



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de
tamarindo (*Tamarindus indica* L.)**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Paute Torres, Ana Belén

TUTOR: Guamán Balcázar, María del Cisne, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgtr.

María del Cisne Guamán Balcázar

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de tamarindo (*Tamarindus indica* L.)" realizado por Ana Belén Paute Torres, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 05 de Diciembre del 2016

f).....

Mgtr. María del Cisne Guamán Balcázar

Cl.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

“Yo Paute Torres Ana Belén declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Mgtr. María del Cisne Guamán Balcázar directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Loja, 05 de Diciembre del 2016

f.....

Paute Torres Ana Belén
C.I: 1105638868

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme, bendecirme cada día de mi vida y por permitirme cumplir una etapa de mi vida muy importante.

A mis padres, por brindarme su apoyo, comprensión, sacrificio y amor constante todos los días y su fe en mi todo lo que soy se los debo a ustedes.

A mis hermanos que me han brindado su amor y sus palabras de aliento.

Y a mis amigos por brindarme su amistad incondicional y su compañía durante estos años de estudio.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por gozar de salud y vida, brindarme sabiduría y fe.

A la Mg. Sc. María del Cisne Guamán quien como director de tesis ha sabido compartir sus conocimientos para poder llevar a cabo este proyecto de la mejor manera, gracias también por su paciencia, orientación y confianza.

A mis profesores, que con sus conocimientos y motivación impulsaron a mi crecimiento académico y personal.

A mi familia, por creer en mí y por su infinito amor, y a mis compañeros por su ánimo y compañía durante todos estos años de estudio.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.).....	5
1.2 Subproducto de tamarindo.	7
1.3 Extracción de compuestos (sólido-líquido).....	8
1.4 Antioxidantes.....	9
1.5 Determinación de compuestos fenólicos y antioxidantes.....	10
1.5.1 Método del ácido 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS●+).....	10
1.5.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).....	10
1.5.3 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazailo (DPPH).....	11
1.5.4 Contenido de fenoles totales.....	11
1.6 Optimización de la extracción por medio de un diseño estadístico experimental..	12
1.6.1 Condiciones de extracción para la optimización	13
1.7 Cinética de extracción.....	14
CAPITULO 2: OBJETIVO	14
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivo específico	15
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Reactivos.....	17
3.2 Instrumentos y equipos.....	18
3.3 Materia prima, preparación y caracterización.....	18
3.3.1 Determinación del contenido de humedad.	18
3.4 Obtención de los extractos.	19
3.4.1 Maceración dinámica.	19
3.4.2 Diseño experimental.	20
3.4.2 Análisis estadístico.	21
3.5 Cinética de extracción.....	21

3.6 Determinación de capacidad antioxidante.....	21
3.6.1 Método de ABTS.....	25
3.6.2 Método de DPPH.....	21
3.6.3 Método de FRAP	23
3.6 Determinación de fenoles totales.....	25
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
4.1 Extracción por maceración dinámica: subproducto de tamarindo.....	27
4.1.1 Análisis del diseño experimental.....	27
4.2 Optimización del método de fenoles totales y actividad antioxidante: ABTS, FRAP y DPPH.	27
4.2.1 Método de fenoles totales	27
4.2.1.1 <i>Cinética de extracción</i>	29
4.2.2 Optimización para el método ABTS.	30
4.2.2.1 <i>Cinética de extracción</i>	32
4.2.3 Optimización para el método de DPPH.....	33
4.2.3.1 <i>Cinética de extracción</i>	35
4.2.4 Optimización del método FRAP	36
4.2.4.1 <i>Cinética de extracción</i>	39
5. CONCLUSIONES.....	40
6. RECOMENDACIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFIA.....	42
8. ANEXOS	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Cuantificación de fenoles totales: método Folin-Ciocalteu.	50
1. Curva de calibración	50
2. Cuantificación de fenoles totales	51
3. Cinética de extracción.....	52
4. Análisis estadístico de la cinética	53
5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones	54
6. Cálculos para la determinación de la concentración	55
Anexo B: Cuantificación de capacidad antioxidante: Método ABTS	57
1. Curva de calibración	57
2. Cuantificación de la capacidad antioxidantes: ABTS	58
3. Cinética de extracción.	59
4. Análisis estadístico de la cinética.	60
5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones	61
6. Cálculos para la determinación de la concentración	62
Anexo C: Cuantificación de capacidad antioxidante: Método DPPH	64
1. Curva de calibración	64
2. Cuantificación de la capacidad antioxidante: DPPH.....	65
3. Cinética de extracción.	66
4. Análisis estadístico de la cinética	67
5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones	68
6. Cálculos para la determinación de la concentración.....	69
Anexo D: Cuantificación de capacidad antioxidante: Método FRAP	71
1. Curva de calibración.....	71
2. Cuantificación de la capacidad antioxidante: FRAP	72
3. Cinética de extracción.	73
4. Análisis estadístico de la cinética.	74
5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones	75
6. Cálculos para la determinación de la concentración.....	76
Anexo E: Determinación del porcentaje de humedad	71
1. Cálculos humedad.....	78
Anexo F: Metodología de extracción: extracto control.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

1. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1. Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)	6
Figura 2. Subproducto de tamarindo.....	7
Figura 3. Estructura de ABTS●+ antes y después de la reacción con el antioxidante.....	11
Figura 4. Reacción del ensayo FRAP.	11
Figura 5. Estructura de DPPH antes y después de reaccionar con el antioxidante.....	12
Figura 6. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo folin-ciocalteu.....	12

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 7. Subproducto de tamarindo; vena de tamarindo.....	19
Figura 8. Esquema de extracción de antioxidante.....	20
Figura 9. Condiciones de extracción.....	21
Figura 10. Metodología para cuantificar fenoles totales.....	23
Figura 11. Metodología para cuantificar la actividad antioxidante por el método ABTS.....	24
Figura 12. Metodología para cuantificar la actividad antioxidante por el método DPPH.....	26
Figura 13. Metodología para cuantificar la actividad antioxidante por el método FRAP.....	28

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Figura 14. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para fenoles totales.....	33
Gráfica 1. Comparación de la concentración de fenoles totales en diferentes subproductos de frutas.....	34
Gráfica 2. Comportamiento cinética de extracción por maceración dinámica para el método: fenoles totales.....	35
Figura 15. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para ABTS.....	37
Gráfica 3. Comparación de la actividad antioxidante de ABTS en diferentes subproductos de frutas.....	37
Gráfica 4. Comportamiento cinética de extracción por maceración dinámica para el método: ABT.....	38
Figura 16. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para DPPH.....	42
Gráfica 5. Ajuste de la relación muestra/solvente para DPPH.....	40

Gráfica 6. Comparación de la actividad antioxidante de DPPH en diferentes subproductos de frutas.....	41
Gráfica 7. Comportamiento cinética de extracción por maceración dinámica para el método: DPPH.....	42
Figura 17. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para FRAP.....	47
Gráfica 8. Comparación de la actividad antioxidante de FRAP en diferentes subproductos de frutas.....	45
Gráfica 9. Comportamiento cinética de extracción por maceración dinámica para el método: FRAP.....	46

ÍNDICE DE TABLAS Y ECUACIONES.

Tabla 1. Composición química de la pulpa de tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.).....	8
Tabla 2. Diseño factorial experimental.....	21
Tabla 3. Factores y variables respuesta estudiadas para la extracción al subproducto de tamarindo.....	31
Tabla 4. Resumen de la cuantificación de los extractos sólido-líquido a diferentes condiciones.....	32
Tabla 5. Ecuación cuadrática de la variable respuesta fenoles totales.....	32
Tabla 6. Ecuación cuadrática de la variable respuesta ABTS.....	36
Tabla 7. Ecuación cuadrática de la variable respuesta DPPH.....	39
Tabla 8. Ecuación cuadrática de la variable respuesta FRAP.....	41
Tabla 9. Análisis de la ecuación cuadrática para cada método	44
Ecuación 1. Fórmula de humedad	18

ABREVIATURAS

N: Normal
ANOVA: Análisis de varianza
Abs.: Absorbancia
Temp.: Temperatura
E: Ensayo
b: Intersección
m: Pendiente
PM: Peso molecular
ST: Solución de trabajo
SM: Solución madre
%ST: Porcentaje de sólidos totales
x: Concentración
BH: Base húmeda
BS: Base seca
W: Peso
h: Hora
H₂O: Agua
H₂O dd: Agua destilada
HCl: Ácido clorhídrico
ET: Equivalente a trolox
FD: Factor dilución
R m/s: Relación muestra/solvente
min.: Minutos
%H: Porcentaje de humedad
MeOH: Metanol
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS: 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
TPTZ: 2,4,6-tripyridyl-s-triazine
TROLOX: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
µmol Eq T / g BS: Micromol equivalentes de trolox / gramo base seca
mg E AG/100 g BS: Miligramo equivalentes de ácido gálico / 100 gramos base seca
mL: Mililitro
µmol: Micromol
g: Gramo
mg: Miligramo
M: Muestra
D: Duplicado de la muestra

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura y la relación muestra/solvente de los extractos sólido-líquido sobre los compuestos presentes en la vena del tamarindo (subproducto), utilizando un diseño factorial 2^k . Luego de obtener las condiciones óptimas se determinó el tiempo de extracción de compuestos mediante la cinética de extracción. En todos los ensayos se midió el contenido de polifenoles empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidantes para los métodos: FRAP, ABTS y DPPH. Las condiciones óptimas para fenoles totales fueron: 20 °C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL; para ABTS 60 °C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL; para FRAP 60 °C y relación muestra/solvente 5 g/50 mL y DPPH 60 °C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL. La cinética determinó que el mejor tiempo fue 150 min para fenoles totales, y 120 min para ABTS y DPPH. En el método DPPH se observó que las variables relación muestra/solvente y temperatura tuvieron efecto significativo, mientras que para fenoles totales, ABTS y FRAP ninguna variable tuvo efecto.

Palabras Claves: Subproducto de tamarindo, actividad antioxidante, contenido fenólico, optimización y cinética de extracción.

ABSTRACT

In the present work, the effect of the temperature and the sample / solvent ratio of the solid-liquid extracts on the compounds present in the tamarind (by-product) vein, using a 2^k factorial design, was evaluated. After obtaining the optimum conditions, the extraction time of compounds was determined by extraction kinetics. In all the tests the content of polyphenols was measured using the Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant activity for the methods: FRAP, ABTS and DPPH. The optimum conditions for total phenols were: 20 °C and sample / solvent ratio 1.67 g / 50 mL; For ABTS 60 °C and sample / solvent ratio 1.67 g / 50 mL; For FRAP 60 °C and sample / solvent ratio 5 g / 50 mL and DPPH 60 °C and sample / solvent ratio 1.67 g / 50 mL. The kinetics determined that the best time was 150 min for total phenols, and 120 min for ABTS and DPPH. In the DPPH method it was observed that the variables sample / solvent and temperature variables had a significant effect, whereas for total phenols, ABTS and FRAP, no variables had an effect.

KEYWORD:

By-product tamarind, antioxidant activity, phenolic content, optimization and extraction kinetics

INTRODUCCIÓN

Ecuador posee una gran variedad de frutas con alto valor nutricional como es el tamarindo (*Tamarindus indica* L.). Este producto se encuentra dentro de la oferta exportable de nuestro país (PRO ECUADOR, 2013; INIFAP, 2006), ya que la pulpa es muy cotizada por la industria alimentaria para la elaboración de jaleas, mermeladas y algunas bebidas (CONABIO, 2013; Wong et al., 1998; González-Palomares, 2009).

La industria de los alimentos genera desechos o subproductos agroindustriales que son utilizados en el mejor de los casos por algunas industrias como: abono, alimento de animales, para extracción de aceites esenciales, extracción de flavonoides y carotenoides, etc. (Singh nee' Nigam et al., 2009), mientras que otras llevan los subproductos a rellenos sanitarios sin considerar la posibilidad de aprovecharlos y darles un valor agregado, debido a la falta de información de sus propiedades químicas y nutricionales (Yepes, Johana, Naranjo, & Sánchez, 2008). Según algunas investigaciones el tamarindo tiene un aporte de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en sus semillas (Komutarin et al., 2004; Lamien-Meda et al., 2008; Martinello et al., 2006; Sudjaroen et al., 2005), pero hasta el momento no hay información de las propiedades de otros subproductos como la cáscara y vena de tamarindo, con lo cual es difícil buscar alternativas para el uso nutricional, funcional o nutracéutico de estos subproductos. Debido a esto, el presente trabajo busca contribuir a la valorización de los subproductos generados en la industria ecuatoriana, mediante: 1. La optimización de los parámetros de extracción de compuestos antioxidantes presentes en el subproducto vena de tamarindo y 2. La determinación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Para la realización del proyecto la materia prima fue adquirida del cantón Macará, provincia de Loja. La obtención de los extractos se la realizó mediante maceración dinámica, para el diseño experimental utilizamos las variables temperatura y relación muestra/solvente con tres niveles cada una. Luego a los extractos obtenidos se les cuantificó la cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante. La optimización se la realizó mediante el análisis de superficie de respuesta evaluando el efecto de la temperatura y relación muestra/solvente con la finalidad de maximizar la cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en los extractos.

Para iniciar con el proyecto una de las limitantes fue la recolección de la materia prima, el tamarindo no es una fruta de producción en la ciudad de Loja y fue dificultoso encontrar la fruta entera sin procesar.

En el capítulo uno describe al subproducto y fundamentos técnicos de la extracción y metodología de investigación. En el segundo capítulo constan los objetivos planteados para

el trabajo de titulación. En el tercer capítulo se detalla la metodología de extracción, cuantificación y diseño experimental. En el cuarto capítulo se plasma los resultados y discusiones en cuanto a la cuantificación de fenoles totales, actividad antioxidante y optimización de cada método, y finalmente podemos encontrar las conclusiones, recomendaciones, bibliografía y anexos.

CAPÍTULO 1:
REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

El fruto de tamarindo (**Figura 1.**) posee forma de vaina curvada, con su corteza gruesa y su pulpa carnosa presenta semillas ovaladas, en el fruto hay de 3 a 6 semillas por vaina (Pérez & Bárcenas, 2010).



Figura 1: Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)
Fuente: La autora.

El tamarindo **Figura 1** es una fruta tropical con un sabor ácido (FAO, 2013) pertenece a la familia Leguminosas (Escudero, 2008), se usa comúnmente en elaboración de jaleas, mermeladas y algunas bebidas (Escalona, 2011). Se cultiva en zonas tropicales, y es originario de las sabanas secas de África tropical, Oceanía, Asia y parte de América. (CONABIO, 2013; Silva & Lucatero, 2006)

En el Ecuador se cultiva tamarindo (*Tamarindus indica* L.) principalmente en las provincias de: El Oro, Manabí y Guayas, plantándose en linderos de propiedades, en parques, avenidas y huertos caseros. Otras zonas como Riochico provincia de Manabí poseen una plantación de 150 a 450 árboles de tamarindo (EL UNIVERSO, 2015; INEC, 2014). El árbol empieza a producir a partir del cuarto año de su establecimiento, los árboles injertados producen en promedio 6 kg, lo cual representa un rendimiento de 1.1 ton/ha, luego en el quinto año se incrementa a 1.8 ton/ha sexto año a 6 ton/ha y del séptimo al décimo año de producción se estima 8 a 12 ton/ha (CONABIO, 2013; INIFAP, 2006).

1.2 Subproducto de tamarindo

Los subproductos son derivados del proceso industrial ya sea animal o vegetal (González, 2013). A partir de ellos se pueden obtener harinas, aceites esenciales, pigmentos y productos cítricos especiales; así como también compuestos bioactivos que tienen efectos benéficos sobre la salud, así como la fibra y los polifenoles, en especial los flavonoides (Girard & Mazza, 1998). En la **Figura 2** se indica las partes del subproducto de tamarindo.

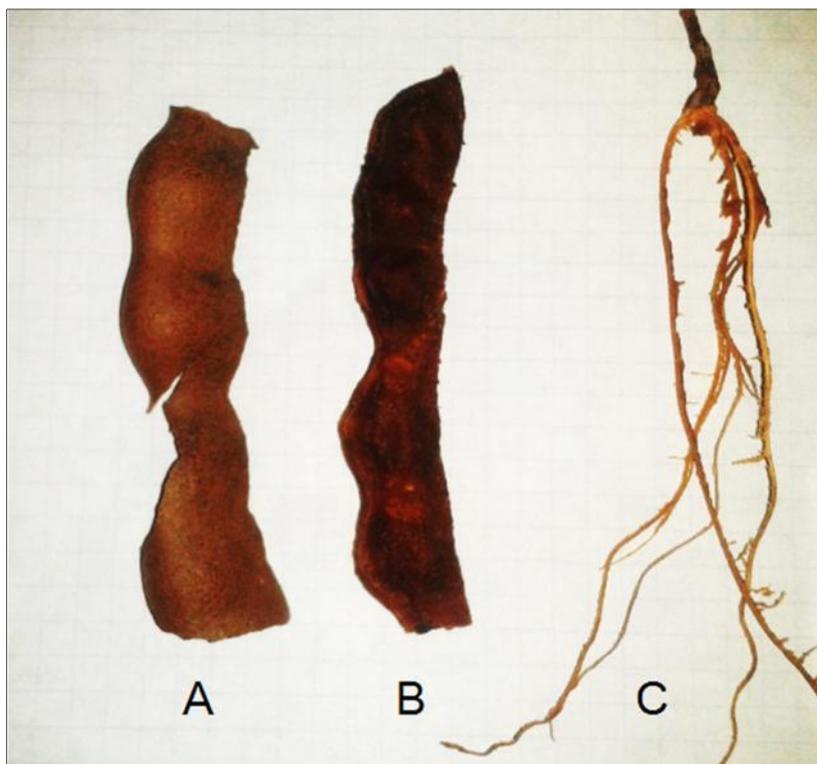


Figura 2: Subproducto de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) **A)** cáscara; **B)** pulpa; **C)** vena
Fuente: La autora.

El tamarindo es reconocido por su sabor característico agridulce y por su pulpa que se utiliza para la preparación de concentrados, comida gastronómica, licores, néctares y jugos (Pérez & Bárcenas, 2010). En la industria la fibra y la cáscara del tamarindo considerados como subproductos que representan aproximadamente el 22.4 % del peso de la fruta (Estrada, Alejandro & Palomares, 2010). Los desechos del tamarindo que se tienen de la obtención de jugos son principalmente cáscara y bagazo, que representan aproximadamente el 50 % de la masa total del fruto original (Marín et al., 2007).

Algunos estudios determinaron la presencia de altas concentraciones de polifenoles y flavonoides en los extractos de diferentes partes del fruto de tamarindo, como son: las semillas

y fruto (pulpa y pericarpio) (Komutarin et al., 2004; Lamien-Meda et al., 2008; Martinello et al., 2006; Sudjaroen et al., 2005).

Según Komutarin et al., (2004) reportaron que los flavonoides son los mayores constituyentes en el extracto del recubrimiento de las semillas, mientras que encontraron rutina, un compuesto parental glicosilado del flavonoide quercetina (Kanashiro et al., 2007). Diversos investigadores, han logrado aislar varios componentes de las semillas de tamarindo como son: 2-hidroxi-3',4'-dihidroxiacetofenona, metil 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y (-)-epicatequina en adición a proantocianidinas oligoméricas (Tsuda et al., 1993, 1994 y 1995).

En la actualidad algunas investigaciones pretenden obtener a partir de estos subproductos compuestos/fracciones con buenas propiedades antioxidantes susceptibles de emplearse como aditivos en el control de procesos oxidativos en la industria alimentaria, o como ingredientes funcionales (Garrido, Monagas, Gómez-Cordovés & Bartolomé, 2007). Por las propiedades mencionadas se pueden considerar al tamarindo un alimento funcional. En la **Tabla 1** se visualiza la composición de la pulpa de tamarindo.

Tabla 1. Composición química de la pulpa de tamarindo

*TABLA DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA DE TAMARINDO	
Agua (g) 31.4	Sodio (mg) 28
Proteínas (g) 2.8	Potasio (mg) 628
Grasas (g) 0.6	Calcio (mg) 24
Cenizas (g) 2.5	Fósforo (mg) 113
Carbohidratos (g) 62.7	Hierro (mg) 2.8
Ácidos grasos saturados (g) 0.3	Zinc (mg) 2.8
Vitamina A U.I 45	Tiamina (mg) 0.43
Ácidos grasos monoinsaturados (g) 0.2	Riboflavina (mg) 0.15
Ácidos grasos poliinsaturados (g) 0.1	Niacina (mg) 1.9
Ácido tartárico (g) 12.5	Ácido nicotínico (mg) 1.8
Colesterol (mg) 0	Vitamina C (mg) 4.0

*Por 100g de porción comestible

Fuente: Food and Agriculture Organization of the United Nations, (1997)

Elaboración: La autora

1.3 Extracción de compuestos (sólido-líquido)

La extracción es un paso muy importante para el aislamiento e identificación de los compuestos polifenólicos. La extracción sólido-líquido es el transporte desde la matriz con contenido sólido hacia un disolvente (Soto, 2015).

La velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido puede ser rápida y la velocidad hacia el interior de la matriz del sólido puede ser lenta o rápida, dentro de este parámetro hay diversos factores que influyen tales como el tamaño de partícula, concentración del disolvente, temperatura, el tiempo de contacto y proporción de sólido-disolvente (Geankoplis, 1988).

La extracción de antioxidantes se la realiza según la polaridad de los compuestos que se desea extraer sean estos polares o apolares, de acuerdo a estos se elige el disolvente, así mismo el rendimiento de la extracción depende de la naturaleza del disolvente, temperatura, pH, tamaño de partícula y materia fresca o seca (Spigno, 2007; Pérez-Nájera, 2013).

1.4 Antioxidantes

Las frutas y vegetales son fuentes de antioxidantes tales como: tocoferoles, antocianinas, ácido ascórbico, compuesto fenólicos y carotenoides (Rojas, 2014), los subproductos o desechos agroindustriales son una fuente rica en antioxidantes o compuestos bioactivos (González, 2013). Los antioxidantes se obtienen por dos rutas: 1) fuentes naturales de frutas o vegetales y 2) por síntesis química (Olivares, 2010; Rojas, 2014). Un antioxidante se define como aquella molécula capaz de impedir o prevenir la oxidación de los radicales, mediante la liberación de electrones, los cuales tienen la capacidad de captar los radicales libres (Lim et al., 2007; Sotomayor, 2015). Entre los compuestos que actúan como antioxidantes tenemos algunos polifenoles presente en alimentos como: flavonoides, taninos y resveratrol estas moléculas tienen grandes beneficios o acción terapéutica para la salud como la prevención de enfermedades generados por los radicales libres (Murray et al., 2008).

El efecto producido por los radicales libres son enfermedades como el cáncer, arterosclerosis, infarto al miocardio, diabetes entre otras (Venereo, 2002). Los radicales libres se producen durante el proceso metabólico aerobio. En los procesos fisiológicos son utilizados como un mecanismo de defensa contra patógenos o agentes infecciosos, ya que son moléculas reactivas con la capacidad de oxidar estructura biológicas, dañarlas o reaccionar químicamente con lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos (Vintimilla, 2013; Olivares, 2010).

1.5 Determinación de la capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante existen métodos que son in-vitro y se determinan por medio de UV-VISIBLE identificando químicamente los compuestos por medio de la absorción de los mismos reflejado por la naturaleza de los disolventes, pH de los extractos y otros compuestos que se absorben proporcionalmente al UV-VISIBLE (Arranz, 2010). La actividad antioxidante es consecuencia de la estructura química de los diferentes compuestos fenólicos (Padilla, Rincón, & Bou-Rached, 2008). Los métodos que utilizan muchos autores para determinar la capacidad antioxidante son: ABTS, FRAP y DPPH.

1.5.1 Método del ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•+).

El método cuantifica la capacidad de captar radicales libres por medio de la decoloración del radical ABTS^{•+}. Entre mayor sea la actividad antioxidante del polifenol mayor es la decoloración de ABTS (Arnao et al., 2001). El ensayo se fundamenta en la reacción de oxidación del persulfato de potasio frente a ABTS^{•+} (azul verdoso) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) y en la oscuridad durante 12 h, generando ABTS²⁻ (incolore) (Tovar del Rio, 2013) en la **Figura 3** se detalla el proceso de reducción.

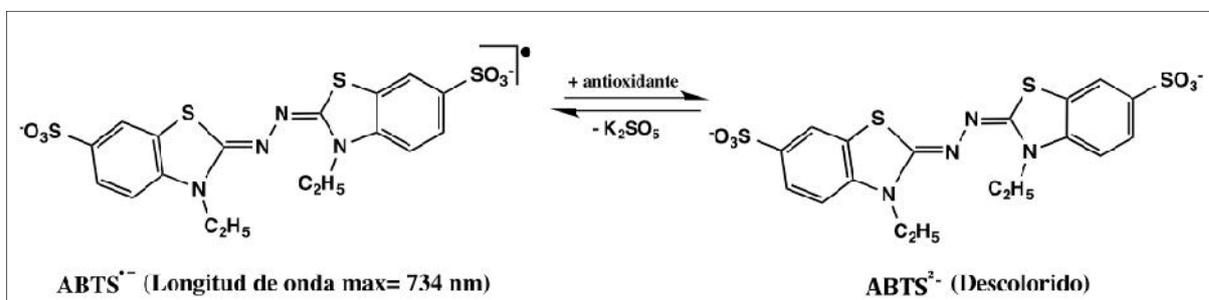


Figura 3: Estructura de ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante
Fuente: Zuleta et al., (2009)

1.5.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).

Método establecido por Brand-Williams et al., (1995), que cuantifica la reducción del hierro, degradando complejos amarillos a complejos azules por un antioxidante en un medio de pH ácido. Espectroscópicamente se lee a 593 nm. En la **Figura 4** se observa la medición del complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ-Fe⁺³) de color amarillo reducirse a su forma ferrosa (TPTZ-Fe⁺²) de color azul por la reacción con los antioxidantes. (Thaipong, Kriengsak, 2006; Huang et al., 2005; Prior et al., 2005)

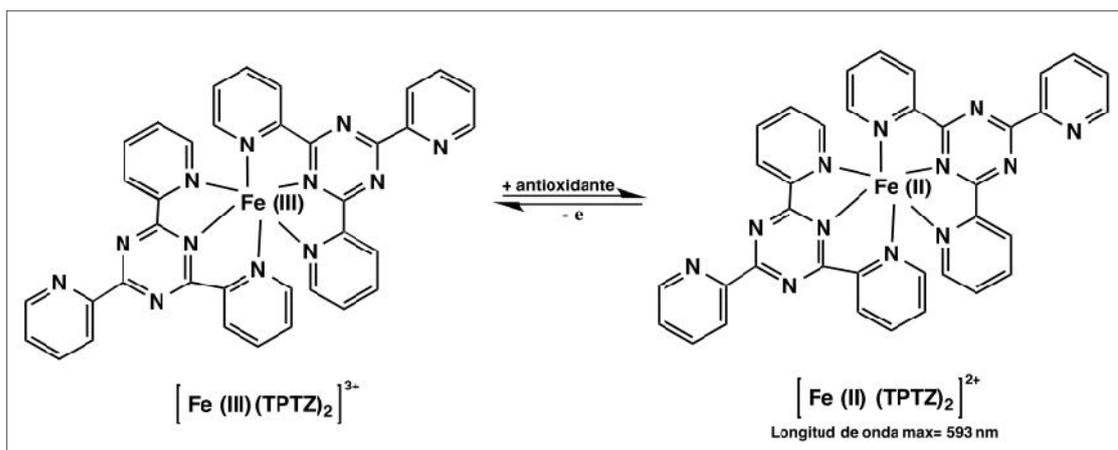


Figura 4: Reacción del ensayo FRAP

Fuente: Huang et al., (2005); Prior et al., (2005)

1.5.3 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Método establecido por Brand-Williams et al. (1995), se basa en la captación de los radicales libres de un extracto, se reduce el catión radical DPPH frente a los antioxidantes del extracto, provocando la decoloración violeta del mismo a un tono amarillo pálido (Thaipong, Kriengsak, 2006). En la **Figura 5** se presenta el proceso de reacción para el método DPPH.

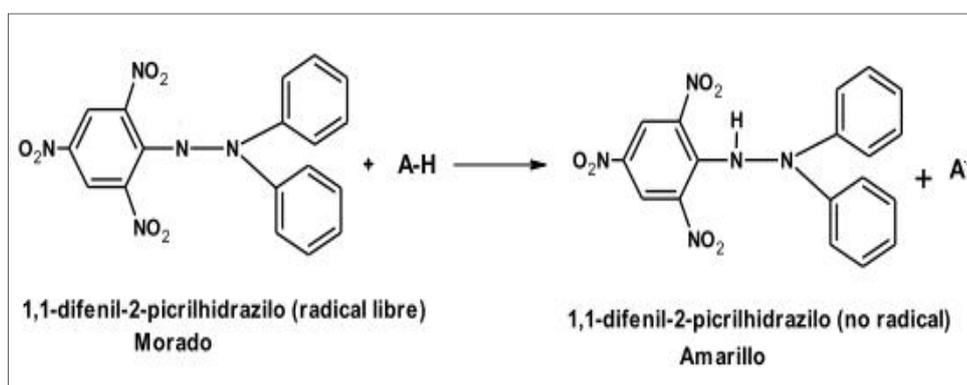


Figura 5: Estructura del DPPH antes y después de reaccionar con el antioxidante el cual dona un átomo de hidrógeno.

Fuente: Alam et al., (2012)

1.5.4 Determinación de fenoles totales.

El ensayo de fenoles totales utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo, mediante un mecanismo de reacción de oxidación/ reducción. Este método se fundamenta en su carácter de reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a un complejo azul, se mide a una absorbancia de 725 nm. En la **Figura 6** se indica la reacción del molibdeno cuando

es reducido y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (VI) y el reductor (Spigno, Tramelli, & Faveri, 2007; Tovar del Rio, 2013).



Figura 6: Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de folin-ciocalteu
Fuente: Huang et al., (2005)

1.6 Optimización de la extracción por medio de un diseño estadístico experimental

La optimización mediante diseño experimental es un método clásico de investigación. La aplicación del diseño tiene como objetivo maximizar la extracción de compuestos antioxidantes y limitar la degradación o alteración de los extractos; por lo cual es vital controlar las variables para obtener una extracción eficiente (Zapata et al., 2014).

El diseño estadístico experimental o también diseño factorial, es el proceso de desarrollo para un experimento en donde obtenemos datos adecuados para luego ser analizados mediante métodos estadísticos que ayuda al experimentador a seleccionar el modelo experimental óptimo (Ferré, 2004), se requiere de un enfoque estadístico del diseño de experimentos para obtener conclusiones significativas a partir de los datos. Esta combinación de técnicas matemáticas y estadísticas ofrecen la posibilidad de clasificar en diferentes niveles, la interacción de las variables dependientes o respuesta, permitiendo al investigador definir el grado de importancia de cada variable y por lo tanto su influencia jerárquica en la respuesta optimizada (Ohene-Afoakwa et al., 2007).

El diseño factorial hace que en cada ensayo tenga réplica completa del experimento permitiendo que se investiguen todas las combinaciones posibles de los niveles con los factores y por tanto, su efecto sobre una respuesta (Montgomery, 2002), los factores toman los valores -1 extremo inferior y +1 extremo superior.

El efecto de un factor se define como el cambio en la variable respuesta por un cambio en el nivel del factor. Los datos obtenidos se los analiza mediante métodos estadísticos para la determinación del análisis de la varianza (ANOVA) y test de diferencia significativa (LSD) con un $p > 0,05$ para comparación de medias en cada una de las variables analizadas (temperatura y relación muestra/solvente) (Zapata, Piedrahita, & Rojano, 2014)

1.6.1 Condiciones de extracción para la optimización.

Las condiciones de extracción tales como la temperatura (°C), relación muestra/solvente (R m/s), tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en mayor medida la estabilidad de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Spigno et al., 2007; Bridgers et al., 2010). Las condiciones ambientales, el estado de madurez de la fruta, variedad de materia prima y ubicación geográfica también influyen en el contenido de compuestos antioxidantes durante la extracción (Bonoli et al., 2004; Hamid et al., 2010; Lim et al., 2007). Trabajar con temperaturas que superen los 60 °C en el agua, puede dar un efecto de degradación sobre fenoles u otros compuestos (Restrepo-Sánchez; Narváez-Cuenca & Restrepo-Sánchez, 2009). Citan algunos estudios relacionados con la optimización que la temperatura es un parámetro fundamental que se debe controlar para evitar la oxidación de compuestos fenólicos y consecuentemente la reducción de los compuestos antioxidante (Spigno et al., 2007; Chew et al., 2011).

El tiempo es otro parámetro fundamental para la extracción, tiempos prolongados podrían causar una disminución en la capacidad antioxidante. El parámetro de relación muestra/solvente es importante considerar ya que al utilizar demasiado muestra podría no existir un contacto por parte del material vegetal y el solvente, lo cual no permitirá una buena extracción quedándose la materia vegetal en las paredes del recipiente (Pérez et al., 2008).

1.7 Cinética de extracción.

El tiempo es un parámetro cinético, que permite obtener la cantidad final de compuestos extraídos. La cinética de extracción se la realiza con la finalidad de minimizar los cambios no deseados en el extracto (evaporación de compuestos termolábiles), disminuir el tiempo de operación y gastos energéticos (Cerón, Higuira, & Cardona, 2011; Urrea, Eim, Roselló, & Simal, 2012).

Investigaciones actuales usan la cinética como parámetro para mejorar el proceso de optimización con respecto al rendimiento del extracto y para encontrar el equilibrio de extracción (Barbero, Palma, & Barroso, 2006; Escobar, 2010; Zapata et al., 2014; Díaz, 2009).

CAPÍTULO 2:
OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Contribuir a la valorización de los subproductos generados en la industria ecuatoriana, favoreciendo su futuro aprovechamiento industrial.

2.2 Objetivo específico

Optimizar los parámetros de extracción de compuestos antioxidantes presentes en el subproducto de tamarindo.

Determinar actividad antioxidante utilizando los métodos: ABTS, DPPH y FRAP.

Cuantificar fenoles totales.

**CAPÍTULO 3:
MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1 Reactivos

Extracción de antioxidantes: metanol (99,9 % PA), acetona (99,9 % PA) proveniente de Panreac Química S.A, agua destilada.

Fenoles totales: Folin-Ciocalteu proveniente de Sigma-Aldrich, carbonato de sodio (ISO) proveniente de Merck, ácido gálico (97,5-102,5 %) proveniente de Sigma, metanol (99,9 % PAI) y etanol absoluto (99,9 % PA) proveniente de Panreac Química S.A.

ABTS: 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (> 98%) proveniente de Sigma, persulfato de potasio (99 % USP) proveniente de Sigma-Aldrich, (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) (97 %) (Trolox) proveniente de Aldrich Chemistry.

FRAP: 2, 4, 6 - tripiridil-s-triazina (< 98%) (TPTZ) proveniente de Sigma, acetato de sodio trihidratado (USP) proveniente de Merck, ácido clorhídrico (37 % PQ) proveniente de Sigma-Aldrich, cloruro férrico hexahidratado (USP) proveniente de Merck.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo proveniente de Sigma, (ácido 6- hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) (97 %) (Trolox) proveniente de Aldrich Chemistry.

3.2 Instrumento y Equipos

- Balanza analítica OHAUS Analytical Plus AP250D
- Baño María Precision Scientific
- Centrífuga CLAY ADAMS® Brand DYNAC 0101® (Becton, Dickinson and Company, MD, USA)
- Espectrofotómetro visible 6400 Jenway®.
- Estufa de tiro forzado Cole Parmer
- Estufa de vacío Lab Companion OV-12
- Micropipetas Thermo Scientific
- Plancha de agitación magnética RO 15 P SIIKA Labortechnik

3.3 Materia prima, preparación y caracterización

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) provino del cantón de Macará; provincia de Loja. Se trabajó con la vena de tamarindo (ver **Figura 7**) para la cual se procedió a separar la fruta por partes: cáscara, pulpa, semilla y vena. La materia prima se redujo a un tamaño de aproximadamente 2 cm (Tasao, 2005). Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas a temperatura de congelación hasta su posterior análisis.



Figura 7: Subproducto de tamarindo; vena
Fuente: La Autora

3.3.1 Determinación del contenido de humedad.

La determinación de humedad se realizó por el método gravimétrico descrito en la AOAC método oficial 934.06 (Asociación Oficial de Agricultura Química, 2005). Previamente se colocaron las cápsulas en la estufa para quitar la humedad del material, luego se pesó 2 g de muestra en la cápsula previamente secada y se llevó a una estufa de vacío a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0,05 MPa, durante 5-6 horas, las muestras se enfriaron por 30 min en un desecador posteriormente se pesó. Después se tomó el peso cada 1 h hasta obtener un peso constante (1 mg de diferencia como mínimo entre peso anterior tomado y el final). Los resultados se obtuvieron por pérdida de peso, expresado como la media \pm desviación estándar de tres réplicas experimentales. Se utilizó la **Ecuación 1** para el calcular la humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

3.4 Obtención de los extractos

3.4.1 Maceración dinámica.

La extracción se la realizó mediante maceración dinámica, utilizando como solvente el agua destilada (H₂O dd) debido a que los extractos se utilizarán posteriormente para la elaboración de ingredientes alimenticios. Al utilizar solventes orgánicos como metanol, etanol o hexano se producen residuos y los extractos pueden experimentar reacciones no deseables (Verma et al., 2008). Se trabajó con un tamaño de muestra de 2 cm ya que según Khan et al., (1998) es el tamaño óptimo para que el material vegetal genere el mayor rendimiento en la obtención de flavonoides (Tsao, 2005), y liberación de antioxidantes ligados a una matriz (Pérez-Jimenez et al., 2008).

Se pesó la muestra: 1,67g/ 50 mL; 2,5 g/ 50 mL; 5,00 g/50 mL (subproducto) para cada ensayo, se llevó agitación magnética por 2 h. La temperatura de extracción fue de 20 °C; 40 °C y 60 °C, luego la muestra fue centrifugada, y se almacenó el sobrenadante a 4 °C hasta su posterior análisis. La metodología se detalla en la **Figura 8**.

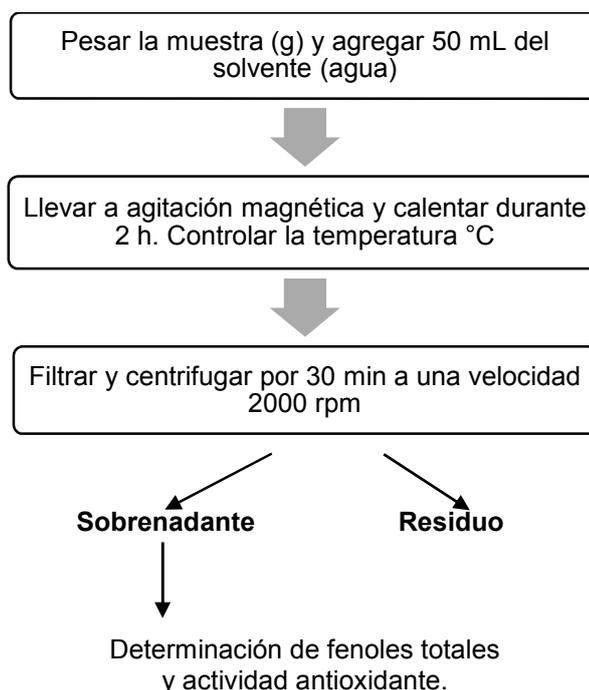


Figura 8. Esquema de extracción de compuestos fenólicos.

Elaboración: La autora

Fuente: La autora

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos de fenoles y capacidad antioxidante en los extractos, se realizó una extracción adicional con el método Pérez-Jimenez & Saura-Calixto, 2007, ya que es el método de referencia de extracción de antioxidantes que utilizan

varios autores. Este extracto se lo denominara extracto control. Este método utiliza una doble extracción usando metanol-agua (50:50 v/v, pH 2) y acetona-agua (70:30 v/v). En el **Anexo F** se detalla la metodología.

Las condiciones de extracción utilizadas en este estudio se detallan en la **Figura 9**.

a. Condiciones de temperatura		
-1	0	1
20 °C	40 °C	60 °C

b. Condiciones de relación muestra/solvente (R m/s)		
-1	0	1
5g /50 mL	2,5 g/50 mL	1,6 7 g/ 50 mL

Figura 9. Condiciones de extracción.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

3.4.2 Diseño experimental.

Para establecer el diseño experimental se empleó el diseño factorial 2^k con 2 factores: temperatura °C y relación muestra/solvente (R m/s) (g/mL) y 4 variables respuestas (fenoles totales y actividad antioxidante: ABTS, FRAP y DPPH) con ayuda del programa estadístico Statgraphic centurión XVII. En total se trabajó con 9 ensayos por publicado dando un total de 18 ensayos descritos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Diseño factorial experimental con valores codificados.

Ensayo	FACTORES	
	Temperatura	Relación muestra/solvente
E1	0	-1
E2	0	1
E3	1	0
E4	1	1
E5	0	0
E6	-1	1
E7	-1	0
E8	1	-1
E9	-1	-1

Fuente: Programa Statgraphic centurión XVII

Elaboración: La autora

3.4.3 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se expresaron como media \pm desviación típica analizados estadísticamente a través del programa Statgraphic centurión XVII, mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó la prueba de Tukey, con un nivel de confianza del 95 % para determinar si existe diferencia significativa entre los diferentes experimentos.

3.5 Cinética de extracción

La cinética se la realizó con la finalidad de comprobar el tiempo de 2 h aplicado inicialmente a los extractos y también para obtener el mejor tiempo de extracción. Este análisis se lo efectuó luego de optimizar los parámetros de temperatura y la relación muestra/solvente, con la finalidad de reducir los costos de operación, reactivos y solventes (Barbero, Palma, & Barroso, 2006; Escobar, 2010 ; Zapata et al., 2014; Díaz, 2009). Se trabajó con 6 tiempos de 30 min hasta 180 min, en intervalos de 30 min. Con el fin de reducir la experimentación se realizó los extractos con las condiciones óptimas de fenoles totales, a estos extractos se les cuantificó la capacidad antioxidante por tres métodos y fenoles totales.

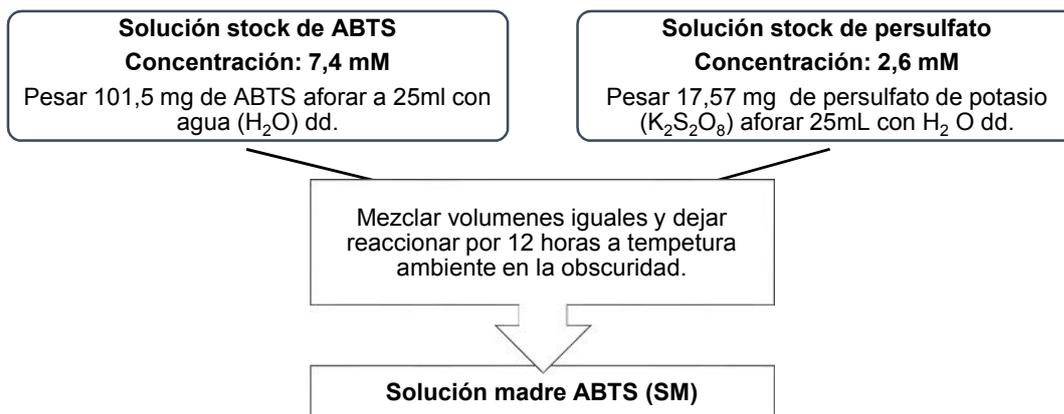
3.6 Determinación de capacidad antioxidante

Se emplearon tres métodos para determinar la actividad antioxidante: ABTS, DPPH y FRAP con la finalidad de evaluar el índice global de compuestos antioxidantes.

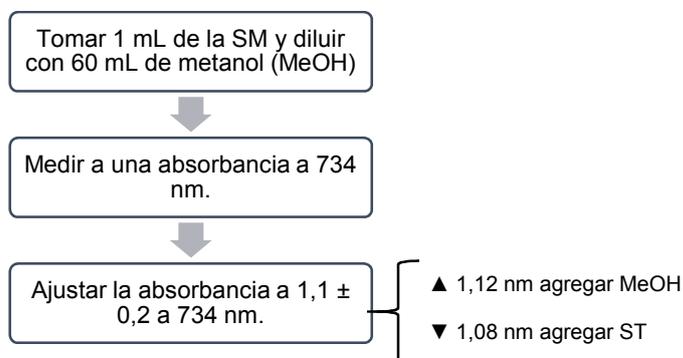
3.6.1 Método de ABTS.

El método se describe en la **Figura 11** y fue establecido por Arnao et al., (2001), con algunas modificaciones detalladas por Thaipong et al., (2006). Para la curva de calibración se utilizó Trolox en concentraciones de 25-600 μmol , la reducción colorimétrica se midió a una absorbancia de 734 nm utilizando el espectrofotómetro UV visible. Los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox/g de base seca. El factor de dilución para los extractos fue de 5.

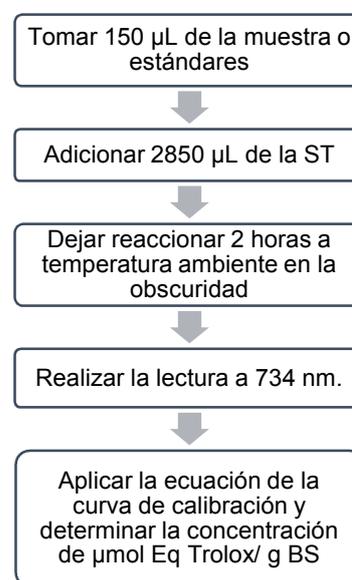
a. Preparación de la solución madre (SM)



b. Preparación de solución trabajo (ST)



d. Preparación para el análisis de muestras y estándares



c. Preparación de la curva de calibración

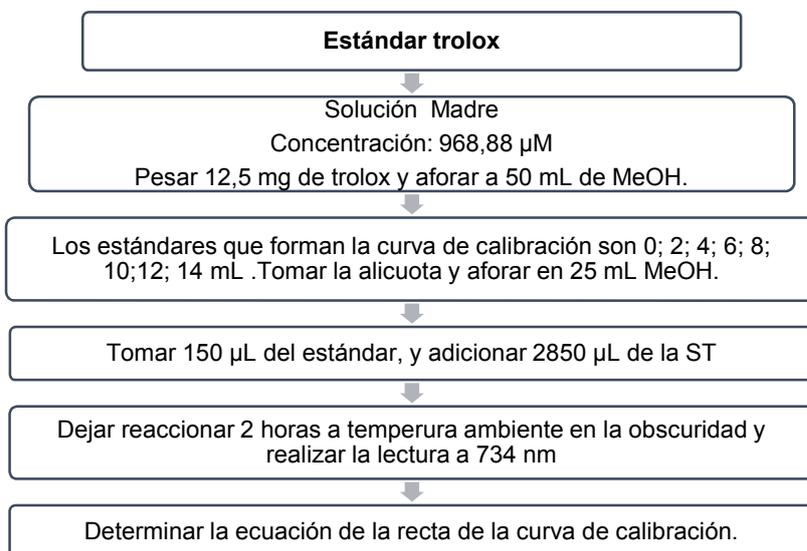


Figura 11: Metodología para cuantificación de la actividad antioxidante por el método de ABTS. **a.** Procedimiento para preparar la solución madre; **b.** Procedimiento para preparar la solución de trabajo; **c.** Preparación de la curva de calibración; **d.** Procedimiento para el análisis de las muestras o estándares.

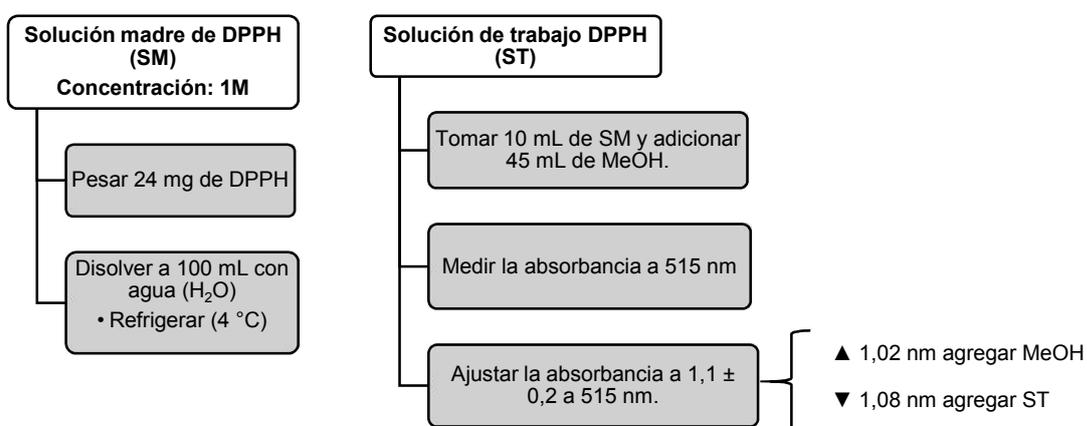
Fuente: Arnao et al., (2001); Thaipong et al., (2006)

Elaboración: La autora

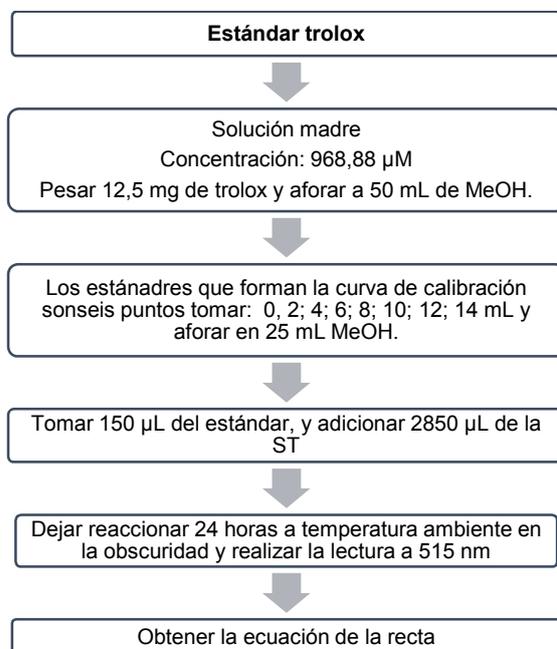
3.6.2 Método de DPPH.

La técnica de Brand-Williams et al., (1995) con modificaciones de Thaipong et al., (2006) mide la capacidad de los antioxidantes en capturar el radical DPPH. Se usó el estándar Trolox para la curva de calibración en concentraciones de 25-800 μmol , la reducción colorimétrica se midió a una absorbancia de 515 nm. Los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox /g de base seca. El factor de dilución para los extractos fue de 5. En la (Figura 12) se detalla el procedimiento aplicado.

a. Procedimiento para preparar la solución: madre y trabajo



b. Preparación de la curva de calibración



c. Lectura de la muestra o estándar

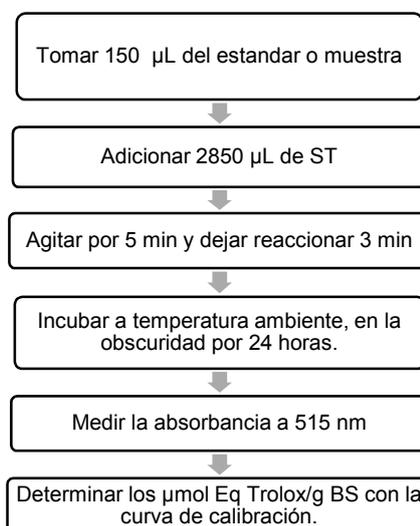


Figura 12: Metodología para determinación de la actividad antioxidante por el Método de DPPH. **a.** Procedimiento para preparar la solución madre y de solución de trabajo; **b.** Preparación de la curva de calibración; **c.** Lectura de la muestra o estándar.

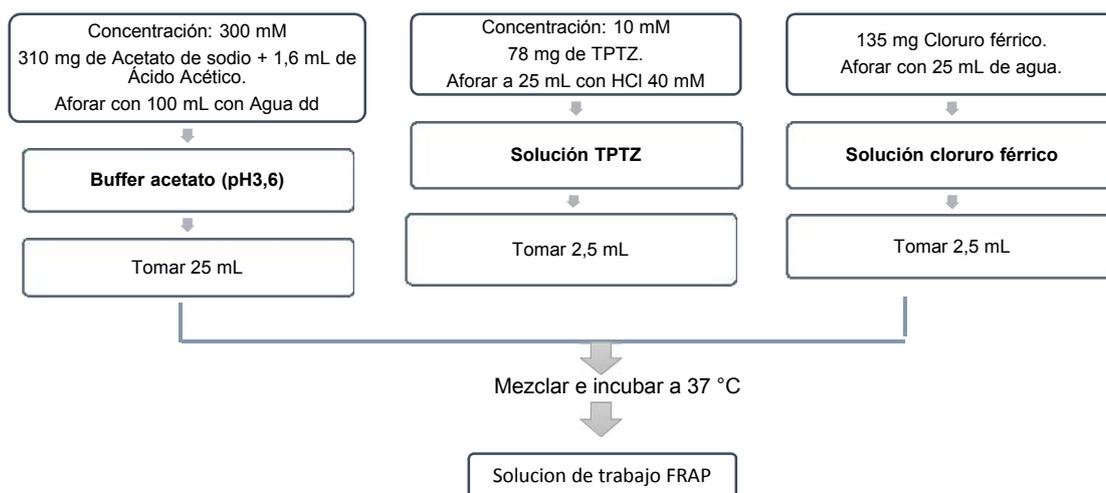
Fuente: Brands-Williand et al., (1995); Thaipong et al., (2006)

Elaboración: La autora

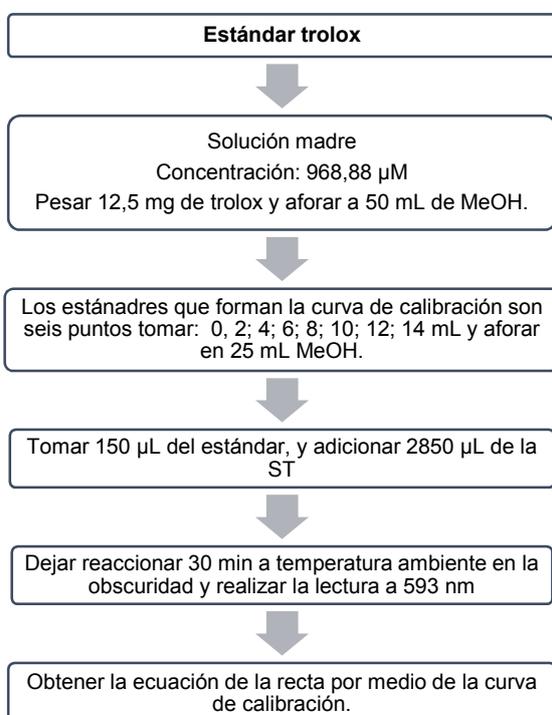
3.6.3 Método de FRAP.

Se utilizó el método descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006), se usó el estándar Trolox para la curva de calibración en concentraciones de 25-800 μmol , y la reducción colorimétrica se midió a una absorbancia de 593 nm, los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox/g de base seca. El factor de dilución para los extractos fue de 5. En la **Figura 13** se detalla el procedimiento aplicado.

a. Procedimiento para preparar la solución de trabajo (ST)



b. Curva de calibración



c. Lectura de las muestras o estándares

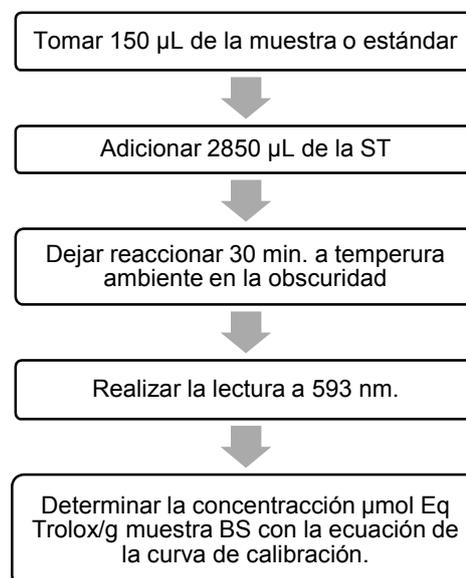


Figura 13: Metodología para determinar la actividad antioxidante por el método de FRAP; **a.** Procedimiento para preparar la solución trabajo; **b.** Curva de calibración; **c.** Lectura de las muestras o estándares.

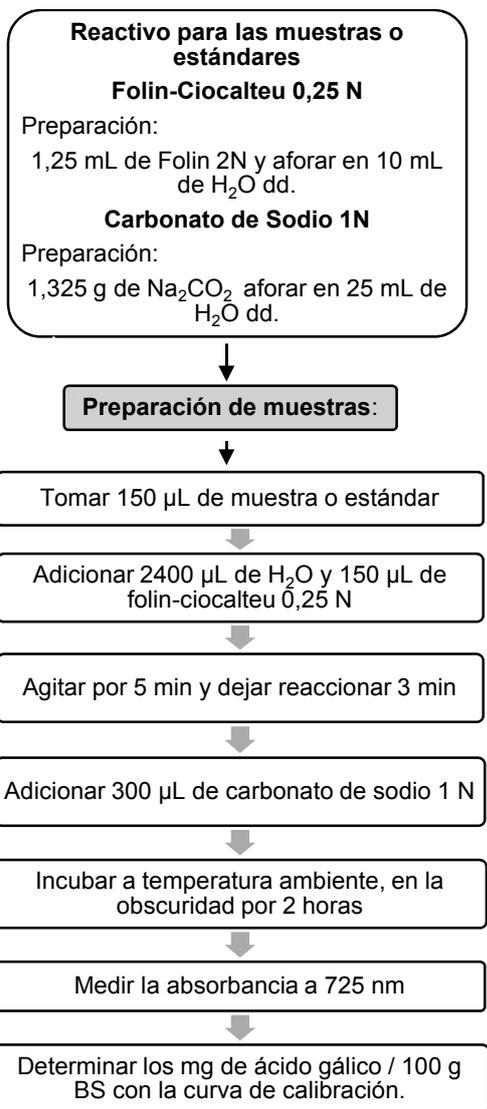
Fuente: Benzie & Stan (1996); Thaipong et al., (2006)

Elaboración: La autora

3.7 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se lo realizó por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, adaptado por Swain y Hillis (1959) y modificado por Thaipong et al., (2006). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra en base húmeda (mg EAG/100 g BH). Para la curva de calibración se utilizó el ácido gálico en concentración de 0-0,1 mg/mL. El factor de dilución para los extractos de subproducto de tamarindo fue de 5; en la (Figura 10) se detalla el método aplicado.

a. Preparación de las muestras o estándares



b. Preparación de la curva de calibración

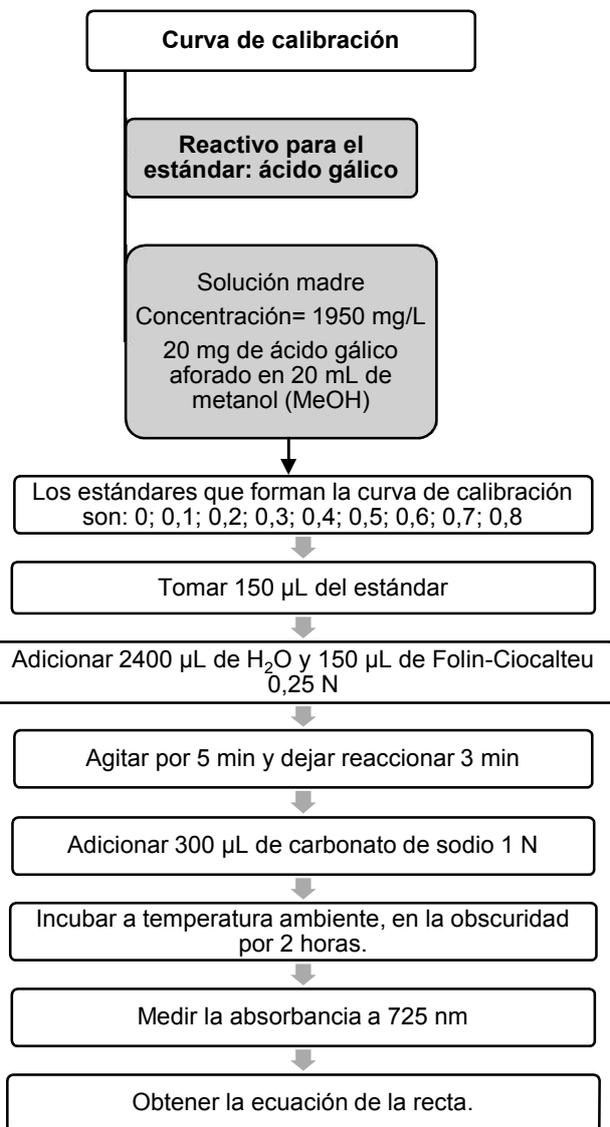


Figura 10: Metodología para determinación de fenoles totales; a. Preparación de las muestras o estándares b. Preparación de la curva de calibración.

Fuente: Thaipong et al., (2007)

Elaboración: La autora

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Extracción por maceración dinámica: Subproducto de tamarindo.

4.1.1 Análisis del diseño experimental.

En la **Tabla 4**, se resalta los valores con mayor extracción de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante, en el caso de fenoles totales y FRAP se observa mayor extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante cuando se trabajó a 20 °C y 1,67 g /50 mL, para DPPH los resultados fueron superiores cuando se trabajó a 40 °C y 1,67 g /50 mL, mientras que para el método ABTS los mejores resultados se obtuvieron cuando se trabajó a 60°C y 2,5 g /50 mL

Tabla 4. Resumen de la cuantificación de la extracción sólido- líquido a diferentes condiciones (Temperatura – Relación muestra/solvente (R m/s)).

Ensayo	*Temperatura	*R m/s	Fenoles totales (mg Eq AG/100g BS)	FRAP (µmol Eq Trolox/g BS)	ABTS (µmol Eq Trolox/g BS)	DPPH (µmol Eq Trolox/g BS)
E1	0	-1	486,70 ± 3,79	21,96 ± 3,52	20,73 ± 0,04	18,09 ± 0,40
E2	0	1	624,37 ± 8,94	24,77 ± 1,52	34,98 ± 1,26	33,57 ± 4,07
E3	1	0	578,30 ± 25,75	27,73 ± 1,32	45,76 ± 12,97	27,76 ± 2,32
E4	1	1	642,72 ± 8,94	31,62 ± 0,89	31,87 ± 0,20	31,79 ± 0,89
E5	0	0	476,20 ± 1,20	18,50 ± 3,23	21,43 ± 0,27	25,13 ± 0,97
E6	-1	1	735,60 ± 5,08	35,43 ± 0,26	27,27 ± 0,27	29,08 ± 0,04
E7	-1	0	279,63 ± 2,22	13,10 ± 0,05	9,69 ± 1,41	13,53 ± 0,44
E8	1	-1	550,24 ± 17,80	31,48 ± 1,63	28,09 ± 0,41	26,84 ± 0,98
E9	-1	-1	376,42 ± 9,80	14,75 ± 2,72	16,37 ± 1,38	14,62 ± 0,79

*Temperatura: -1 = 20 °C; 0 = 40 °C; 1 = 60 °C

*R m/s: -1 = 5 g/50 mL; 0 = 2,5 g/50 mL; 1 = 1,67 g/50 mL

Fuente: La Autora

Elaboración: La autora

4.2 Optimización del método de fenoles totales y actividad antioxidante: ABTS, FRAP y DPPH

4.2.1 Método de fenoles totales.

El diagrama de Pareto evalúa si existe efecto significativo para las variables de estudio. En la **Figura 14.**, se observa que no existe influencia significativa de los factores hacia la variable respuesta fenoles totales. La ecuación obtenida fue cuadrática y se observa en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Ecuación de cuadrática de la variable respuesta fenoles totales.

Respuesta	Ecuación cuadrática
Fenoles totales mg Eq AG/100g BS	Fenoles totales = 445,999 + 63,2686*Temperatura + 98,2204*Relación m:s - 1,93654*Temperatura^2 - 66,6738*Temperatura*Relación m:s + 124,634*Relación m:s^2

Fuente: Programa Statgraphic centurion XVII

Elaboración: La autora

La **Figura 14** también indica los parámetros óptimos de temperatura y relación muestra/solvente. Bajo las condiciones de optimización se obtuvo el valor teórico de 670,35 mg Eq AG/100g BS.

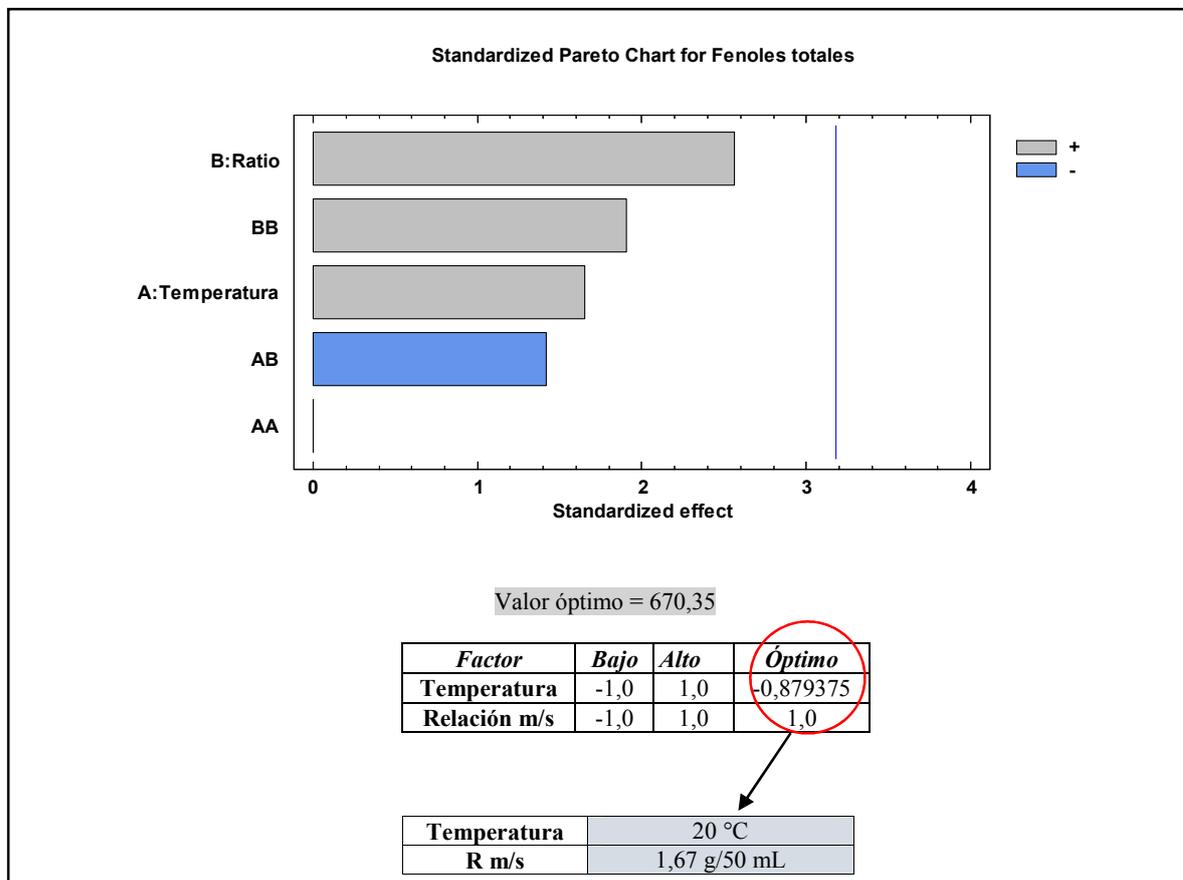
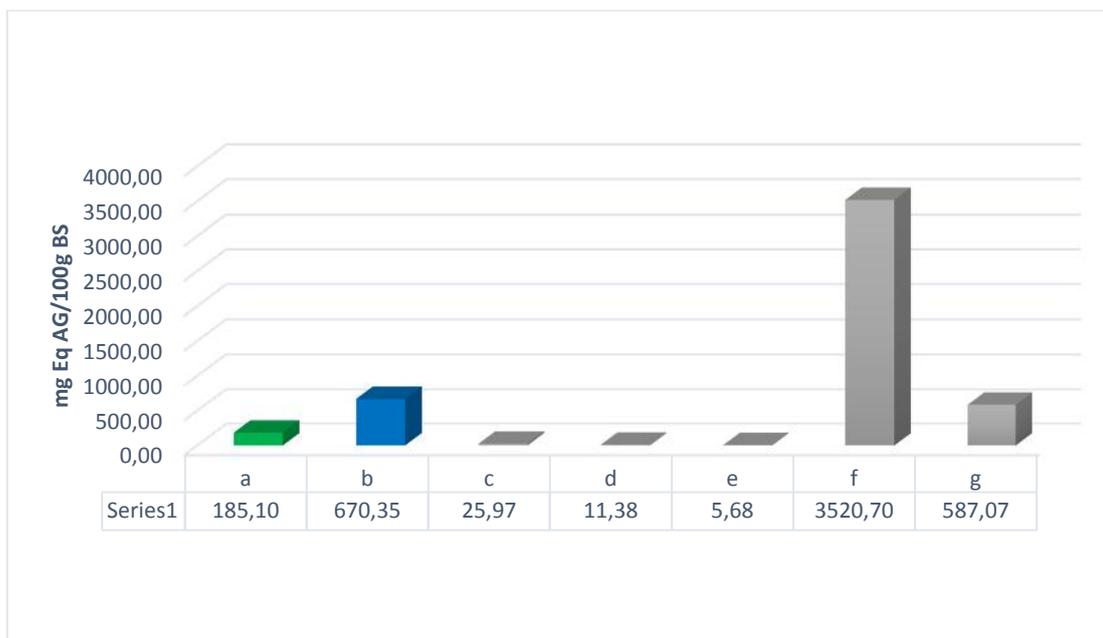


Figura 14. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para fenoles totales
Fuente: Programa Statgraphic XVII

En la **Grafica 1**, se compara el valor teórico de 605,27 mg Eq AG/100 g BS frente al extracto control de 185,10 mg Eq AG/100 g BS realizado a la vena del subproducto de tamarindo utilizando la metodología de Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, (2007). Al analizar el contenido de fenoles totales de estos 2 resultados, podemos decir que al usar como solvente de extracción agua es cuatro veces más que al usar otro solvente como metanol o acetona, es decir el subproducto está formado en su mayoría de compuestos antioxidantes de naturaleza polar.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con diferentes subproductos de frutos cítricos en la **Grafica 1** se puede observar valores inferiores para la cáscara de limón (5,68 mg Eq AG/100 g BS) y cáscara de toronja (11,38 mg Eq AG/100 g BS). Además se observa que el subproducto de tamarindo tiene mayor cantidad de fenoles totales al compararlo con las hojas del mismo fruto (25,97 mg Eq AG/100 g BS). Subproductos como la

piel de mango (3520,70 mg EAG/100 g BS) y guayaba (587,07 mg EAG/100 g BS) poseen valores superiores a la vena del tamarindo.

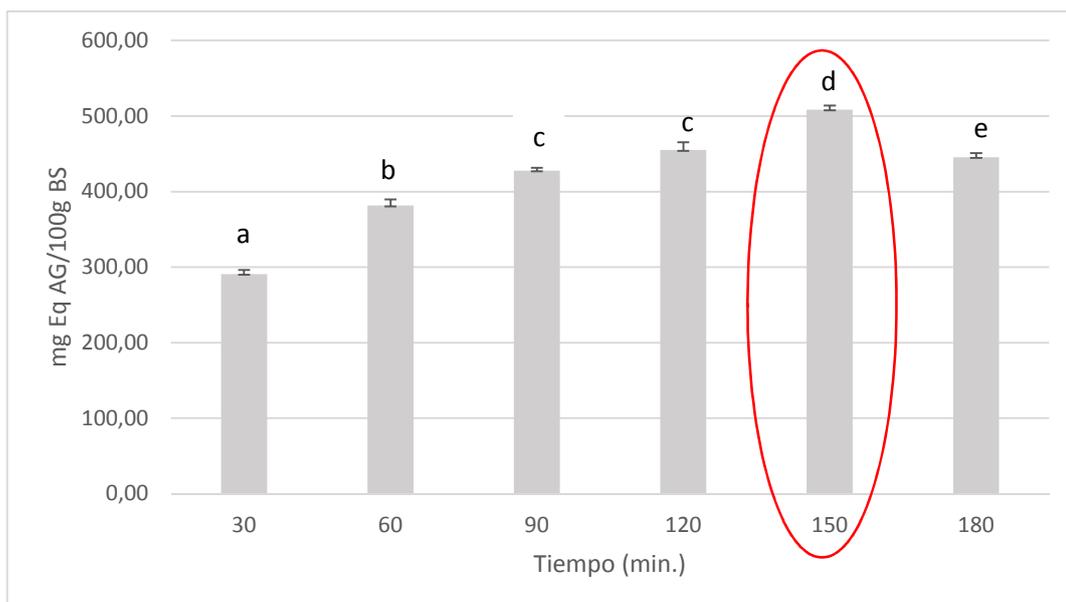


a) Extracto control vena de tamarindo; **b)** Extracto de vena de tamarindo; **c)** Extracto de etanol 75% v/v en hojas de tamarindo; **d)** Extracto de etanólico 80% v/v en cáscara de toronja; **d)** Extracto de etanólico 80% v/v en cáscara de limón; **e)** Extracto de etanol/agua en piel de mango; **f)** Extracto de acetona/agua en piel de guayaba rosada

Grafica 1. Comparación de la concentración de fenoles totales en diferentes subproductos de frutas.
Fuente: **a,b)** La autora; **c)** Escalona-Arranz et al., (2011); **d,e)** Escobar, (2010); **f)** Ortega, (2015); **g)** Jimenez-Escrig et al., (2001);
Elaboración: La autora.

4.2.1.1 Cinética de extracción.

Se detalla gráficamente (ver **Grafica 2.**) el comportamiento cinético del proceso de extracción por maceración dinámica para el método de fenoles totales.



*Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Grafica 2: Comportamiento cinético del proceso de extracción por maceración dinámica para el método: Fenoles totales.

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

En la **Grafica 2** se puede observar que el mayor valor obtenido de fenoles totales fue a 150 min. Entre 150 min y 180 min existe diferencia significativa, lo cual se puede deber a la degradación de los compuestos orgánicos por mayor exposición de los antioxidantes frente a la luz y oxígeno (Silva, 2012).

4.2.2 Optimización para el método ABTS.

La **Figura 15** podemos observar que no existe efecto significativo de las variables estudiadas hacia la variable respuesta ABTS. El modelo matemático se presenta en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Ecuación cuadrática de la variable respuesta ABTS.

Respuesta	Ecuación cuadrática
ABTS μmol Eq Trolox / g BS	$ABTS = 25,093 + 8,72873*Temperatura + 4,82053*Relación\ m:s + 0,797123*Temperatura^2 - 1,78248*Temperatura*Relación\ m:s + 0,925662*Relación\ m:s^2$

Fuente: Programa Statgraphic centurion XVII

Elaboración: La autora

En la **Figura 15**, se indica la temperatura y R m/s óptimas obtenidas para ABTS. El valor teórico obtenido 38,58 μmol Eq Trolox/g BS bajo las condiciones de optimización.

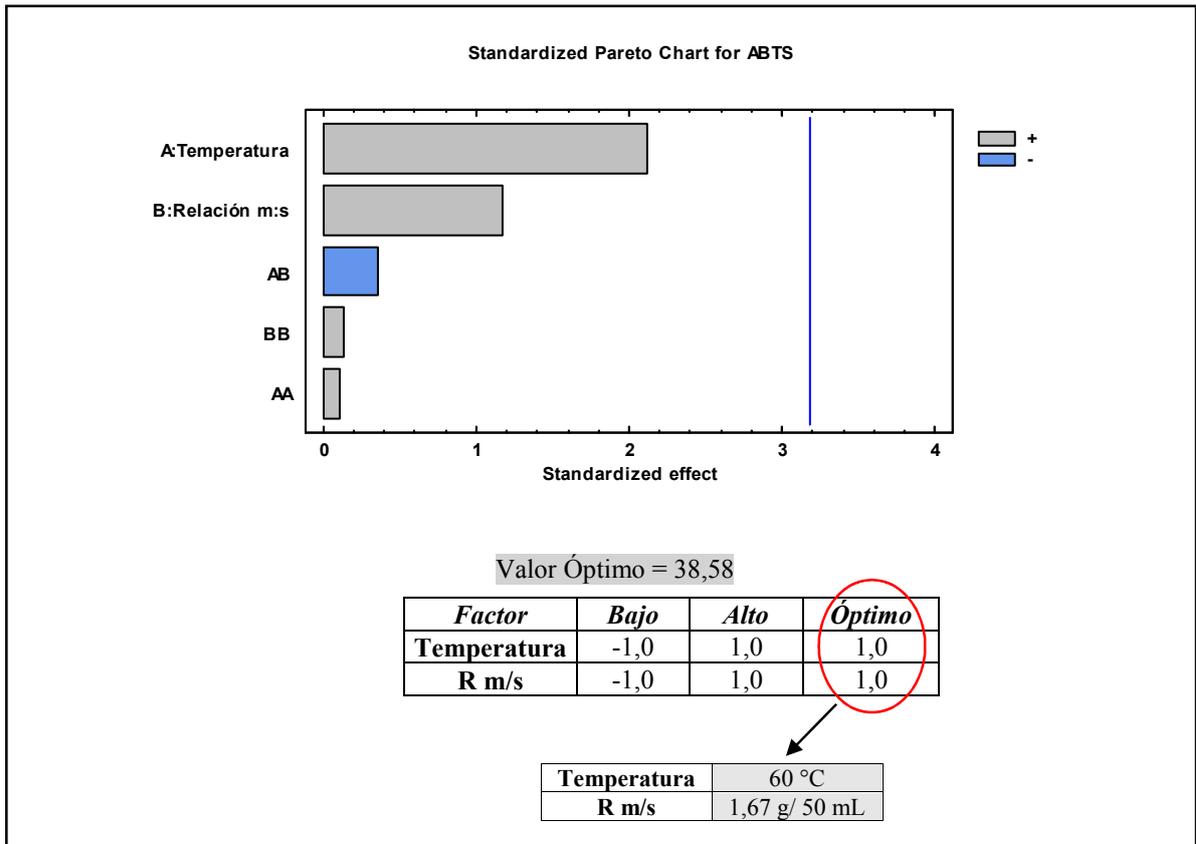
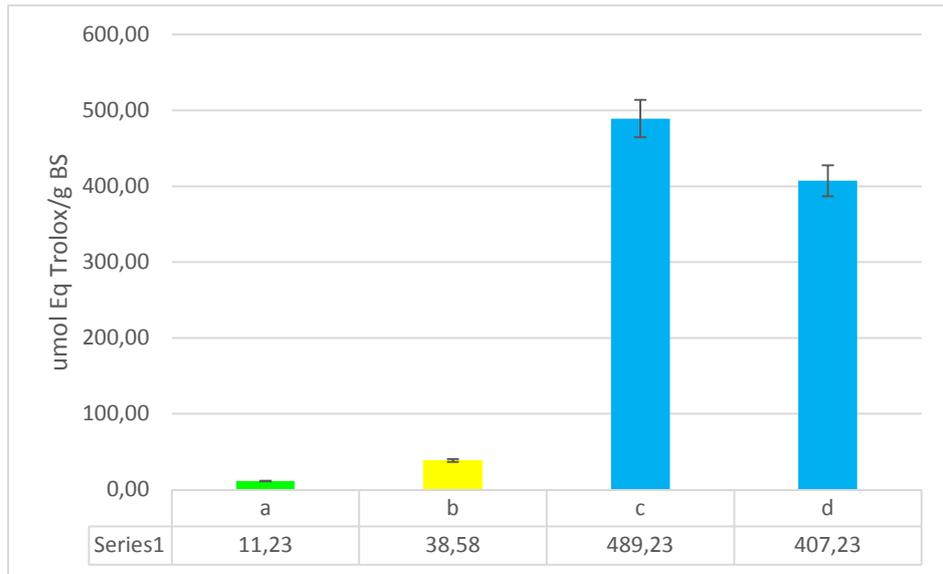


Figura 15. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para ABTS
Fuente: Programa Statgraphic XVII

En la **Grafica 3** se observa que el valor teórico 38,58 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ del método desarrollado en este estudio frente a un extracto control de la vena de tamarindo 11,23 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ posee un valor superior en capacidad antioxidante por el método ABTS. Con lo cual podemos decir que la extracción de los compuestos antioxidante de la vena de tamarindo está influenciada por las condiciones de extracción como temperatura y solvente utilizado. Comparando el subproducto de tamarindo 38,58 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ con subproductos de orujos de uva 489,23 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ y mango 489,23 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$, podemos observar un valor superior para estos subproductos.



a) Extracto control vena de tamarindo; **b)** Extracto vena de tamarindo; **c)** Extracto de etanol / agua en piel de mango; **d)** Extracto de agua/etanol en subproducto de orujo de uva (piel y semilla)

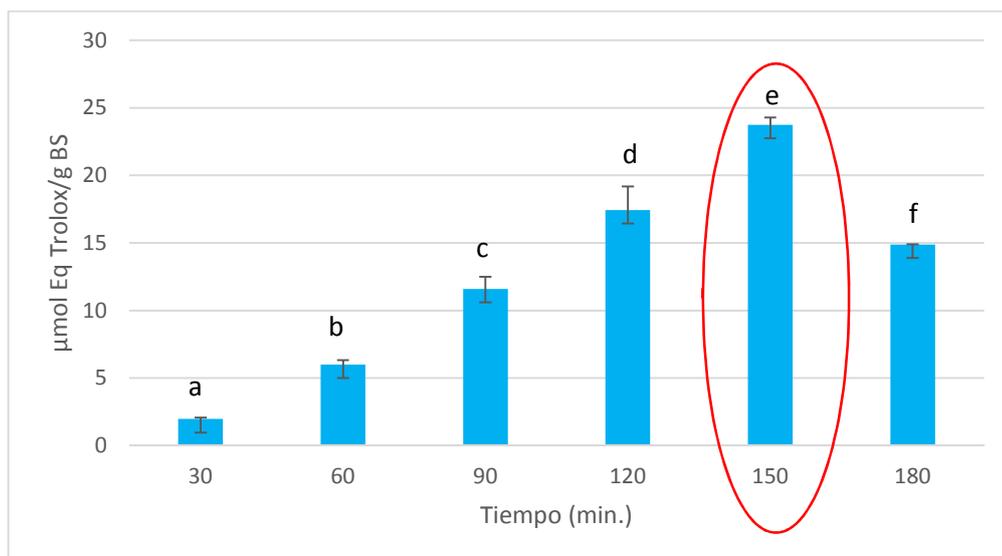
Grafica 3. Comparación de la actividad antioxidante: método ABTS en diferentes subproductos

Fuente: a,b) La autora; c) Ortega, (2015); d) Sánchez-Alonso et al., (2008).

Elaboración: La autora

4.3.2.1 Cinética de extracción.

Se detalla gráficamente (**Grafica 4**) el comportamiento cinético del proceso de extracción para el método de ABTS.



*Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Grafica 4: Comportamiento cinético del proceso de extracción por maceración dinámica para el método de: ABTS.

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

La cinética de extracción permitió obtener el mejor tiempo de extracción, en la **Grafica 4** se observa que al minuto 150 existe una mayor cuantificación de la actividad antioxidante 23.74 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$. El comportamiento de la cinética nos revela que los tratamientos de extracción no deben ser a tiempos prolongados, es decir superiores a 150 min, ya que podrían disminuir la capacidad antioxidante (Pérez et al., 2008).

4.3.3 Optimización para el método de DPPH.

En el diagrama de Pareto de la **Figura 16.**, se puede observar que existe efecto significativo para relación m/s sobre la variable respuesta DPPH. En la **Tabla 7** se indica la ecuación cuadrática obtenida.

Tabla 7. Ecuación de cuadrática de la variable respuesta DPPH

Respuesta	Ecuación cuadrática
DPPH $\mu\text{mol Eq Trolox / g BS}$	$\text{DPPH} = 23,2469 + 4,85955 * \text{Temperatura} + 5,81651 * \text{Relación m:s} - 1,65951 * \text{Temperatura}^2 - 2,3782 * \text{Temperatura} * \text{Relación m:s} + 3,52725 * \text{Relación m:s}^2$

Fuente: Programa Statgraphic centurión XVII

Elaboración: La autora

Las condiciones óptimas de temperatura y relación muestra/ solvente (R m/s) se indican en la **Figura 16** así como también el valor óptimo teórico.

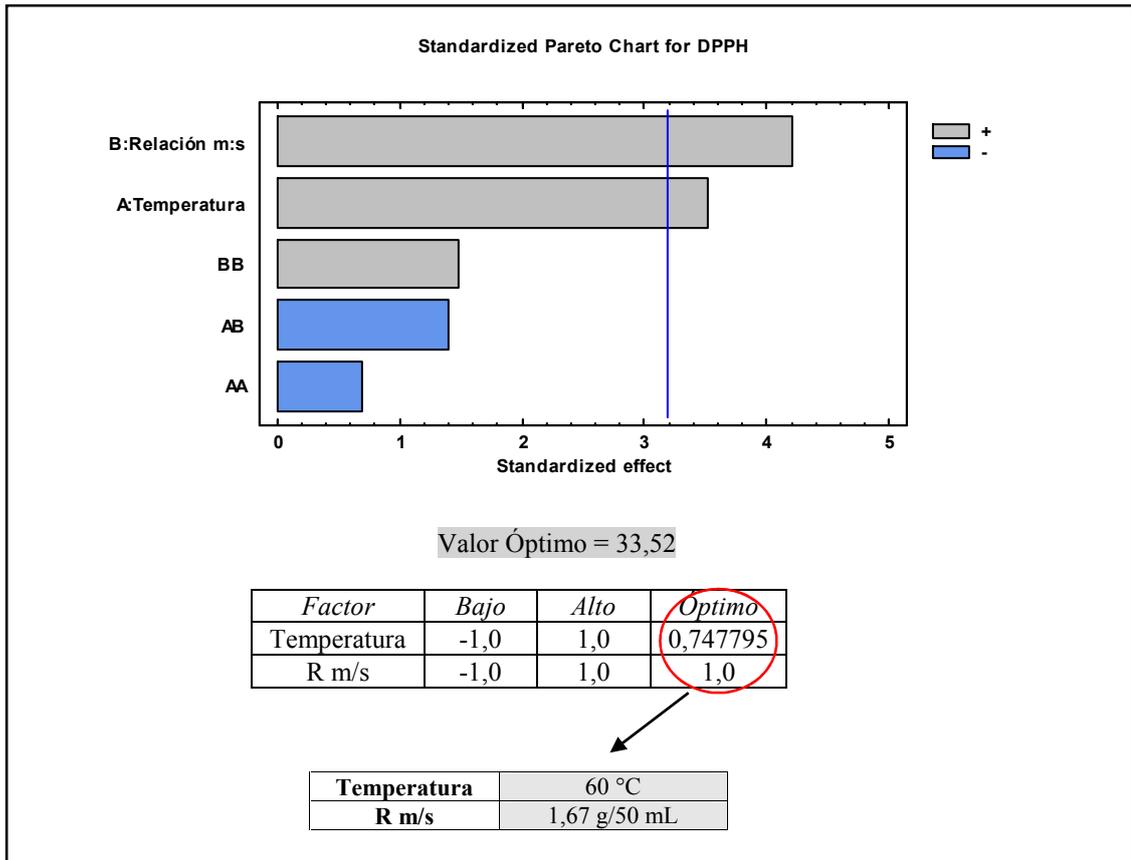
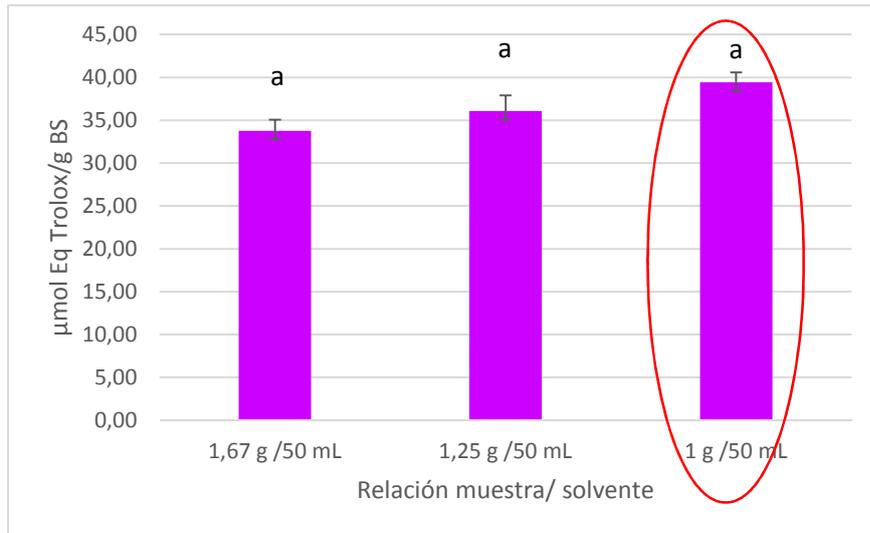


Figura 16. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para DPPH
Fuente: Programa Minitab 16

Al analizar el efecto de las variables en la **Figura 16** se puede mencionar que al aumentar la temperatura y la R m/s existe un aumento significativo de antioxidantes. Debido a que la R m/s se encuentra en el extremo superior (1,67 g/50 mL), se realizó pruebas con valores superiores de R m/s (1,67 g/50 mL; 1,25 g/50 mL; 1 g/50 mL). En la **Gráfica 5**, se pudo observar que no existe diferencia significativa en cada ensayo por lo cual se eligió el parámetro con mayor cantidad de sólidos totales 1 g/50 mL, ya que el extracto será usado posteriormente para la obtención de ingredientes alimenticios mediante el proceso de atomización.



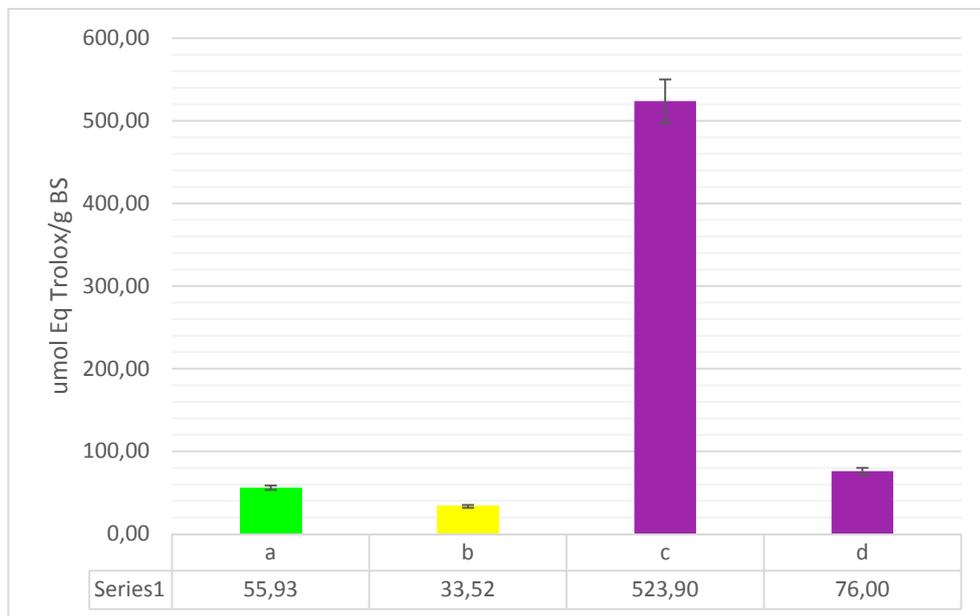
*Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Grafica 5. Ajuste de la relación m/s para DPPH

Fuente: La autora

Elaboración: La autora.

Se muestra en la **Grafica 6**, que el valor teórico 33,52 µmol Eq Trolox/g BS obtenido frente al extracto control 55,93 µmol Eq Trolox/g BS, posee menor cantidad de actividad antioxidante. Subproducto de mango y capulí, poseen valores superiores al de nuestro estudio.



a) Extracto control vena de tamarindo; **b)** Extracto vena de tamarindo; **c)** Extracto de metanol/ agua; Subproducto de mango (piel); **d)** Extracto de etanol; Subproducto de capulí (piel)

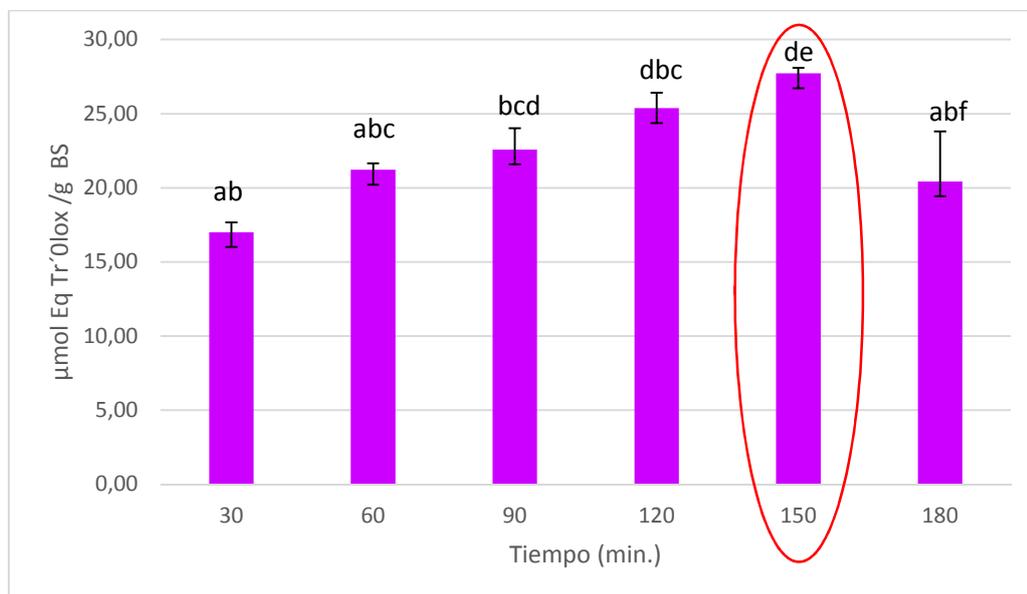
Grafica 6. Comparación de la concentración de la actividad antioxidante: Método DPPH; se indica diferencia significativa para cada muestra de diferentes subproductos de frutas.

Fuente: a,b) La autora; c) Ortega, (2015); d) Espinal & Restrepo, (2010)

Elaboración: La autora

4.3.3.1 Cinética de extracción.

En la **Grafica 7** el comportamiento cinético para el método de DPPH.



*Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Grafica 7. Comportamiento cinético del proceso de extracción por maceración dinámica para DPPH.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

La cinética permitió obtener el mejor tiempo de extracción, en la **Grafica 4**, se indica que al minuto 150 existe una mayor cuantificación de la actividad antioxidante 27,71 μmol Eq Trolox/g BS a diferencia de otros tiempos de extracción donde tenemos menor comportamiento cinético.

4.4.4 Optimización del método FRAP.

La **Figura 16** indica que no existe efecto significativo para la R m/s. Los parámetros de extracción obtenidos fueron cuadráticos y se muestran en la ecuación la **Tabla 8**.

Tabla 8. Ecuación cuadrática de la variable respuesta FRAP

Respuesta	Ecuación cuadrática
FRAP μmol Eq Trolox / g BS	FRAP = 17,1473 + 4,59026*Temperatura + 3,93757*Relación m:s + 3,94111*Temperatura ² - 5,13418*Temperatura*Relación m:s + 6,89034*Relación m:s ²

Fuente: Programa Statgraphic centurion XVII

Elaboración: La autora

La **Figura 17**, nos muestra la temperatura y la relación muestra / solvente (R m/s) óptima para la extracción. El valor teórico obtenido fue 33,77 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$

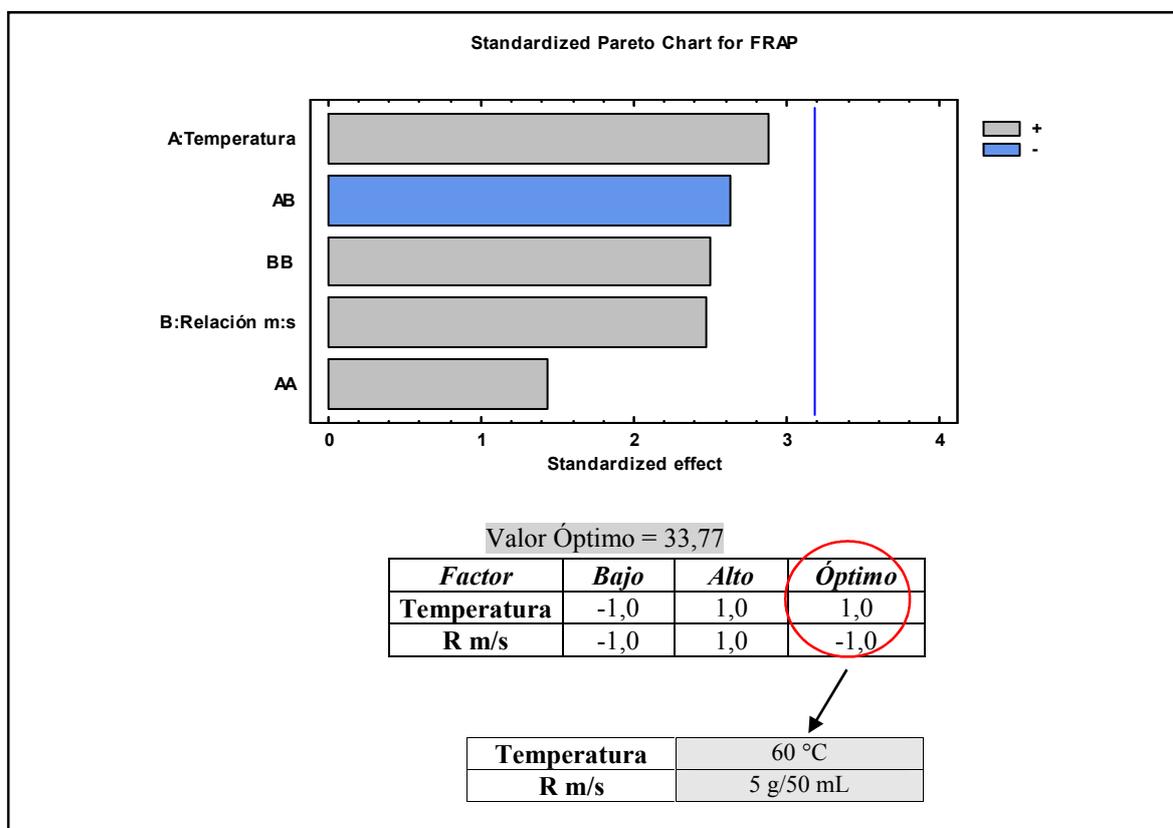
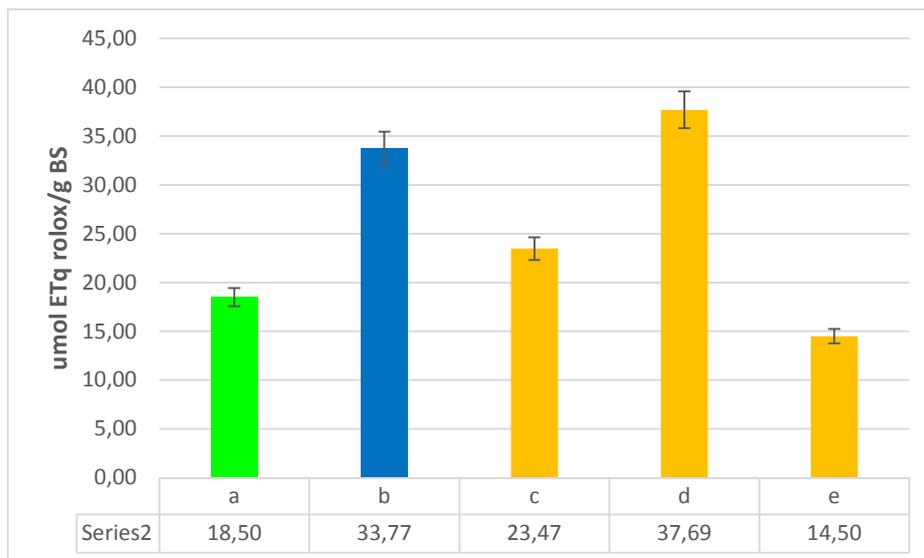


Figura 17. Diagrama de pareto y condiciones óptimas para FRAP

Fuente: Programa Statgraphic centurión XVII

Elaboración: La autora

En la **Grafica 8**, podemos observar que el valor teórico es superior a los valores del extracto control. Además la gráfica indica que el subproducto de tamarindo tiene valores superiores a los diferentes subproductos de mango conformados por corteza y residuos de pulpa adheridos a la piel del mango y piel y pulpa, pero contiene valores inferiores a la piel de mango.



Extracto control vena de tamarindo; **b)** Extracto vena de tamarindo; **c)** Extracto de etanol/agua en subproducto de mango: corteza y residuos de pulpa adheridos a la piel del mango; **d)** Extracto de metanol/agua en subproducto de mango: piel; **e)** Extracto de metanol/acetona en subproducto de mango piel y pulpa.

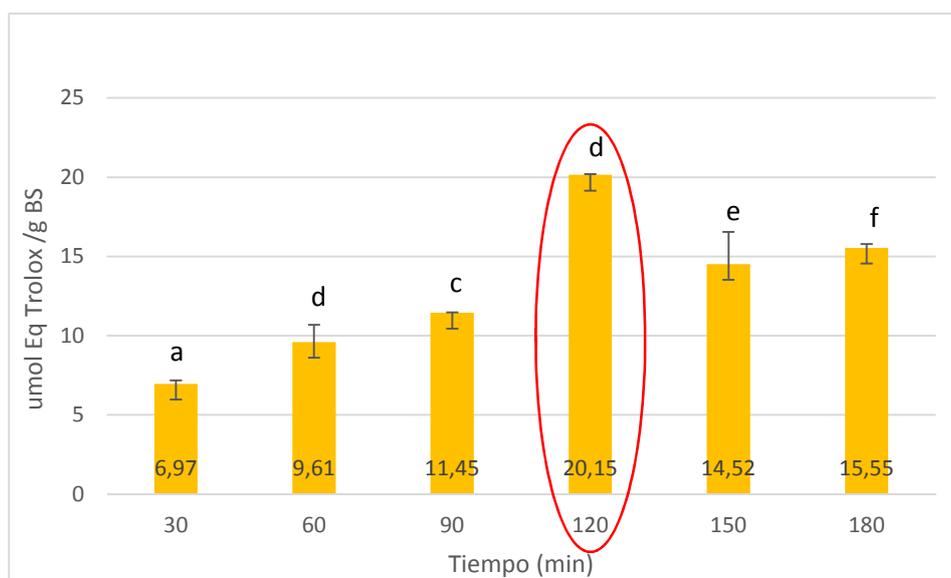
Grafica 8. Comparación de la actividad antioxidante: método FRAP; se indica diferencia significativa para cada muestra de y diferentes subproductos de frutas.

Fuente: a,b) La autora; c) Vintimilla, (2013); d) Martínez et al., (2012); e) Días, (2011)

Elaboración: La autora

4.4.4.1 Cinética de extracción.

Se detalla gráficamente (ver **Grafica 9**) la cinética de extracción.



*Letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Grafica 9. Cinética de extracción para el método de FRAP.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

La cinética permitió obtener el mejor tiempo de extracción, en la **Grafica 9** se observa que a los 120 min existe una mayor cuantificación de la actividad antioxidante 20,15 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ a diferencia de otros tiempos de extracción donde existe menor comportamiento cinético.

Según la clasificación de Marethe et al. (2011), valores superiores a 200 mg EAG / 100 g para fenoles totales y 12 $\mu\text{mol Eq Trolox/ g}$ para capacidad antioxidante se consideran como alto contenido, todos nuestros resultados son superiores a estos valores por lo tanto nuestro subproducto puede ser considerado con alto contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.

Finalmente debido a que las condiciones óptimas obtenidas para cada método fueron diferentes, se decidió establecer una sola condición de extracción, para lo cual se utilizó las ecuaciones cuadrática 1, 2, 3 y 4 de cada método (**Tabla 9**). Se reemplazó cada una de las condiciones óptimas de los métodos en cada ecuación, permitiendo estimar la cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante que se obtendrá del subproducto de tamarindo. En la **Tabla 9** se puede observar que en el caso de los métodos ABTS y FRAP, los valores más cercanos al óptimo se obtuvieron al utilizar las condiciones de fenoles totales; en el caso de método DPPH, el valor más alto se obtuvo al utilizar las condiciones óptimas de FRAP pero muy cercano al valor obtenido al reemplazar las condiciones de fenoles totales. Por lo tanto se eligió las condiciones óptimas de fenoles totales temperatura: 20 °C y relación muestra/solvente: 1,67 g/50 mL.

Tabla 9. Análisis de la ecuación.

<p>Ecuación 1 fenoles totales = $445,999 + 63,2686 \cdot \text{Temperatura} + 98,2204 \cdot \text{Relación m:s} - 1,93654 \cdot \text{Temperatura}^2 - 66,6738 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación m:s} + 124,634 \cdot \text{Relación m:s}^2$</p> <p>Ecuación 2 ABTS = $25,093 + 8,72873 \cdot \text{Temperatura} + 4,82053 \cdot \text{Relación m:s} + 0,797123 \cdot \text{Temperatura}^2 - 1,78248 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación m:s} + 0,925662 \cdot \text{Relación m:s}^2$</p> <p>Ecuación 3 DPPH = $23,2469 + 4,85955 \cdot \text{Temperatura} + 5,81651 \cdot \text{Relación m:s} - 1,65951 \cdot \text{Temperatura}^2 - 2,3782 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación m:s} + 3,52725 \cdot \text{Relación m:s}^2$</p> <p>Ecuación 4 FRAP = $17,1473 + 4,59026 \cdot \text{Temperatura} + 3,93757 \cdot \text{Relación m:s} + 3,94111 \cdot \text{Temperatura}^2 - 5,13418 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación m:s} + 6,89034 \cdot \text{Relación m:s}^2$</p>											
Datos de la Ecuación Fenoles totales mg Eq AG/100g BS			Datos de la Ecuación ABTS $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$			Datos de la Ecuación FRAP $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$			Datos de la Ecuación DPPH $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$		
Valor		% Dif.	Valor		% Dif.	Valor		% Dif.	Valor		% Dif.
Teórico	605,27	-	Teórico	31,65	-	Teórico	32,61	-	Teórico	34,61	-
Óptimo	670,35	-	Óptimo	38,58	-	Óptimo	33,77	-	Óptimo	33,52	-
FRAP	600,42	10,43	FT	41,75	8,21	FT	31,50	6,71	FT	29,13	24,50
ABTS	663,51	1,02	FRAP	15,05	61,00	ABTS	31,37	7,09	ABTS	26,54	13,39

DPPH	665,27	0,76	DPPH	38,69	0,27	DPPH	29,73	11,95	FRAP	33,41	31,22
-------------	--------	------	-------------	-------	------	-------------	-------	-------	-------------	-------	-------

Fuente: Programa Statgraphic centurion 16.

Elaboración: La autora

5. CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó las condiciones óptimas para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidantes. Para fenoles totales fueron: temperatura 20°C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL; para ABTS temperatura 60°C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL; para FRAP temperatura 60°C y relación muestra/solvente 5 g/50 mL y para DPPH temperatura 60°C y relación muestra/solvente 1,67 g/50 mL.
- ✓ El subproducto de tamarindo se puede considerar como una fuente de antioxidantes ya que se obtuvieron valores altos para capacidad antioxidante para los tres métodos: FRAP 33,77 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$; ABTS 38,58 $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ y DPPH 33,52 $\mu\text{mol Eq Trolox/g BS}$ y valores altos para fenoles totales 670,35 mg EAG/100g BS.
- ✓ El método desarrollado extrae cuatro veces más de compuestos fenólicos, en referencia a otros métodos de extracción para subproducto de tamarindo.
- ✓ La cinética permitió establecer el mejor tiempo de extracción por maceración dinámica para fenoles totales y capacidad antioxidante. Para los métodos de fenoles totales, ABTS y DPPH el tiempo determinado fue de 150 min y para FRAP 120 min.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda realizar la identificación de los compuestos antioxidantes presentes en el subproducto de tamarindo mediante HPLC., este ensayo es importante para los diferentes campos científicos como farmacéuticos y alimentarios etc.
- ✓ Determinar los valores obtenidos del subproducto de tamarindo (vena) frente a la pulpa de tamarindo, para valorar el aporte de compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes.
- ✓ Realizar el análisis sensorial del extracto, si se lo utiliza como posible uso de ingrediente para la industria alimenticia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Arranz, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid
2. Askar, S.E.; El-Nemr & Siliha, H. (1987). *Aroma constituents of Egyptian tamarind pulp*. Deut. Lebensmut. Rundsch. (83):108-110.
3. Arnao, M.; Cano, A.; Acosta, M. (2001). *The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity*. Food Chemistry. 73, 239- 244.
4. Alam, M.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. (2012). *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. Saudi Pharmaceutical Journal, 21: 143-52. 2012
5. AOAC. Association of Official Agricultural Chemists, US. (2005). Official methods of analysis of AOAC International. 18° edición.
6. Bridgers, E.N.; Chinn, M.S.; Truong, V.D.; (2010). *Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars*. Industrial: Crops and Product. 32 (3): 613-620.
7. Barahona, P.; Cardona, K.; Rodríguez-Orellana, A. L. (1995). *Aprovechamiento del extracto de Tamarindus indica L. en la obtención de preparados de uso dermatológico*. Universidad Salvadoreña Dr. Alberto Masferrer (USAM): Facultad de Química-Farmacia y Biología.
8. Barbero, G. F; Palma, M. & Barroso, C. G. (2006). *Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Analytica Chimica Acta, 578(2), 227–233. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.074>
9. Benzie, I.; Strain, J. (1996). *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay*. Analytical Biochemistry. 239(0292): 70-76.
10. Bonoli, M.; Verardo, V.; Marconi, E. & Carboni, M.F. (2004). *Antioxidant phenols in barley (Hordeum vulgare L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds*. Journal of Agricultural and food chemistry, 52, 5195-5200.
11. Bustos-Hipólito, E.; Legorreta-Siañez, A.; González-González, L.; Jorfe, A.; Arena-Huertero, F.; García-Gil, F. & Buenrostro-Zagal, J. (2012). *Efecto de la extracción de los compuestos antioxidantes de la cáscara de manzana con solventes, sobre la bioactividad y su capacidad antioxidante*. Investigación Universitaria

- Multidisciplinaria, 11, 123–130. Retrieved from file:///E:/Downloads/Dialnet-EfectoDeLaExtraccionDeLosCompuestosAntioxidantesDe-4281255 (4).pdf
12. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
 13. Chew, K. M.; Khoo, S. Ng; Thoo, W.; Wan Aida, C. Ho (2011). *Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus extracts. International. Food Research Journal*. 18(4):1427-1435.
 14. CONABIO. (2013). *Ficha Técnica Tamarindus indica*. Species Plantarum, (1753), 91–95.
 15. Cerón, I.; Higuita, J. & Cardona, C. (2010). *Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina*. Vector, 5, 17-26.
 16. Diario el Universo. (2015). Recuperado el 22 de Septiembre de 2015 de: <http://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/216042-rentabilidad-del-tamarindo-seduce/>
 17. Días, A. (2011). *Pulpa de café: Coffea arabica L: como fuente alternativa de antioxidantes*. Universidad Técnica Particular de Loja.
 18. Escalona, A.J.C.; Pérez, R.R.; Licea, J.I.; Rodríguez, A.J.R.; Argota-Coello, H.; Cañizares-Lay, J. et al. (2010). *Chemical constituents of Tamarindus indica L. leaves*. Rev Cubana Quím. 23(3);65-71
 19. Escalona, J. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de Tamarindus indica L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria*. Universida de Oriente de Cuba.
 20. Escalona-Arranz, J. C.; Rodríguez-Amado, J.; Pérez-Rosés, R.; Cañizares-Lay, J.; Sierra-González, G.; Morris-Quevedo, H. & Licea-Jiménez, I. (2011). *Metabolites extraction optimization in Tamarindus indica L. leaves*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas, 10(4), 369–378. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80051491327&partnerID=40&md5=b38a088d983d8c4cf216eb4fa6d53e62>
 21. Escobar, M. (2010). *Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México*. Instituto Politécnico Nacional - México.
 22. Escudero, J. (2008). *Estudio e investigación de la fruta de tamarindo (Tamarindus indica L.) y propuesta gastronómica*. Universidad Tecnológica Equinoccial.

23. Estrada, A. Alejandro, M; & Palomares, S. (2010). *Galletas de tamarindo (Tamarindus indica L.)*. UNACAR TECNOCENCIA (161), 16–22. <http://doi.org/10.3109/13880209209053984>
24. FAO. Food and Agriculture organization of United Nations. (2003). Tablas nutricionales de América Latina (Latin foods 1997).
25. FAO. Food and Agriculture organization of United Nations. (2013). *Fichas técnicas: Procesados de frutas*. Retrieved January 31, 2016,
26. Ferré, J. (2004). *El diseño factorial completo 2k*. Técnicas de Laboratorio, 1–10.
27. Garrido, I.; Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; & Bartolomé, B. (2007). *Extracción de antioxidantes a partir de subproductos del procesado de la almendra*. Rev. Grasas y Aceites, 58(2), 130–135.
28. Gonzáles, D. (2013). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal*. México
29. Gunasena, L.; Hughes, A. (2000). *Tamarindo: Tamarindus indica L. International centre for underutilized*. Crops. Printed at Redwood Books. U.S.A. 170 p.
30. Gabrielson, J.; Lindberg, N.; Lundtedt, T. (2002). *Multivariate methods in pharmaceutical applications*. J Chemiometric 16: 141 – 160
31. Girard, B.; Mazza G. (1998). *Functional grape and citrus products*. In: Mazza G. *Functional Foods, Biochemical and Processing*. Technomic Publishing Company (ed), Pensilvania. pp 155- 178.
32. Huang, D., Ou, Boxin. & Pior, Ronald., L. (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(6), 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
33. INIFAP. (2006). *Ficha tecnológica: Sistema de producción de tamarindo con plantas injertadas*.
34. Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. (2001). *Guava fruit (Psidium guajava L.) as a new source of antioxidant dietary fiber*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 49 (11), 5489-5493. doi:10.1021/jf010147p
35. Kuskoski, E.K; Asuero, A.; Troncoso, A.; Fett, R. (2006). *Comparación de Métodos en la Determinación de la Actividad Antioxidante de pulpa de frutos congelados*. Schironia. Pag. 17-19. Brasil.
36. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. (2010). *A review of the antioxidant potential of medicinal plant species*. Food and Bioproducts Processing, In Press, Corrected Proof.

37. Marín, FR.; Soler-Rivas, C.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Pérez-Álvarez J.A. (2007). *By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres*. Food Chemistry. 100(2): 736-741.
38. Marethe, S.A., et al (2019). Comparative study on antioxidants activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. Food and Chemical Toxicology, 49(9). 2005-2012.
39. Murray, R.; Granner, K.; Mayes, T; Peter, A.; Rowell, V.W. (2008). Bioquímica de Harper, Editorial Manual Moderno, 12^o edición. Argentina
40. Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M.; Figueroa, J. & Pérez-Álvarez, J. (2012) *Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate*. Food Chemistry. Pag 1520-1536. Vol 153.
41. Montgomery, D.C. (2002). *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2da edición. Editorial Limusa, S.A. Balderas, México D.F.
42. Olivares, D. et al. (2010). *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo*. Investigación Y Ciencia, 50(1), 1665–4412.
43. Ortega, N. (2015). *Evaluación de antioxidantes provenientes de subproducto de mango en galletas*. Universidad Técnica Particular de Loja.
44. Orozco, S.M. (2005). *Tecnología para el manejo integrado de barrenadores del fruto del tamarindo*. Ficha de tecnología para el Catálogo Nacional. INIFAP - Campo Experimental Tecomán, Colima. Tecomán, Colima, México. Pp. 71-72
45. Proecuador. (2013). Recuperado el 22 de Septiembre de 2015 de: <http://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/frutas-no-tradicionales/>
46. Padilla, F. C.; Rincón, A. M. & Bou-Rached, L. (2008). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 58(3), 303–308.
47. Pérez, D. & Bárcenas, E. (2010). *Aprovechamiento integral de la vaina del tamarindo (Tamarindo indica L.)*.
48. Pérez, E. (2014). *Propiedades tecno-funcionales de subproducto de mandarina variedad: King*. Universidad Técnica Particular de Loja.
49. Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2007). *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*. V Congreso Iberoamericano de Tecnología postcosecha y agroexportaciones, 2007, 1150–1160.

50. Pérez-Nájera, V. et al. (2013). *Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (citrus limetta risso) y determinación de su actividad antioxidante*. Biotecnia. México Df.
51. Pérez, J. S.; Arranz, M.; Tabernero, M.; Díaz, J.; Serrano, I.; Goñi, S. & Saura, F. (2008). *Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results*. Food Research International. 41: 274–285.
52. Pengelly, B.; Maas, B. (2001). *Lablab purpureus (L.) Sweet – diversity, potential use and determination of a core collection of this multi-purpose tropical legume*. Genetic Resources and Crop Evolution. 48(3):261-272.
53. Pior, R.; Wu, X. & Schaich, K. (2005). *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290-4202. doi:10.1021/jf0502698
54. Restrepo-Sánchez, D., Narváez-Cuenca, C., & Restrepo-Sánchez, L. (2009). *Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia*. Quin Nova, 32(6), 1517–1522.
55. Rojas, X. (2014). *Valoración de los subproductos de mango (Mangifera indica L.) y guayaba (Psidium guajava L.) como fuente de fibra dietaria y antioxidante*. Universidad Técnica Particular de Loja.
56. Rosso, A., & Said, T. (2011). *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*. Universidad Industrial de Santader.
57. Restrepo, D.; Narváez, C. & Restrepo, L. (2009). *Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Satander*. Quim Nova. Vol 32. Bogotá-Colombia.
58. Rojas, D.; Narváez, E. & Restrepo, L. (2008). *Evaluación del contenido de vitamina C, Fenoles totales y Actividad antioxidante en pulpa de guayaba (Psidium guajava L.) de las variedades pera: regional roja y regional blanca*. Red-Alfa Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena.
59. Swain, T. & Hillis, W. E. (1959). *The phenolic constituents of Prunus domestica I. The quantitative analysis of phenolic constituents*. Journal of the Sience of Food and Agriculture, 10(1), 63-68. doi:10.1002/jsfa.2740100110
60. Spigno, G. L; Tramelli, D. & De Faveri, M. (2007). *Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics*. Journal. Food Engineering. 81: 200-208.

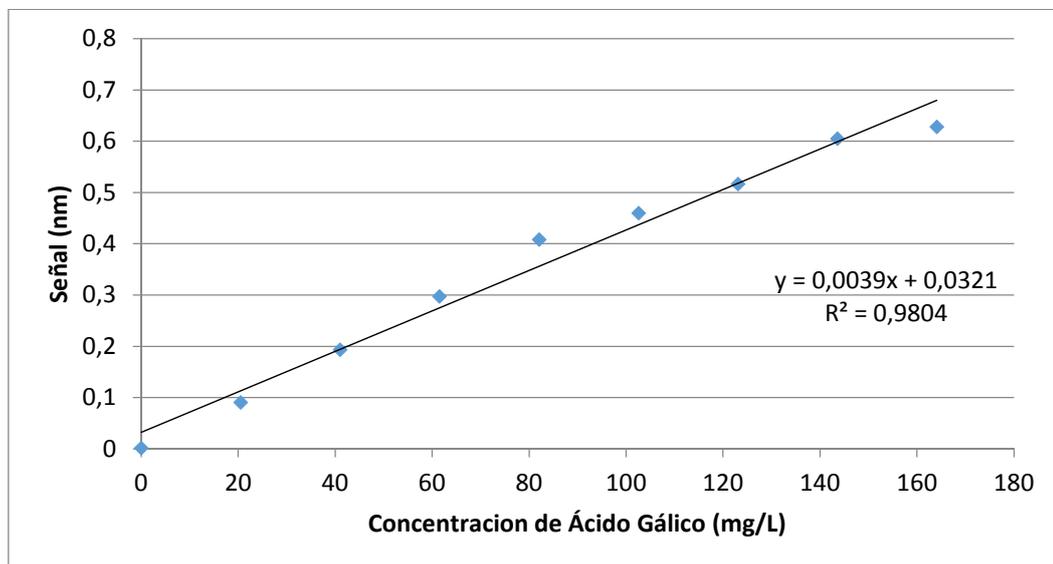
61. Silva, R. & Lucatero, S. (2006). *Diagnóstico de la Cadena del Sistema Producto Tamarindo (Tamarindos indica L.), en el Estado de Colima*. Colima. México Df: Universidad de Colima.
62. Silva, S. (2012). *Optimización del proceso de extracción supercrítica de los polifenoles de la vaina de tara (Caesalpinia spinosa)*. Universidad De Chile. Universidad de Chile.
63. Soto, C. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chíá*. Universidad de Chile.
64. Sotomayor, M. (2015). *Valoración de la actividad antioxidante de los subproductos de naranja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
65. Spigno, G.; Tramelli, L. & Faveri, D. M. (2007). *Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics*. 81, 200–208. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
66. Thaipong, K. et al. (2006). *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. Journal of Food Composition and Analysis, 19(6–7), 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
67. Tovar del Rio, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco-región cafetera*.
68. Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovie, E. (2005). *Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple*. J. Agric. Food Chem. 53, 4989-4995.
69. Uurrea, D.; Eim, V., Roselló, C.; & Simal, S. (2012). *Modelos cinéticos de degradación de carotenoides, polifenoles y actividad antioxidante durante el secado convectivo de zanahoria (Daucus carota V. Nantesa)*. Alimentos Hoy, 21(27), 68–101.
70. Venereo, J. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Revista Cubana de Medicina Militar, 31(2), 126–133.
71. Vintimilla, M. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango*. Universidad Técnica Particular de Loja.
72. Wong, K.C.; Tan, C.P.; Chow, C.H. & Chee, S.G. (1998). *Volatile constituents of the fruit of Tamarindus indica L.* J. Essent. Oil Res. 10:219-221
73. Yepes, S. M.; Johana, L.; Naranjo, M. & Sánchez, F. O. (2008). *Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del valle del Aburrá*. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellin, 61(1), 4422–4431.

- 74.** Zuleta, A.; Esteve, M.; Frigola, A. (2009). *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products*. Food Chemistry, 114: 310-316
- 75.** Zapata, L.; Heredia, A.; Quinteros, C. & Malleret, A., Clemente, G., & Cárcel, J. (2014). *Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos*. Ciencia Docencia Y Tecnología, 25, 166–192.
- 76.** Zapata, S.; Piedrahita, A. M.; & Rojano, B. (2014). *Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia*. Perspectivas Nutrición Humana, 16, 25–36.

8. ANEXOS

Anexo A: Cuantificación de fenoles totales. Método Folin-Ciocalteu.

a. Curva de calibración



<i>w</i> (g) Acido Gálico	PM g/mol	Riqueza %	Aforo mL	Concentración Madre mg/L
0,02	170,12	97,5	10	1950 L
Alicuota mL	Aforo mL	Concentración de ácido gálico mg/L	Absorbancia nm	
0	10	0,0	0,002	
0,1	10	19,50	0,091	
0,2	10	39,00	0,194	
0,3	10	58,50	0,298	
0,4	10	78,00	0,409	
0,5	10	97,50	0,460	
0,6	10	117,00	0,517	
0,7	10	136,50	0,605	
0,8	10	156,00	0,629	
Pendiente	0,0039			
Intercepto	0,0321			
R²	0,9804			

b. Cuantificación de fenoles totales

N° Muestra	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extractos mL	% H; Humedad	% ST; Solidos Totales	FD	Alícuota para			Abs. (nm)	Concentración				SD	Cv	
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL		mg/L	mg Eq AG/100g BH	mg Eq AG/100g BS	PROM			
M1	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,201	42,89	641,69	644,84	732,00	735,60	5,08	0,69
D1	1,67								0,203	43,40	648,00		739,19			
M2	1,67								0,175	36,22	541,80	547,34	618,05	624,37	8,94	1,43
D2	1,67								0,178	36,98	552,88		630,69			
M3	2,52								0,227	49,39	490,99	506,95	560,09	578,30	25,75	4,45
D3	2,52								0,240	52,77	522,91		596,51			
M4	2,50								0,128	24,39	243,75	245,13	278,05	279,62	2,22	0,79
D4	2,53								0,131	24,99	246,50		281,20			
M5	2,53								0,234	51,08	504,98	417,45	576,04	476,20	141,2	29,65
D5	2,51								0,163	33,09	329,92		376,35			
M6	5,00								0,422	98,72	493,39	482,36	562,83	550,24	17,8	3,24
D6	5,05								0,408	95,17	471,32		537,65			
M7	1,67								0,180	37,49	560,73	563,42	639,65	642,72	4,34	0,68
D7	1,67								0,181	37,82	566,12		645,79			
M8	5,08								0,307	69,58	342,29	329,98	390,46	376,42	19,85	5,27
D8	5,05								0,285	64,17	317,68		362,39			
M9	5,07								0,372	86,05	424,31	426,65	484,02	486,70	3,79	0,78
D9	5,03								0,373	86,30	429,00		489,37			

M: Muestra

D: Duplicado de la muestra

c. Cinética de extracción

Tiempo min.	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extracto mL	% H; Humedad	% ST; Solidos Totales	FD	Alícuota para			Abs nm	Concentración				SD	CV
						Dilución mL	Volumen total	Alícuota mL		mg/L	mg Eq AG/100g BH	mg Eq AG/100g BS	PROM		
30	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,103	17,27	258,31	294,67	290,99	5,21	1,79
D 30	1,67								0,101	16,83	251,86	287,3			
60	1,67								0,129	22,7	339,47	387,25	381,51	8,12	2,13
D 60	1,67								0,126	22,06	329,41	375,77			
90	1,67								0,139	24,92	372,83	425,3	427,87	3,63	0,85
D 90	1,67								0,140	25,21	377,33	430,44			
120	1,67								0,145	26,28	392,7	447,97	455,13	10,14	2,23
D 120	1,67								0,149	27,14	405,26	462,3			
150	1,67								0,163	30,00	449,16	512,38	508,50	5,48	1,08
D 150	1,67								0,161	29,58	442,36	504,62			
180	1,67								0,143	25,86	387,02	441,49	445,49	5,65	1,27
D 180	1,67								0,146	26,36	394,03	449,48			

D: Duplicado de la muestra

d. Análisis estadístico de la Cinética

Análisis de la varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	581,97	290,99	27,15
Fila 2	2	763,02	381,51	65,90
Fila 3	2	855,74	427,87	13,18
Fila 4	2	910,26	455,13	102,73
Fila 5	2	1017,00	508,50	30,08
Fila 6	2	890,97	445,48	31,92
Columna 1	6	2509,05	418,18	5313,08
Columna 2	6	2509,91	418,32	5895,19

Análisis de la varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	55770,42	5	11154,08	205,86	0,00	5,05
Columnas	0,06	1	0,06	0,00	0,97	6,61
Error	270,91	5	54,18			
Total	56041,39	11				

LSD 3,16 6,01 19,01

TIEMPO		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
PROMEDIO		290,99	381,51	427,87	455,13	508,50	445,48
30 min	290,99	0,00	90,52	136,89	164,15	217,51	154,50
60 min	381,51	90,52	0,00	46,36	381,51	126,99	63,97
90 min	427,87	136,89	46,36	0,00	27,26	80,63	17,61
120 min	455,13	164,15	73,62	27,26	0,00	53,37	9,65
150 min	508,50	217,51	126,99	508,50	53,37	0,00	63,01
180 min	445,48	154,50	63,97	418,22	9,65	63,01	0,00

30 min es diferente estadísticamente para 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

60 min es diferente estadísticamente para 30 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

90 min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 120 min, 150 min y 180 min.

150 min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 180 min.

120 min no es diferente estadísticamente para 180 min

180 min no es diferente estadísticamente para y 120 min.

*Se eligió de manera arbitrariamente el tiempo óptimo siendo 150 min

e. Cálculos para determinar la concentración de las Soluciones

Solución Madre

Para conocer la concentración de la solución madre de nuestro estándar de Ácido gálico, se aplicó la siguiente fórmula.

$$C_{o_{SM}} \frac{m * p}{v} = \frac{0,020g * 0,975}{10mL} = 1,95 * 10^{-3} \text{ g/ml}$$

$$C_{o_{SM}} = 1950 \text{ mg/L}$$

Donde:

- Co_{SM}: Concentración de la Solución madre
- p: % pureza del Ácido Gálico
- v: Volumen de dilución del Ácido Gálico (mL)
- m: cantidad de Ácido Gálico (mg)

El volumen obtenido de la solución madre de ácido Gálico es 1950mg/L, este valor permitirá calcular los volúmenes de los estándares.

Preparación de estándares:

La concentración de los diferentes estándares dada por la siguiente ecuación.

$$C_{o_{SM}} * V_{SM} = C_{o_{st}} * V_{st}$$

Donde:

- Co_{SM}: Concentración de solución madre (mg/L)
- V_{SM}: Volumen de la solución madre
- Co_{st}: Concentración del estándar (mg/L)
- V_{st}: Volumen del estándar

Despejo:

$$C_{o_{st}} = \frac{C_{o_{SM}} * V_{SM}}{V_{st}}$$

Ejemplo:

Si tomamos el valor de la alícuota 0,1 (mL) de la solución madre y se lo afora a un volumen de 10 mL, se tendrá una concentración del estándar de:

$$C_{ost} = \frac{1950 \frac{mg}{L} * 0,1mL}{10mL} = 19,5 mg/L$$

f. Cálculos para la determinación de la concentración

La concentración expresada en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra, se realizó mediante un retroceso, el cual partimos desde la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

$$y = mx + b$$

Donde:

y= absorbancia (nm)

m= pendiente

x= Concentración (Co)

b= Intersección

Despejamos la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Ejemplo, se reemplaza los valores de la pendiente e intercepción de la curva de calibración, y la primera absorbancia de la muestra 1; teniendo así:

$$C_o = \frac{\textit{Absorbancia} - \textit{Intersección}}{\textit{Pendiente}}$$

$$C_o = \frac{0,201 - 0,0321}{0,0039} = \frac{mg}{L}$$

$$C_o = 42,89 \frac{mg}{L}$$

Esta concentración está dada en litros de solución, nuestra muestra fue diluida en un volumen final de 5 mL, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 42,89 \text{ mg/L} & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} 1000 \text{ mL} \\ 5 \text{ mL} \end{array} \\ X & & \end{array}$$

$$=0,21 \text{ mg}$$

De la dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL del volumen total de sobrenadante, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 0,21 \text{ mg} & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} 1 \text{ mL} \\ 50 \text{ mL} \end{array} \\ X & & \end{array}$$

$$=10,72 \text{ mg}$$

El valor encontrado equivale a la cantidad de muestra pesada, reportada por gramos:

$$\begin{array}{ccc} 10,72 \text{ mg} & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} 1,67 \text{ g} \\ 100 \text{ g} \end{array} \\ X & & \end{array}$$

$$= 641,69 \text{ mg Eq AG/ 100g BH}$$

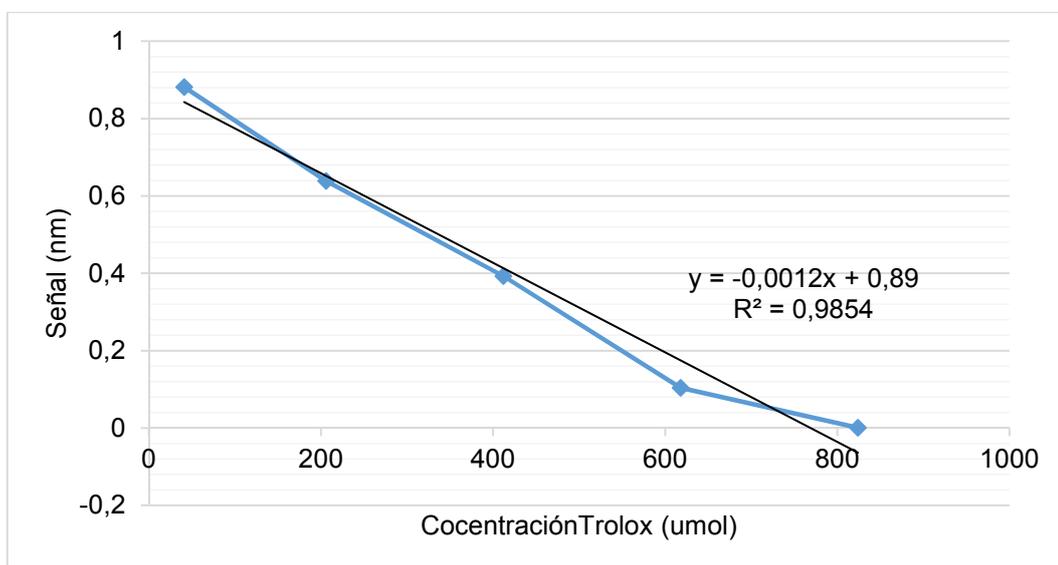
El resultado esta expresado en base humedad, por lo tanto para reportarlo en base seca se utilizó el % de humedad de la muestra, como se indica a continuación:

$$\begin{array}{ccc} 641,69 \text{ mg} & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} (100-12,34) \\ 100\% \end{array} \\ X & & \end{array}$$

$$= 732,00 \text{ mg Eq AG/ 100g BS}$$

Anexo B: Cuantificación de capacidad antioxidante. Método ABTS

1. Curva de calibración



w (g) Trolox	PM g/mol	Riqueza %	Aforo mL	Concentración Madre	
				mg/L	umol
0,025	250,29	97	100	242,50	1029,73
Alícuota mL	Aforo (mL)		Concentration Trolox umol	Absorbancia nm	
0,4	10		41,19	0,882	
2	10		205,25	0,639	
4	10		411,89	0,393	
6	10		617,84	0,104	
8	10		823,79	0,001	
Pendiente	-0,0012				
Intercepto	0,8900				
R²	0,9854				

2. Cuantificación de la capacidad antioxidante: ABTS.

N° Muestra	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extracto mL	% H; Humedad	% ST; Solidos Totales	FD	Alícuota para			Abs. (nm) PROM	Concentración					SD	Cv
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL		mg/L	µmol Eq Trolox/g BH	PROM	µmol Eq Trolox/g BS	PROM		
M1	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,706	158,67	23,74	23,91	27,08	27,27	0,27	1,01
D1	1,67								0,703	161,26	24,08		24,32			
M2	1,67								0,647	210,20	31,44	30,66	35,87	34,98	1,26	3,61
D2	1,67								0,659	199,84	29,88		34,08			
M3	2,52								0,517	321,90	48,15	40,11	48,64	45,76	12,98	28,36
D3	2,52								0,515	323,63	32,07		32,39			
M4	2,50								0,789	86,99	8,69	9,69	8,87	9,69	1,41	14,57
D4	2,53								0,760	112,61	10,69		11,88			
M5	2,53								0,725	142,26	14,18	14,18	16,88	16,88	0,00	0,00
D5	2,51								0,725	142,26	14,18		16,88			
M6	5,00								0,233	567,76	28,38	28,09	30,19	28,09	0,41	1,44
D6	5,05								0,240	561,43	27,80		32,71			
M7	1,67								0,642	213,94	32,00	31,86	34,41	31,86	0,20	0,63
D7	1,67								0,645	211,93	31,72		34,48			
M8	5,08								0,530	310,96	15,39	16,37	16,92	16,37	1,38	8,45
D8	5,05								0,482	352,71	17,35		19,94			
M9	5,07								0,404	419,79	20,70	20,73	21,79	20,73	0,04	0,18
D9	5,03								0,407	417,48	20,75		23,32			

M: muestra

Duplicado: Duplicado de la muestra

3. Cinética de extracción.

Tiempo min	Peso de la muestra g.	Volumen	% H; Humedad	% ST; Solidos totales	FD	Alícuota para			Abs (nm)	Concentración					SD	CV
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL		mg/L	μmol Eq Trolox/g BH	PROM	μmol Eq Trolox/g BS	PROM		
30	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,868	11,00	1,65	1,71	1,88	1,96	0,11	5,69
D30	1,67								0,867	11,92	1,78		2,03			
60	1,67								0,840	36,56	5,47	5,26	6,23	5,99		
D60	1,67								0,843	33,79	5,04		5,75			
90	1,67								0,802	71,66	10,72	10,17	12,23	11,60		
D90	1,67								0,810	64,27	9,62		10,97			
120	1,67								0,761	109,54	16,37	15,28	18,67	17,43		
D120	1,67								0,777	95,07	14,19		16,19			
150	1,67								0,727	141,26	21,15	20,81	24,12	23,74		
D150	1,67								0,731	136,95	20,48		23,37			
180	1,67								0,785	87,06	13,03	13,05	14,87	14,88		
D180	1,67								0,785	87,37	13,06		14,90			

D: duplicado de la muestra

4. Análisis estadístico de la cinética.

Análisis de la varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	3,91	1,96	0,01
Fila 2	2	11,99	5,99	0,12
Fila 3	2	23,20	11,60	0,79
Fila 4	2	34,86	17,43	3,07
Fila 5	2	47,49	23,74	0,29
Fila 6	2	29,77	14,88	0,00
Columna 1	6	78,00	13,00	65,88
Columna 2	6	73,22	12,20	58,85

Análisis de la varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	621,29	5	124,26	262,35	0,00	5,05
Columnas	1,90	1	1,90	4,01	0,10	6,61
Error	2,37	5	0,47			
Total	625,558979	11				

LSD 3,16 0,56 1,76

TIEMPO	PROMEDIO	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		1,96	5,99	11,60	17,43	23,74	14,88
30 min	1,96	0,00	4,04	9,65	15,47	21,79	12,93
60 min	5,99	4,04	0,00	5,61	5,99	17,75	8,89
90 min	11,60	9,65	5,61	0,00	5,83	12,14	3,28
120 min	17,43	15,47	11,44	5,83	0,00	6,31	2,55
150 min	23,74	21,79	17,75	23,74	6,31	0,00	8,86
180 min	14,88	12,93	8,89	9,05	2,55	8,86	0,00

30 min es diferente estadísticamente para 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

60 min es diferente estadísticamente para 30 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min.

90 min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 120 min, 150 min y 180 min.

120min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 150 min y 180 min

150 min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 180 min

180 min es diferente estadísticamente para 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 150 min

* Se eligió de manera arbitrariamente el tiempo 150 min siendo este el óptimo

5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones

Solución Madre

La concentración de la solución madre de Trolox se la calcula aplicando la siguiente ecuación.

$$\begin{array}{ccc} 250,29 \text{ mg} & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 1000 \text{ mL} \text{ ----- } 1\text{M} \\ 0,0250 \text{ g} & & 100 \text{ mL} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 9,9884 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$X = 998,84 \text{ } \mu\text{mol}$$

Donde:

P= pureza (%)

m= peso Trolox (mg)

v= Volumen de aforo (L)

El resultado calculado debemos realizar una conversión para obtener el porcentaje de pureza real de la solución madre de Trolox.

$$\begin{array}{ccc} 97\% & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 100\% \\ 998,84 \text{ } \mu\text{mol} & & x \end{array}$$

$$x = 1029,73 \text{ } \mu\text{mol}$$

Preparación de estándares:

La concentración de los diferentes estándares dada por la siguiente ecuación.

$$C_{o_{SM}} * V_{SM} = C_{o_{st}} * V_{st}$$

Donde:

$C_{o_{SM}}$: Concentración de solución madre (mg/L)

V_{SM} : Volumen de la solución madre

$C_{o_{st}}$: Concentración del estándar (mg/L)

V_{st} : Volumen del estándar

Despejo:

$$C_{ost} = \frac{C_{oSM} * V_{SM}}{V_{st}}$$

Ejemplo:

Si tomamos el valor de la alícuota 0,4 (mL) de la solución madre y se lo afora a un volumen de 10 mL, se tendrá una concentración del estándar de:

$$C_{ost} = \frac{1029,73 \mu mol * 0,4 mL}{10 mL} = 41,19 \mu mol$$

6. Cálculos para la determinación de la concentración

La concentración expresada en micromoles equivalentes de trolox por gramos de muestra, se realizó mediante un retroceso, el cual partimos desde la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

$$y = mx + b$$

Donde:

y= absorbancia (nm)

m= pendiente

x= Concentración (Co)

b= Intersección

Despejamos la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Ejemplo, se reemplaza los valores de la pendiente e intersección de la curva de calibración, y la primera absorbancia de la muestra 1; teniendo así:

$$Co = \frac{\text{Absorbancia} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$Co = \frac{0,706 - 0,8900}{-0,0012} = 158,68 \mu mol$$

$$C_o = 158,67 \mu\text{mol}$$

Esta concentración está dada en litros de solución, nuestra muestra fue diluida en un volumen final de 5 mL, obteniendo:

$$158,68 \mu\text{mol} \quad \begin{array}{l} \nearrow 1000\text{mL} \\ \searrow 5 \text{ mL} \end{array}$$

$$X$$

$$X = 0,79 \mu\text{mol}$$

De la dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL del volumen total de sobrenadante, obteniendo:

$$0,79 \mu\text{mol} \quad \begin{array}{l} \nearrow 1 \text{ mL} \\ \searrow 50 \text{ mL} \end{array}$$

$$X$$

$$X = 39,66 \mu\text{mol}$$

El valor encontrado equivale a la cantidad de muestra pesada, reportada por gramos:

$$39,66 \mu\text{mol} \quad \begin{array}{l} \nearrow 1,67 \text{ g} \\ \searrow 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X$$

$$X = 23,74 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BH}$$

El resultado está expresado en base humedad, por lo tanto para reportarlo en base seca se utilizó el % de humedad de la muestra, como se indica a continuación:

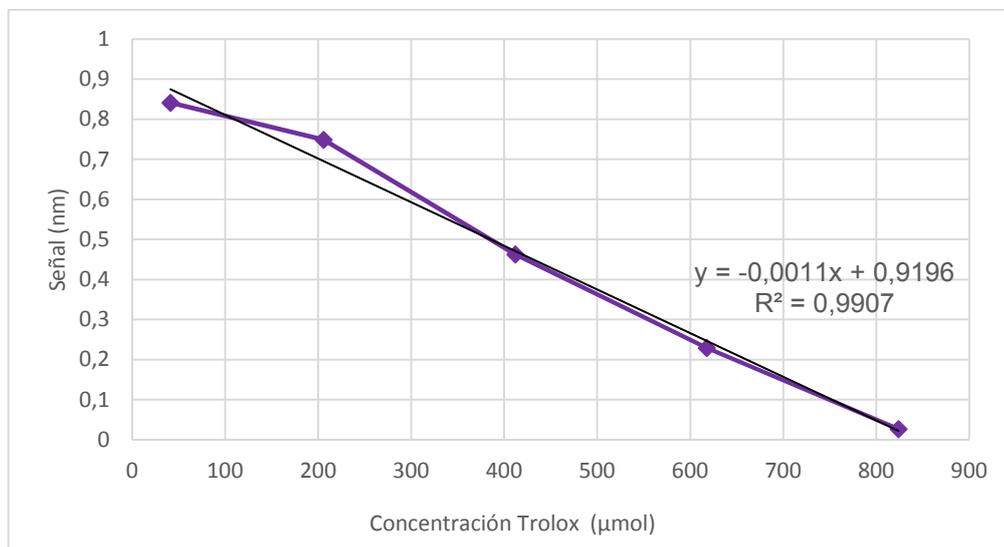
$$23,74 \mu\text{mol} \quad \begin{array}{l} \nearrow (100-12,34) \\ \searrow 100\% \end{array}$$

$$X$$

$$X = 27,08 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BS}$$

Anexo C: Cuantificación de capacidad antioxidante: Método DPPH

1. Curva de calibración



w (g) Trolox	PM g/mol	Riqueza %	Aforo mL	Concentración Madre	
				mg/L	µmol
0,025	250,29	97	100	242,50	1029,73
Alícuota mL	Aforo mL	Concentración Trolox µmol		Absorbancia nm	
0,4	10	41,19		0,882	
2	10	205,25		0,639	
4	10	411,89		0,393	
6	10	617,84		0,104	
8	10	823,79		0,001	
Pendiente	-0,0011				
Intercepto	0,9166				
R²	0,9854				

2. Cuantificación de la capacidad antioxidante: DPPH.

N° Muestra	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extracto mL	% H; Humedad	% ST; Sólidos totales	FD	Alícuota para			Abs. (nm)	Concentración					SD	Cv			
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL		mg/L	µmol Eq Trolox/g BH	PROM	µmol Eq Trolox/g BS	PROM					
M1	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,734	170,59	25,52	25,50	29,11	29,08	0,04	0,14			
D1	1,67								0,734	170,59	25,47		29,06						
M2	1,67								0,686	214,02	32,02	31,32	36,52	33,57	4,17	12,41			
D2	1,67								0,696	204,84	30,63		30,63						
M3	2,52								0,637	259,28	25,77	25,94	29,40	27,76	2,32	8,37			
D3	2,52								0,632	263,57	26,12		26,12						
M4	2,50								0,775	132,36	13,22	13,53	13,22	13,53	0,44	3,23			
D4	2,53								0,767	140,31	13,84		13,84						
M5	2,53								0,635	261,12	25,81	25,13	25,81	25,13	0,97	3,84			
D5	2,51								0,652	245,21	24,45		24,45						
M6	5,00								0,349	523,23	26,15	26,84	26,15	26,84	0,98	3,64			
D6	5,05								0,314	555,96	27,53		27,53						
M7	1,67								0,683	216,77	32,43	31,79	32,43	31,79	0,89	2,81			
D7	1,67								0,693	208,21	31,16		31,16						
M8	5,08								0,583	308,53	15,18	14,62	15,18	14,62	0,79	5,40			
D8	5,05								0,610	284,06	14,06		14,06						
M9	5,07								0,526	361,13	17,81	18,09	17,81	18,09	0,40	2,23			
D9	5,03								0,517	369,70	18,38		18,38						

M: muestra

D: Duplicado de la muestra

3. Cinética de extracción.

Tiempo Min	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extracto mL	%H; Humedad	% ST; Sólidos totales	FD	Alícuota para				Concentración					SD	CV
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL	Abs (nm)	(mg/L)	µmol Eq Trolox/g BH	PROM	µmol Eq Trolox/g BS	PROM		
30	1,67	50	12,337	87,662	4	1	5	0,15	0,874	96,88	14,49	14,90	16,53	17,00	0,66	3,89
D30	1,67								0,868	102,38	15,31		17,47			
60	1,67								0,845	122,62	18,33	18,60	20,91	21,22	0,43	2,04
D60	1,67								0,84	126,38	18,87		21,53			
90	1,67								0,84	126,38	18,90	19,80	21,57	22,58	1,44	6,38
D90	1,67								0,827	138,23	20,69		23,60			
120	1,67								0,819	144,60	21,60	22,24	24,64	25,37	1,03	4,07
D120	1,67								0,809	153,27	22,88		26,11			
150	1,67								0,801	160,79	24,07	24,30	27,46	27,72	0,37	1,33
D150	1,67								0,797	163,97	24,52		27,98			
180	1,67								0,832	133,61	20,00	17,91	22,81	20,43	3,37	16,48
D180	1,67								0,864	105,85	15,82		18,05			

D: Duplicado de la muestra

4. Análisis estadístico de la cinética

Análisis de la varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	2	13,93	6,97	0,04
Fila 2	2	19,21	9,61	1,18
Fila 3	2	22,90	11,45	0,00
Fila 4	2	40,29	20,15	0,00
Fila 5	2	29,04	14,52	4,14
Fila 6	2	31,09	15,55	0,06
Columna 1	6	75,95	12,66	21,98
Columna 2	6	80,52	13,42	22,83

Análisis de la varianza.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	143,08	5	28,62	9,42	0,01	5,05
Columnas	0,05	1	0,05	0,02	0,90	6,61
Error	15,19	5	3,04			
Total	158,33	11				

LSD 3,16 1,42 4,50

TIEMPO		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
	PROMEDIO	17,00	21,22	22,58	25,37	27,72	20,43
30 min	17,00	0,00	4,22	5,58	8,37	10,71	3,43
60 min	21,22	4,22	0,00	1,36	21,22	6,50	0,79
90 min	22,58	5,58	1,36	0,00	2,79	5,13	2,15
120 min	25,37	8,37	4,15	2,79	0,00	2,34	4,94
150 min	27,72	10,71	6,50	27,72	2,34	0,00	7,28
180 min	20,43	3,43	0,79	17,64	4,94	7,28	0,00

30 min no es estadísticamente diferente de 60 min y 180 min.
 60 min no es estadísticamente diferente 30 min, 90 min, 120 min y 180 min.
 90 min no es estadísticamente diferente de 60 min y 120 min.
 120 min no es estadísticamente diferente de 90 min y 150 min.
 150 min no es estadísticamente diferente 120 min.
 180 min no es estadísticamente diferente de 30 min, 60 min y 90 min.
 * Se eligió de manera arbitrariamente el tiempo 150 min siendo este el óptimo

5. Cálculos para determinar la concentración.

Solución Madre

La concentración de la solución madre de Trolox se la calcula aplicando la siguiente ecuación.

$$\begin{array}{ccc} 250,29 \text{ mg} & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 1000 \text{ mL} \text{ ----- } 1 \text{ M} \\ 0,0250 \text{ g} & & 100 \text{ mL} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 9,9884 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$X = 998,84 \text{ } \mu\text{mol}$$

Donde:

P= pureza (%)

m= peso Trolox (mg)

v= Volumen de aforo (L)

El resultado calculado debemos realizar una conversión para obtener el porcentaje de pureza real de la solución madre de Trolox.

$$\begin{array}{ccc} 97 \% & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 100 \% \\ 998,84 \text{ } \mu\text{mol} & & x \end{array}$$
$$x = 1029,73 \text{ } \mu\text{mol}$$

Preparación de estándares:

La concentración de los diferentes estándares dada por la siguiente ecuación.

$$C_{o_{SM}} * V_{SM} = C_{o_{st}} * V_{st}$$

Donde:

$C_{o_{SM}}$: Concentración de solución madre (mg/L)

V_{SM} : Volumen de la solución madre

$C_{o_{st}}$: Concentración del estándar (mg/L)

V_{st} : Volumen del estándar

Despejo:

$$C_{ost} = \frac{C_{oSM} * V_{SM}}{V_{st}}$$

Ejemplo:

Si tomamos el valor de la alícuota 0,4 (mL) de la solución madre y se lo afora a un volumen de 10 mL, se tendrá una concentración del estándar de:

$$C_{ost} = \frac{1029,73 \mu mol * 0,4 mL}{10 mL} = 41,19 \mu mol$$

6. Cálculos para la determinación de la concentración

La concentración expresada en micromoles equivalentes de trolox por gramos de muestra, se realizó mediante un retroceso, el cual partimos desde la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

$$y = mx + b$$

Donde:

y= absorbancia (nm)

m= pendiente

x= Concentración (Co)

b= Intersección

Despejamos la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Ejemplo, se reemplaza los valores de la pendiente e intersección de la curva de calibración, y la primera absorbancia de la muestra 1; teniendo así:

$$Co = \frac{\text{Absorbancia} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$Co = \frac{0,73 - 0,92}{-0,0011} = 170,59 \mu mol$$

$$Co = 170,59 \mu mol$$

Esta concentración está dada en litros de solución, nuestra muestra fue diluida en un volumen final de 5 mL, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 170,59 \mu\text{mol} & \nearrow & 1000 \text{ mL} \\ X & \searrow & 5 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0,85 \mu\text{mol}$$

De la dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL del volumen total de sobrenadante, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 0,8529 \mu\text{mol} & \nearrow & 1 \text{ mL} \\ X & \searrow & 50 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 42,65 \mu\text{mol}$$

El valor encontrado equivale a la cantidad de muestra pesada, reportada por gramos:

$$\begin{array}{ccc} 42,645 \mu\text{mol} & \nearrow & 1,671 \text{ g} \\ X & \searrow & 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 25,52 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BH}$$

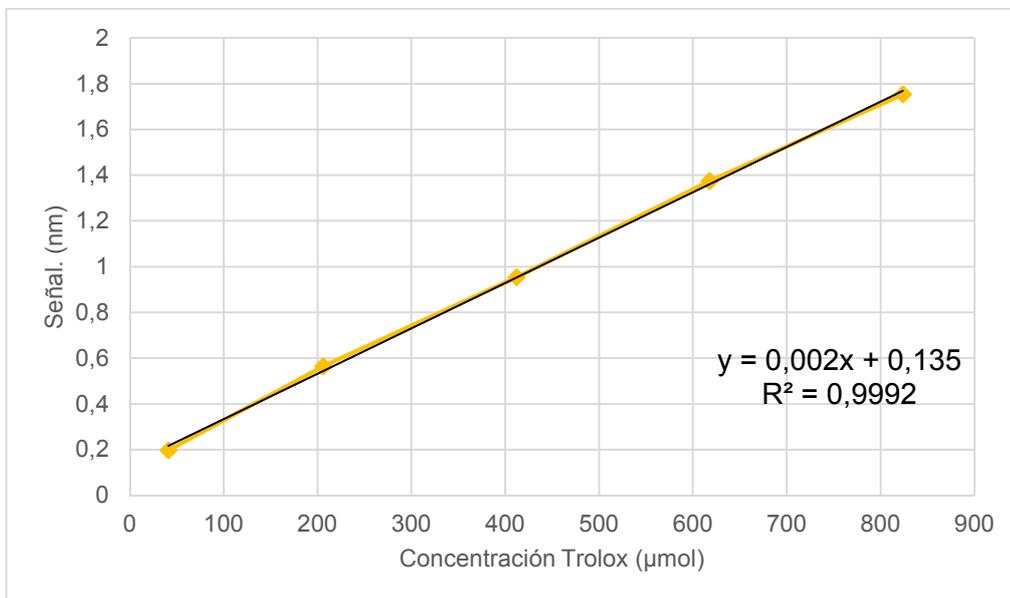
El resultado está expresado en base humedad, por lo tanto para reportarlo en base seca se utilizó el % de humedad de la muestra, como se indica a continuación:

$$\begin{array}{ccc} 25,52 \mu\text{mol} & \nearrow & (100 - 12,34) \\ X & \searrow & 100\% \end{array}$$

$$X = 29,11 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BS}$$

Anexo D: Cuantificación de capacidad antioxidante. Método FRAP

1. Curva de calibración



w (g) Trólox	PM g/mol	Riqueza %	Aforo mL	Concentración madre	
				mg/L	µmol
0,025	250,29	97	100	242,50	1029,73
Alicuota mL	Aforo mL	Concentración Trolox µmol	Absorbancia nm		
0,4	10	41,19	0,197		
2	10	205,95	0,564		
4	10	411,89	0,954		
6	10	617,84	1,374		
8	10	823,79	1,754		
Pendiente	0,0021				
Intercepto	0,1350				
R²	0,9992				

2. Cuantificación de la capacidad antioxidante: FRAP.

N° Muestra	Peso de la muestra para el extracto (g)	Volumen extracto mL	% H; Humedad	% ST; Solidos Totales	FD	Alícuota para			Abs. (nm)	Concentración					SD	Cv
						Dilución mL	Volumen total mL	Alícuota mL		mg/L	µmol Eq Trolox/g BH	PROM	µmol Eq Trolox/g BS	PROM		
M1	1,67	50	12,34	87,66	4	1	5	0,15	0,569	206,51	30,90	31,06	35,24	35,43	0,26	0,72
D1	1,67								0,574	209,05	31,21		35,61			
M2	1,67								0,453	151,43	22,65	21,71	25,84	24,77	1,52	6,12
D2	1,67								0,427	138,93	20,77					
M3	2,52								0,666	252,74	25,12	24,30	28,66	27,73	1,32	4,76
D3	2,52								0,633	237,02	23,49					
M4	2,50								0,377	115,24	11,51	11,48	13,14	13,10	0,05	0,39
D4	2,53								0,379	116,07	11,45					
M5	2,53								0,522	184,29	18,22	16,22	20,78	18,50	3,23	17,44
D5	2,51								0,435	142,62	14,22					
M6	5,00								1,318	563,10	28,14	27,59	32,10	31,48	0,89	2,82
D6	5,05								1,282	546,07	27,04					
M7	1,67								0,510	178,53	26,71	27,71	30,46	31,61	1,63	5,15
D7	1,67								0,538	191,90	28,72					
M8	5,08								0,759	297,14	14,62	12,93	16,67	14,75	2,72	18,45
D8	5,05								0,612	227,14	11,24					
M9	5,07								1,048	434,52	21,43	19,25	24,44	21,96	3,52	16,02
D9	5,03								0,856	343,33	17,07					

M: Muestra
D: Duplicado de la muestra

2. Cinética de extracción.

Tiempo min	Peso de la muestra del extracto (g)	Volumen extracto mL	% H; Humedad	% ST; Solidos Totales	FD mL	Alicuota para		Abs (nm)	Concentración					SD	CV										
						Dilución mL	Alicuota mL		(mg/L)	µmol Eq Trolox/g BH	PROM	µmol Eq Trolox/g BS	PROM												
30	1,67	50	12,34	87,66	4	1	0,15	0,284	41,69	6,24	6,11	7,12	6,97	0,21	3,03										
D 30	1,67							0,281	39,95	5,98		6,82													
60	1,67							0,304	51,82	7,75	8,42	8,84	9,61			1,09	11,30								
D 60	1,67							0,321	60,90	9,09		10,37													
90	1,67							0,333	67,01	10,02	10,04	11,43	11,45					0,03	0,23						
D 90	1,67							0,333	67,18	10,06		11,47													
120	1,67							0,430	117,98	17,63	17,66	20,11	20,15							0,05	0,27				
D 120	1,67							0,431	118,51	17,69		20,18													
150	1,67							0,351	76,61	11,47	12,73	13,08	14,52									2,04	14,02		
D 150	1,67							0,383	93,54	13,99		15,96													
180	1,67							0,377	90,05	13,48	13,63	15,38	15,55											0,24	1,54
D 180	1,67							0,381	92,15	13,78		15,72													

D: duplicado de la muestra

4. Análisis estadístico de la cinética.

Análisis de la varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	13,93	6,97	0,04
Fila 2	2	19,21	9,61	1,18
Fila 3	2	22,90	11,45	0,00
Fila 4	2	40,29	20,15	0,00
Fila 5	2	29,04	14,52	4,14
Fila 6	2	31,09	15,55	0,06
Columna 1	6	75,95	12,66	21,98
Columna 2	6	80,52	13,42	22,83

Análisis de la varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	220,37	5	44,07	59,74	0,00	5,05
Columnas	1,74	1	1,74	2,35	0,19	6,61
Error	3,69	5	0,74			
Total	225,79	11				

LSD 3,16338145 0,70133778 **2,21859892**

TIEMPO	PROMEDIO	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
		6,97	9,61	11,45	20,15	14,52	15,55
30 min	6,97	0,00	2,64	4,49	13,18	7,55	8,58
60 min	9,61	2,64	0,00	1,85	9,61	4,92	5,94
90 min	11,45	4,49	1,85	0,00	8,69	3,07	4,09
120 min	20,15	13,18	10,54	8,69	0,00	5,63	4,60
150 min	14,52	7,55	4,92	14,52	5,63	0,00	1,03
180 min	15,55	8,58	5,94	6,85	4,60	1,03	0,00

30min es estadísticamente diferente de 60 min, 90 min, 120min, 150 min y 180 min.
 60 min es estadísticamente diferente de 30 min, 120min, 150 min y 180 min.
 90 min es estadísticamente diferente de 30 min, 120min, 150 min y 180 min.
 120 min es estadísticamente diferente de 30 min, 60 min, 90 min, 150 min y 180 min.
 150 min es estadísticamente diferente de 30 min, 60 min, 90min y 120 min.
 180 min es estadísticamente diferente de 30 min, 60 min, 90min y 120 min
 *Se eligió de manera arbitrariamente el tiempo siendo este el óptimo 150 min.

5. Cálculos para determinar la concentración de las soluciones

Solución Madre

La concentración de la solución madre de Trolox se la calcula aplicando la siguiente ecuación.

$$\begin{array}{ccc} 250,29 \text{ mg} & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 1000 \text{ mL} \text{ ----- } 1 \text{ M} \\ 0,0250 \text{ g} & & 100 \text{ mL} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 9,9884 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$X = 998,84 \text{ } \mu\text{mol}$$

Donde:

P= pureza (%)

m= peso Trolox (mg)

v= Volumen de aforo (L)

El resultado calculado debemos realizar una conversión para obtener el porcentaje de pureza real de la solución madre de Trolox.

$$\begin{array}{ccc} 97\% & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 100\% \\ 998,84 \text{ } \mu\text{mol} & & x \end{array}$$

$$x = 1029,7319 \text{ } \mu\text{mol}$$

Preparación de estándares:

La concentración de los diferentes estándares dada por la siguiente ecuación.

$$C_{o_{SM}} * V_{SM} = C_{o_{st}} * V_{st}$$

Donde:

$C_{o_{SM}}$: Concentración de solución madre (mg/L)

V_{SM} : Volumen de la solución madre

$C_{o_{st}}$: Concentración del estándar (mg/L)

V_{st} : Volumen del estándar

Despejo:

$$C_{ost} = \frac{C_{oSM} * V_{SM}}{V_{st}}$$

Ejemplo:

Si tomamos el valor de la alícuota 0,4 (mL) de la solución madre y se lo afora a un volumen de 10 mL, se tendrá una concentración del estándar de:

$$C_{ost} = \frac{1029,73 \mu mol * 0,4 mL}{10 mL} = 41,19 \mu mol$$

6. Cálculos para la determinación de la concentración

La concentración expresada en micromoles equivalentes de trolox por gramos de muestra, se realizó mediante un retroceso, el cual partimos de la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

$$y = mx + b$$

Donde:

y= absorbancia (nm)

m= pendiente

x= Concentración (Co)

b= Intersección

Despejamos la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Ejemplo, se reemplaza los valores de la pendiente e intersección de la curva de calibración, y la primera absorbancia de la muestra 1; teniendo así:

$$Co = \frac{\text{Absorbancia} - \text{Intersección}}{\text{Pendiente}}$$

$$Co = \frac{0,569 - 0,1350}{-0,0021} = 206,50 \mu mol$$

$$C_o = 206,508 \mu\text{mol}$$

Esta concentración está dada en litros de solución, nuestra muestra fue diluida en un volumen final de 5 mL, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 206,50 \mu\text{mol} & \nearrow & 1000 \text{ mL} \\ X & \searrow & 5 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 1,03 \mu\text{mol}$$

De la dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL del volumen total de sobrenadante, obteniendo:

$$\begin{array}{ccc} 1,0325 \mu\text{mol} & \nearrow & 1 \text{ mL} \\ X & \searrow & 50 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 51,63 \mu\text{mol}$$

El valor encontrado equivale a la cantidad de muestra pesada, reportada por gramos:

$$\begin{array}{ccc} 51.63 \mu\text{mol} & \nearrow & 1,67\text{g} \\ X & \searrow & 1\text{g} \end{array}$$

$$X = 30,90 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BH}$$

El resultado esta expresado en base humedad, por lo tanto para reportarlo en base seca se utilizó el % de humedad de la muestra, como se indica a continuación:

$$\begin{array}{ccc} 30,896 \mu\text{mol} & \nearrow & (100-12,34) \\ X & \searrow & 100 \% \end{array}$$

$$X = 35,24 \mu\text{mol Eq Trolox/g muestra BS}$$

ANEXO E: Determinación del porcentaje de humedad

1. Cálculo de humedad

	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Cápsula vacía	122,0200	115,2100
Muestra	124,0500	117,2100
Peso 1	123,8238	116,9901
Peso 2	123,8003	116,9888
Peso 3	123,8233	116,9123
Peso 4	123,7981	116,9682
Peso 5	123,7987	116,9678
Peso 6	123,7980	116,9673
Peso 7	123,7966	116,9663
Peso 8	123,7965	116,9663
% Humedad	12,4876 g	12,1850 g
Promedio	12,3354 g	

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

Siendo:

m_1 : peso cápsula y muestra

m_2 : peso de la muestra seca

m : peso cápsula vacía

- **Cálculo muestra 1**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{124,0500 \text{ g} - 123,7965 \text{ g}}{124,0500 \text{ g} - 122,0200 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 12,487 \text{ g}$$

- **Cálculo muestra 2**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{117,2100 \text{ g} - 116,9663 \text{ g}}{117,2100 \text{ g} - 115,2100 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 12,185 \text{ g}$$

Anexo F: Metodología de extracción: extracto control

