

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOLES Y ANTOCIANINAS
CONTENIDOS EN EL AGRAZ (*Vaccinium meridionale swartz*) OBTENIDOS A
NIVEL LABORATORIO POR MEDIO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN POR
SOLVENTES Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.

XIMENA DE LOS ANGELES HERRERA QUIÑONES
KAREN STEFANY RODRÍGUEZ CASTILLO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2016

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOLES Y ANTOCIANINAS
CONTENIDOS EN EL AGRAZ (*Vaccinium meridionale swartz*) OBTENIDOS A
NIVEL LABORATORIO POR MEDIO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN POR
SOLVENTES Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.

XIMENA DE LOS ANGELES HERRERA QUIÑONES
KAREN STEFANY RODRÍGUEZ CASTILLO

Proyecto integral de grado para optar el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Director
Javier Francisco Rey Rodríguez
Ingeniero de Alimentos

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2016

Nota de aceptación

Ing. Elizabeth Torres
Presidente del Jurado

Ing. Felipe Correa
Jurado 1

Ing. Martha Malagón
Jurado 2

Bogotá D.C, Agosto 10 de 2016

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Ing. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO de JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las Directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente la autor.

DEDICATORIA

A Dios, por la vida y por ser el pilar de la misma, por haberme llenado de fuerza, sabiduría, valentía y fe para no desfallecer, porque día a día durante esta etapa, me demostró que estaba conmigo para levantarme en victoria.

A mis padres, por haberme enseñado desde pequeña a luchar por mis metas, por haberme inculcado valores que hoy son guía de mi vida, por su apoyo incondicional, por siempre creer en mí y por demostrarme con su ejemplo de vida que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

A mi hermana, por ser mi ejemplo a seguir, por estar siempre dispuesta a orientarme en el camino, por aportarme de su conocimiento, por impulsarme a ser mejor persona cada día, porque ha estado a mi lado, incluso detrás de mí para sostenerme.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Ximena Herrera Quiñones

DEDICATORIA

No hay palabras suficientes que manifiesten mi agradecimiento y dedicatoria a todas aquellas personas que hicieron este trabajo posible.

Dedico este trabajo primero que todo a Dios quien me ha guiado por un buen camino y ha puesto personas valiosas en mi vida que han hecho que esta meta se logre.

A mis padres quienes me enseñaron todo lo que soy actualmente, hicieron este sueño una realidad, apoyándome siempre y sobretodo nunca perdieron la fe en mí.

Mi padre quien me aconsejo y con todas sus experiencias me motivaron a estudiar esta carrera; a mi madre quien siempre supo aconsejarme y a tener fe en que si es bueno ha de pasar.

A mis hermanas, Camila y Melany quienes son mi orgullo y hacen de mi vida una locura y me motivan para continuar este camino.

A mis familiares quienes siempre me hicieron ver lo bello de la vida y me hicieron sentir capaz de poder realizar este proyecto.

A mis amigos quienes estuvieron siempre a mi lado y quienes nos aconsejaron sobre como continuar e hicieron esta etapa universitaria una experiencia única llena de muchas alegrías y recuerdos.

Karen Stefany Rodríguez Castillo

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Universidad de América, por brindarnos la capacidad de crecer no solo de forma intelectual sino personal y por permitirnos participar en un ámbito de innovación y desarrollo.

A nuestro Director Javier Rey, por la orientación durante todo el proyecto, por la ayuda que nos brindó para la realización de este y por su apoyo que nos permitió continuar.

A nuestro Co-director Luis Hernán Vélez, por su guía durante el desarrollo del proyecto, por cada una de sus correcciones e instrucciones para el buen desempeño de este.

A nuestro Orientador Juan Carlos Segura quien por sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado que podamos terminar este proyecto.

A la Pontificia Universidad Javeriana por abrirnos sus puertas y prestarnos no solo sus instalaciones sino su personal y colocarlo a nuestra disposición.

A Tecnoparque SENA, por su préstamo de equipos y laboratorios para la realización de las pruebas experimentales, llevadas a cabo en este proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	22
OBJETIVOS	24
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 AGRAZ	25
1.1.1 Características físicas del agraz y el arándano	26
1.2 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	28
1.2.1 Flavonoides	29
1.2.1.1 Antocianinas	30
1.2.1.2 Antoxantinas	31
1.3 COLORIMETRÍA	32
1.3.1 Espacio de color Cielab	32
1.4 SECADO DE LA MATERIA PRIMA	32
1.4.1 Secado en el horno	32
1.4.2 Liofilización	32
1.5 PROCESOS DE SEPARACIÓN	32
1.5.1 Extracción	33
1.5.1.1 Extracción por solventes orgánicos	33
1.5.1.2 Extracción asistida por microondas	33
1.6 CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE FLAVONOLES Y ANTOCIANINAS	34
2. METODOLOGÍA	37
2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL	37
2.1.1. Homogenización de la muestra	37
2.1.2. Desinfección de la muestra	37
2.2 TEMPERATURA	37
2.2.1 Secado de la muestra en horno	39
2.2.2 Liofilización de la muestra	40
2.3 EXTRACCIÓN	40
2.3.1 Extracción por solventes soxhlet	40
2.3.2 Extracción asistida por microondas	41
2.4 CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS Y FLAVONOLES	42
2.4.1 Titulación	42
2.4.1.1 Ensayo ácido-base	42
2.4.1.2 Ensayo Shinoda	42
2.4.2 Espectrofotometría UV	42
2.4.2.1 Soluciones buffer	42
2.4.2.2 Lectura de absorbancias	43

2.4.3	Espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoles	43
2.5	CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)	43
3.	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	44
3.1	HIPÓTESIS	44
3.1.1	Antocianinas	44
3.1.2	Flavonoles	44
3.2	ANÁLISIS EXPERIMENTALES	44
3.2.1	Análisis experimental para antocianinas	45
3.2.2	Análisis experimental para flavonoles	49
4.	RESULTADOS	52
4.1	HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA	52
4.1.1	Prueba de colorimetría	54
4.1.2	Humedad de la muestra	55
4.1.2.1	Muestra secada en el horno	55
4.1.2.2	Muestra liofilizada	57
4.2	EXTRACCIÓN POR SOLVENTES SOXHLET	57
4.2.1	Cuantificación de antocianinas	57
4.2.2	Cuantificación de flavonoles	63
4.2.3	Balance de masa global	64
4.3	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	65
4.3.1	Cuantificación de antocianinas	65
4.3.2	Cuantificación de flavonoles	69
4.3.3	Balance de masa global	71
4.4	TITULACIÓN DE LA MUESTRA	71
4.5	CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA	73
4.6	CÁLCULO DE RENDIMIENTOS	74
4.6.1	Rendimiento antocianinas	74
4.6.2	Rendimiento flavonoles	75
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	77
6.	CONCLUSIONES	82
7.	RECOMENDACIONES	84
	BIBLIOGRAFÍA	85
	ANEXOS	90

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición nutricional del agraz	27
Tabla 2. Composición nutricional del arándano	28
Tabla 3. Concentración de antocianinas	45
Tabla 4 Análisis de varianza	46
Tabla 5. Concentración de flavonoles	49
Tabla 6. Análisis de varianza	50
Tabla 7. Diámetros y peso del fruto fresco	52
Tabla 8. Coordenadas CieLab*	54
Tabla 9. Resultados de la prueba colorimetría CieLab*	54
Tabla 10. Peso de la muestra durante el secado en el horno	55
Tabla 11. Lectura de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente secadas en el horno.	59
Tabla 12. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras secadas en el horno	60
Tabla 13. Lectura de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente liofilizadas	61
Tabla 14. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras liofilizadas	62
Tabla 15. Contenido de antocianinas	62
Tabla 16. Absorbancia a 258 nm de las muestras	63
Tabla 17. Contenido de flavonoles	64
Tabla 18. Resultados del balance de masa global	65
Tabla 19. Lecturas de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5 previamente secada en el horno.	66
Tabla 20. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras secadas en el horno	67

Tabla 21. Lectura de las absorbancias pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente liofilizadas	68
Tabla 22. Contenido de antocianinas monoméricas y totales de las muestras liofilizadas	69
Tabla 23. Contenido de antocianinas	69
Tabla 24. Absorbancia a 258 nm de las muestras	69
Tabla 25. Contenido de flavonoles	70
Tabla 26. Resumen de resultados obtenidos del contenido de antocianinas y flavonoles	70
Tabla 27. Resultados del balance de masa global	71
Tabla 28. Titulación de antocianinas y flavonoles	72
Tabla 29. R_f obtenidos por cromatografía de capa delgada	74
Tabla 30. Rendimiento del contenido de antocianinas	75
Tabla 31. Rendimiento del contenido de flavonoles	76

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Efectos normales (absolutos) estandarizados	47
Gráfica 2. Efectos principales para la concentración de antocianinas	48
Gráfica 3. Relación de la concentración de antocianinas para la extracción por solventes soxhlet.	48
Gráfica 4. Efectos estandarizados	50
Gráfica 5. Efectos principales para el contenido de flavonoles	51
Gráfica 6. Comparación de los diámetros tomados de la fruta	53
Gráfica 7. Comparación del peso tomado de la fruta	53
Gráfica 8. Gráfica de la relación de la humedad	56
Gráfica 9. Relación de la máxima absorbancia con la longitud de onda	59
Gráfica 10. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda	62
Gráfica 11. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda	67
Gráfica 12. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda	68

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Agraz	25
Ilustración 2. Compuesto polifenol	29
Ilustración 3. Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.	30
Ilustración 4. Estructura básica de la antocianina.	31
Ilustración 5. Quercetina	31
Ilustración 6. Diagrama de flujo para la homogenización y desinfección del agraz	38
Ilustración 7 Diagrama de flujo para el secado de la muestra	39
Ilustración 8. Montaje de un extractor soxhlet	41
Ilustración 9. Montaje de la extracción asistida por microondas	41
Ilustración 10. Muestra homogenizada	54
Ilustración 11 Muestra de agraz antes y después del secado en el horno	56
Ilustración 12. Muestra de agraz antes y después de la liofilización	57
Ilustración 13. Diagrama de flujo global	64
Ilustración 14. Diagrama de flujo del balance de masa global	71
Ilustración 15. Espectro de cromatografía de capa delgada UV/Visible	73
Ilustración 16. Cromaticidad de espacio de color CIELAB	78

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Antocianinas Monoméricas	57
Ecuación 2. Absorbancia	58
Ecuación 3. Antocianinas Totales	58
Ecuación 4. Absorbancia (A')	58
Ecuación 5. Flavonoles totales	63
Ecuación 6. Balance de masa global	64
Ecuación 7. R_f	73
Ecuación 8. Rendimiento antocianinas	74
Ecuación 9. Rendimiento Flavonoles	75

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A . Ilustración de los equipos empleados en las pruebas de laboratorio	91
Anexo B. Calculo de rendimientos	97
Anexo C. Fichas de seguridad de la materia prima	102

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

% H: porcentaje de humedad

ε : Coeficiente de extinción molar

λ : Longitud de onda

α : Nivel de significancia (0.05)

A_{700} : Absorbancia a 700 nm

$A_{\lambda_{max}}$: Absorbancia a la longitud de onda máxima

A: Absorbancia determinada

A': Absorbancia a pH 1

Abs: Absorbancia

A_m : Absorbancia del extracto (nm)

A_r : Absorbancia de la sustancia de referencia (nm)

cm: Centímetros

DF: Distancia (en cm) desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente

DM: Distancia (en cm) desde el punto de aplicación hasta el centro de la mancha

E_1 : Flujo de salida del proceso de extracción

$E_{1antocianinas}$: Flujo de salida del proceso de extracción de las antocianinas

$E_{1flavonoles}$: Flujo de salida del proceso de extracción de los flavonoles

EtOH: Etanol

F: Distribución de probabilidad continua

F_0 : Flujo de entrada al proceso de extracción

FD: Factor de dilución

Fl: Contenido de flavonoides totales expresados en quercetina

g: Gramo

Gl: Grados de libertad

H_0 : Hipótesis nula

H_1 : Hipótesis alterna

L: Litros

m_{agraz} : Masa de agraz

mbar: Milibares

MC: Cuadrados medios

$m_{\text{EtOH recup}}$: Masa de etanol recuperado

m_{EtOH} : Masa de etanol

m_{extracto} : Masa extracto

mg: Miligramos

mL: Mililitros

m_R : Masa residual

nm: Nanómetro

p: Probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula

PM: Peso molecular de la sustancia de referencia

P_r : Peso de la sustancia de referencia (302.236 g)

R_f : Relación de frentes

SC: Suma de cuadrados

GLOSARIO

AGRAZ: es una fruta con gran cantidad de compuestos polifenólicos con capacidades antioxidantes y colorantes además de tener propiedades beneficiosas para la salud.

ALELOPATÍA: se define como un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento.

ANTIOXIDACIÓN: es la actividad que tienen las sustancias fitoquímicas como minerales y vitaminas sobre compuestos considerados dañinos para la salud, conocidos como radicales libres.

ANTIOXIDANTES: son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

ANTOCIANINAS: son pigmentos encargados de dar colores llamativos y brillantes a flores, frutas y hojas, que van desde el rojo al violeta o azul que poseen propiedades antioxidantes y son empleados para tratar enfermedades cardiovasculares y prevenir el cáncer.

CHALCONA: es una cetona aromática y un enona (cetona y doble enlace) formando un núcleo central dando origen a una variedad de compuestos biológicos importantes.

COLORIMETRÍA: técnica que consiste en suministrar información de manera cuantitativa y cualitativa de una disolución por medio de un instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática midiendo la intensidad de haz luminoso emergente.

CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC): es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil, en el cual el principio es que la sustancia de interés se adhiera a la fase estacionaria o se mueva con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria.

ESPECTROFOTOMETRÍA: método que se basa en la relación entre absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración.

EXTRACCIÓN: procedimiento utilizado para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción por medio de un disolvente.

FLAVONOIDES: son pigmentos naturales con poder antioxidante protegiendo la salud humana de agentes oxidantes.

FLAVONOLES: representados por la quercetina, posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

HEMIACETALES: se forman por reacción de un equivalente de alcohol con el grupo carbonilo de un aldehído o cetona.

LIOFILIZACIÓN: proceso que tiene como objetivo separar un solvente de una disolución mediante congelación y después sublimación manteniendo todas sus propiedades organolépticas.

MICROONDAS: se basa en la irradiación con microondas causando el movimiento de las moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a un incremento de la temperatura lo que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente.

NUTRACÉUTICO: producto natural con propiedades biológicas activas favorables para la salud con actividad terapéutica o preventiva.

OXONIO: también llamado hidrónico, es un protón hidratado correspondiente al catión H_3O^+ , el cual es el ácido más fuerte que puede existir en agua. Este ion se produce cuando un ácido fuerte transfiere un protón al agua, y se forma en presencia de cationes de hidrógeno H^+ .

QUELANTE: sustancia que forma complejos con iones pesados.

QUERCETINA: pigmento natural hidrosoluble representativo de los flavonoles.

SECADO: método de eliminación de sustancias volátiles, es decir, humedad; para obtener un producto sólido y seco.

SOLVENTE: líquido o gas que puede diluir o extraer otras sustancias.

RESUMEN

“Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos”¹. Además, contienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Los flavonoles y antocianinas hacen parte de ellos, asimismo se encuentran presentes en el agraz.

Inicialmente a partir de bibliografía de especies del género *Vaccinium* a los cuales se les realizaron procedimientos similares, se determinaron las condiciones iniciales y preparación de la muestra, definiendo propiedades como pH de 2.1, temperatura de secado de 40°C y liofilizado del fruto de -86°C a -55°C y una temperatura constante en las bandejas de 25°C y el tipo de solvente a utilizar de acuerdo a la aplicación que se le quiera dar, en este caso etanol debido a que no es tóxico y tiene alta polaridad.

Para la extracción por solventes (soxhlet), los resultados obtenidos del contenido de antocianinas totales para la muestra secada en el horno (3879.5 ± 54 mg de 3-cianidin glucósido/100 g), con respecto al extracto obtenido con la materia liofilizada (3969.7 ± 110.5 mg de 3-cianidin glucósido/100 g). En cuanto al método de extracción asistida por microondas con la muestra secada en el horno (3106.0 ± 285 mg de 3-cianidin glucósido/100 g), a comparación del extracto obtenido con la muestra liofilizada (3837.4 ± 47.9 mg de 3-cianidin glucósido/100 g).

La caracterización se realizó por medio del ensayo Shinoda, generando una coloración cereza y ácido base dando una coloración verde, para el reconocimiento cualitativo de los flavonoles y antocianinas respectivamente y cuantitativo usando un análisis espectrofotométrico. Posteriormente se utilizó la cromatografía de capa delgada (TLC), para la verificación de los datos y selección de las mejores condiciones para la obtención del extracto.

Dando como resultado que la extracción soxhlet con un rendimiento de 39.8% con la materia prima previamente liofilizada da una mayor concentración de antocianinas. Asimismo, el contenido de flavonoles se ve favorecida por el método de extracción asistida por microondas con un rendimiento de 11.8% con la materia previamente liofilizada.

¹ MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J; CULEBRAS, J. Y TUÑÓN, M^a. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. España: Universidad de León, 2002 p. 271.

INTRODUCCIÓN

El agraz es una fruta que ha empezado a tener auge en los últimos años, una de las principales características de esta, es que su capacidad antioxidante es mucho mayor que la de otros frutos de su mismo género (*Vaccinium*) como lo son los arándanos, a los cuales ya se le han realizado estudios de extracción de antioxidantes, por lo que se tomarán como punto de comparación según los resultados obtenidos.

En la industria de alimentos puede ser usado como conservante y/o colorante natural, como nutracéutico o como aditivo alimentario. En la industria de cosméticos por su cuidado en la piel debido a que evita el desarrollo de células de cáncer, como reafirmante y tratamiento para cicatrices y arrugas. En la industria farmacéutica por que ayuda a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, artritis, Alzheimer y Parkinson y por último en la industria mecánica como anticorrosivo.

Se tiene la certeza que el agraz, presenta propiedades antioxidantes, por la existencia de antocianinas y flavonoles², en su mayoría presentes en el estado de maduración, 120 días de cosecha³, que han sido estudiadas y analizadas a nivel laboratorio con la seguridad de que pueden ser utilizadas en la estabilización de sistemas alimenticios, en especial aceites vegetales inhibiendo su oxidación. El agraz, que se tomó como materia prima se cultiva en Boyacá localizada a 5° 31'15" N y 73°43'39" O y a una altura de 2.615 msnm en el municipio de San Miguel de Sema donde se encuentra ubicada la finca Medialuna en la Vereda de Sabaneca Sector La Isla.

Los arándanos son considerados el fruto con un alto contenido de antioxidantes como polifenoles, presentes tanto en la cáscara como en la pulpa, debido a esto se considera como "fruto de la longevidad". Su disponibilidad, versatilidad y variedad de formas durante casi todo el año es una de las ventajas. Además el gran interés, es de los posibles beneficios para la salud humana. Por lo cual se considera viable tecnológicamente el desarrollo de alimentos funcionales frescos mediante la incorporación de extracto de antocianinas procedente de arándano.

Teniendo en cuenta previos estudios llevados a cabo en los arándanos, los cuales ofrecen información sobre los hallazgos del proceso de extracción de antocianinas determinando la influencia de las principales variables de proceso en su extracción como temperatura, pH, tiempo de extracción, tipo de solvente y proporción de

² PARR; BOLWELL. KAHKONEN et al. PRIOR et al., citado por GAVIRIA, Carlos. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 96.

³GAVIRIA, Carlos; HERNÁNDEZ, Juan; ARIAS Mario; MEDINA, Clara; ROJANO, Benjamín. Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale Sw.*) durante su desarrollo y maduración. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 2012. p. 6490

materia prima/solvente (MP/S) y basados en otros estudios en los cuales se hace énfasis en el tipo de secado para la preparación de la materia prima en el cual hace la comparación de la extracción de antocianinas a partir de arándanos secos al horno y liofilizados, siendo esta última la que indica mayor concentración de antocianinas, se fundamenta el desarrollo de la presente investigación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el extracto de antocianinas y flavonoles en el agraz (*Vaccinium meridionale swartz*) obtenidos a nivel laboratorio por medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones de operación iniciales de la muestra a la cual se le va a realizar la extracción.
- Obtener el extracto de antocianinas y flavonoles por medio del método de extracción por solventes a nivel laboratorio.
- Obtener el extracto de antocianinas y flavonoles por medio del método de extracción asistida por microondas a nivel laboratorio.
- Comparar los extractos obtenidos de la aplicación de los métodos anteriores.

1. MARCO TEÓRICO

Con el objetivo de contextualizar, se presenta a continuación un panorama general del agraz, sus propiedades, contenido polifenólico, las extracciones usadas y sus respectivos ensayos de caracterización y cuantificación para la determinación de las mejores condiciones de preparación de la muestra.

1.1 AGRAZ

Carlos Gaviria⁴, hace mención en su artículo que el agraz o mortiño, es un fruto perteneciente al género *Vaccinium*, tiene más de 400 especies en el mundo, algunas de las cuales han sido domesticadas en Estados Unidos y Canadá. El mortiño es una fruta con sabor cítrico dulce, de tamaño pequeño (Ilustración 1.) y generalmente conocida como un matorral y ha atraído el interés de muchos investigadores alrededor del mundo, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos, tales como ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y antocianidinas.

Ilustración 1. Agraz



Fuente. Ciencia de la vida. Pesquisa 28. Universidad Javeriana. pág. 12

Según Ávila et al.⁵, en Colombia, el agraz se presenta como un pequeño arbusto silvestre, con una altura de 1 a 4 m aproximadamente, en casos particulares pueden encontrarse hasta 8 m de altura. Los frutos de agraz son bayas redondas de 5 a 10 mm de diámetro ecuatorial, de color púrpura a rojizo oscuro en la madurez, con cáliz persistente en el ápice, fruto comestible de sabor ácido y

⁴ GAVIRIA, Carlos. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño. Universidad Nacional de Colombia. 2009

⁵ ÁVILA, Hernán; CUSPOCA, Julián, FISCHER, Gerard; LIGARRETO, Adolfo y QUICAZÁN, Martha. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) almacenado 1 a 2 °C. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. {En línea} {10 de octubre de 2016} Vol. 60 no 2 (2007) Disponible en (<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v60n2/a19v60n2.pdf>)

agradable, y contiene gran cantidad de semillas pequeñas. En el país, se presentan cosechas dos veces al año.

Entre las sustancias bioactivas que se encuentran en los vegetales y frutas se destacan especialmente el grupo denominado polifenoles que tienen beneficios a largo plazo sobre la salud humana. Además pueden ser utilizados en cosméticos, mecánica, fármacos y como aditivos alimentarios con el fin de impedir o retardar las oxidaciones catalíticas, el enranciamiento natural o provocada por agentes físicos.

Según Anna Rosso y Said Toro⁶, los tipos de agentes antioxidantes son sintéticos y naturales. Los sintéticos, se caracterizan por tener una estructura fenólica con sustitución alquílica y generalmente se usan como aditivos alimenticios. No obstante, existen estudios que sugieren que estos antioxidantes sintéticos tienen actividad cancerígena lo que ha restringido su uso en los últimos años, en esta categoría se destacan el butilhidroxinasol (BHA) y el butilhidroxitoluenon (BHT).

“Por otro lado, los antioxidantes naturales son sustancias más saludables y seguras que los antioxidantes sintéticos. Entre las principales familias se destacan los ácidos fenólicos, los ácidos cinámicos, los flavonoides y los taninos”⁷.

1.1.1 Características físicas del agraz y el arándano. Las características físicas ideales las cuales son tamaño mínimo 6 mm, forma redonda de apariencia brillante, de textura suave pero firme al tacto, color morado oscuro, con un estado de maduración fisiológica de 120 días, según Gaviria⁸ puesto que en este tiempo se reporta un aumento de antocianinas totales.

La composición nutricional del fruto de agraz, depende del origen y la variedad analizada, en términos generales de 100 gramos de pulpa comestible pueden contener lo mostrado en la Tabla 1.

⁶ ROSSO, Ana María y TORO, Said. Optimización de las condiciones de extracción sólido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha (*Mangifera indica*. Var. *Magdalena River*) y ajuste de sus parámetros cinéticos. Trabajo de Grado de Ingeniería Química. Bucaramanga: Escuela de Ingeniería química. Facultad fisicoquímica. 2011. 59 p.

⁷ *Ibid.*, p. 20.

⁸ GAVIRIA, Carlos, et al. Op. cit., p. 6490.

Tabla 1. Composición nutricional del agraz

Composición nutricional	Cantidad
Agua	87.4 g
Proteína	0.3 g
Fibra	1.7 g
Calorías	42 Kcal
Vitamina B1	0.014 mg
Vitamina B2	0.0024 mg
Vitamina B6	0.012 mg
Vitamina C	12 mg
Patótonico	12 mg
Ácido nicotínico	0.2 mg
Sodio	2 mg
Potasio	72 mg
Calcio	14 mg

Para el caso del arándano son frutos de 5mm de diámetro ecuatorial de color negro, azul cubierto de una pilosidad violeta, de forma redondeada. Su composición nutricional por cada 100 g de futa se muestra en la Tabla 2⁹.

⁹ TORRES, Marcelo. Propiedades del arándano. Emprendimientos agropecuarios. [en línea] < <http://marcelo-torres-nosa.idoneos.com/>> [citado el 27 de mayo de 2016]

Tabla 2. Composición nutricional del arándano

Composición nutricional	Cantidad
Agua	84.21 g
Proteína	0.74 g
Fibra	2.4 g
Calorías	57 kcal
Vitamina B1	0.037 mg
Vitamina B2	0.041 mg
Vitamina B6	0.052 mg
Vitamina C	9.7 mg
Vitamina B7	6 mg
Vitamina E	0.57 mg
Sodio	1 mg
Potasio	77 mg
Calcio	6 mg

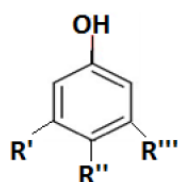
1.2 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.

El reino vegetal ofrece gran variedad de compuestos de alto y bajo peso molecular con propiedades antioxidantes. La mayoría de estos compuestos antioxidantes naturales que se han estudiado para su aplicación en la industria alimentaria son compuestos polifenólicos. Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios que se caracterizan por estar formados por unidades de fenoles-anillos aromáticos que llevan al menos un sustituyente hidroxilo¹⁰ (Ilustración 2). Estas biomoléculas se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración varía a lo largo del ciclo vegetativo, además participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y la alelopatía¹¹.

¹⁰ ROSSO. Op. cit., p. 21.

¹¹ CONDE, Enma. Revalorización de Residuos Agroindustriales y Forestales para la Obtención de antioxidantes Naturales con Aplicaciones en la Industria Alimentaria, Cosmética y/o Farmacéutica. Ourense, España, 2009, Trabajo de Maestría. Universidad de Vigo. Facultad de Química.

Ilustración 2. Compuesto polifenol



Fuente. Rosso¹².

Según Conde¹³ y Paladino¹⁴, los compuestos polifenólicos presentan actividad antioxidante, y la capacidad de donar electrones, lo cual indica su carácter reductor, debido a la presencia de los grupos hidroxilo en el anillo aromático y su capacidad para deslocalizar los electrones del radical fenólico.

1.2.1 Flavonoides. “Son el grupo más abundante en los vegetales, son compuestos de bajo peso molecular que generalmente están enlazados a moléculas de azúcar, se clasifican en antocianinas y antoxantinas, Las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y purpuras. Las antoxantinas, que incluyen flavonoles, flavonas, flavanoles e isoflavonas, son moléculas incoloras o de colores que oscilan desde el blanco hasta el amarillo”¹⁵.

En la Ilustración 3 se muestra el núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides, además de mostrar ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.

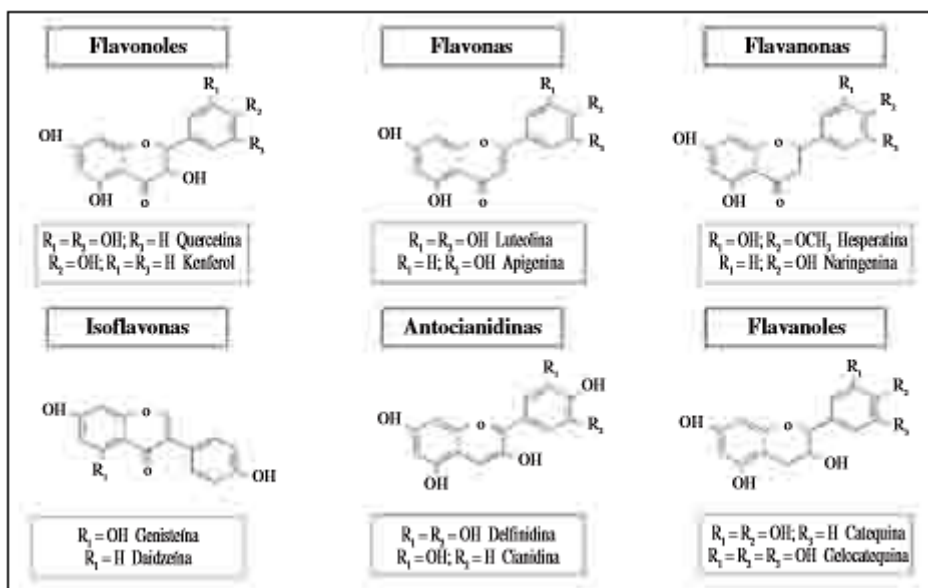
¹² ROSSO. Op. cit., p. 21.

¹³ CONDE. Op. cit., p. 21.

¹⁴ PALADINO, Silvia. Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos Contenidos en las Semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.). Mendoza, Argentina, 2008, Trabajo de Maestría. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.

¹⁵ *Ibíd.*, p. 21-22.

Ilustración 3. Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.



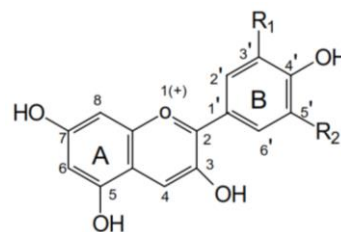
Fuente: Quiñones, [et al.]¹⁶

1.2.1.1 Antocianinas. Según Reyes¹⁷, las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, distribuidos en el reino vegetal. Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas es decir, están formadas por una molécula de antocianidina, particularmente la aglicona, que se une con un azúcar mediante un enlace β -glucosídico. La estructura química de estas agliconas es el ión flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que cuenta con dos grupos aromáticos (Ilustración 4).

¹⁶ QUIÑONES, M.; MIGUEL, M. y ALEIXANDRE, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. En: Nutrición hospitalaria: órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral. Febrero, 2012. Vol. 27, no. 5, p. 79.

¹⁷ REYES, Jesús. Colorantes orgánicos de origen natural utilizados como sensibilizadores de celdas solares. Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2014. 27 p.

Ilustración 4. Estructura básica de la antocianina.

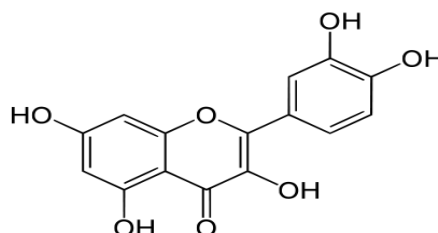


Fuente. Martínez¹⁸.

1.2.1.2 Antoxantinas. Pigmentos característicos de las plantas, solubles en agua con un rango de color que va desde el blanco o incoloro, hasta el crema o amarillo, a menudo en los pétalos de las flores.

➤ **Flavonoles.** Son una clase de flavonoides que se encuentran repartidos en todos los alimentos de origen vegetal, las pieles y hollejos de las frutas, son particularmente ricos en estos compuestos, proporcionando un ligero color amarillo a los tejidos vegetales. “La estructura química que suelen poseer es 3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona) (Ilustración 5). Su diversidad radica en las diferentes posiciones que acomodan los grupos -OH fenólicos”¹⁹. Los más conocidos son quercetina, kaempferol y miricetina y se presentan generalmente en forma de glicósidos²⁰.

Ilustración 5. Quercetina



Fuente. Morales, [et al.]²¹.

¹⁸ MARTÍNEZ, Noé. Extracción de compuestos antioxidantes presentes en la fresa (*Fragaria SPP*). Técnico superior universitario en procesos alimentarios. Oaxaca. Universidad Tecnológica de los Valles de Oaxaca. 2013. p. 19

¹⁹ GARCÍA, Jimmy. Fenoles naturales. Facultad de ciencias químicas. Universidad Central del Ecuador. {En línea} {18 de octubre de 2015} Disponible en (<https://q-organicauce.wikispaces.com/file/view/Fenoles+Jimmy+Gar.pdf>)

²⁰ TOBON, Manuel. Estudio de las posibles conformaciones de los flavonoides quercetina y hidroquercetina por métodos de mecánica cuántica. Trabajo de grado para licenciatura en física. Puebla. Universidad Autónoma de Puebla. 2015. 7 p.

²¹ MORALES, Martin; SÁNCHEZ, Vicente; SANDOVAL, Santiago; TARRAGO, Fernández; LÓPEZ, José y PÉREZ F. Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio. En: Revista de toxicología. {En línea} {30 de marzo de 2016}. Disponible en (<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4036872>)

1.3 COLORIMETRÍA.

Es la técnica que cuantifica el color mediante la medición del mismo a partir de tres colores primarios de luz que son vistos por el ojo humano, específicamente, el rojo, el verde y el azul. Esta medición de color llamada "tri-estímulos" proporciona datos sobre la cantidad de los tres componentes que están presentes en la luz reflejada (sólidos) o transmitida (típicamente los líquidos) por un producto alimenticio²².

Esta técnica en la industria de alimentos se utiliza para determinar los factores tales como grados de maduración y el deterioro en relación a los ciclos de transporte, almacenamiento, conservación, sabor y ciclo de eliminación.

1.3.1 Espacio de color Cielab. También conocido como coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ el cual permite detallar estímulos de color en un espacio tridimensional. Se compone de 3 ejes, el primero de ellos es el eje L^* , luminosidad y va de 0 (negro) a 100 (blanco), representando la escala acromática de grises, los otros dos ejes son coordenadas cromáticas llamadas a^* y b^* , que representan variación entre las tonalidades de rojo a verde, y de amarillo a azul, respectivamente. Se presentan algunos casos en los que tanto a^* como b^* son iguales a cero (0) por lo tanto son acromáticos²³.

1.4 SECADO DE LA MATERIA PRIMA

Es un método que se ha practicado desde la antigüedad, permitiendo la extracción total del agua contenida en el fruto, impidiendo la actividad microbiana y reduciendo la actividad enzimática.

El secado es importante para aislar la parte del fruto que se pretende estudiar, poniéndose de manifiesto todas las características necesarias para la obtención de los resultados deseados.

1.4.1 Secado en el horno. El secado en el horno es un método donde se coloca la materia prima en una cámara donde el flujo de aire, temperatura y humedad son controladas para proporcionar un secado rápido.

1.4.2 Liofilización. Es un proceso con el cual se separa el solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida, sin alterar la composición cualitativa o cuantitativa.

²² KONICA MINOLTA. Control de color en la industria alimenticia. La calidad del color. <http://sensing.konicaminolta.com.mx/learning-center/case-studies/FoodIndustryApps.pdf>. [Citado: 25 de Mayo de 2016]

²³ WESTLAND, Stephen. Que es el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. [en línea]. <http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab> [citado el 15 de febrero de 2016]

1.5 PROCESOS DE SEPARACIÓN

En Ingeniería química una parte muy importante son las operaciones unitarias debido a que está relacionada con el problema de modificar la composición de soluciones y mezclas mediante métodos que no impliquen, necesariamente, reacciones químicas. Por lo común estas operaciones se enfocan a separar las partes que componen la materia. Estos procedimientos son significativos, puesto que todo proceso químico requiere una purificación inicial de las materias primas o de la separación final de los diferentes productos y subproductos que se puedan obtener y sean de interés para el proceso; por lo tanto, las operaciones de transferencia de masa, se usan según su clasificación considerando si el contacto entre las dos fases inmiscibles es directo, son fases separadas por una membrana o contacto directo de fases miscibles; en particular, en esta investigación las separaciones que intervienen son contactos entre dos fases sólido líquido insolubles.

1.5.1 Extracción. Según Ampara Caubet et al.,²⁴ la separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. El principal objetivo de la extracción es separar selectivamente el producto de una reacción, o bien eliminar las impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción, gracias a sus diferencias de solubilidad en el disolvente de extracción elegido.

Existen diferentes métodos de extracción entre los cuales se llevarán a cabo, extracción por solventes orgánicos (soxhlet) y extracción asistida con microondas.

1.5.1.1 Extracción por solventes orgánicos. Es una operación de transferencia de masa en un sistema de dos fases líquidas considerada como uno de los procesos más efectivos y económicos para purificar, concentrar y separar la sustancia de interés de otros que no lo son. Conocida también como intercambio iónico líquido y se basa en el principio por el cual un soluto o ion metálico puede distribuirse en cierta proporción entre dos solventes inmiscibles, uno de los cuales es usualmente acuoso y el otro un solvente orgánico como lo es el etanol acidificado. Esto es posible debido que varios reactivos orgánicos poseen un alto grado de afinidad selectiva con determinados iones metálicos²⁵.

²⁴ Operaciones básicas en el laboratorio de química. Universidad de Barcelona. Disponible en http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona.html [Citado el 30 de Septiembre de 2015]

²⁵ CODELCO EDUCA. Extracción por solventes (SX). En: Codelco Educa. {En línea} {septiembre de 2015} Disponible en (https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_lxivacion_extraccion.asp)

1.5.1.2 Extracción asistida por microondas. “La extracción por microondas ha sido usada por muchos años para extraer compuestos de diferentes matrices: muestras biológicas, alimentos, agua contaminada y muchos otros tipos de muestras. La energía de microondas ha sido empleada y desarrollada en los últimos años para la extracción de compuestos orgánicos a partir de matrices ambientales, además de su uso para la digestión de muestras para el análisis de metales”²⁶. Las microondas son radiaciones electromagnéticas portadores de información y vectores de energía, conformadas por un campo eléctrico y un campo magnético, por lo que estas ondas tienen la capacidad de absorber una fracción de energía electromagnética y convertirla en el calor.

Este procedimiento es usado para extraer compuestos insolubles o ligeramente solubles en agua, de matrices generalmente sólidas como lo es la arcilla, lodos, sedimentos o residuos sólidos. El proceso utiliza energía del microondas proveniente de magnetrones independientes que rotan logrando una distribución homogénea de las microondas en la muestra para generar condiciones de presión y temperatura elevada en un recipiente cerrado que contiene la sustancia²⁷.

Esto lo convierte en un método fácil y eficiente, ya que la rapidez en el calentamiento es la principal ventaja de las microondas frente a los métodos tradicionalmente empleados en la extracción con solventes, que causan el calentamiento a partir de la transmisión de la energía al material de forma indirecta. Por lo tanto, el empleo de las microondas permite ahorrar tiempo de manera significativa; disminuir los volúmenes de disolventes necesarios en los tratamientos, así mismo, de energía en el proceso; además, no contamina el medio ambiente, lo cual se manifiesta en la reducción de los costos en general y permite obtener alta recuperación de los compuestos de interés²⁸.

1.6 CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE FLAVONOLES Y ANTOCIANINAS

La evaluación cuantitativa y cualitativa, permite identificar la presencia de los antioxidantes de interés y su cantidad. A continuación se definen los métodos utilizados según el compuesto.

²⁶ RODRIGUEZ, Carlos. Estudio de la técnica de Extracción Asistida por Microondas (MAE) para su aplicación en la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH's) en suelos. Disertación previa a la obtención del título Licenciado en Ciencias Químicas, mención Química Analítica. Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2013. 23-24 p.

²⁷ VILLEMUR, María; RIMINI, Marta. Determinación de pesticidas organoclorados en suelos – Extracción por microondas. Centro de tecnología del uso del agua. Programa Química Analítica.

²⁸ SALOMÓN, Susleby; BERMELLO, Addiss; MÁRQUEZ, Tania; LÓPEZ, Orestes; GONZÁLEZ, María; LLÓPIZ, Julio. Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza). Revista Cubana de plantas medicinales. La Habana, Cuba. 2013

Para la caracterización cualitativa de antocianinas, debido a que se comportan como indicadores ácido – base, se realizará una prueba de pH, según lo propuesto por Martínez²⁹. A pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y/o moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y/o azules. Con esta prueba se pueden diferenciar entre las antocianinas y las betacianinas.

Mientras que para flavonoles, se realiza el ensayo Shinoda que permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

La caracterización cuantitativa se basa en la espectrofotometría, la técnica más usada para el cálculo de concentraciones de antocianinas, relacionando la absorción de luz con la concentración de los compuestos de interés. Para su cuantificación el proceso se usó pH diferencial pues es un método basado en el cambio a nivel estructural que sufren las antocianinas con respecto a la variación del pH, manifestado por un cambio en la absorbancia, para esto se preparan soluciones buffer que tienen como objetivo mostrar la forma oxonium que predomina a pH 1 (coloreadas) y la forma hemiacetal presente a pH 4.5 (incolores). Donde el extracto es diluido en estas soluciones para su respectiva lectura de absorbancia.

Para flavonoles, se sigue el procedimiento descrito por Kostennikova Z. a 258 nm leídos en espectrofotómetro UV visible.

El espectro de absorción de las antocianinas depende del pH. La absorción máxima de 520-540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas, según lo propuesto por Aguilera³⁰ y la absorción máxima de flavonoles está presente en dos bandas, la banda I de 300-390 nm relacionada con la funcionalidad cinamoilo y la banda II entre 250-280 nm que corresponde al anillo aromático A es decir funcionalidad benzoilo, según lo propuesto por Martínez³¹.

No obstante, existen otros métodos de cuantificación de flavonoides, como la cromatografía de capa delgada (TLC) el cual consiste en separar moléculas relativamente pequeñas. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria (comúnmente se utiliza sílica gel³².) y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá

²⁹ MARTÍNEZ, Alejandro. Flavonoides. Medellín: Universidad de Antioquia. 2005. p. 21

³⁰ AGUILERA, Miguel; REZA, María del Carmen; GERARDO, Rodolfo. Propiedades funcionales de las antocianinas. Durango: Universidad Juárez del Estado de Durango. 2011. p. 18

³¹ MARTÍNEZ. Op. cit., p. 22.

³² BONILLA, Andrés. Caracterización de los pigmentos antocianos en los primordios florales de *Miconia biappendiculata* y *Clusia muliflora* de un bosque andino. Trabajo de grado para obtener el título de biólogo. Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá. 2002. p. 67

con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria.

2. METODOLOGÍA

A continuación se muestran los diferentes procedimientos llevados a cabo para la obtención de antocianinas y flavonoles, con su respectiva caracterización.

2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA INICIAL

Como la temperatura es un factor importante que afecta la calidad del agraz en su estado de maduración fresco, se almacenó a una temperatura de 2 °C, de esta forma se reduce el deterioro fisiológico y patológico del fruto.

2.1.1. Homogenización de la muestra. A partir de bibliografía se establecieron las condiciones iniciales de la muestra como son la temperatura, el pH y el estado de la muestra.

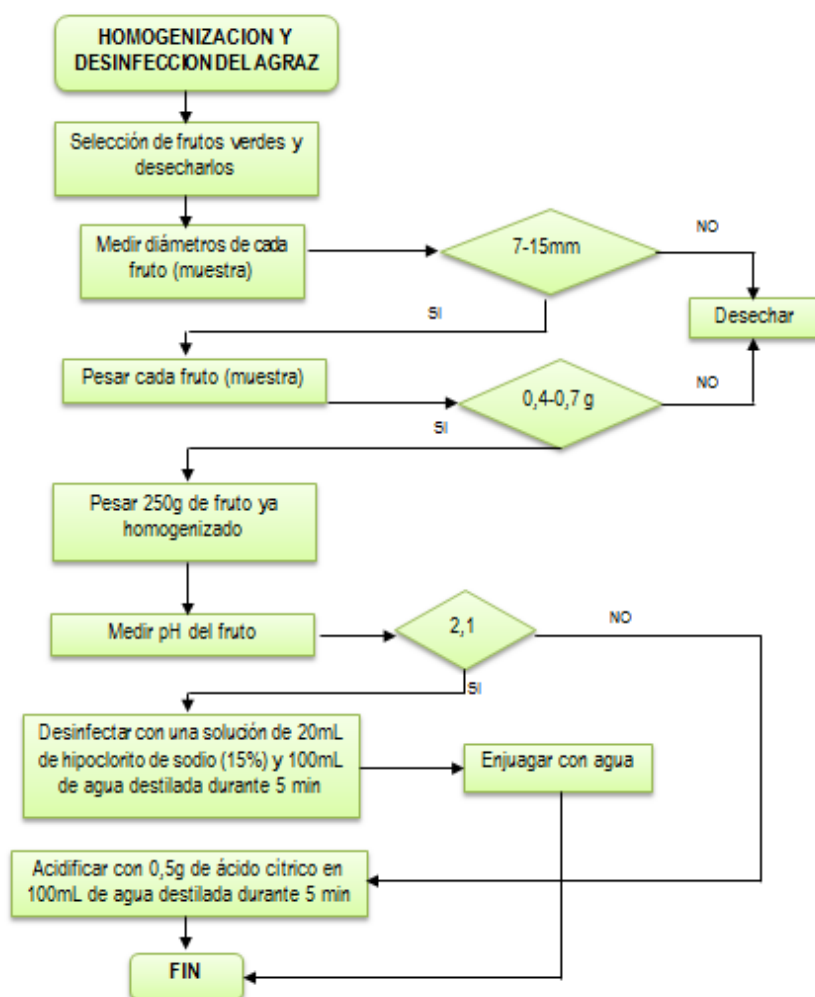
El fruto se recolectó en el estado de maduración fisiológica propuesta. La homogenización se realizó posteriormente, descartando los frutos que no presentaban las características de coloración adecuadas a su estado de maduración, este proceso se realizó con un colorímetro Konica Minolta CR-400 con una precisión e 0.6. Asimismo se tomó el 40% de la muestra a la cual se le midieron los diámetros ecuatoriales con un calibrador digital Truper con una precisión de 0.05 mm; la masa fresca, se pesó en una balanza digital Nimbus con una precisión de 0.1 mg y para la medición del pH se maceraron aproximadamente 10 g de fruto fresco, la medición se realizó con un pH-metro Schott ProLab 1000 con una precisión de 0.05.

2.1.2. Desinfección de la muestra. Al tener la muestra homogenizada se realizó la desinfección de la materia prima designada para la extracción por solventes (soxhlet) y asistida por microondas, la cual consta de desinfectar el agraz con una solución de 20 mL de hipoclorito de sodio al 15% en 100 mL de agua durante 5 minutos, y posteriormente se enjuaga con abundante agua. Después, se procede a agregar una solución con 0.5 g de ácido cítrico en 100 mL de agua para acidificar el fruto, hasta 2.1³³.

Los anteriores procedimientos se describen en la Ilustración 6.

³³ ZAPATA, Luz Marina. Extracción de antocianinas de arándanos. Tesis doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos, 2014. ii p.

Ilustración 6. Diagrama de flujo para la homogenización y desinfección del agraz



2.2 TEMPERATURA

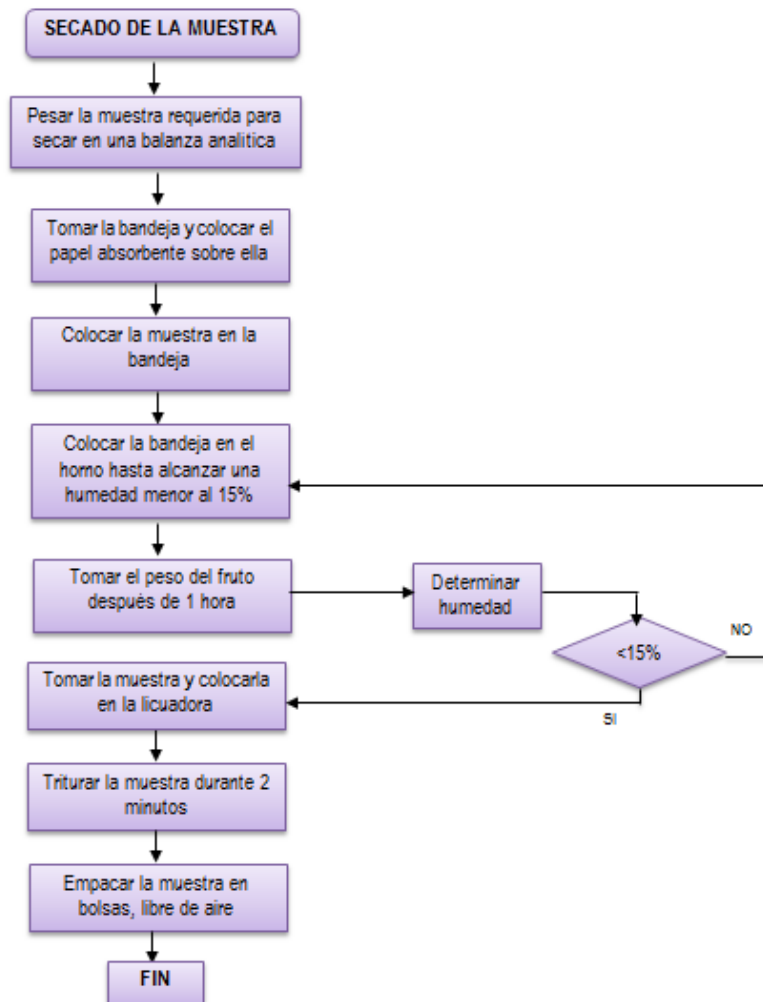
Teniendo en cuenta que la temperatura influye en el estado inicial de la muestra, esta es una de las variables que se va a evaluar tanto para la extracción por solventes (soxhlet) como para la asistida por microondas.

2.2.1 Secado de la muestra en horno. Se tomaron 750 g de muestra desinfectada y se colocaron en una bandeja con papel absorbente en un horno a 40°C según lo propuesto por Paes³⁴ quien plantea un secado de 4 a 5 días para el arándano, por lo que se determinó la humedad después de 24 horas de permanecer en el horno.

Finalmente cada muestra destinada para las dos extracciones, se trituran en una licuadora para alimentos CBL 999 durante 2 min y se empaca la muestra resultante en bolsas de cierre hermético para evitar posible oxidación.

Los anteriores procedimientos se describen en la Ilustración 7.

Ilustración 7 Diagrama de flujo para el secado de la muestra



³⁴PAES, Juliana; DOTTA, Raquel y MARTÍNEZ, Julián. Extraction of phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized water. Campinas: Universidad de Campinas, 2013. p. 2

2.2.2 Liofilización de la muestra. En la liofilización se pretende disminuir la temperatura para determinar su efecto en el contenido de flavonoles y antocianinas en el agraz. A continuación se detalla el procedimiento llevado a cabo.

Se toman 600 g de fruta fresca y previamente se congela en un ultra-congelador Evermed durante 24 horas a -76.5°C , asegurando la congelación completa de la materia prima. Posteriormente se lleva a un liofilizador LABCONCO con una temperatura de -86°C a -55°C , en las bandejas una temperatura constante de 25°C durante 31 horas a una presión de vacío de 0.2 mbar.

Los procesos de oxidación se controlaron guardando los productos liofilizados en recipientes herméticos y en lugares de bajas temperaturas para evitar la desnaturalización.

2.3 EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción son una de las variables en la investigación, donde se quiere evaluar la influencia del método en el contenido final de los antioxidantes. A continuación se presentan los procedimientos realizados para cada uno de estos.

2.3.1 Extracción por solventes soxhlet. El proceso de extracción por solventes soxhlet se basó según lo planteado por Lutz & Paes³⁵. Se pesaron 10 g del material seco y triturado y se colocaron en papel filtro, dentro del tubo del extractor. Se armó un montaje Soxhlet como se muestra en la Ilustración 8. En el balón se colocaron 150 mL de etanol. Se empezó a calentar, cuidando que el flujo de agua en el condensador sea suficiente y graduando la cantidad de calor para impedir la ebullición violenta del etanol. Se continuó el calentamiento durante el tiempo necesario para que recirculara lo suficiente reduciendo notablemente la coloración del extracto más solvente. Se rotavaporó a 40°C a vacío, en un rotavaporador Heidolph. Luego se almacenó el extracto obtenido a 4°C hasta los siguientes estudios.

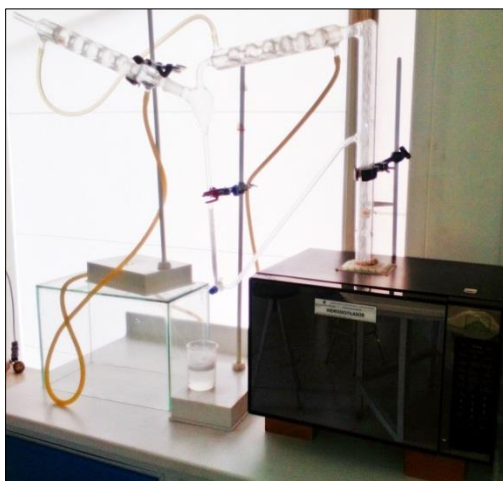
³⁵ LUTZ I. A., Physico-chemical methods for food analysis. Analytical standards of institute Adolfo Lutz, 4 ed. São Paulo. Citado por: PAES, Juliana; DOTTA, Raquel y MARTÍNEZ, Julián. Extraction of phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO_2 and pressurized water. Campinas: Universidad de Campinas, 2013. p. 5

Ilustración 8. Montaje de un extractor soxhlet



2.3.2 Extracción asistida por microondas. Tomando una muestra de 10 g de fruto, previamente deshidratado y triturado, se adicionan a 150 mL de etanol y la mezcla resultante se somete a radiación de microondas usando un horno microondas Samsung convencional acoplado a un hidroddestilador, como se muestra en la Ilustración 9, con una salida de frecuencia de 2450 MHz, a tiempos de exposición de la radiación de 2 minutos a potencia de 80 watts. El extracto obtenido se filtra a vacío, y el sobrenadante se rotavapora a 40°C a vacío, en un rotavaporador Heidolph. El extracto resultante se guarda a 4 °C hasta los análisis posteriores.

Ilustración 9. Montaje de la extracción asistida por microondas



2.4 CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS Y FLAVONOLES

Para corroborar la presencia de antocianinas y flavonoles en el agraz se utilizan dos métodos de titulación, teniendo en cuenta, que estos no pertenecen al mismo grupo dentro de los antioxidantes.

2.4.1 Titulación. Se procede a realizar la titulación de los extractos para la cualificación mediante los ensayos ácido-base para antocianinas y el ensayo Shinoda para flavonoles.

2.4.1.1 Ensayo ácido-base. En un vidrio de reloj se tomaron aproximadamente 5 gotas de extracto y se le agregaron 2-3 gotas de ácido acético glacial, después para hacer la prueba a pH alcalino se agregó a otra muestra de extracto 2-3 gotas de hidróxido de sodio.

2.4.1.2 Ensayo Shinoda. Se tomó como referencia el ensayo utilizado por Martínez³⁶, que consiste en colocar 5 gotas del extracto en un vidrio de reloj, después se agregó 0.1 g de cinc en polvo y 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

2.4.2 Espectrofotometría UV. Para la cuantificación de antocianinas. Siendo la espectrofotometría la técnica usada para cuantificar antocianinas y flavonoles, se presentan a continuación las soluciones buffer y procedimientos correspondientes para dichas lecturas.

2.4.2.1 Soluciones buffer. Para su preparación se siguió con el procedimiento propuesto por Chávez, et al.³⁷

➤ **Preparación de la solución buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025M/HCl pH=1.** Se pesó 0.466 g de cloruro de potasio y se mezcló en 15 mL de agua destilada usando un agitador magnético. Posteriormente se ajustó el pH a 1 con ácido clorhídrico concentrado y finalmente se aforó a 250 mL con etanol.

➤ **Preparación de la solución buffer de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4M/HCl pH=4.5.** Se pesó 8.203 g de acetato de sodio y se mezcló en 15 mL de agua destilada; el pH se ajustó a 4.5 con ácido clorhídrico concentrado y se aforó a 250 mL con etanol.

³⁶Ibíd., p. 20.

³⁷CHÁVEZ, Ronald y ORDOÑEZ, Elizabeth. Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao {en línea} {1 Abril de 2016} No 1 (2013) Disponible en http://www.encuentrocientificointernacional.org/revista/eci2013irevista/04ronaldchavez_polifenolesantioxidant.esfinal.pdf

2.4.2.2 Lectura de absorbancias. Las lecturas de las absorbancias se realizaron en un rango de longitud de onda ya establecido que muestra la presencia de la antocianina más representativa llamada cianidin-3-glucósido. A continuación se describe el proceso realizado para la obtención de las mismas.

➤ **Procedimiento.** Se diluye cada muestra 120 veces con las soluciones buffer pH=1 y pH=4.5 y se lee la espectrofotometría desde 500 hasta 600 nm y 700 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Jenway 6320D con una precisión de ± 2 nm. Tomando los datos de absorbancia leída.

2.4.3 Espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoles. Según lo propuesto por Camacho³⁸, se pesaron 0.5252 g del extracto etanólico concentrado, se diluyó en 10 mL de etanol y se llevó a 100 mL. Como solución patrón se utilizó 0.0445 g de quercetina en 100 mL de etanol. Se usó un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu para la lectura a 258 nm, en la cual según bibliografía se indica la existencia de quercetina.

2.5 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Para la fase móvil se preparó un diluyente que contenía: acetato de etilo, agua, ácido acético y ácido fórmico (100:26:11:11).

Debido a una pre-experimentación realizada la proporción del ácido y el agua se invirtió para disminuir la polaridad y ver el desprendimiento adecuado de los componentes. La nueva fase móvil fue agua, acetato de etilo, ácido acético y ácido fórmico (100:26:11:11)

El eluyente fue agregado a la cámara cromatográfica, dejándola 30 minutos en reposo para saturarla. Una vez que la cámara estuvo saturada, se procedió a colocar las placas individualmente dentro de esta teniendo en cuenta que el borde inferior de la placa estuviera sumergido 5 mm en el eluyente sin que éste tocara las muestras colocadas en las placas. La cromatografía se desarrolló dejando correr el eluyente 7 centímetros sobre las placas.

Una vez corridas, éstas se sacaron de la cámara y se colocaron en una estufa a una temperatura de 45 °C por 20 minutos para que estuvieran secas.

Luego, se procedió a realizar el revelado utilizando una lámpara con luz ultravioleta (254 nm-366 nm). Con el fin de visualizar las manchas sobre las placas, se revelaron con amoníaco dejándolas en una cámara por 5 minutos.

³⁸ CAMACHO, O.; MELGAREJO, S. Actividad antioxidante del extracto etanólico e hidroalcohólico y determinación química de los componentes mayoritarios del fruto de *Eugenia jambolana* (Uva venezolana). Tesis Pregrado Programa de Farmacia, Universidad del Atlántico, Atlántico-Colombia. 2009

3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

3.1 HIPÓTESIS

Dado que la extracción asistida por microondas aprovecha las propiedades fisicoquímicas de los disolventes, este método permitirá disminuir el tiempo de extracción y aumentar la recuperación de compuestos fenólicos de agraz de forma más eficaz y sostenible en relación al método de extracción por solventes (soxhlet).

A continuación se plantean las hipótesis alternas (H_1) para cada una de las variables respuesta, en este caso la concentración de antocianinas y de flavonoles.

3.1.1 Antocianinas.

- El método de extracción (por solventes o asistida por microondas) si afecta la concentración de antocianinas.
- El método de secado de la muestra (secado en el horno o liofilizada) si afecta la concentración de antocianinas.
- La interacción entre el método de extracción y el método de secado de la muestra si afecta la concentración de antocianinas.

3.1.2 Flavonoles.

- El método de extracción (por solventes o asistida por microondas) si afecta la concentración de flavonoles.
- El método de secado de la muestra (secada en el horno o liofilizada) si afecta la concentración de flavonoles.
- La interacción entre el método de extracción y el método de secado de la muestra si afecta la concentración de flavonoles.

3.2 ANÁLISIS EXPERIMENTALES

Los resultados obtenidos en cada uno de los procesos de extracción, se analizarán por medio del software Minitab Versión 17.3 (versión libre), aplicando el diseño factorial 2^2 para observar el efecto entre los métodos de extracción (extracción por solventes soxhlet y asistida por microondas), entre las temperaturas de secado de la muestra (al horno y liofilizado), y la correspondiente interacción entre estas variables, desarrollando tres réplicas.

Se tuvieron en cuenta estas variables debido a que la temperatura influye en el contenido de los antioxidantes para frutos similares, en esta investigación se quiere comprobar si tiene la misma influencia. Con respecto a los métodos de extracción se quiere evaluar con cuál de ellos se obtiene el extracto más rico en antocianinas y flavonoles, dado que el método por solventes soxhlet se ha venido utilizando en la extracción de antioxidantes, debido a que presenta características que permiten purificar, concentrar y separar la sustancia de interés además de ser más efectivo y económico. La extracción acompañada por microondas, es uno de los procedimientos más recientes en cuanto extracción de polifenoles, empezando a tener auge debido a sus cortos tiempos de extracción.

Las variables del proceso que se mantienen constantes, son la concentración del solvente y la potencia del microondas. Para finalmente cuantificar el contenido de antocianinas y flavonoles, siendo estas las variables respuesta.

3.2.1 Análisis experimental para antocianinas. A continuación, en la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos, tras la aplicación del diseño de experimentos, por los métodos de extracción y el secado de la materia prima. Teniendo en cuenta que el resultado se expresa en miligramo de cianidin-3-glucósido por 100 gramos de fruta.

Tabla 3. Concentración de antocianinas

	SECADO EN EL HORNO (mg/100g)	LIOFILIZADO (mg/100g)
SOXHLET	3751.2	3805.3
	3843.4	3701.1
	3879.5	3969.7
MICROONDAS	2841.5	3837.4
	2550.9	3723.2
	3106.0	3757.2

En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza reportado por Minitab, teniendo en cuenta las siguientes hipótesis:

- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto del método de extracción en la concentración de antocianinas.
- $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto del método de extracción en la concentración de antocianinas.

- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto del método de secado de la muestra en la concentración de antocianinas.
 $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto del método de secado de la muestra en la concentración de antocianinas.
- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto entre la interacción del método de extracción y el método de secado de la muestra en la concentración de antocianinas.
 $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto entre la interacción del método de extracción y el método de secado de la muestra en la concentración de antocianinas.

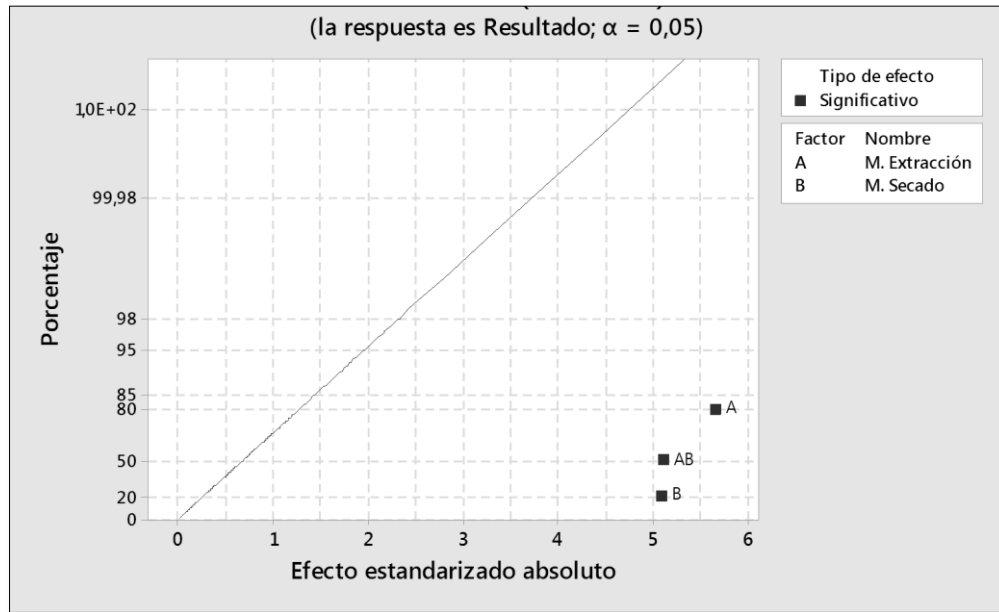
Tabla 4 Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	2138708	712903	27.97	0.000
Lineal	2	1472980	736490	28.90	0.000
M. extracción	1	813826	813826	31.93	0.000
M. Secado	1	659153	659153	25.86	0.001
Interacción M. extracción y M. secado	1	665728	665728	26.12	0.001
Error	8	203901	25488		
Total	11	2342609			

Teniendo en cuenta que se tiene un nivel de significancia (α) de 0.05, el valor de p se compara con este, y cuando p es menor que α se rechaza la hipótesis nula (H_0), esto significa que si hay efecto en el método de extracción y en el método de secado, incluso en la interacción entre ellos. El error, que representa la variación de los resultados de cada uno de los métodos, muestra que hay una ligera desviación entre ellos.

En la Gráfica 1 se muestra el efecto normal absoluto debido a que compara la magnitud y la significancia estadística de los efectos principales y de interacción del diseño factorial de dos niveles. La línea ajustada indica donde se esperaría que se situaran los puntos si los efectos fueran cero.

Gráfica 1. Efectos normales (absolutos) estandarizados

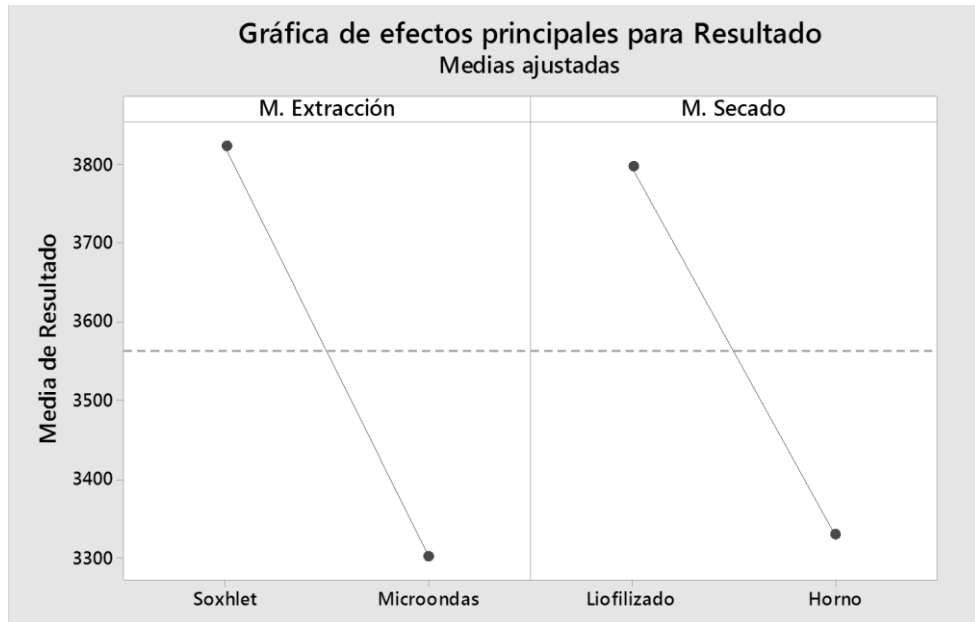


Fuente. Minitab 17.3 (versión libre)

Como se puede observar, la que mayor efecto genera en la concentración de antocianinas es el método de extracción (A), seguido de la interacción del método de extracción y el método de secado de la muestra (liofilizado y secado en el horno), (AB).

En la Gráfica 2 se relacionan los niveles variados con respecto al método de extracción y el de preparación de la muestra. Donde cada punto es el promedio del contenido de antocianinas según corresponda; como el objetivo del proyecto es evaluar el método de extracción que proporcione el mayor contenido de antocianinas, en esta gráfica no solo se indica que el método de extracción por solventes soxhlet es mejor, sino que también muestra que liofilizar la materia prima es la mejor opción para aplicar este método y extraer los compuestos de interés.

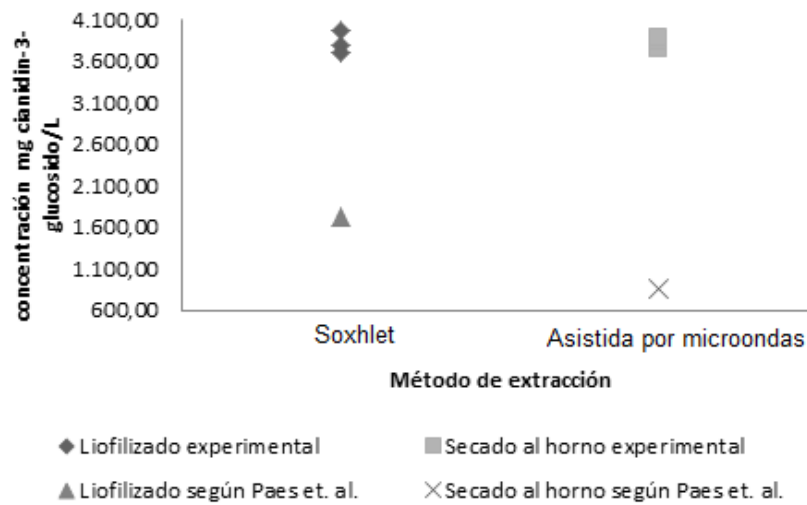
Gráfica 2. Efectos principales para la concentración de antocianinas



Fuente. Minitab 17.3 (versión libre)

A continuación se muestra en la Gráfica 3 la relación de las concentraciones obtenidas experimentalmente con respecto a las reportadas por Paes, et al.,³⁹ para los arándanos, indicando que el agraz tiene mayor cantidad de antocianinas.

Gráfica 3. Relación de la concentración de antocianinas para la extracción por solventes soxhlet.



³⁹ PAES, Juliana, et al. Op. cit., p. 7.

3.2.2 Análisis experimental para flavonoles. A continuación, en la Tabla 5, se presentan los resultados obtenidos, tras la aplicación del diseño de experimentos para los métodos de extracción y de secado de la materia prima. Teniendo en cuenta que el resultado se expresa en miligramo de quercetina por 100 gramos de fruta.

Tabla 5. Concentración de flavonoles

	SECADO EN EL HORNO (mg/100 g)	LIOFILIZADO (mg/100 g)
	348.3	650.5
SOXHLET	333.1	527.9
	338.2	555.3
	621.3	978.2
MICROONDAS	531.5	1170.7
	548.6	1175.8

En la Tabla 6 se muestra el análisis de la varianza, teniendo en cuenta las siguientes hipótesis:

- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto del método de extracción en la concentración de flavonoles.
 $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto del método de extracción en la concentración de flavonoles.
- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto del método de secado de la muestra en la concentración de flavonoles.
 $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto del método de secado de la muestra en la concentración de flavonoles.
- $H_0 \rightarrow \mu_A = \mu_B$ No hay efecto entre la interacción del método de extracción y el método de secado de la muestra en la concentración de flavonoles.
 $H_1 \rightarrow \mu_A \neq \mu_B$ Si hay efecto entre la interacción del método de extracción y el método de secado de la muestra en la concentración de flavonoles.

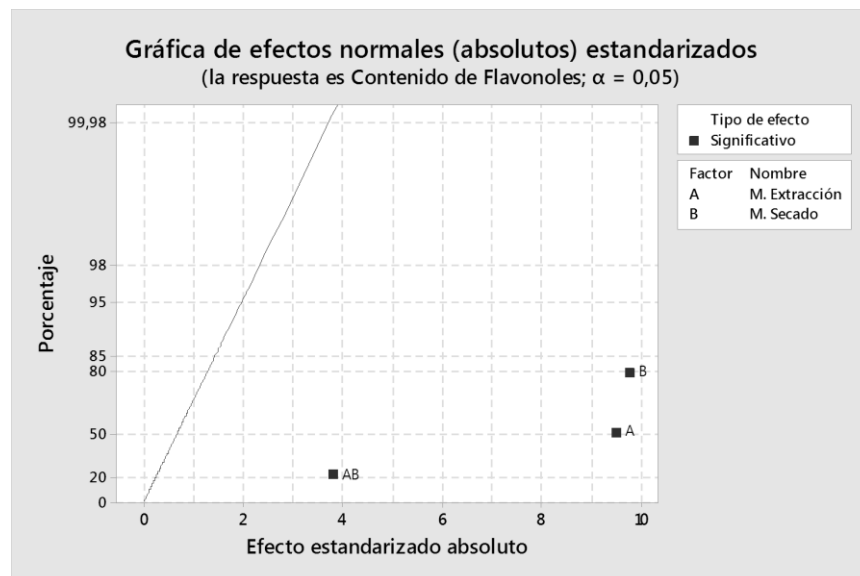
Tabla 6 Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	954643	318214	66.43	0.000
Lineal	2	885755	442877	92.45	0.000
M. extracción	1	430468	430468	89.86	0.000
M. Secado	1	455287	455287	95.04	0.000
Interacción M. extracción y M. secado	1	68887	68887	14.38	0.005
Error	8	38324	4791		
Total	11	992966			

Teniendo en cuenta que se tiene un nivel de significancia (α) de 0.05 el valor de p se compara con este, y cuando p es menor que alfa se rechaza la hipótesis nula, esto significa que si hay efecto en el método de extracción y en el método de secado, incluso en la interacción entre ellos. El error, que representa la variación de los resultados de cada uno de los métodos, muestra que hay una pequeña variación entre ellos.

En la Gráfica 4 se muestra el efecto principal entre las variables anteriormente propuestas y el resultado obtenido.

Gráfica 4. Efectos estandarizados

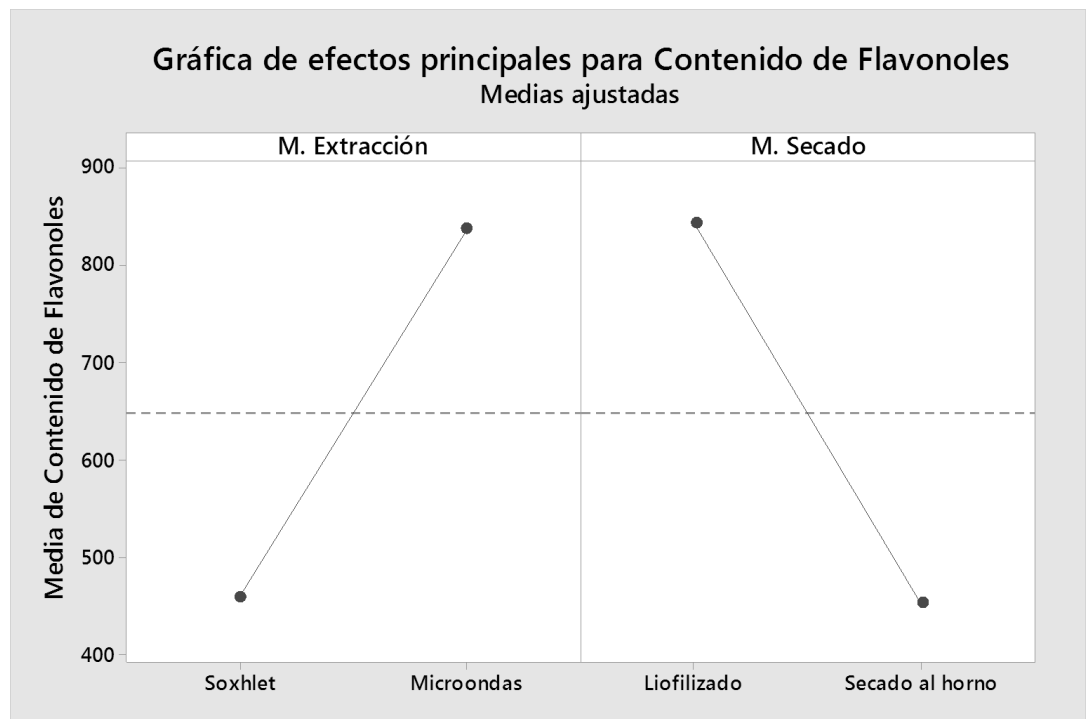


Fuente. Minitab 17.3 (versión libre)

El efecto del el tipo de secado (B), es el más significativo seguido del método de extracción (A), y finalmente el efecto de la interacción entre las variables (AB).

En la Gráfica 5 se relacionan los niveles variados con respecto al método de extracción y el de preparación de la muestra. Donde cada punto es el promedio del contenido de flavonoles según corresponda; como el objetivo del proyecto es evaluar el método de extracción que proporcione el mayor contenido de este tipo de antioxidantes, en esta gráfica no solo se muestra que el método de extracción asistida por microondas es mejor, sino que también se observa que liofilizar la materia prima es la mejor opción para aplicar este método y extraer los compuestos de interés.

Gráfica 5. Efectos principales para el contenido de flavonoles



Fuente. Minitab 17.3 (versión libre)

4. RESULTADOS

4.1 HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA

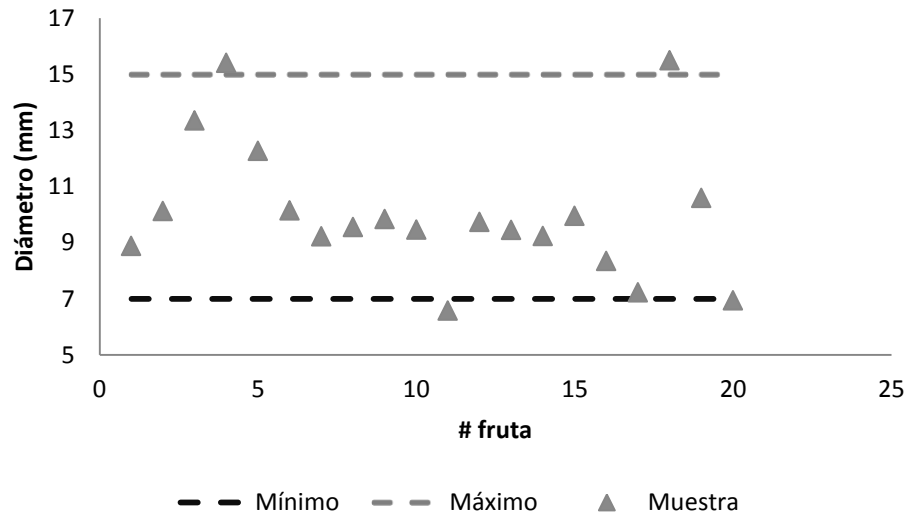
Para homogenizar la muestra, se seleccionaron los frutos que estuvieran en el rango de 7-15 mm de diámetro ecuatorial; además que su masa fresca estuviera entre 0.40 y 0.64 g. En la Tabla 7 se muestra una parte de los resultados obtenidos.

Tabla 7. Diámetros y peso del fruto fresco

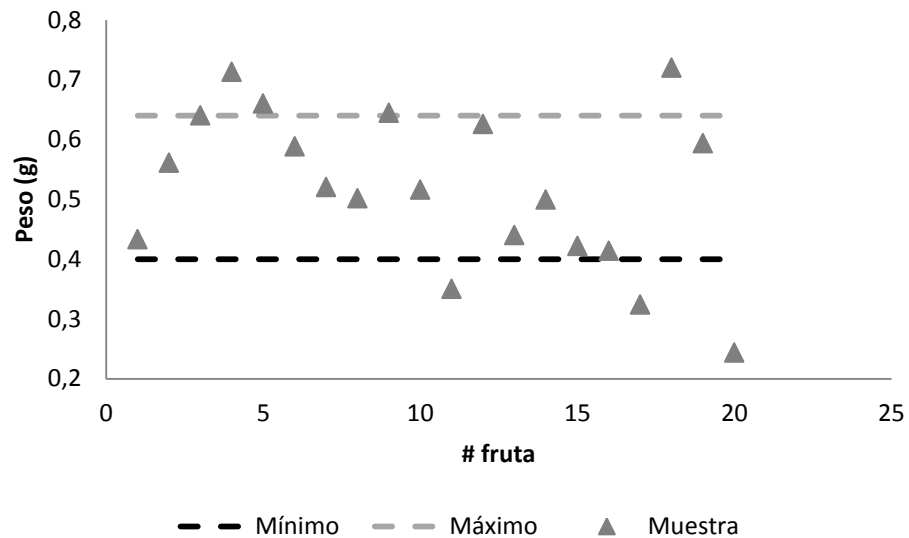
Fruto	Diámetros mm	Peso g
1	8.882	0.4328
2	10.120	0.5610
3	13.350	0.6400
4	15.400	0.7129
5	12.270	0.6600
6	10.150	0.5881
7	9.230	0.5201
8	9.550	0.5015
9	9.840	0.6445
10	9.470	0.5158
11	6.580	0.3500
12	9.740	0.6256
13	9.450	0.4399
14	9.240	0.4995
15	9.950	0.4215
16	8.350	0.4136
17	7.230	0.3239
18	15.500	0.7200
19	10.590	0.5937
20	6.950	0.2433

A continuación en las Gráficas 6 y 7, se presenta el diámetro y el peso de cada fruto, con los límites máximos y mínimos que debe presentar el producto previamente seleccionado, descartando aquellos que no cumplieren con las especificaciones dadas.

Gráfica 6. Comparación de los diámetros tomados de la fruta



Gráfica 7. Comparación del peso tomado de la fruta



Posteriormente, se midió el pH de una muestra macerada del fruto, obteniendo como resultado un pH de 3.7, por lo cual se acidifica con ácido cítrico para

disminuir su pH a 2.1. En la Ilustración 10 se muestra el resultado de la homogenización del agraz.

Ilustración 10. Muestra homogenizada



4.1.1 Prueba de colorimetría. Según Buitrago et al.,⁴⁰ la coloración que debe presentar el fruto en el último estado de maduración es el color morado oscuro, el cual se confirma mediante una prueba de colorimetría, con las coordenadas CieLab* ($L^*a^*b^*$), la cual se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Coordenadas CieLab*⁴¹

L*	a*	b*
20.83	4.02	1.14

Los resultados obtenidos tras realizar la prueba en la muestra de agraz se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la prueba colorimetría CieLab*

L*	a*	b*
19.15	2.29	-1.02

⁴⁰ BUITRAGO, Claudia; RINCÓN, Martha; BALAGUERA, Helber y LIGARRETO, Gustavo. Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). En: Revista Facultad Nacional de Agronomía {en línea} {15 de febrero de 2016} No. 1 (2013) Disponible en (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/47840>)

⁴¹ *Ibid.*, p. 7524.

4.1.2 Humedad de la muestra. Para saber el tiempo de secado de la muestra se debe tener una humedad por debajo del 15%, cuidando que la temperatura no exceda el punto de ebullición, debido a que esto generaría una descomposición de los antioxidantes.

4.1.2.1 Muestra secada en el horno. Para el secado de la materia prima se debe considerar la humedad de la muestra antes y después del secado. Para este proceso se toma el peso durante cada hora hasta completar el tiempo establecido de 24 horas, con una temperatura de 40 °C⁴². En la Tabla 10 se muestran los datos obtenidos.

Tabla 10. Peso de la muestra durante el secado en el horno

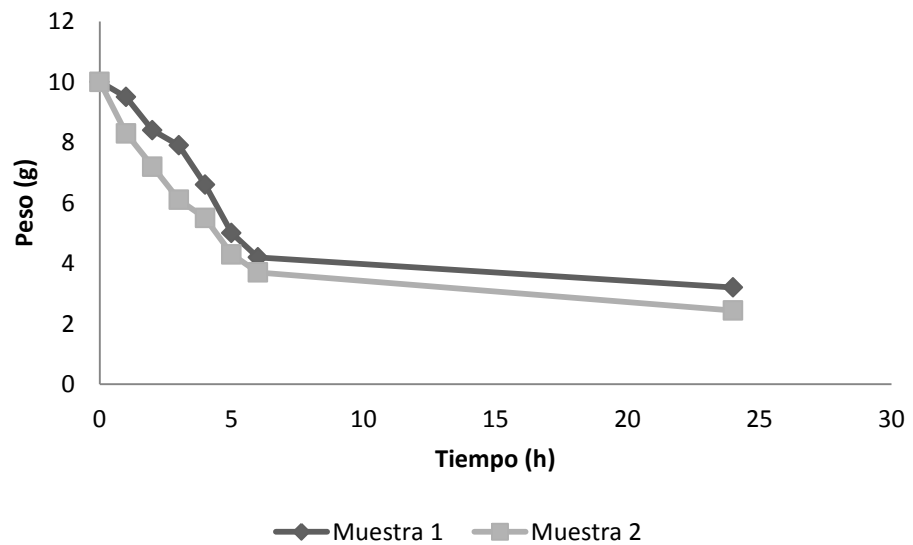
Tiempo (h)	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
0	10	10
1	9.5	8.3
2	8.4	7.2
3	7.9	6.1
4	6.6	5.5
5	5	4.3
6	3.2	3.7
23	2.443	24.429
24	19.407	16.103

Para determinar la humedad final se aplica una relación de unidades entre la humedad, el tiempo y el peso iniciales, con respecto a la humedad correspondiente al tiempo y peso finales. Obteniendo una humedad final del 14.56%, teniendo en cuenta que la humedad inicial en base húmeda del agraz es del 84.2%⁴³. Con la tabla anteriormente mostrada, se realizó una curva del peso total para cada muestra y de esta manera observar el comportamiento en el proceso de secado, esto se muestra en la Gráfica 8.

⁴² CASTAGNINI, Juan Manuel. Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío. Tesis doctoral en ingeniería de alimentos. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia. 2014. p. vii.

⁴³ ÁVILA, Hernán; et al. Op. cit., 4181.

Gráfica 8. Gráfica de la relación de la humedad



La Ilustración 11 muestra una comparación de las características físicas del cambio de diámetro, la masa y el brillo del fruto antes y después del proceso de secado de la muestra. Teniendo en cuenta que inicialmente se tenían 750 g de fruto y posterior al secado y triturado se obtiene una masa seca de 130.064 g.

Ilustración 11 Muestra de agraz antes y después del secado en el horno



4.1.2.2 Muestra liofilizada. Para la muestra liofilizada, en la Ilustración 12 se observa que no hubo cambio en las características organolépticas del fruto tras realizado el procedimiento, como es el olor y el aspecto físico, ya que se mantuvieron intactos el color y brillo. Se tiene una masa inicial de 600 g, después de liofilizar el peso resultantes es de 95.6216 g. En comparación con la muestra previamente secada se observa que el porcentaje de humedad es de 13.39%. El tiempo de este proceso es de 24⁴⁴ a 48⁴⁵ horas en La determinación de la humedad se realizó de la misma forma que el secado en el horno, aunque no fue posible registrar el peso de la muestra a cada hora, sin embargo se elimina el agua presente en la fruta y su peso disminuye, de esta forma se determinó su humedad.

Ilustración 12. Muestra de agraz antes y después de la liofilización



4.2 EXTRACCIÓN POR SOLVENTES SOXHLET

A continuación se muestran las cuantificaciones de antocianinas y flavonoles en cada una de las extracciones realizadas.

4.2.1 Cuantificación de antocianinas. El contenido de antocianinas esta expresado en miligramos de cianidin-3-glucósido por 100 g de fruto:

Ecuación 1. Antocianinas Monoméricas

$$\text{Antocianinas Monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{A * PM * FD * 100}{\epsilon * 1}$$

⁴⁴ HERAS Irina, ALVIS Armando y ARRAZOLA Guillermo. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera L.*). Universidad de Córdoba. 2013.

⁴⁵ PAES, Juliana, et al. Op. cit., p. 2.

Donde

A = Absorbancia

PM = Peso molecular sustancia de referencia

FD = Factor de dilución

ε = Coeficiente de extinción molar

Ecuación 2. Absorbancia

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH=1} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH=4.5}$$

Donde

$A_{\lambda_{max}}$ = Absorbancia máxima

A_{700} = Absorbancia a 700 nm

Ecuación 3. Antocianinas Totales

$$\text{Antocianinas total} \left(\frac{mg}{100 g} \right) = \frac{A' * PM * FD * 1000}{\varepsilon * 1}$$

Ecuación 4. Absorbancia (A')

$$A' = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH=1}$$

Para la lectura de las antocianinas se diluyó el extracto tanto de la muestra secada previamente en el horno, como para la muestra liofilizada en los buffer.

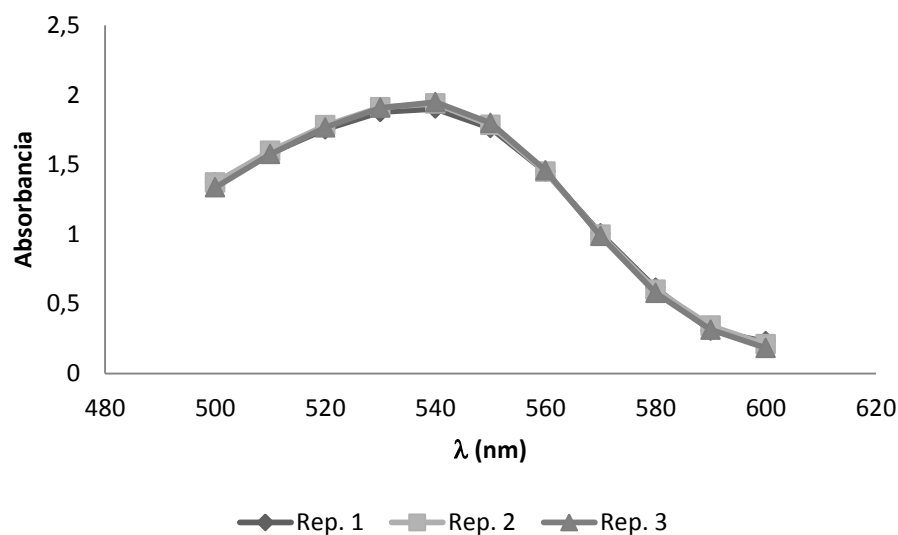
En la Tabla 11, se muestran los resultados obtenidos tras realizar la lectura de la absorbancia, tanto para pH 1.0 como para pH 4.5, para la muestra previamente secada en el horno de las tres repeticiones realizadas.

Tabla 11. Lectura de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente secadas en el horno.

λ (nm)	Absorbancia Rep. 1.		Absorbancia Rep. 2		Absorbancia Rep. 3	
	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5
500	1.369	0.509	1.369	0.72	1.335	0.776
510	1.579	0.615	1.596	0.788	1.573	0.862
520	1.752	0.704	1.780	0.846	1.765	0.932
530	1.876	0.772	1.910	0.889	1.907	0.985
540	1.900	0.858	1.936	0.895	1.947	0.997
550	1.761	0.719	1.783	0.838	1.797	0.939
560	1.447	0.551	1.447	0.736	1.457	0.81
570	1.004	0.293	0.994	0.601	0.985	0.649
580	0.613	0.084	0.601	0.476	0.577	0.501
590	0.306	0.91	0.342	0.374	0.313	0.388
600	0.229	0.776	0.209	0.299	0.182	0.305
700	0.028	0.030	0.018	0.039	0.011	0.024

Según lo anterior, la lectura máxima se ve a los 540 nm y en la Gráfica 9, se muestra la absorbancia máxima de cada una de las repeticiones.

Gráfica 9. Relación de la máxima absorbancia con la longitud de onda



A continuación se presenta una muestra de los cálculos para determinar el contenido de antocianinas monoméricas y totales de extracto obtenido

$$A = (1.900 - 0.028)_{pH=1} - (0.858 - 0.030)_{pH=4.5}$$

$$A = 1.044$$

$$\text{Antocianinas Monoméricas} \left(\frac{mg}{100 g} \right) = \frac{2 * 449.2 g/mol * 120 * 1000}{26900 * 1}$$

$$\text{Antocianinas Monoméricas} = 2092.0 \frac{mg \text{ cianidin} - 3 - \text{glucósido}}{100 g \text{ fruta fresca}}$$

Para conocer el contenido de antocianinas totales se aplica la ecuación 3 y 4, como se muestra en la Tabla 12, teniendo en cuenta que el resultado de antocianinas monoméricas y totales esta expresado como miligramo de cianidin-3-glucósido por 100 g de fruta.

$$A' = (1.900 - 0.028)_{pH=1}$$

$$A' = 1.872$$

$$\text{Antocianinas total} \left(\frac{mg}{100 g} \right) = \frac{1.872 * 449.2 * 120 * 1000}{26900 * 1}$$

$$\text{Antocianinas total} = 3751.2 \frac{mg \text{ cianidin} - 3 - \text{glucósido}}{100 g \text{ fruta fresca}}$$

Tabla 12. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras secadas en el horno

Repetición	Contenido de antocianinas monoméricas (mg/100g)	Contenido antocianinas totales (mg/100g)
Repetición 1	2092.0	3751.2
Repetición 2	2128.1	3843.4
Repetición 3	1929.7	3879.5

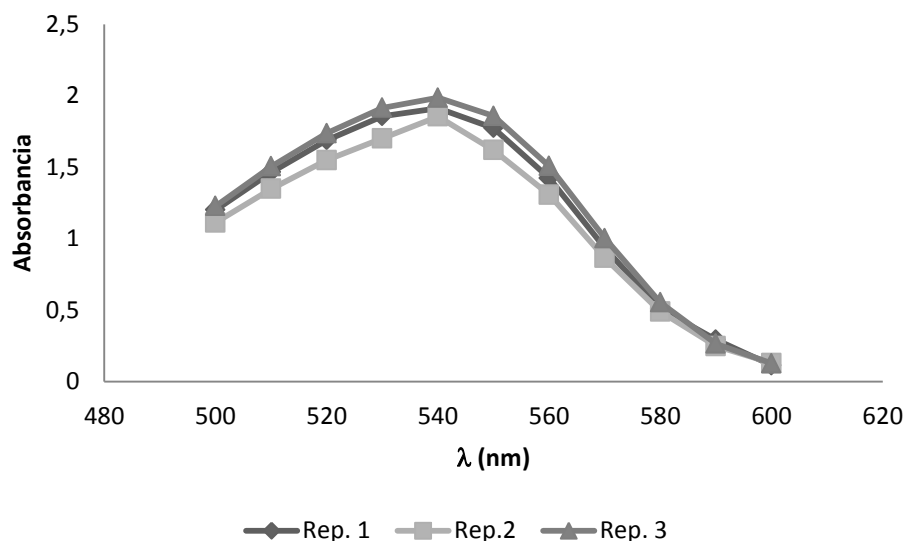
Se aplica el mismo procedimiento para la muestra previamente liofilizada, en la Tabla 13 se exponen las absorbancias leídas.

Tabla 13. Lectura de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente liofilizadas

λ (nm)	Absorbancia Rep. 1		Absorbancia Rep. 2		Absorbancia Rep. 3	
	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5
500	1.201	0.611	1.113	0.944	1.228	1.042
510	1.465	0.704	1.349	1.072	1.506	1.203
520	1.689	0.779	1.549	1.178	1.737	1.334
530	1.857	0.844	1.702	1.257	1.915	1.446
540	1.912	0.955	1.855	1.272	1.986	1.475
550	1.774	0.815	1.620	1.183	1.858	1.387
560	1.424	0.713	1.307	1.012	1.508	1.189
570	0.935	0.574	0.865	0.791	1.003	0.930
580	0.511	0.439	0.491	0.602	0.554	0.686
590	0.293	0.329	0.249	0.451	0.266	0.506
600	0.114	0.252	0.130	0.342	0.128	0.381
700	0.013	0.009	0.008	0.038	0.005	0.033

Según lo anterior, la lectura máxima se ve a los 540 nm, en la Gráfica 10 se muestra la relación de cada una de las repeticiones con respecto a la absorbancia máxima.

Gráfica 10. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda



Se aplica la ecuación 3 y 4 nombradas anteriormente para conocer el contenido de antocianinas totales, los resultados se muestran en la Tabla 14. Teniendo en cuenta que el valor obtenido de antocianinas monoméricas y totales esta expresado como miligramo de cianidin-3-glucósido por 100 gramos de fruta.

Tabla 14. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras liofilizadas

Repeticición	Contenido de antocianinas monoméricas (mg/100g)	Contenido antocianinas totales (mg/100g)
Repeticición 1	1909.7	3805.3
Repeticición 2	1228.3	3701.1
Repeticición 3	1080.1	3969.7

Los resultados obtenidos a partir de la extracción soxhlet se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Contenido de antocianinas

Muestra	Contenido de antocianinas (mg/100g)
Secada en el horno	3879.5 ± 54
Liofilizada	3969.7 ± 110.5

4.2.2 Cuantificación de flavonoles. Para la cuantificación de los flavonoles, según lo propuesto por Venegas⁴⁶, se aplica la siguiente ecuación y el resultado se expresa como contenido de quercetina.

Ecuación 5. Flavonoles totales

$$FI = \frac{A_m * P_r * FD}{A_r}$$

Dónde:

A_m = Absorbancia de la muestra

P_r = Peso de la sustancia de referencia

FD = Factor de dilución

A_r = Absorbancia de referencia

Las absorbancias obtenidas se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Absorbancia a 258 nm de las muestras

Muestra	Repeticiones	Absorbancia
Secada en el horno	1	0.892
	2	0.853
	3	0.866
Liofilizada	1	1.666
	2	1.352
	3	1.422

Aplicando la ecuación 5, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 17, teniendo en cuenta que el contenido de flavonoles esta expresado en miligramo de quercetina:

$$FI = \frac{0.892 * 302.236 \text{ g} * 5}{3.87}$$

⁴⁶ VENEGAS, Edmundo. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. En: Revista UCV – Scientia [en línea]. Vol. 4 No. 2 (2012)
file:///D:/Trabajo%20de%20Grado/Articulos/Cuantificacion%20De%20Flavonoides%20Totales%20258nm.pdf [citado el 16 de marzo de 2016]

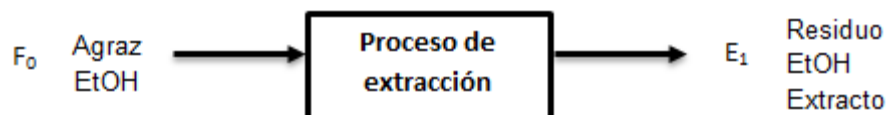
$$FI = 348.3 \text{ mg de } \frac{\text{quercetina}}{100 \text{ g de fruta}}$$

Tabla 17. Contenido de flavonoles

Muestra	Repeticiones	Contenido de flavonoles (mg quercetina/100 g fruta)
Secada en el horno	1	348.3
	2	333.1
	3	338.2
Liofilizada	1	650.5
	2	527.9
	3	555.3

4.2.3 Balance de masa global. A continuación en la Ilustración 13 se muestra el diagrama global del proceso de extracción, los cálculos del balance de masa, son para el sistema global, es decir no se tienen en cuenta las recirculaciones durante el proceso.

Ilustración 13. Diagrama de flujo global



Ecuación 6. Balance de masa global

$$ENTRADA = SALIDA$$

$$m_{\text{agraz}} * \%H + m_{\text{EtOH}} = m_{R(\text{agraz}+\text{EtOH})} + m_{\text{extrato}} + m_{\text{EtOH recup}}$$

$$\rho_{\text{EtOH}} = 0,8106 \text{ g/ml}$$

$$10 \text{ g} * 0.146 + 150 \text{ mL} * 0.8106 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 3.5326 + 10.2848 + 130 \text{ mL} * 0.8106 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

$$123.05 \text{ g} \cong 119.20 \text{ g}$$

Para las demás réplicas se siguió el mismo procedimiento, los resultados son presentados a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados del balance de masa global

	RÉPLICAS	BALANCE (g)
SECADO EN EL HORNO	1	119.20
	2	122.16
	3	120.45
LIOFILIZADO	1	121.53
	2	122.85
	3	122.32

4.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la extracción asistida por microondas, seguida de las cuantificaciones de antocianinas y flavonoles en cada una de las extracciones realizadas según la preparación de la materia prima.

4.3.1 Cuantificación de antocianinas. Para la cuantificación de antocianinas se usó el método de pH diferencial, aplicando las ecuaciones 1 a 4.

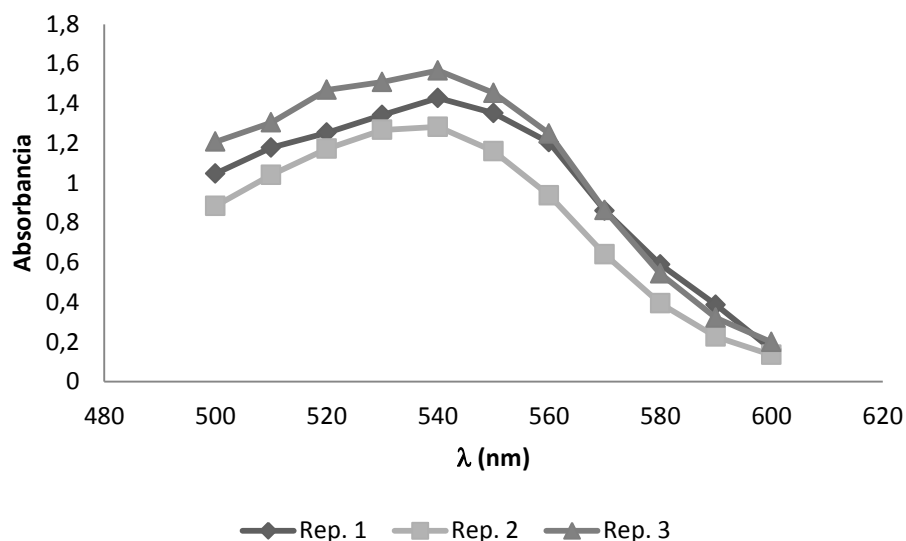
En la Tabla 19, se muestran los resultados obtenidos tras realizar la lectura de la absorbancia, tanto para pH 1.0 como para pH 4.5. Para la muestra previamente secada en el horno de las tres repeticiones realizadas:

Tabla 19. Lecturas de las absorbancias a un pH 1 y pH 4.5 previamente secada en el horno.

λ (nm)	Absorbancia Rep. 1		Absorbancia Rep. 2		Absorbancia Rep. 3	
	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5
490	0.225	0.325	0.747	0.225	1.019	0.417
500	1.048	0.337	0.885	0.237	1.208	0.443
510	1.178	0.443	1.041	0.253	1.305	0.474
520	1.253	0.486	1.173	0.268	1.469	0.504
530	1.343	0.536	1.268	0.278	1.509	0.522
540	1.428	0.618	1.283	0.286	1.567	0.624
550	1.352	0.514	1.161	0.273	1.454	0.496
560	1.205	0.447	0.938	0.247	1.249	0.445
570	0.861	0.359	0.641	0.209	0.863	0.376
580	0.590	0.247	0.394	0.174	0.544	0.306
590	0.387	0.162	0.227	0.142	0.322	0.246
600	0.162	0.102	0.135	0.112	0.199	0.201
700	0.010	0.024	0.010	0.008	0.017	0.02

Según lo anterior, la lectura máxima se ve a los 540 nm, en la Gráfica 11 se muestra la relación de la absorbancia máxima de cada una de las repeticiones con respecto a las longitudes de onda.

Gráfica 11. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda



Para conocer el contenido de las antocianinas totales se aplica la ecuación 3 y 4. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20, teniendo en cuenta que el resultado del contenido de las antocianinas monoméricas y las totales se expresa en miligramo de cianidin-3-glucósido por 100 gramos de fruta.

Tabla 20. Contenido de antocianinas totales y monoméricas de las muestras secadas en el horno

Repetición	Contenido de antocianinas monoméricas (mg/100g)	Contenido antocianinas totales (mg/100g)
Repetición 1	1651.2	2841.5
Repetición 2	1993.9	2550.9
Repetición 3	1895.7	3106.0

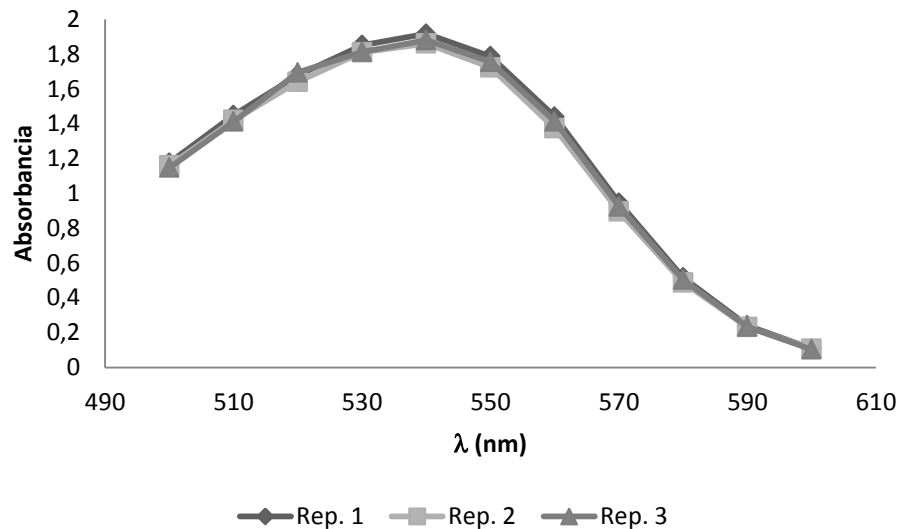
Se aplica el mismo procedimiento para la muestra previamente liofilizada, en la Tabla 21, se exponen las absorbancias leídas.

Tabla 21. Lectura de las absorbancias pH 1 y pH 4.5, de las muestras previamente liofilizadas

λ (nm)	Absorbancia Rep. 1		Absorbancia Rep. 2		Absorbancia Rep. 3	
	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5	pH:1.0	pH: 4.5
500	1.175	1.103	1.160	0.953	1.147	0.849
510	1.449	1.201	1.421	1.132	1.411	0.994
520	1.678	1.291	1.640	1.170	1.694	1.123
530	1.851	1.359	1.809	1.249	1.812	1.229
540	1.916	1.372	1.860	1.314	1.879	1.325
550	1.786	1.309	1.723	1.329	1.754	1.183
560	1.44	1.183	1.373	1.130	1.412	1.010
570	0.945	0.522	0.895	0.855	0.923	0.785
580	0.516	0.383	0.488	0.622	0.503	0.576
590	0.241	0.273	0.231	0.439	0.233	0.408
600	0.107	0.203	0.107	0.323	0.103	0.303
700	0.001	0.009	0.002	0.010	0.004	0.018

Según lo anterior, la lectura máxima se ve a los 540 nm. En la Gráfica 12 da una de las réplicas.

Gráfica 12. Relación de la absorbancia máxima con la longitud de onda



Para conocer el contenido de antocianinas totales se aplica la ecuación 3 y 4, mostrando los resultados en la Tabla 22, teniendo en cuenta que el resultado del contenido de antocianinas monoméricas y totales se expresa en miligramo de cianidin-3-glucósido por 100 gramos de fruta.

Tabla 22 Contenido de antocianinas monoméricas y totales de las muestras liofilizadas

Repetición	Contenido de antocianinas monoméricas (mg/100g)	Contenido antocianinas totales (mg/100g)
Repetición 1	1106.1	3837.4
Repetición 2	1110.1	3723.2
Repetición 3	1138.2	3757.3

Los resultados obtenidos a partir de la extracción asistida por microondas se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Contenido de antocianinas

Muestra	Contenido de antocianinas (mg/100g)
Secada en el horno	3106.0 ± 285
Liofilizada	3837.4 ± 47.9

4.3.2 Cuantificación de flavonoles. En la Tabla 24, se muestra las absorbancias obtenidas.

Tabla 24. Absorbancia a 258 nm de las muestras

Muestra	Repeticiones	Absorbancia
Secada en el horno	1	1.591
	2	1.361
	3	1.405
Liofilizada	1	2.505
	2	2.998
	3	3.011

Aplicando la ecuación 5, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 25, teniendo en cuenta que el contenido de flavonoles esta expresado en miligramo de quercetina:

$$FI = \frac{1.591 * 302.236 \text{ g} * 5}{3.87}$$

$$FI = 621.3 \text{ mg de } \frac{\text{quercetina}}{100 \text{ g de fruta}}$$

Tabla 25. Contenido de flavonoles

Muestra	Repeticiones	Contenido de flavonoles (mg quercetina/100 g fruta)
Secada en el horno	1	621.3
	2	531.5
	3	548.6
Liofilizada	1	978.2
	2	1170.7
	3	1175.8

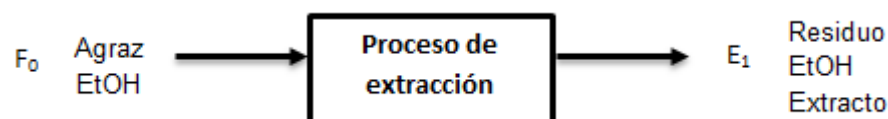
A continuación en la Tabla 26, se muestra la mejor concentración de antocianinas y flavonoles según el proceso de secado previo y el método de extracción utilizado.

Tabla 26. Resumen de resultados obtenidos del contenido de antocianinas y flavonoles

	Método de extracción y secado	Cantidad	Unidades
Antocianinas	Soxhlet/ liofilizado	3969.7 ± 110.5	mg de cianidin-3-glucósido/100 g
	Microondas/liofilizado	3837.4 ± 47.9	
Flavonoles	Soxhlet/ liofilizado	650.5 ± 52.5	mg de quercetina
	Microondas/liofilizado	1175.8 ± 92	

4.3.3 Balance de masa global. En la Ilustración 14 se muestra el diagrama global del proceso de extracción, para los cálculos del balance de masa se aplica la ecuación 6, para el sistema global, teniendo en cuenta que no se toman las recirculaciones llevadas a cabo en el proceso.

Ilustración 14. Diagrama de flujo del balance de masa global



ENTRADA = SALIDA

$$m_{\text{agraz}} * \%H + m_{\text{EtOH}} = m_{R(\text{agraz}+\text{EtOH})} + m_{\text{extracto}} + m_{\text{EtOH recup}}$$

$$\rho_{\text{EtOH}} = 0,8106 \text{ g/ml}$$

$$10 \text{ g} * 0.135 + 150 \text{ mL} * 0.8106 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 9.4866 + 18.6874 + 114 \text{ mL} * 0.8106 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

$$122.94 \text{ g} \cong 120.58 \text{ g}$$

Para las demás réplicas se siguió el mismo procedimiento, los resultados son presentados a continuación en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados del balance de masa global

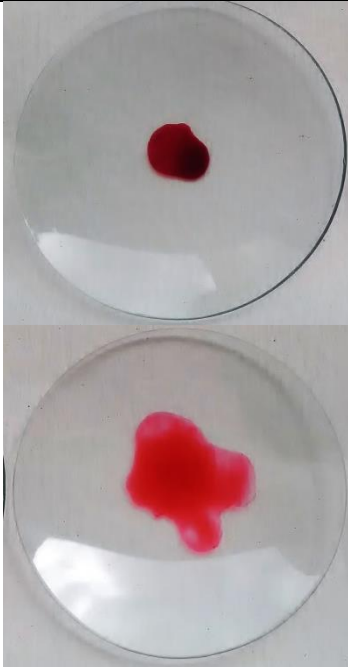
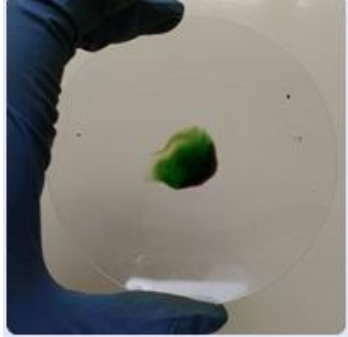
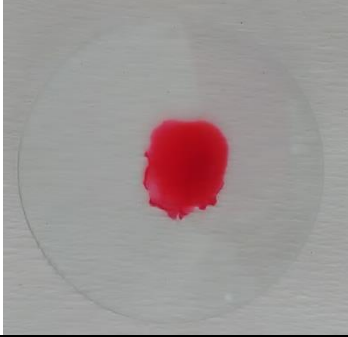
RÉPLICAS BALANCE (g)		
SECADO EN EL HORNO	1	120.58
	2	121.16
	3	122.89
LIOFILIZADO	1	121.50
	2	120.87
	3	121.89

4.4 TITULACIÓN DE LA MUESTRA

Aplicando los respectivos ensayos de Ácido-base y Shinoda, las coloraciones presentadas en los extractos obtenidos en los procesos de separación por solventes soxhlet y asistida por microondas, tanto secados en el horno, como

previamente liofilizados, dieron positivas en la presencia de antocianinas, coloración cereza en pH ácido y color verde o azul para pH alcalino, y para flavonoles, color cereza, como se muestra en la Tabla 28.

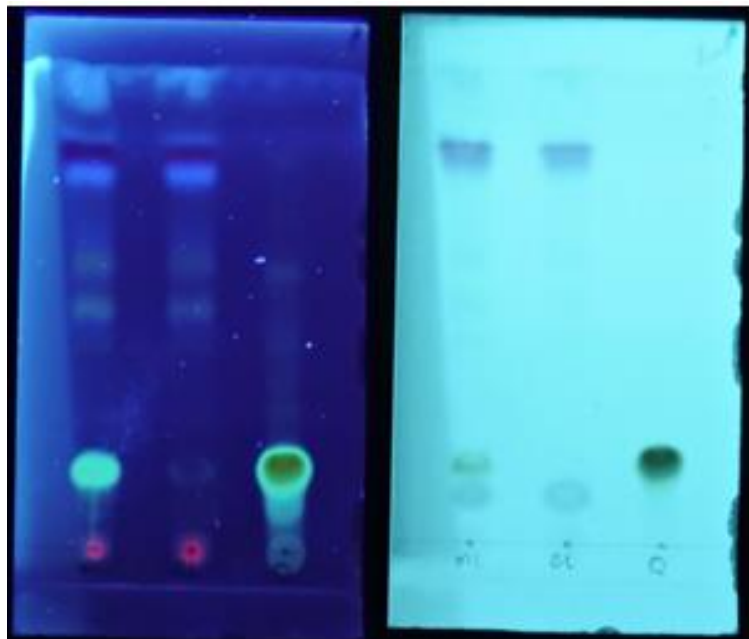
Tabla 28. Titulación de antocianinas y flavonoles

	Ensayo	Imagen
Extracto	Ensayo ácido	
Antocianinas	Ensayo base	
Flavonoles	Ensayo Shinoda	

4.5 CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA

Los resultados de la corrida de las placas sembradas, se muestra a continuación en la Ilustración 15 de izquierda a derecha se tiene el extracto de microondas liofilizado, seguido del extracto obtenido por solventes soxhlet con la muestra previamente liofilizada y un patrón de quercetina.

Ilustración 15. Espectro de cromatografía de capa delgada UV/Visible



Se realizó la identificación y la caracterización de las placas, teniendo en cuenta que el valor R_f , es diferente para cada sustancia, expresado como:

Ecuación 7. R_f

$$R_f = \frac{D_m}{D_f}$$

Se determinó el R_f en los extractos de microondas liofilizado y soxhlet liofilizado, dando como resultado lo mostrado en la Tabla 29.

Tabla 29. R_f obtenidos por cromatografía de capa delgada

DF	6.9 cm	1		2		3		4	
		DM (cm)	R _f	DM (cm)	R _f	DM (cm)	R _f	DM (cm)	R _f
Microondas liofilizado	Repetición 1	1.2	0.17	3.4	0.49	5.3	0.77	5.61	0.81
	Repetición 2	1.22	0.18	3.4	0.49	5.2	0.75	5.6	0.81
Soxhlet liofilizado	Repetición 1	1.1	0.16	3.35	0.49	5.26	0.76	5.63	0.82
	Repetición 2	1.15	0.17	3.4	0.49	5.3	0.77	5.62	0.81
Quercetina	Repetición 1	1.25	0.18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Repetición 2	1.3	0.19	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Debido a que no se tiene un patrón de cianidina, el R_f obtenido se relaciona con el reportado por Bonilla⁴⁷, R_f = 0.54 que corresponde al pigmento antociano cianidina (Harborne 1967). En este caso el más cercano es de 0.49, hay que tener en cuenta que el valor del R_f varía debido a que la fase móvil cambia.

4.6 CÁLCULO DE RENDIMIENTOS

A continuación se muestran los cálculos de rendimiento de las antocianinas obtenidas.

4.6.1 Rendimiento antocianinas

Ecuación 8. Rendimiento antocianinas

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{E_{1\text{Antocinas}}}{F_0} * 100$$

Dónde:

$E_{1\text{Antocinas}}$ = Flujo de salida del proceso de extracción de antocianinas

F_0 = Flujo de entrada en el proceso de extracción

⁴⁷ BONILLA. Op. cit., p. 67.

A continuación en la Tabla 30, se determinan los rendimientos de los extractos por cada uno de los métodos (extracción por solventes soxhlet y asistida por microondas) y por cada uno de los métodos de secado (secado en el horno y liofilizado) por cada una de las réplicas.

Repetición 1:

$$3751.2 \text{ mg} \rightarrow 3.7512 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.7512 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 37.512\%$$

Tabla 30. Rendimiento del contenido de antocianinas

Método de extracción	Método de secado	Repetición	Rendimiento (%)
Por solventes soxhlet	Secado en el horno	1	37.512
		2	38.434
		3	39.795
	Liofilizado	1	38.053
		2	37.011
		3	39.697
Asistida por microondas	Secado en el horno	1	28.415
		2	25.551
		3	31.060
	Liofilizado	1	38.837
		2	37.232
		3	37.573

4.6.2 Rendimiento flavonoles

Ecuación 9. Rendimiento Flavonoles

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{E_{1\text{Flavonoles}}}{F_0} * 100$$

Dónde:

$E_{1\text{Flavonoles}}$ = Flujo de salida del proceso de extracción de flavonoles

F_0 = Flujo de entrada en el proceso de extracción

A continuación en la Tabla 31, se determinan los rendimientos de los extractos por cada uno de los métodos (extracción por solventes soxhlet y asistida por microondas) y por cada uno de los métodos de secado (secado en el horno y liofilizado) por cada una de las réplicas.

Repetición 1:

$$348.3 \text{ mg} \rightarrow 0.3483 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.3483}{10 \text{ g}} * 100 = 3.483\%$$

Tabla 31. Rendimiento del contenido de flavonoles

Método de extracción	Método de secado	Repetición	Rendimiento (%)
Por solventes soxhlet	Secado en el horno	1	3.483
		2	3.310
		3	3.382
	Liofilizado	1	6.502
		2	5.279
		3	5.553
Asistida por microondas	Secado en el horno	1	6.213
		2	5.315
		3	5.486
	Liofilizado	1	9.782
		2	11.707
		3	11.758

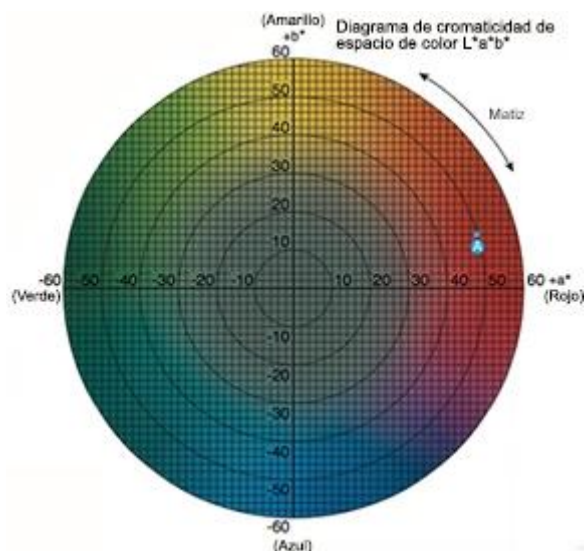
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El agraz tiene características físicas específicas en su estado de maduración apropiado para la extracción de la mayor cantidad de antocianinas y flavonoles, que consisten en que el fruto tenga un color morado oscuro, un tamaño de 7-15 mm, una masa fresca de 0.40 a 0.64 g, forma redonda de apariencia brillante, que no se encuentren con rajaduras ni rupturas de la epidermis. Estas características, permiten tener una materia prima libre de frutos que no fueran apropiados para la extracción y presentaran por ejemplo una coloración más rojiza o verde, así como que en su piel se presenten defectos como fisuras o magulladuras que afecten la calidad del extracto; en la Figura 4 y 5 se muestran los límites máximos y mínimos permitidos para el diámetro ecuatorial y para el peso en masa fresca respectivamente. Cabe aclarar como que la mayoría de los frutos se encontraban dentro de estos límites establecidos.

Para establecer que su estado de maduración correspondiera a la coloración morado oscuro casi negro se realizó una prueba de colorimetría mostrada en la Tabla 9 estos datos comparados con lo propuesto por Buitrago et, al. (Tabla 8), ya que como se menciona en este artículo el fruto se encontraba en su estado de maduración más avanzado beneficiando de esta manera el rendimiento de la extracción así como la cantidad de antioxidantes.

Estableciendo que L^* es luminosidad y a^* y b^* son coordenadas cromáticas, específicamente en la coordenada a^* (+ a^* significa rojo y $-a^*$ significa verde) y en la coordenada b^* (+ b^* significa amarillo y $-b^*$ significa azul), el colorímetro identifica de manera rápida estas propiedades de coloración, determinando el color del objeto dentro del espacio de color modelado por CIELAB. En la Ilustración 16 se presenta el diagrama de cromaticidad de espacio de color $L^*a^*b^*$, en el cual se pueden ajustar los valores obtenidos en la colorimetría, dando como resultado que con disminución de L^* la fruta es más opaca, con valor de a^* hay disminución en la tonalidad rojiza y con el valor de b^* mayor tonalidad azul, por lo que dichos valores de a^* y b^* tienden a ubicarse en el centro, que pertenece a tonos grises, estado en el cual predomina el color morado oscuro con predisposición al color negro.

Ilustración 16. Cromaticidad de espacio de color CIELAB



Fuente. Konica Minolta

Hay que tener en cuenta que la coloración del fruto y el extracto influyen en el contenido de antocianinas obtenido, puesto que entre más oscura este la materia prima, más antocianinas hay presentes, debido a que estas son las encargadas de darle el pigmento al fruto.

El pH, es un factor muy importante, “ya que la disminución del contenido total de antocianinas se manifiesta con el incremento del pH, debido a la degradación del catión flavilio, ya que éste es deficiente en electrones, y por lo tanto, muy reactivo, dando lugar a formación de hemiacetal y chalcona, ambas inestables”⁴⁸. Además de retardar la rápida oxidación del fruto.

Otra variable importante y a tener en cuenta es el tiempo de secado de la muestra, como se dijo anteriormente la humedad del agraz es del 84.2%, y que para que se considere una muestra seca, su humedad debe estar por debajo del 15%, esto permite una sencilla extracción de los compuestos de interés, debido a que la temperatura genera una ruptura en las moléculas de la fruta. Las frutas secas, generalmente tienen una capacidad antioxidante significativamente mayor, cuando se compara con frutas frescas. Esto se debe al efecto de concentración que ocurre durante el secado por lo tanto se determinó la humedad, teniendo la temperatura constante, y con esto el tiempo resultante de secado de la muestra es de 24 horas. Para lo anterior, sabiendo que el peso de la fruta disminuye con respecto al tiempo al ser sometida a una temperatura de 40 °C que favorece la solubilidad de los antocianos y el coeficiente de difusión; hay que tener en cuenta que por

⁴⁸ ZAPATA. Op. cit., p. ii.

encima de esa temperatura, las antocianinas extraídas se degradan, posiblemente debido a que el efecto del calor produce la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y por consiguiente la apertura del anillo, produciendo chalconas incoloras.

Las antocianinas son moléculas polares y por consiguiente son más solubles en solventes polares que en los no polares; al igual que los flavonoles, que también se extraen con solventes polares, pues poseen un gran número de grupos hidroxilos que forman glicósidos, por tal motivo se usó como único solvente etanol, debido a su alta polaridad y que no es tóxico a comparación del metanol.

A valores de pH donde las moléculas de antocianinas no están ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas, por lo tanto los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos⁴⁹, por lo cual se acidificó previamente con ácido cítrico.

Para conocer la concentración de antocianinas se aplicó el método de pH diferencial debido a que estas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH presentado por el espectro a diferentes absorbancias. La formación del oxonio o catión flavilio coloreado predomina a pH 1.0 de manera que la acidez genera una capa protectora sobre la molécula y la formación hemiacetal y chalcona incolora a pH 4.5, ya que ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 de la molécula. El método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite de manera segura y rápida medir el total de antocianinas monoméricas.

Los extractos se almacenaron a 4 °C y en frascos de color ámbar, puesto que las antocianinas presentan un comportamiento relativamente inestable presentando frecuentemente degradación durante el procedimiento y almacenamiento del extracto, debido a algunos factores como lo son la temperatura y la luz.

Los resultados obtenidos del contenido de antocianinas totales en el método de extracción por solventes soxhlet, para la muestra previamente secada en el horno (3879.5 ± 54 mg de 3-cianidin glucósido/100 g), con respecto al extracto obtenido con la materia previamente liofilizada (3969.7 ± 110.5 mg de 3-cianidin glucósido/100 g). Con relación al método de extracción asistida por microondas con la muestra previamente secada en el horno (3106.0 ± 285 mg de 3-cianidin glucósido/100 g), a comparación del extracto obtenido con la muestra liofilizada (3837.4 ± 47.9 mg de 3-cianidin glucósido/100 g), se contempla que en los dos métodos de extracción, el mejor proceso de secado es el liofilizado, presentando

⁴⁹GARCÍA, Claudia; GONZALEZ, Emmanuel; GUERRERO, Patricia; HERNANDEZ, Brandon; HERNANDEZ, José; TIRADO, Gabriela. Cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial. Universidad Politécnica de Guanajuato. 2015

la mayor concentración extraída. Esto se debe a que al tener bajas temperaturas descompone las moléculas sin desestabilizarlas.

No obstante, se contempla que entre los dos métodos, el mejor es la extracción por solventes soxhlet, presentando la mayor concentración extraída, sin embargo, la diferencia entre concentraciones en los dos procesos de extracción llevados a cabo es de aproximadamente un 10% y para la selección del mejor método hay que considerar factores como son el tiempo de extracción, que en este caso es mucho mayor para soxhlet con un promedio de veinte minutos por recirculación, en el cual se hicieron seis recirculaciones, lo que da un promedio de extracción de dos horas por réplica; lo que no sucede con la extracción asistida por microondas dado que su tiempo de extracción promedio fue de cuatro minutos por réplica.

El resultado de antocianinas monoméricas totales obtenidos en esta investigación, es más alto con respecto al contenido reportado en el mismo fruto por Garzón, et al.⁵⁰ (329 ± 28 mg cianidin-3-glucósido/100 g de fruta), teniendo en cuenta que el método utilizado fue extracción por solventes, con el fruto pulverizado en nitrógeno líquido, además de usar metanol puro como solvente; demostrando la eficiencia de los métodos propuestos ya que el resultado obtenidos es 11 veces mayor, esto se debe a que el solvente usado es toxico y su polaridad es más baja.

En la Figura 3, se hace una comparación de los resultados obtenidos por Paes et al.,⁵¹ acerca del contenido de antocianinas extraídas del arándano para la muestra secada en el horno (868.34 mg/100 g), asimismo para la muestra liofilizada (1724.16 mg/100g) con respecto a los resultados obtenidos para el agraz y se observa una cantidad mayor, además teniendo en cuenta lo reportado por Gaviria⁵² de que el agraz tiene mayor cantidad de antioxidantes que otros frutos de su misma especie.

A diferencia del fruto de zarzamora⁵³ en el contenido de antocianinas monoméricas (183.63 ± 0.33 mg cianidin-3-glucósido/100 g de peso fresco), por medio de una extracción por ultrasonido y utilizando como solvente metanol acidificado con ácido clorhídrico concentrado, se observa que hay una mayor concentración en los métodos que se emplearon para esta investigación en la extracción por solventes soxhlet (1909.7 mg cianidin-3-glucosido/100g) y la asistida por microondas (1138.2mg cianidin-3-glucosido/100g).

⁵⁰ GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ, C. E.; RIEDL, K. M. y SCHWARTZ, S. J. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale swartz*) from Colombia. *Food Chemistry* 122. 2010. p. 982

⁵¹ PAES, Juliana, et al. Op. cit., p. 7.

⁵² GAVIRIA. Op. cit., p. 93.

⁵³ LEYVA, Diana. Determinación de antocianinas fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis para optar al título de ingeniero de alimentos. Oaxaca. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 2009. p. 35.

Además en la Figura 1, según lo obtenido en Minitab 17.3 (software libre) en el diseño de experimentos, el método de extracción es el que mayor influencia tiene en el contenido de antocianinas, y en la Figura 2 se observa que el método de extracción soxhlet junto con la muestra liofilizada, son la mejor acoplamiento para la obtención del alto contenido de estas. Esto debido a que el tiempo de contacto entre el soluto y el solvente es mayor y además de su polaridad por lo que la miscibilidad de las antocianinas fue mayor.

En cuanto a los flavonoles mediante el método propuesto por Kostennikova, Z. presenta que el contenido de flavonoles en la extracción por solventes soxhlet con la materia prima previamente liofilizada presenta mayor cantidad (650.5 ± 52.5 mg de quercetina/ 100 g de fruta), que la muestra secada en el horno, al igual que la extracción asistida por microondas con la materia prima previamente liofilizada (1175.8 ± 92 g de quercetina/ 100 g de fruta), esto se debe a que la temperatura influye en los compuestos de la muestra y al subir la temperatura puede sufrir desnaturalización de los mismos, lo que no pasa con temperaturas bajas, puesto que estas los mantienen intactos.

Por lo tanto la mejor extracción para favorecer el contenido de flavonoles, es la asistida por microondas como se muestra en la Tabla 25. Esto se debe a que las ondas ejercen un efecto mayor en estas moléculas logrando su desprendimiento y exitosa extracción, lo que no sucede en la extracción por solventes soxhlet.

Para la cromatografía de capa delgada se usó una placa de sílice, debido a que ésta posee la característica de separar compuestos como fenoles, flavonoides y derivados de aminoácidos, entre otros, de manera exitosa.⁵⁴ Como se muestra en la ilustración 17, la quercetina se desprende y llega a la misma altura en las tres bandas, se puede corroborar que en la extracción por microondas se ve mayor intensidad en esta marca que por solventes soxhlet, lo que indica que la mayor extracción de flavonoles se obtiene por microondas, a comparación de las antocianinas que se observa una mayor intensidad en soxhlet.

Según lo anterior el método en conjunto de extracción que favorece el contenido de antocianinas y flavonoles es la asistida por microondas, debido a que esta permite obtener mayor contenido de flavonoles y su contenido de antocianinas no difiere de manera significativa con respecto al método de extracción por solventes soxhlet.

⁵⁴ BONILLA. Op. cit., p. 67.

6. CONCLUSIONES

- La homogenización de la muestra es importante debido a que el fruto debe cumplir con ciertas características físicas que mejoren la extracción del contenido de antocianinas y flavonoles, por lo que debe tener un contenido de humedad menor al 15%, diámetro ecuatorial 7-15 mm, un estado de 120 días de maduración y peso fresco de 0.40 a 0.64 g. Además de la liofilización previa a la extracción de la materia prima ya que esta permite la obtención de mayor cantidad de antocianinas y flavonoles.
- El tipo de secado es un factor que afecta la cantidad de antocianinas y flavonoles, teniendo en cuenta que con la materia prima liofilizada se obtienen mayor cantidad de estos componentes, en comparación de la secada en el horno, debido a que este proceso no los desestabiliza, y no afecta el contenido de los mismos.
- El método de extracción que proporciona el mayor contenido de antocianinas con un valor de 3969.7 ± 110.5 mg de cianidin-3-glucósido/100 g de fruta, es por solventes soxhlet, usando la materia prima previamente liofilizada. Debido a que el tiempo de extracción es más extenso y por consiguiente hay mayor contacto de la muestra con el solvente.
- El método de extracción que favorece la obtención de flavonoles, es la asistida por microondas con un valor de 1175.8 ± 92 mg de quercetina, con la materia prima previamente liofilizada, debido a que los flavonoles son estables al calor y resisten a la mayoría de los tratamientos térmicos, este método tiene la ventaja de que el tiempo requerido para realizar el proceso, es más corto y es recomendado debido a que su contenido de antocianinas no varía mucho con respecto al obtenido por soxhlet.
- Comparando los métodos de extracción, aquel que favorece el contenido de antocianinas y flavonoles en conjunto, es la asistida por microondas, con la materia prima liofilizada, debido a que la cantidad de flavonoles es mayor y la variación del contenido de antocianinas no se diferencia de gran manera con respecto al método de extracción por solventes soxhlet.
- El rendimiento de los extractos obtenidos, para el contenido de antocianinas, en la extracción por solventes soxhlet con la muestra liofilizada fue de 39.697%; con respecto a la extracción asistida por microondas con la materia prima liofilizada fue de 38.837%. En cuanto al contenido de flavonoles obtenidos a partir de la extracción por solventes soxhlet con la materia prima liofilizada de 6.502%; para la extracción asistida por microondas con la materia prima liofilizada de 11.758%.

- Los métodos utilizados en esta investigación dieron mejores resultados para las antocianinas monómericas totales, en la extracción por solventes soxhlet (1909.7 mg cianidin-3-glucosido/100g) y la asistida por microondas (1138.2mg cianidin-3-glucosido/100g); con respecto al contenido reportado en el mismo fruto por otras investigaciones (329 ± 28 mg cianidin-3-glucósido/100 g) y para el fruto de zarzamora (183.63 ± 0.33 mg cianidin-3-glucósido/100 g).
- Los extractos obtenidos tienen una amplia aplicación en la industria, debido a su alto contenido de polifenóles, específicamente antocianinas y flavonoles, pues son los más usados como conservantes y preservantes de alimentos, ya que retardan la oxidación de una sustancia aumentando su vida útil.
- La presencia de antioxidantes naturales en los alimentos es importante, no sólo porque estos compuestos contribuyen a definir las características organolépticas y a preservar la calidad nutricional de los productos que los contienen, sino además, porque al ser ingeridos, ayudan a preservar de manera considerable la salud de los individuos que los consumen. En efecto, la recomendación de aumentar la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes naturales es, en la actualidad, considerada una de las formas más efectivas de reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas.
- Si bien todos los polifenóles exhiben propiedades antioxidantes, se ha establecido que algunos de estos compuestos exhiben, además, propiedades anti-inflamatorias, anti-agregantes plaquetarias, anti-bacterianas, actividad moduladora de la actividad de numerosas enzimas, incluyendo la de ciertas enzimas digestivas.

7. RECOMENDACIONES

- Mejorar la precisión de los resultados obtenidos, controlando de manera estricta las variables que los puedan afectar, además de la contaminación de la muestra y la pureza de los reactivos.
- Estudiar la influencia del solvente diluido en agua, para conocer el comportamiento de las antocianinas y flavonoles, es decir si se puede obtener mayor contenido de antioxidantes.
- Aplicar cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, para cuantificar las antocianinas y los flavonoles.
- Utilizar otros métodos de extracción como líquidos presurizados, fluidos supercríticos, ultrasonido, entre otros, para evaluar el rendimiento de la concentración de antioxidantes del fruto.
- Evaluar las diferentes aplicaciones en la industria de alimentos, cosméticos, farmacéutica y mecánica, aplicando el proceso a nivel industrial de la obtención de estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILERA, Miguel; REZA, María del Carmen; GERARDO, Rodolfo. Propiedades funcionales de las antocianinas. Durango: Universidad Juárez del Estado de Durango. 2011. p, 18

ANGURELL, Inmaculada; CASAMITJANA, Núria; CAUBET, Amparo; DINARÈS, Immaculada; LLOR, Núria; MUÑOZ, Diego; NICOLÁS, Ernesto; PÉREZ, Lluïsa; PUJOL, Dolors; ROSELL, Glòria; SECO, Miquel; VELASCO, Dolors; GRUPO GUIDOLQUIM. Técnicas y Operaciones Avanzadas en el Laboratorio Químico (TALQ) {En línea} {24 de septiembre de 2015} Disponible en (<http://www.ub.edu/talq/es/node/285>)

ÁVILA, Hernán; CUSPOCA, Julián, FISCHER, Gerard; LIGARRETO, Adolfo y QUICAZÁN, Martha. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) almacenado 1 a 2 °C. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. {En línea} {10 de octubre de 2016} Vol. 60 no 2 (2007) Disponible en (<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v60n2/a19v60n2.pdf>)

BONILLA, Andrés. Caracterización de los pigmentos antocianos en los primordios florales de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora* de un bosque andino. Trabajo de grado para obtener el título de biólogo. Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá. 2002. p. 67

BUITRAGO, Claudia; RINCÓN, Martha; BALAGUERA, Helber y LIGARRETO, Gustavo. Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). En: Revista Facultad Nacional de Agronomía {en línea} {15 de febrero de 2016} No. 1 (2013) Disponible en (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/47840>)

CAMACHO, O.; MELGAREJO, S. Actividad antioxidante del extracto etanólico e hidroalcohólico y determinación química de los componentes mayoritarios del fruto de *Eugenia jambolana* (Uva venezolana). Tesis Pregrado Programa de Farmacia, Universidad del Atlántico, Atlántico-Colombia. 2009

CASTAGNINI, Juan Manuel. Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío. Tesis doctoral en ingeniería de alimentos. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia. 2014. p. vii.

CHÁVEZ, Ronald y ORDOÑEZ, Elizabeth. Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao {en línea} {1 Abril de 2016} No 1 (2013) Disponible en (http://www.encuentrocientificointernacional.org/revista/eci2013irevista/04ronaldchavez_polifenolesantioxidantesfinal.pdf)

CODELCO EDUCA. Extracción por solventes (SX). En: Codelco Educa. {En línea} {septiembre de 2015} Disponible en (https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_lixivacion_extraccion.asp)

CONDE, Enma. Revalorización de Residuos Agroindustriales y Forestales para la Obtención de antioxidantes Naturales con Aplicaciones en la Industria Alimentaria, Cosmética y/o Farmacéutica. Ourense. España. 2009. Trabajo de Maestría. Universidad de Vigo. Facultad de Química.

GARCÍA, Claudia; GONZALEZ, Emmanuel; GUERRERO, Patricia; HERNANDEZ, Brandon; HERNANDEZ, José; TIRADO, Gabriela. Cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial.

GARCÍA, Jimmy. Fenoles naturales. Facultad de ciencias químicas. Universidad Central del Ecuador. {En línea} {18 de octubre de 2015} Disponible en (<https://q-organicauce.wikispaces.com/file/view/Fenoles+Jimmy+Gar.pdf>)

GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ, C. E.; RIEDL, K. M. y SCHWARTZ, S. J. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale swartz*) from Colombia. Food Chemistry 122. 2010. p. 982.

GAVIRIA, Carlos; HERNÁNDEZ, Juan; ARIAS Mario; MEDINA, Clara; ROJANO, Benjamín. Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale Sw.*) durante su desarrollo y maduración. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 6490

GAVIRIA, Carlos. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño. Universidad Nacional de Colombia. 2009

HERAS Irina, ALVIS Armando y ARRAZOLA Guillermo. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera L.*). Universidad de Córdoba. 2013.

HERAZO, Cristina. Obtención y estabilización de antocianinas de berenjena (*solanun melongena L.*) mediante microencapsulación y su evaluación como compuesto funcional en la industria alimentaria. Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Ciencia Agroalimentaria con énfasis en Ciencias de los Alimentos. Córdoba. Universidad de Córdoba. 2013. 24p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN.

Documentación, presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá D.C.: El Instituto, 2008. 110 p.

Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 38 p.

Referencias documentales, para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 30 p.

LEYVA, Diana. Determinación de antocianinas fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis para optar al título de ingeniero de alimentos. Oaxaca. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 2009. p. 35.

LUTZ I, A. Physico-chemical methods for food analysis. Analytical standards of instituto Adolfo Lutz. 4ed. São Paulo. Citado por: PAES, Juliana; DOTTA, Raquel y MARTÍNEZ, Julián. Extraction of phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium myrtillus L.*) residues using supercritical CO₂ and pressurized water. Campinas: Universidad de Campinas. 2013. p. 5

MARTÍNEZ, Alejandro. Flavonoides. Medellín: Universidad de Antioquia. 2005. p. 22

MARTÍNEZ, Nieves del Socorro; ARÉVALO, Katiushka; VERDE, María; RIVAS, Catalina; ORANDAY, Azucena; NÚÑEZ, Adriana y MORALES, Eufemia. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). En revista Mexicana de ciencias farmacéuticas. {En línea} {27 de febrero de 2016}. Vol. 42 no. 4 (oct. – dic., de 2011); p. 68 Disponible en (<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n4/v42n4a7.pdf>.)

MARTÍNEZ, Noé. Extracción de compuestos antioxidantes presentes en la fresa (*Fragaria SPP*). Técnico superior universitario en procesos alimentarios. Oaxaca. Universidad Tecnológica de los Valles de Oaxaca. 2013. p. 17.

MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J; CULEBRAS, J, Y TUÑÓN, M^a. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. España: Universidad de León. 2002 p. 271.

MORALES, Martin; SÁNCHEZ, Vicente; SANDOVAL, Santiago; TARRAGO, Fernández; LÓPEZ, José y PÉREZ F. Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio. En: Revista de toxicología. {En línea} {30 de marzo de 2016}. Disponible en (<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4036872>)

PAES, Juliana; DOTTA, Raquel y MARTÍNEZ, Julián. Extraction of phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium myrtillus L.*) residues using supercritical CO₂ and pressurized water. Campinas: Universidad de Campinas. 2013. p. 2.

PALADINO, Silvia. Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos Contenidos en las Semillas de la Vid (*Vitis vinifera L.*). Mendoza, Argentina.

2008. Trabajo de Maestría. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.

PARR; BOLWELL, KAHKONEN et al. PRIOR et al., citado por GAVIRIA, Carlos. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 96.

PINZÓN, I., FISCHER, G. y CORREDOR, G., 2007. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis Sims.*). *Agronomía Colombiana* 25(1): 83-95.

PUERTAS, Miguel; RÍOS, Yersica y ROJANO, Benjamín. Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) de alto consumo en Antioquia-Colombia. En: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [En línea] vol. 18 no. 2 (abr.-jun., de 2013); [citado el 16 de octubre de 2015] Disponible en SciELO.

QUIÑONES, Adalí. Eficacia de la extracción asistida por microondas para determinar plaguicidas organofosforados en aceites vegetales mediante cromatografía gaseosa. Título de químico farmacéutico. Santiago: Universidad de Chile. 2008. 5 p.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M. y ALEIXANDRE, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. En: *Nutrición hospitalaria: órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*. Febrero, 2012. Vol. 27, no. 5, p. 79.

REYES, Jesús. Colorantes orgánicos de origen natural utilizados como sensibilizadores de celdas solares. Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2014. 27 p.

RODRIGUEZ, Carlos. Estudio de la técnica de Extracción Asistida por Microondas (MAE) para su aplicación en la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH's) en suelos. Disertación previa a la obtención del título Licenciado en Ciencias Químicas, mención Química Analítica. Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2013. 23-24 p.

ROSSO, Ana María y TORO, Said. Optimización de las condiciones de extracción solido-liquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha (*Mangifera indica*. Var. *Magdalena River*) y ajuste de sus parámetros cinéticos. Trabajo de Grado de Ingeniería Química. Bucaramanga: Escuela de Ingeniería química. Facultad fisicoquímica. 2011. 59 p.

SALOMÓN, Susleby; BERMELO, Addiss; MÁRQUEZ, Tania; LÓPEZ, Orestes; GONZÁLEZ, María y LLÓPIZ, Julio. Extracción asistida por microondas de lípidos

de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). Revista Cubana de plantas medicinales. La Habana, Cuba. 2013.

TOBON, Manuel. Estudio de las posibles conformaciones de los flavonoides quercetina y hidroquercetina por métodos de mecánica cuántica. Trabajo de grado para licenciatura en física. Puebla. Universidad Autónoma de Puebla. 2015. 7 p.

TORRES, Marcelo. Propiedades del arándano. Emprendimientos agropecuarios. [En línea] < <http://marcelo-torres-nosa.idoneos.com/>> [citado el 27 de mayo de 2016]

VENEGAS, Edmundo. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de Thea sinensis L. y su capacidad antioxidante. En: Revista UCV – Scientia [en línea]. Vol. 4 No. 2 (2012) <<file:///D:/Trabajo%20de%20Grado/Articulos/Cuantificacion%20De%20Flavonoides%20Totales%20258nm.pdf>> [citado el 16 de marzo de 2016]

VILLEMUR, María y RIMINI, Marta. Determinación de pesticidas organoclorados en suelos – Extracción por microondas. Centro de tecnología del uso del agua. Programa Química Analítica.

WESTLAND, Stephen. Que es el espacio de color CIE L*a*b*. [en línea]. <http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab> [citado el 15 de febrero de 2016]

ZAPATA, Luz Marina. Extracción de antocianinas de arándanos. Tesis doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos, 2014. ii p.

ANEXOS

ANEXO A

ILUSTRACIÓN DE LOS EQUIPOS EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

BALANZA

COLORÍMETRO

ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS

ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS 1800

FILTRACIÓN AL VACÍO

HORNO DE SECADO

LIOFILIZADOR

PH-METRO

ROTAVAPORADOR

BALANZA ANALÍTICA



COLORÍMETRO



ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS



ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS 1800



FILTRACIÓN AL VACIO



MUFLA



LIOFILIZADOR LABCONCO



pH-METRO



ROTAVAPORADOR



ANEXO B

CALCULO DE RENDIMIENTOS

A continuación se muestran los cálculos de rendimiento de antocianinas y flavonoles de cada uno de los extractos obtenidos.

RENDIMIENTO ANTOCIANINAS

Extracción por solventes soxhlet. A continuación se determinan los rendimientos por réplica de las muestras secadas previamente en el horno.

Repetición 1:

$$3751.2 \text{ mg} \rightarrow 3.7512 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.7512 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 37.512\%$$

Repetición 2:

$$3843.4 \text{ mg} \rightarrow 3.8434 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.8434 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 38.434\%$$

Repetición 3:

$$3879.5 \text{ mg} \rightarrow 3.8795 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.8795 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 38.795\%$$

Para la muestra previamente liofilizada a continuación se determinan los rendimientos por réplica.

Repetición 1:

$$3805.3 \text{ mg} \rightarrow 3.8053 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.8053 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 38.053\%$$

Repetición 2:

$$3701.1 \text{ mg} \rightarrow 3.7011 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.7011 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 37.011\%$$

Repetición 3:

$$3969.7 \text{ mg} \rightarrow 3.9697 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.9697 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 39.697\%$$

Extracción asistida por microondas. A continuación se determinan los rendimientos por réplica de las muestras secadas previamente en el horno.

Repetición 1:

$$2841.5 \text{ mg} \rightarrow 2.84145 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{2.8415 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 28.415\%$$

Repetición 2:

$$2550.9 \text{ mg} \rightarrow 2.55509 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{2.55509 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 25.551\%$$

Repetición 3:

$$3106 \text{ mg} \rightarrow 3.106 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.106 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 31.06\%$$

Para la muestra previamente liofilizada a continuación se determinan los rendimientos por réplica.

Repetición 1:

$$3837.4 \text{ mg} \rightarrow 3.8374 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.8374 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 38.837\%$$

Repetición 2:

$$3723.2 \text{ mg} \rightarrow 3.7232 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.7232 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 37.232\%$$

Repetición 3:

$$3757.3 \text{ mg} \rightarrow 3.7573 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento antocinas} = \frac{3.7573 \text{ g}}{10 \text{ g}} * 100 = 37.573\%$$

RENDIMIENTO FLAVONOLES

Extracción por solventes soxhlet. A continuación se determinan los rendimientos por réplica de las muestras secadas previamente en el horno.

Repetición 1:

$$348.3 \text{ mg} \rightarrow 0.3483 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.3483}{10 \text{ g}} * 100 = 3.483\%$$

Repetición 2:

$$333.1 \text{ mg} \rightarrow 0.3331 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.3331}{10 \text{ g}} * 100 = 3.31\%$$

Repetición 3:

$$338.2 \text{ mg} \rightarrow 0.3382 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.3382}{10 \text{ g}} * 100 = 3.382\%$$

Para la muestra previamente liofilizada a continuación se determinan los rendimientos por réplica.

Repetición 1:

$$650.2 \text{ mg} \rightarrow 0.6502 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.6502}{10 \text{ g}} * 100 = 6.502\%$$

Repetición 2:

$$527.9 \text{ mg} \rightarrow 0.5279 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.5279}{10 \text{ g}} * 100 = 5.279\%$$

Repetición 3:

$$555.3 \text{ mg} \rightarrow 0.5553 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.5553}{10 \text{ g}} * 100 = 5.553\%$$

Extracción asistida por microondas. A continuación se determinan los rendimientos por réplica de las muestras secadas previamente en el horno.

Repetición 1:

$$621.3 \text{ mg} \rightarrow 0.6213 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.6213}{10 \text{ g}} * 100 = 6.213\%$$

Repetición 2:

$$531.5 \text{ mg} \rightarrow 0.5315 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.5315}{10 \text{ g}} * 100 = 5.315\%$$

Repetición 3:

$$548.6 \text{ mg} \rightarrow 0.5486 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.5486}{10 \text{ g}} * 100 = 5.486\%$$

Para la muestra previamente liofilizada a continuación se determinan los rendimientos por réplica.

Repetición 1:

$$978.2 \text{ mg} \rightarrow 0.9782 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{0.9782}{10 \text{ g}} * 100 = 9.782\%$$

Repetición 2:

$$1170.7 \text{ mg} \rightarrow 1.1707 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{1.1707}{10 \text{ g}} * 100 = 11.707\%$$

Repetición 3:

$$1175.8 \text{ mg} \rightarrow 1.1758 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento flavonoles} = \frac{1.1758}{10 \text{ g}} * 100 = 11.758\%$$

ANEXO C

FICHAS DE SEGURIDAD DE LA MATERIA PRIMA

ACETATO DE ETILO

ACETATO DE SODIO

ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL

ÁCIDO CÍTRICO

ÁCIDO CLORHÍDRICO

ÁCIDO FÓRMICO

CINC

CLORURO DE POTASIO

ETANOL

HIDRÓXIDO DE SODIO

HIPOCLORITO DE SODIO