. | CONCLUSIONES..... | 23 |
| 5.2 | RECOMENDACIONES..... | 23 |
| CAPÍTULO VI | | 24 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | | 24 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Hieronyma Macrocarpa</i> (Motilón)..... | 3 |
| Tabla 2. Colorantes naturales utilizados en la industria alimentaria. | 6 |
| Tabla 3. Nivel de los factores para la metodología de superficie de respuesta. | 10 |
| Tabla 4. Resultados de precisión del método de análisis..... | 14 |
| Tabla 5. Resultados de límites de detección y cuantificación del método de análisis..... | 14 |
| Tabla 6. Diseño Box-Behnken Desing a partir de las variables independientes (A, B, C y E) y resultados experimentales de los compuestos antociánicos: | 15 |
| Tabla 7. ANOVA para el modelo BBD seleccionado..... | 16 |
| Tabla 8. Comparación del contenido de antocianinas y actividad antioxidante de <i>H. macrocarpa</i> y otras especies. | 22 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras químicas de antocianinas encontradas en el motilón (1) Delfinidina-3-O-glucopiranososa, (2) Delfinidina-3-O-(6''-O-- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido. (4) Petunidina-3-O-(6''-O- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido..... | 4 |
| Figura 2. Espectro visible de antocianinas | 13 |
| Figura 3. Influencia de la temperatura (a), tiempo (b), pH(c) y la relación etanol-agua (d) en la extracción de antocianinas totales. Modelo cuadrático con los valores predichos y experimentales del contenido total de antocianinas (e)..... | 18 |
| Figura 4. Superficie de respuestas y gráficos de contorno para los efectos tiempo y temperatura sobre el contenido total de antocianinas para la condiciones óptimas. | 21 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La planta *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg. pertenece a la familia *Phyllanthaceae*. Es una especie de los bosques andinos del Ecuador, Colombia y Perú. En Ecuador hay alrededor de diez especies de *Hieronyma*, y por lo general todas son conocidas por el nombre común "motilón" (Neil, 2019). Son consideradas como importantes árboles maderables utilizados en construcción, muebles, contrachapado, etc. Los frutos de esta especie poseen antocianinas, que pueden ser importantes para la industria alimentaria por su posible empleo como colorantes naturales y por sus propiedades antioxidantes (Ramirez, 2007). Su inocuidad también ha sido demostrada (Santacruz & Osorio, 2012).

En el registro del herbario de la Universidad Estatal Amazónica en el Ecuador se menciona que la especie *H. macrocarpa* se encuentra ubicada en la provincia de Tungurahua, donde se registra su mayor producción y comercialización (Neil, 2019).

Los árboles de *H. macrocarpa* llegan a alcanzar hasta los 20 metros de altura, sus hojas son elípticas con una longitud de 4 a 9 cm y 2,5 a 4 cm de ancho, sus frutos son elipsoidales, casi esféricos, de hasta 2 cm de longitud; en estado de inmadurez sus frutos son verdes, una vez maduros son de color morado (Mueller, 2003).

Las antocianinas son pigmentos naturales que se clasifican en el grupo de los flavonoides, van desde el color rojo hasta el color azul en frutas, vegetales y cereales (Zhang, 2004). Estos compuestos polifenólicos son solubles en agua, lo cual facilita su incorporación en una gran variedad de sistemas alimenticios acuosos, además de sus posibles efectos terapéuticos y benéficos, los cuales son la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antidiabéticos, antiinflamatorios; también se describe que contribuyen al mejoramiento de la agudeza visual y el comportamiento cognitivo (Abdel-Aal, 2010).

Los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de disolventes ácidos, en alguna literatura reciente (Menéndez, 2008) se sugiere utilizar, por ejemplo: ácido clorhídrico en metanol o en etanol, cloroformo con acetona, etanol con ácido acético, metanol con ácido acético o etanol con ácido cítrico. También se ha recomendado el uso de la extracción asistida por ultrasonidos (Özgür, 2018). Si se toma en cuenta que el

concentrado final deberá ser de grado alimenticio, los disolventes como metanol y cloroformo, que podrían provocar daños irreversibles para la salud deberán ser eliminados y aquellos que pudieran dejar un olor residual como ácido acético y acetona, deben ser minimizados (Menéndez, 2008).

Para determinar cuantitativamente las antocianinas en los extractos obtenidos, se utiliza frecuentemente la espectrofotometría visible (Özgür, 2018) , y las mediciones de absorbancia se realizan con la ayuda de un espectrofotómetro a la longitud de onda de máxima absorción de las antocianinas que es de 520-550 nm. (Arena, 2004).

En la actualidad, las personas optan por consumir productos naturales, libres de compuestos dañinos como los colorantes artificiales. Los colorantes son un atractivo para el producto, pueden llegar incluso a definir si el producto es aceptado o rechazado por el consumidor, (Escalona, 2014), es por ello que existe la necesidad de obtener nuevos colorantes de origen natural como las antocianinas.

1.1. Problema de Investigación. –

¿Cuáles son las condiciones óptimas para la máxima extracción de antocianinas de frutos de *Hieronyma macrocarpa* Müll Arg?

1.2. Objetivo General. –

Determinar las condiciones óptimas para la máxima extracción de antocianinas de frutos de *Hieronyma macrocarpa* Müll. Arg mediante metodología de superficie de respuesta.

1.3. Objetivos Específicos. –

1. Aplicar una técnica analítica espectrofotométrica para la cuantificación de antocianinas de frutos *H. macrocarpa*.
2. Evaluar la fiabilidad de la técnica analítica desarrollada, a través de la determinación de los parámetros de desempeño.
3. Establecer las condiciones óptimas para la máxima extracción asistida por ultrasonidos de antocianinas de frutos de *H. macrocarpa*.
4. Evaluar la actividad antioxidante de extracto óptimo mediante los métodos FRAP y ABTS.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 *HIERONYMA MACROCARPA* (MOTILÓN)

La planta *H. macrocarpa*, conocida comúnmente como motilón es una especie de los bosques andinos del Ecuador, Colombia y Perú (Neil, 2019). Su descripción botánica se observa en la Tabla 1. El fruto posee un alto contenido de antocianinas, sustancias pigmentadas y antioxidantes que ayudan a prevenir el cáncer de vías digestivas. Un estudio demuestra que 100 gramos de motilón contienen alrededor de 240 miligramos de antocianinas, valor diez veces mayor que el de otras frutas estudiadas, entre ellas la mora de castilla, que contiene 18 miligramos por cada 100 gramos de fruta. En dicha fruta se identificaron cuatro antocianinas: delfinidina-3-rutinósido, petunidina-3-rutinósido, cianidina-3- rutinósido y delfinidina-3-glucósido (Santacruz & Osorio, 2012).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Hieronima Macrocarpa* (Motilón).

| | |
|-------------------|-------------------------|
| Reino | <u>Plantae</u> |
| Clase | <u>Equisetopsida</u> |
| Subclase | <u>Magnoliidae</u> |
| Orden | <u>Malpighiales J</u> |
| Superorden | <u>Rosanae Takht</u> |
| Familia | <u>Phyllanthaceae</u> |
| Género | <u><i>Hieronima</i></u> |

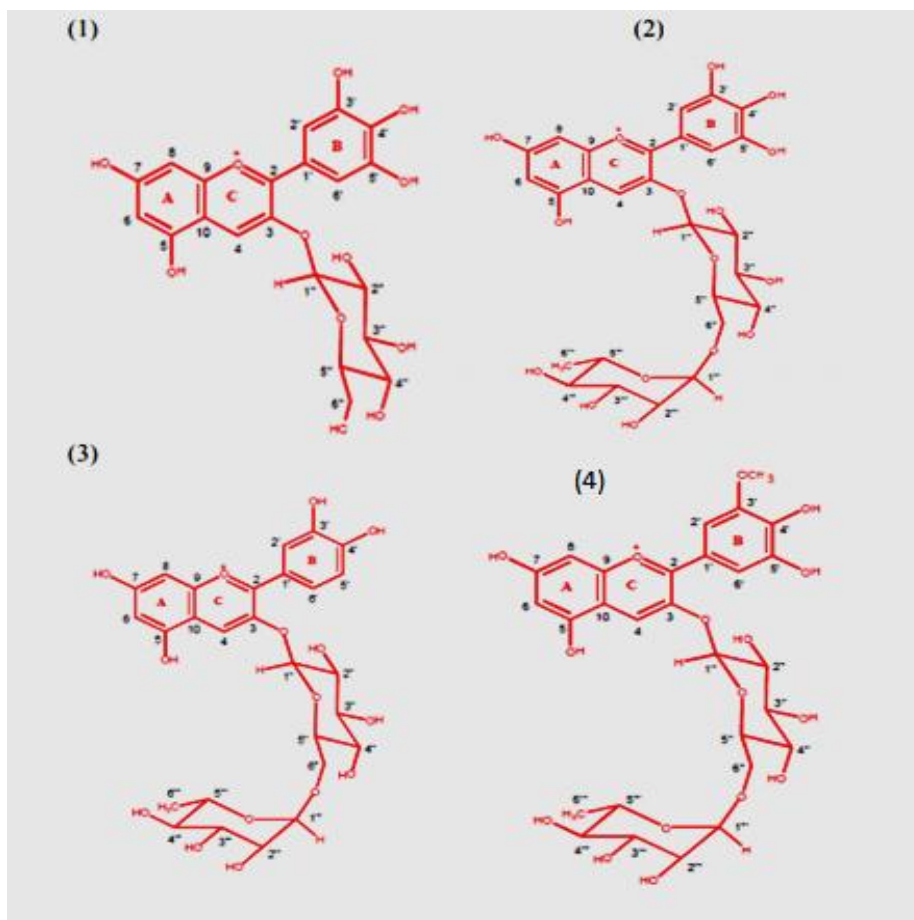
Fuente: (Neil, 2019)

2.2. COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS EN *HIERONYMA MACROCARPA*.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidina, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianinas conocidas. En la naturaleza las antocianinas siempre se aprecian en la forma heteroglucosídica, conteniendo

una o más moléculas de azúcar y de la aglicona antocianidina. Son solubles en agua y en mezcla de agua y alcohol, sin embargo, son insolubles en aceites y grasas (Astrid, 2008).

A continuación, se detallan las estructuras de antocianinas en *H. macrocarpa* (figura 1).



Fuente: (Santacruz & Osorio, 2012)

Figura 1. Estructuras químicas de antocianinas encontradas en el motilón (1) Delphinidina-3-O-glucopiranososa, (2) Delphinidina-3-O-(6''-O-- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido). (4) Petunidina-3-O-(6''-O-- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido).

2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La espectrofotometría ultravioleta – visible es una técnica de análisis instrumental que permite cuantificar compuestos inorgánicos, generalmente a través de la formación de complejos coloreados, o compuestos orgánicos, ya sea de forma directa, a la longitud de

onda de máxima absorción en el intervalo ultravioleta o visible o de forma indirecta, una vez obtenidos los respectivos derivados coloreados (Brunatti, 2010).

En años recientes se han publicado resultados importantes de cuantificación de antocianinas en extractos vegetales mediante la espectrofotometría visible. Tal es el caso de pétalos de rosa, cuya extracción fue asistida por ultrasonido (Özgür, 2018).

También se ha informado de la cuantificación de antocianinas extraídas del maíz morado utilizando comparativamente la cromatografía líquida de alta eficacia y la espectrofotometría visible directa (Lao, 2016)

Otros autores han publicado recientemente resultados de cuantificación de este tipo de compuestos coloreados, una vez extraídos con la ayuda de ultrasonidos a partir de la flor de Jamaica (Pinela, 2019).

Todos estos resultados indican que la espectrofotometría visible es adecuada para la cuantificación de antocianinas en extractos vegetales.

Se cree que los efectos beneficiosos de una dieta rica en frutas y verduras se deben a estos antioxidantes naturales. Entre ellos se encuentran los polifenoles (captadores de radicales libres, p.e. catequinas del té, proantocianidinas de la uva) y los carotenos (p.e. licopeno del tomate) (Ruiz, 2010).

2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN COMPUESTOS FENÓLICOS.

Para la extracción de los compuestos fenólicos es fundamental el disolvente, la naturaleza y preparación del material, la temperatura, tiempo de extracción, el método de extracción empleado, entre otros. Dos de los métodos frecuentemente empleados son: extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas, los cuales reducen el tiempo de extracción y aumentan los rendimientos (Guntero, 2015).

2.5. ESPECTROFOTOMETRÍA.

Un espectrofotómetro es un instrumento que permite determinar la presencia, naturaleza y cantidad (concentración) de una sustancia en una muestra (disolución, sólidos opacos o transparentes o gases), mediante el uso de leyes de la física óptica al medir la intensidad de

luz de cierta longitud de onda (luz monocromática) absorbida por dicha muestra luego de atravesarla. Se usa para medir compuestos coloreados en el rango de luz visible (entre 350 nm y 800 nm) y de este modo obtener más información sobre la sustancia que se estudia (Diaz, 2006).

2.6. COLORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. ANTOCIANINAS.

La FDA, organismo encargado de la administración de alimentos y medicamentos en Estados Unidos, define como aditivo colorante a cualquier pigmento o sustancia fabricada u obtenida de vegetales, animales o minerales capaces de colorear alimentos, medicamentos, cosméticos, o alguna parte del cuerpo humano (Ortega, 2004).

De los colorantes permitidos en la actualidad, la mayor parte pertenecen al grupo de las vitaminas, las provitaminas y sustancias naturales como: clorofila, xantofilas, carotenos y el rojo de remolacha (E162), que se excreta por la orina y para el cual no se han detectado efectos nocivos en su consumo ni se ha fijado una ingesta diaria admisible (Badui, 1993).

El beta-caroteno (pro-vitamina A) y la riboflavina (vitamina B2) pueden añadirse a los alimentos sin necesidad de declararlos. Asimismo, el caramelo sintético está también, por lo general, permitido sin restricciones para muchos alimentos (Elmadfa, 2013). Los principales colorantes naturales se observan en la tabla 2.

Los pigmentos que existen en forma natural, pueden también sintetizarse y obtenerse químicamente, para ser aplicados en la industria tanto en alimentación, como en pinturas, barnices, cosméticos, ropa, etc. (Lock, 1997).

Tabla 2. Colorantes naturales utilizados en la industria alimentaria.

| FUENTE | COLORANTE |
|--|---------------------------------|
| <i>Bixia orellana</i> (achiote) | Bixia (carotenoide) |
| <i>Crocus sativus</i> (azafrán) | Crocetina (carotenoide) |
| <i>Beta vulgaris</i> (betabel) | Betalainas |
| <i>Curcuma longa</i> (cúcuta) | Curcumina |
| <i>Dactylopius coccus</i> (cochinilla) | Ácido carmínico |
| <i>Capsicum annuum</i> (pimiento rojo) | Capsantina (carotenoide) |
| <i>Daucus carota</i> (zanahoria) | β -caroteno (carotenoide) |
| <i>Tajetes erecta</i> (cempasúchil) | Luteína (carotenoide) |
| Plantas Verdes | Clorofila |

FUENTE: (Badui,1993)

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se realizó en la Universidad Estatal Amazónica (UEA) localizada en el km 2 ½ vía al Tena, provincia de Pastaza. La extracción y análisis de las antocianinas se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de la UEA (Campus Puyo).

3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS.

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos.
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000 µL. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100 µL. Alemania
- Espátulas de laboratorio
- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Branson Ultrasonic, Serie CPXH.
- Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- pH-metro Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- Embudos separadores
- Soporte universal
- Celda de vidrio para lectura espectrofotométrica.
- Agua destilada
- Etanol, MERCK. Alemania
- Ácido clorhídrico 40 mM
- Acetato de sodio. MERCK. Alemania
- Frutos de motilón
- 2,4,6 – tripiridil – s -triazina (TPTZ).
- FeCl₃ 20 Mm
- ABTS (Ácido 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)
- Persulfato de Potasio (K₂S₂O₈)

3.2.2 TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN

En el mercado principal de la ciudad de Baños en el mes de abril del 2019 fueron adquiridos 1074,73g de frutos de motilón. Los mismos se trasladaron al laboratorio de química de la Universidad Estatal Amazónica para separar el mesocarpio de la semilla, cuyo peso resultó

658,32 g de pulpa de la fruta, que se procedió a triturar en una licuadora de mano (ATMA Lm5043E).

3.2.3. EXTRACCIÓN

Los extractos se obtuvieron mediante la extracción asistida por ultrasonido con el uso de un instrumento modelo Bransonic Ultrasonic, Serie CPXH, para lo cual se emplearon a diferentes relaciones etanol: agua (70:30, 80:20 y 90:10), pH (2, 4 y 6), temperaturas (30 °C, 45 °C y 60 °C), y tiempo (5, 10 y 15 minutos). Se colocaron aproximadamente 5 g de muestra en cada corrida experimental y se añadió el disolvente etanol-agua en proporción 5:50. Después de someterse a ultrasonido en las condiciones definidas en el diseño del experimento para cada condición, los extractos se filtraron al vacío a través de papel de filtro y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 4 °C hasta su posterior uso. Todos los análisis se llevaron a cabo en los días posteriores a la extracción para evitar cualquier cambio en las muestras debido al almacenamiento prolongado.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS

La determinación de compuestos antociánicos se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-vis marca Thermo Scientific, Estados Unidos.

Para los análisis, se tomó 1 mL del extracto filtrado, se llevó a un matraz aforado de 10 mL y se enrasó con la misma mezcla de disolventes que se empleó para la extracción.

Se realizó la lectura de la absorbancia a 520 nm contra blanco de disolventes.

Para los cálculos se empleó el siguiente modelo matemático (Özgür, 2018):

$$TAC \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{A_{520} - 0,0044}{0,017} \quad (1)$$

Donde:

TAC – Contenido total de antocianinas

A₅₂₀ – Absorbancia medida a 520 nm

3.2.5. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO PARA LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS

Para validar la técnica analítica aplicada se evaluaron los parámetros de desempeño que son: precisión, especificidad y límites de detección y cuantificación.

El ensayo de precisión se realizó a través de ocho réplicas del análisis bajo condiciones homogéneas (mismo analista, mismo equipo, intervalo breve de tiempo).

Para evaluar la especificidad se valoró la longitud de onda de máxima absorción en el intervalo visible y las posibles interferencias espectrales.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon como la concentración correspondiente a una señal igual a tres y diez veces, respectivamente y la desviación estándar de los blancos.

3.2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los diseños de Box-Behnken son diseños de superficie de respuesta, especialmente diseñados para requerir solo tres niveles, codificados como -1, 0 y +1. Los diseños de Box-Behnken están disponibles para 3 a 21 factores. Se forman combinando diseños factoriales de dos niveles con diseños de bloques incompletos. Este procedimiento crea diseños con propiedades estadísticas deseables, pero, lo más importante, con solo una fracción de los experimentos necesarios para un diseño factorial de tres niveles. Como solo hay tres niveles, el modelo cuadrático es apropiado (Bonat, 2015).

Para la optimización de antocianinas de *H. macrocarpa* se realizó un diseño de Box-Behnken Desing con 29 experimentos. Las cuatro variables estudiadas fueron temperatura, tiempo, pH y relación etanol-agua sobre la extracción de antocianinas.

Las variables significativas se analizaron empleando un diseño de Box-Behnken Desing (metodología de superficie respuesta) y el efecto de interacción de las variables independientes en la respuesta (Bonat, 2015).

Se empleó el software Design Expert versión 10 (Stat Ease, EE. UU) para identificar los niveles óptimos de las variables independientes.

El nivel de los factores y el punto central del diseño para la metodología superficie respuesta (bajo, medio, alto) en variables independientes codificadas y no codificadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Nivel de los factores para la metodología de superficie de respuesta.

| Variable independiente | Nivel variable codificado | | | |
|------------------------|---------------------------|-------|--------|-------|
| | Símbolo | Bajo | Centro | Alto |
| | | -1 | 0 | 1 |
| Tiempo | A | 5 | 10 | 15 |
| Temperatura | B | 30 | 45 | 60 |
| pH | C | 2 | 4 | 6 |
| EtOH/H2O | D | 70/30 | 80/20 | 90/10 |

Fuente: (Elaboración propia)

Se utilizó la metodología superficie respuesta para evaluar el efecto de las variables independientes. El diseño BBD de tipo RSM se empleó para optimizar las cuatro variables estudiadas relacionadas con los rendimientos de antocianinas. La ecuación aplicada fue polinomial de segundo orden:

$$Y (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Dónde: β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para los términos de intercepción, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente y x_i , x_j son las variables independientes (Cacace & Mazza, 2003).

3.2.7 VERIFICACIÓN DEL MODELO

Para la validación del modelo, se determinaron los valores de los coeficientes de R^2 ajustado y el R^2 predicho. Se obtuvo la validez de cada serie experimental y se evaluó la adecuación del modelo mediante análisis de varianza (ANOVA) (Nazir *et al.*, 2017; Pompeu *et al.*, 2019).

Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos antocianínicos en los frutos de *H. macrocarpa* a partir de las variables independientes, relación etanol-agua, temperatura y el tiempo de extracción, se obtuvieron a partir de la ecuación predictiva de la metodología

superficie respuesta. La actividad antioxidante se determinó después de la extracción de compuestos antociánicos en condiciones óptimas. Los valores experimentales y predichos se compararon para determinar la validez del modelo.

3.2.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Esta evaluación se realizó por los métodos espectrofotométricos conocidos como ABTS y FRAP, que permitieron por dos mecanismos diferentes comprobar el carácter antioxidante de los extractos optimizados. Estos métodos se emplean comúnmente debido a la simplicidad de los ensayos y la instrumentación necesaria, además de la rapidez y la reproducibilidad de los resultados (Jang, 2018).

3.2.8.1. ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES ABTS (ÁCIDO 2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN)-6 SULFÓNICO)

Se preparó el radical ABTS mezclando en partes iguales las disoluciones de ABTS a la concentración de 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. Se conservó en la oscuridad a temperatura ambiente por un intervalo de 16 horas. Esta disolución fue diluida con etanol hasta obtener una absorbancia de 0,873. La disolución de persulfato de potasio se elaboró pesando 0,663 g del mismo y diluyendo a 100 mL con agua destilada en un matraz aforado. El ABTS se preparó a partir de 0,384 g disueltos en 10 mL de agua destilada.

Las disoluciones de las muestras se prepararon a partir de 100 µL de extracto y adicionando 2 ml del reactivo. Las lecturas se realizaron a 754 nm.

La curva de calibración se confeccionó para cubrir el intervalo de concentraciones de 0 a 0,16 mg/L, de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

$$C = \frac{A}{17,618} \quad (3)$$

Donde A en la absorbancia de la muestra.

C - Concentración en mmol eq. TROLOX/100g de masa seca

3.2.8.2. PODER DE REDUCCIÓN DEL ION FERROSO (FRAP)

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 (Negrón Arroyo, Rossana, & Fernández Pinto, 2010).

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 enrasado 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 alcanzó un pH 3,5, posteriormente se enrasó con agua destilada a 250 mL.

Para 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-carboxílico).

$$C = \frac{A}{0,1879} \quad (4)$$

Donde:

A - absorbancia de la muestra.

C – Concentración en mmol eq. TROLOX/100g de masa seca.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA VISIBLE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS

Dentro del desarrollo analítico fue necesario determinar la longitud de onda de máxima absorción para las mediciones de absorbancia correspondientes a antocianinas totales. Para ello se registró un espectro en el intervalo de 400 a 580 nm (Figura 2).

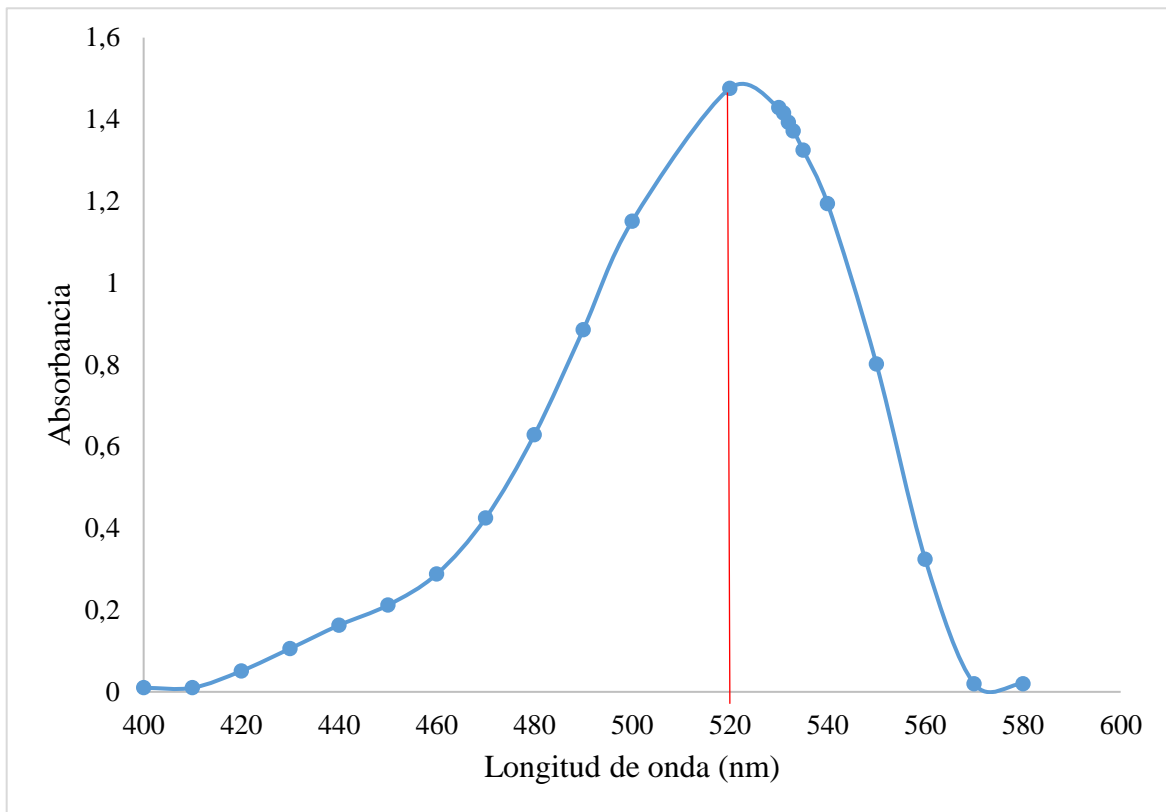


Figura 2. Espectro visible de antocianinas

Fuente: (Elaboración propia)

Teniendo el espectro, la longitud de onda de máxima absorción resultó ser 520 nm. Esta longitud de onda en el intervalo visible garantiza una gran especificidad pues no interfieren compuestos con otras coloraciones o que sean incoloros.

En la tabla 4 se pueden apreciar los resultados de los experimentos de precisión, y en la tabla 5 los límites de detección y cuantificación.

Tabla 4. Resultados de precisión del método de análisis

| REPETIBILIDAD | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Concentración (mg/100g ms) | Parámetros estadísticos | Resultados |
| 11001,94 | Media | 11091,02 |
| 11157,23 | Desviación estándar | 549,22 |
| 10613,71 | Coeficiente de variación (%) | 4,95 |
| 12020,99 | | |
| 11594,24 | | |
| 10714,96 | | |
| 10534,06 | | |

Fuente: (Elaboración propia)

El resultado del coeficiente de variación obtenido permite afirmar que el método de análisis cumple con el parámetro de precisión para el orden de concentraciones de las partes por millón, pues el valor límite es de 5% (USP-38-NF, 2015).

Tabla 5. Resultados de límites de detección y cuantificación del método de análisis

| Absorbancia del blanco | Desviación Estándar (s) | 3s | LD (mg/L) | 10s | LC (mg/L) |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------|------------------|------------|------------------|
| 0,002 | | | | | |
| 0,000 | | | | | |
| 0,003 | | | | | |
| 0,001 | 0,001676 | 0,005028 | 0,03697 | 0,01676 | 0,7272 |
| -0,002 | | | | | |
| 0,002 | | | | | |
| 0,000 | | | | | |

Fuente: (Elaboración propia)

Los límites de detección y cuantificación calculados permiten afirmar que existe una adecuada sensibilidad; el límite de cuantificación (0,7272) se encuentra muy por debajo de las concentraciones calculadas (11091,02).

Estos resultados correspondientes a los parámetros de desempeño permiten afirmar que el método de análisis posee una adecuada fiabilidad. El término fiabilidad (en inglés: reliability), se emplea comúnmente cuando se ha demostrado la capacidad de un método

analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, exactitud o veracidad, precisión, límite de detección y cuantificación, especificidad o selectividad y robustez. Dependiendo del tipo de método de análisis y del nivel de desarrollo o aplicación, puede ser necesario demostrar el cumplimiento de todos esos parámetros o solo de algunos de ellos (USP-38-NF, 2015), (INEN-CODEX, 2014) y (Thompson, 2002)

4.1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS.

En los experimentos preliminares de la presente investigación, se estudiaron los efectos de cuatro factores: tiempo, temperatura, pH y relación etanol-agua en la extracción asistida por ultrasonido de compuestos antociánicos del fruto de *H. macrocarpa*. Los valores de cada factor se muestran en la tabla 3. Los contenidos de antocianinas obtenidos estuvieron entre 2968,69 y 11034,2 mg/100g, de acuerdo a las condiciones experimentales (Tabla 6).

Tabla 6. Diseño Box-Behnken Desing a partir de las variables independientes (A, B, C y D) y resultados experimentales de los compuestos antociánicos:

| Exp | A Temperatura (°C) | B Tiempo (min) | C pH | D EtOH/H2O | E Antocianinas Totales (mg/100g m.s.) |
|------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------------|--|
| 1 | 45 | 10 | 4 | 80 | 3178,94 |
| 2 | 30 | 10 | 4 | 90 | 3073,73 |
| 3 | 45 | 15 | 6 | 80 | 3553,46 |
| 4 | 45 | 10 | 6 | 70 | 3418,88 |
| 5 | 60 | 15 | 4 | 80 | 3014,66 |
| 6 | 30 | 5 | 4 | 80 | 3175,78 |
| 7 | 45 | 10 | 4 | 80 | 3443,43 |
| 8 | 45 | 5 | 6 | 80 | 2873,99 |
| 9 | 45 | 10 | 4 | 80 | 3697,68 |
| 10 | 60 | 10 | 4 | 90 | 3005,78 |
| 11 | 45 | 15 | 4 | 70 | 3897,33 |

| | | | | | |
|-----------|----|----|---|----|---------|
| 12 | 45 | 10 | 4 | 80 | 3394,56 |
| 13 | 60 | 10 | 2 | 80 | 10413,4 |
| 14 | 45 | 15 | 2 | 80 | 11034,2 |
| 15 | 60 | 10 | 6 | 80 | 3171,58 |
| 16 | 45 | 10 | 2 | 70 | 10450,3 |
| 17 | 30 | 10 | 6 | 80 | 2968,69 |
| 18 | 60 | 10 | 4 | 70 | 2686,4 |
| 19 | 45 | 10 | 4 | 80 | 3177,82 |
| 20 | 30 | 15 | 4 | 80 | 3171,5 |
| 21 | 45 | 10 | 2 | 90 | 10383 |
| 22 | 45 | 15 | 4 | 90 | 3571,63 |
| 23 | 45 | 10 | 6 | 90 | 2865,57 |
| 24 | 30 | 10 | 2 | 80 | 10455,8 |
| 25 | 45 | 5 | 4 | 90 | 3265,19 |
| 26 | 45 | 5 | 2 | 80 | 10417,6 |
| 27 | 45 | 5 | 4 | 70 | 2926,18 |
| 28 | 30 | 10 | 4 | 70 | 3206,78 |
| 29 | 60 | 5 | 4 | 80 | 2936,18 |

Fuente: (Elaboración propia)

El modelo de BBD se realizó con 4 factores los cuales fueron: temperatura, tiempo, pH y la relación etanol: agua, para ello se propusieron 3 niveles codificados como son: -1, 0 y +1, este diseño se formó de la combinación de diseños factoriales de dos niveles con diseños de bloques incompletos, creando un factorial de tres niveles, el cual resultó con 29 experimentos (Bonat, 2015).

El pH, fue el factor significativo ($p < 0,05$) mientras la relación que resultó no significativa ($p > 0,05$) en la extracción de contenido de antocianinas (Tabla 7) fue la interacción, tiempo-temperatura, temperatura-relación etanol: agua.

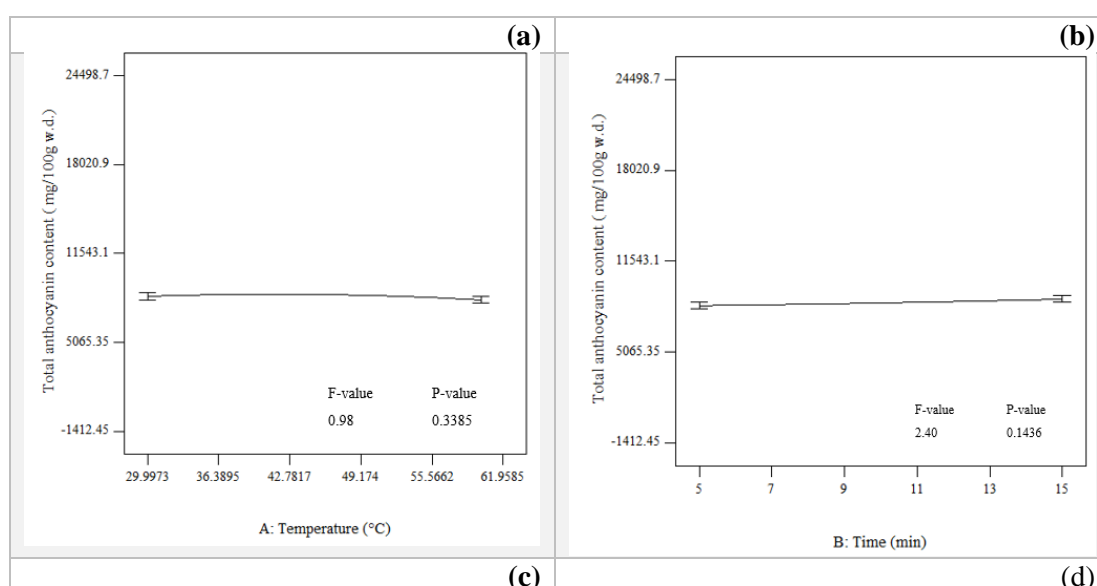
Tabla 7. ANOVA para el modelo BBD seleccionado.

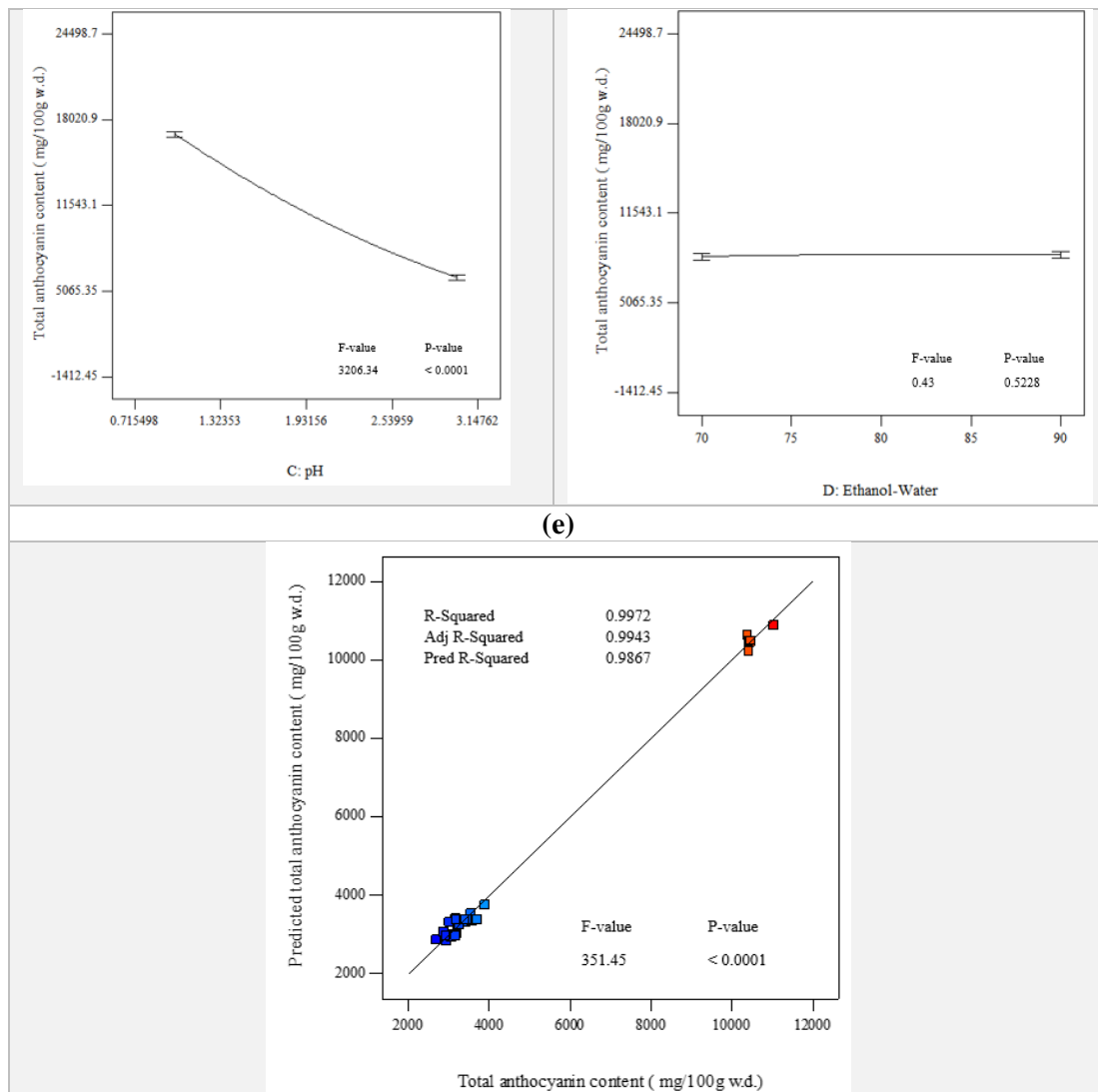
| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrados medios | Valor F | p-valor Prob > F | |
|---------------|-------------------|----|------------------|---------|------------------|---------------|
| Modelo | 2,566E+008 | 14 | 1,833E+007 | 351,45 | < 0,0001 | Significativo |
| A-Temperatura | 51231,49 | 1 | 51231,49 | 0,98 | 0,3385 | |
| B-Tiempo | 1,252E+005 | 1 | 1,252E+005 | 2,40 | 0,1436 | |
| C-pH | 1,672E+008 | 1 | 1,672E+008 | 3206,34 | < 0,0001 | |

| | | | | | | |
|-----------------|------------|----|------------|---------|--------|------------------|
| D-Etanol-Agua | 22403,74 | 1 | 22403,74 | 0,43 | 0,5228 | |
| AB | 2059,37 | 1 | 2059,37 | 0,039 | 0,8453 | |
| AC | 15042,03 | 1 | 15042,03 | 0,29 | 0,5997 | |
| AD | 51176,26 | 1 | 51176,26 | 0,98 | 0,3387 | |
| BC | 986,77 | 1 | 986,77 | 0,019 | 0,8926 | |
| BD | 1,105E+005 | 1 | 1,105E+005 | 2,12 | 0,1676 | |
| CD | 59047,46 | 1 | 59047,46 | 1,13 | 0,3053 | |
| A ² | 4,939E+005 | 1 | 4,939E+005 | 9,47 | 0,0082 | |
| B ² | 12410,91 | 1 | 12410,91 | 0,24 | 0,6332 | |
| C ² | 8,238E+007 | 1 | 8,238E+007 | 1579,56 | < | |
| | | | | | 0,0001 | |
| D ² | 56254,80 | 1 | 56254,80 | 1,08 | 0,3166 | |
| Residuo | 7,302E+005 | 14 | 52156,45 | | | |
| Falta de ajuste | 5,437E+005 | 10 | 54374,71 | 1,17 | 0,4787 | no significativo |
| Error Puro | 1,864E+005 | 4 | 46610,78 | | | |
| Correlación | 2,574E+008 | 28 | | | | |
| Total | | | | | | |

Fuente: (Elaboración propia)

En la figura 3 se pudo observar que la influencia del factor temperatura, tanto a 30 °C como para 60 °C, en la extracción de antocianinas totales a partir de frutos de *H. macrocarpa* fue similar. Este resultado evidenció que la temperatura no influyó significativamente. De igual manera el factor tiempo y relación etanol: agua no influyeron significativamente. A pH 2 hubo mayor extracción de compuestos antociánicos que a pH 6 lo que demostró una influencia significativa de este factor y en el factor de la relación etanol- agua no se observó diferencias significativas.





Fuente: (elaboración propia)

Figura 3. Influencia de la temperatura (a), tiempo (b), pH (c) y la relación etanol-agua (d) en la extracción de antocianinas totales. Modelo cuadrático con los valores predichos y experimentales del contenido total de antocianinas (e).

La ecuación, en términos de factores codificados, se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles de cada factor. La ecuación codificada es útil para identificar el impacto relativo de los factores significativos al comparar los coeficientes de los factores.

La ecuación en términos de factores codificados se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. Por defecto, los niveles altos de los factores se codifican como +1 y el nivel bajo de los factores se codifica como -1. La ecuación codificada es útil para identificar el impacto relativo de los factores mediante la comparación de los coeficientes de los factores.

La ecuación en términos de factores reales puede usarse para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. Aquí, los niveles deben especificarse en las unidades originales para cada factor, esta ecuación no debe usarse para determinar el impacto relativo de cada factor porque los coeficientes se escalan para acomodar las unidades de cada factor y la intersección no está en el centro del espacio de diseño.

$$\begin{aligned} \text{Contenido de antocianinas} = & 10634,17 - 130,68*A + 204,28*B - 5409,76*C + 86,42*D \\ & + 22,69*AB + 30,66*AC + 113,11*AD + 7,85*BC - 166,18*BD - 60,75*CD - 275,95*A^2 \\ & + 43,74*B^2 + 890,96*C^2 - 93,13*D^2 \end{aligned}$$

El modelo codificado se usó para generar gráficos de superficie, para el análisis de los efectos variable sobre el rendimiento de los compuestos de antocianinas totales.

En la extracción de antocianinas de *Solanum melongena* L. (Berenjenas) la concentración de antocianinas disminuye con el aumento de la temperatura de extracción en el rango de 30-60 °C, mientras que con la concentración del solvente (etanol acidificado) a 70 % v/v y el tiempo de extracción 8 horas, hay un aumento del contenido de antocianinas cuando estas dos variables aumentan (Heras, 2013).

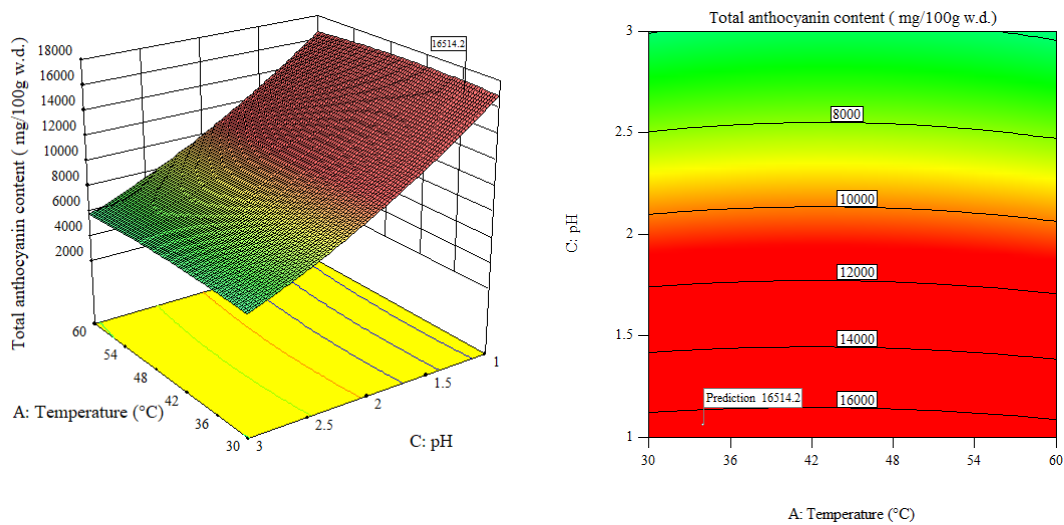
El factor pH demostró tener una influencia significativa sobre el color de los extractos de antocianinas, las lecturas de absorbancia y la recuperación del extracto. A valores de pH más bajos (pH < 2), los extractos de trigo azul y morados exhibieron un cambio de color rojo a rojo oscuro, después de la extracción, mientras a pH más alto (pH >4), los extractos presentaron un color amarillo (Abdel-Aal, 2010).

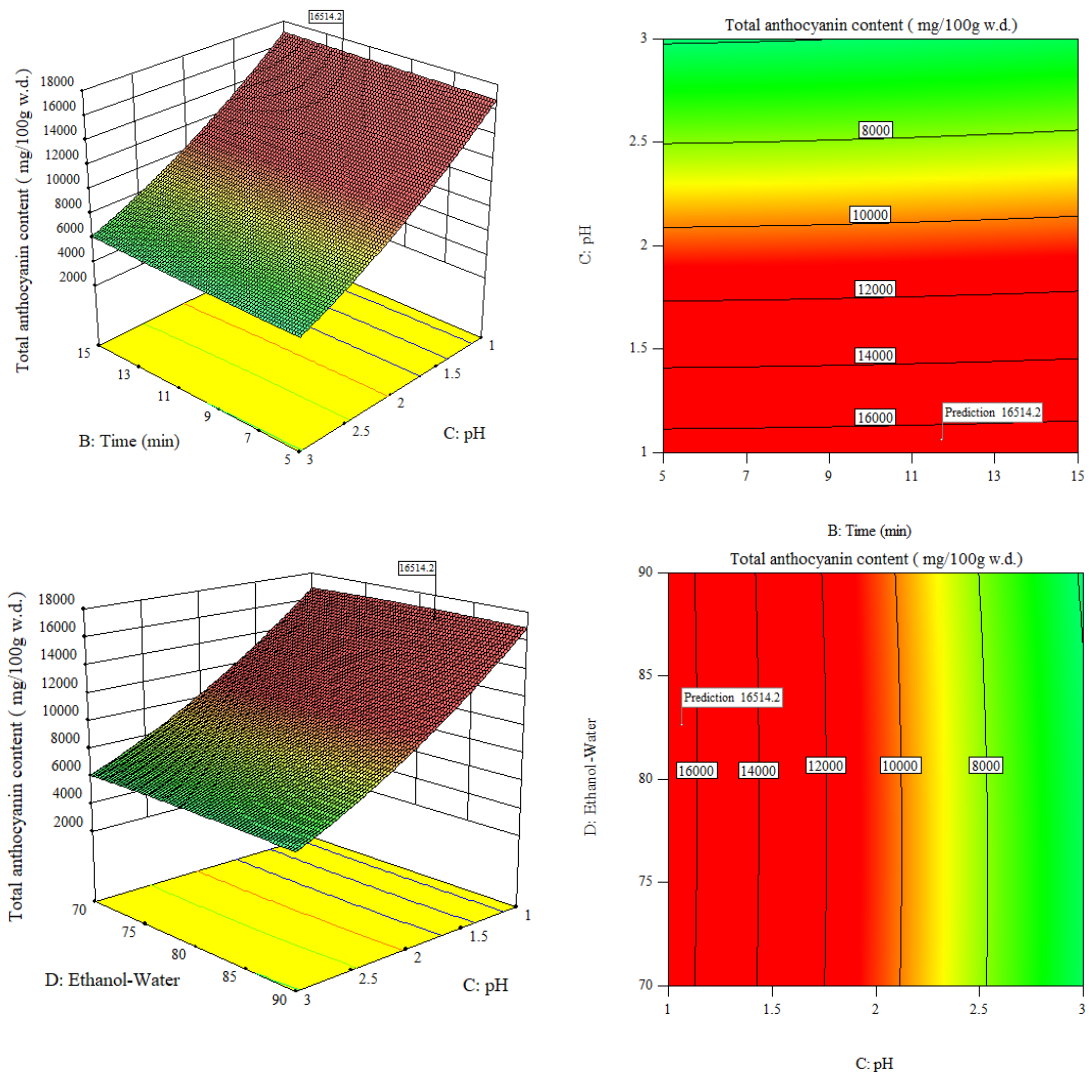
Los autores (Cacace & Mazza, 2003) presentaron un trabajo el cual consistía en la optimización de la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras, para esto usaron etanol acuoso como el solvente para la extracción. Las variables que tomaron fueron: concentración etanol (60 %), temperatura (30°C) y solvente-sólido (19 L: 1 kg de fruta). Donde pudieron observar que la temperatura de extracción no afectó la extracción de fenoles, pero provocó una disminución en el rendimiento de extracción de antocianinas, debido a la degradación de las mismas. Estos autores obtuvieron una fuerte disminución en la concentración de antocianinas extraídas a temperaturas superiores a 45°C.

Un estudio sobre las mejores condiciones de extracción de antocianinas fue realizado a partir de corontas de maíz morado. Los resultados obtenidos indicaron que a una temperatura de 75 °C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos se logró una mejor extracción, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25 °C y 30 minutos. Además, la extracción se vio favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20 % como agente de extracción y un pH entre 2 y 4 (Gutierrez, 2009).

4.1.3 CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO OBTENIDO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

En la figura 4 se muestran los resultados de concentración de antocianinas obtenidos bajo condiciones óptimas encontradas por el modelo, temperatura de extracción 35,75 °C, tiempo 14,51 min, pH de 1,18 y una relación etanol-H₂O de 82:18.





Fuente: (Elaboración propia)

Figura 4. Superficie de respuestas y gráficos de contorno para los efectos tiempo y temperatura sobre el contenido total de antocianinas para las condiciones óptimas.

4.1.4. VALIDACIÓN DEL MODELO PREDICHO

Para la validación del modelo se encontró que el contenido total de antocianinas en el fruto motilón fue de $16306,54 \pm 1610,941$ mg/100g. Otros autores como (Silva, 2007) que obtuvo mayor contenido de antocianinas en la cáscara de berenjena con un total de 62 mg /100 g y el autor (Todaro, 2009) que obtuvo un resultado similar de 76,44 mg/100g de cáscara de berenjena. Otros reportes de contenido de antocianinas han sido documentados (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación del contenido de antocianinas y actividad antioxidante de *H. macrocarpa* y otras especies.

| Género | CAT (g eq. mg /100g) | ABTS (mmol/g) | FRAP (umol/g) | Fuente |
|--------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>H. macrocarpa</i> | 16306,54 ± 1610,941 | 0,598546147 | 297,9392525 | (propia) |
| <i>R. adenotrichos</i> | 394,53± 24,11 | - | 3,51 ± 0,01 | (Cuesta R, 2010) |
| <i>R. occidentalis</i> | 430 ± 170 | 0,223±0,022 | - | (Santacruz L. , 2011) |
| <i>R. glaucus</i> | 187,96 ± 11,28 | - | 3,40±0,04 | (Cuesta R, 2010) |
| <i>M. aff cauliflora</i> | 143,51±26,29 | 0,345±0,029 | - | (Santacruz & Osorio, 2012) |

Fuente: (Elaboración propia)

La actividad antioxidante del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas medida a través de los métodos FRAP y ABTS resultó inferior en otras especies, pero en concordancia al contenido de antocianinas totales. Estos resultados han sido previamente demostrados, encontrándose una alta correlación entre los CAT y la actividad antioxidante (Dudonné, 2009).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se aplicó una técnica analítica espectrofotométrica visible que permitió la cuantificación de antocianinas totales en extractos de frutos de *Hieronyma macrocarpa*, la concentración promedio fue de $2968,69 \pm 11034,2$ mg /100g, lo cual es inferior a lo informado para otras especies.
- El método analítico aplicado resultó fiable pues cumplió con los parámetros de desempeño evaluados: especificidad, precisión y límites de detección y cuantificación.
- Las condiciones óptimas para la máxima extracción de antocianinas fueron una temperatura de 35,75 °C, en un tiempo de 14,51 minutos, pH de 1,18 y una relación de etanol: agua de 82:18.
- El extracto de *H.macrocarpa* evaluado presentó valores de actividad antioxidante, mediante los métodos ABTS y FRAP, de 59,855 mmol/100g y 297,94 μ mol/g, respectivamente, superiores a los reportados para otras especies.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar una prueba en alimentos de alta acidez utilizando las antocianinas como un ingrediente alimenticio y evaluar su capacidad antioxidante y su capacidad de pigmentación.
- Evitar el uso de temperaturas elevadas y tiempos prolongados en procesos de extracción de compuestos antociánicos, pues estos, si bien pueden liberar los compuestos con mayor facilidad, también provocarán la degradación de los mismos, lo cual dará un efecto neto de disminución del rendimiento del proceso.
- Continuar con estudios de estabilidad y formulación del producto para su uso como colorantes naturales.

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, S. J. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food. *The Open Food Science Journal*, 4:7-22.
- Abreu-Naranjo, R. A.-C.-Q.-Q. (2018). Response surface methodology for optimisation of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from *Maytenus macrocarpa* bark by means of ultrasound-assisted extraction. *Wood science and technology*, 52(5) 1359-1376.
- Arena, I. L. (2004). Espectrofotometría de absorción. Cuernavaca, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de maestría.
- Astrid, G. (2008). Las Antocianinas como colorantes naturales y compuestos Bioactivos: Revisión. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, 27-36.
- Badui, D. S. (1993). Química de los alimentos. Mexico: Addison Wesley Longman de México, S. A. DE C. V. México D. F., México.
- Barragan, M. M. (2017). Evaluación del efecto de la temperatura del proceso de cocción, sobre el contenido de Antocianinas y Antioxidantes en variedades de papas nativas (*Solanum tuberosum spp andigena* y *Solanum tuberosum spp stenotomum*). Universidad Nacional de San Antonio Abad. Tesis de grado.
- Bonat, C. G. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea L.*) using Response Surface Methodology. ELSEVIER, 449-455.
- Brunatti, C. &. (2010). Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>
- Cacace, J., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1) 240-248.
- Chang, J., Vallejo, C., & Morales, W. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao L.*) en el Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 21-34.
- Cuesta R., S. C. (2010). Efecto de pretratamientos en la extracción de antocianinas de la Mora Castilla (*R. glaucus*) y Silvestre (*R. adenotrichos*), para su uso como indicador visual de pH. *UTADEO*, 50-62.
- De la Torre, L. N. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA y Herbario AAU.

- Diaz, A. A. (2006). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 1-8.
- Dudonné, S. V. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extract of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 1768-1774.
- Elmadfa, I. M. (2013). Tabla de aditivos. Los números E. *Química Viva*, 236-245.
- Escalona, S. (2014). Encapsulados de luteína-enocianina y su aplicación en alimentos. *Scielo*, 93-101.
- Galleano, M. V. (2010). Antioxidant actions of flavonoid: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*. 1;501(1):23-30.
- Guntero, V. A. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. http://www.aaig.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/05c/05c_1775_727.pdf
- Gutierrez, G. A. (2009). Extracción de antocianinas de las corontas de (*Zea mays L*) “Maíz morado”. *Ciencia e Investigación*, 12(2): 64-74.
- Heras, I. A. (2013). Optimization of the Anthocyanin Extraction Process and Evaluation of the Antioxidant Capacity of Eggplant (*Solanum melongena L.*). *SCIELO*, 93-101.
- INEN-CODEX CAC/GL 49 (2014) Directrices armonizadas de la UIQPA para la validación interna de los métodos de análisis (CAC/GL 49-2003, IDT). Primera edición. Quito. Ecuador.
- Jang, J. S. (2018). Antioxidant Properties (ABTS, FRAP, Total Phenolic Content) of Alaska and Gochujang Pollock Roes and Fermented Pollock Roe Seasoning. 28(12), 1461-1468.
- Lao, F. &. (2016). Quantification of purple corn (*Zea mays L.*) anthocyanins using spectrophotometric and HPLC approaches: method comparison and correlation. *Food analytical methods*, 9(5), 1367-1380.
- Lock, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Fondo Editorial. <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/7562/7808>
- Menéndez, W. (2008). *Obtención de Colorante para Su Uso en Yogurt a Partir de la Flor De Jamaica (Hibiscus sabdariffa) y del Mortiño (Vaccinium myrtillus L.)*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Consultado el 25 de nov.2009.
- Muelle, J. (01 de abril de 2003). El Motilón Hyeronima cf Macrocarpa: Especie promisoría para la región Andina Ecuatoriana. Proyecto Apoyo al Desarrollo Forestal.
- Negrón Arroyo, C., Rossana, P. N., & Fernández Pinto, J. (2010). Comparación de dos métodos espectrofotométricos que estiman la capacidad Antioxidante en plasma de individuos expuestos a 5200 m.s.n.m. *SCientífica*, 16-18.

- Neil, D. (17 de Marzo de 2019). *Herbario ECUAMZ en línea*. Recuperado el 24 de Abril de 2019, de Herbario ECUAMZ en línea: <http://www.tropicos.org/Specimen/101110730>2019>
- Ortega, V. (2004). *Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*. Recuperado el 23 de 3 de 2019, de Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap259e/pdf/fap259e.pdf>
- Özgür, M. Ü. (2018). Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Red Rose Petals and New Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Monomeric Anthocyanins. *Journal of AOAC international*, 967-980.
- Pappa-Louisi, A. &. (2003). Statistical tests for the selection of the optimum parameters set in models describing response surfaces in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 57(3-4), 169-176.
- Pinela, J. P. (2019). Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food chemistry*, 275,309-321.
- Poo, S. (2005). *Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (Vaccinium macrocarpon Ait.) mediante Nanofiltración*. . Valdivia, Chile. : Universidad Austral de Chile.Tesis de grado.
- Ramirez, M. G. (2007). *Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la región de Boyacá*. Pereira, Colombia: UTP. ISSN 0122-1701 415.
- Ruiz, D. V. (2010). *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*. Santiago de Compostela: Graficas Garabal, S.L. .
- Santacruz, L. (2011). Análisis Químico de Antocianinas en frutos silvestres. Universidad Nacional de Colombia, 49-57.
- Santacruz, L. (2008). Anthocyanin composition of wild tropical Colombian fruits and antioxidant activity measurement by electron paramagnetic resonance (EPR). *J. Agric. Food Chem*, Manuscrito en preparación.
- Santacruz, L. e., & Osorio, C. (2012). Anthocyanin Composition of Wild Colombian Fruits and Antioxidant Capacity Measurement by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Agricultural and Food Chemistry*, 1397-1404.
- Silva, M. R. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*., 55 (3): 381-387, (2007).
- Suverswaran, S. Y. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 Indian medical plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Todaro, A. F. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*., 114: 434-439.

Thompson, S.L.R. Ellison and R. Wood (2002) “Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis” *pure appl. chem.*, 74, (5) 835 – 855.

United States Pharmacopeia Convention. USP 38-NF 33. (2015). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. Rockville, Maryland: The United States Pharmacopeial Convention.

Udapurkar PP., K. M. (2008). Antioxidant activity of *Syzygium cumini* seeds in aspirin induced peptic ulcer in rats. *J. Cell Tissue Res.*, 8(3):1577-80.

Zhang, K. I. (2004). Anthocyanins-more than Nature’s Colours. *Journal Biomedical and Biotechnology*, 5:239-240.