



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## **ÁREA BIOLÓGICA**

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Actividad antioxidante y cinética de liberación de co-precipitados  
supercríticos de compuestos fenólicos de mango.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Valverde Encalada, Adriana Salomé

DIRECTOR: Meneses Chamba. Miguel Ángel, Dr.

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

Doctor.

Miguel Ángel Meneses Chamba

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Actividad antioxidante y cinética de liberación de co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango" realizado por Valverde Encalada Adriana Salomé ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero 2016

f) .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Adriana Salomé Valverde Encalada declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: “Actividad antioxidante y cinética de liberación de co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Dr. Miguel Ángel Meneses Chamba director 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 que se realicen a través. o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f. ....

Autor: Adriana Salomé Valverde Encalada

Cédula: 1104494768

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme su infinito amor y bondad y permitirme lograr todos mis objetivos propuestos.

A mi madre quien ha sido el pilar fundamental en mi vida, la que me ha impartido todos sus sabios consejos y valores los cuales me han permitido ser una persona de bien, por su motivación constante y su amor incondicional en cada momento para que logre todas mis metas propuestas.

A mi esposo por darme su amor, apoyo, confianza y por todos los momentos llenos de felicidad que me brinda día a día, a mi hija Sofía y a mi pequeño angelito que viene en camino que sin duda alguna son el motivo de lucha para poderles dar un futuro mejor.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida.

A mis Padres por todo el amor que me han brindado siempre y han sido mi apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mis queridos hermanos que con su cariño y confianza han estado siempre a mi lado.

A mis queridas tías que han sido un pilar fundamental en nuestra familia apoyándome siempre en todas las metas que me he propuesto.

A mis queridos sobrinos que con su inocencia y dulzura han alegrado nuestras vidas.

A mi hija Sofía que ha cambiado mi vida y me ha hecho sentir que existe el verdadero y más puro amor.

A la Universidad Técnica Particular de Loja que me ha permitido crecer como persona y a la vez formarme profesionalmente.

Al Ing. Miguel Ángel Meneses quien con sus vastos conocimientos me ha brindado toda la ayuda necesaria para culminar de manera satisfactoria el presente trabajo. Gracias por su apoyo confianza y paciencia en todo este tiempo.

Gracias a todos.

## Contenido

CARATULA.....	I
APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRAC.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
NOMENCLATURA.....	5
CAPITULO 1.....	6
REVISION DE LITERATURA.....	6
1.1 MANGO.....	7
1.2. COMPUESTOS FENOLICOS.....	8
1.2.1 Compuestos fenólicos del mango.....	8
1.3 EXTRACCION DE COMPUESTOS FENOLICOS.....	9
1.3.1 Precipitación supercrítica.....	10
1.4 ANTIOXIDANTES.....	10
1.5 LIBERACIÓN CONTROLADA O DE PROTECCIÓN.....	11
CAPITULO 2.....	13
OBJETIVOS.....	13
2.1 PROPÓSITO U OBJETIVO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN:.....	14
2.2 COMPONENTE U OBJETIVO ESPECÍFICO DE LA INVESTIGACIÓN:.....	14
CAPITULO 3.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	16
3.1 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	16
3.1.1 Reactivos:.....	16
3.1.2 Equipos utilizados.....	16
3.2 MUESTRAS.....	16
3.3 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	17
3.3.2 Método ABTS.....	17
3.4 DETERMINACION DE FENOLES TOTALES.....	18
3.5 CURVAS DE LIBERACION Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACION.....	18
3.6 ANALISIS ESTADISTICO.....	19

CAPITULO 4.....	16
RESULTADOS Y DISCUSION .....	20
4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	21
4.1.1 Actividad Antioxidante método DPPH .....	21
4.2.1 Actividad Antioxidante método ABTS .....	25
4.3.1. Fenoles totales .....	29
4.4.1 Cinética de liberación.....	33
DISCUSION DE RESULTADOS.....	35
5. CONCLUSIONES.....	37
6. RECOMENDACIONES.....	38
CAPITULO 7 .....	39
BIBLIOGRAFIA.....	39
CAPITULO 8.....	43
ANEXOS.....	43
ANEXO 1: ESQUEMAS.....	44
2.1 CURVAS DE CALIBRACION .....	48
2.1.1 Curva de Calibración DPPH.....	48
2.1.2 Curva de Calibración ABTS .....	49
2.1.2 Curva de Calibración ABTS .....	50
2.1.3 Curva de Calibración Fenoles Totales .....	52
2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	54
2.2.1. DPPH.....	54
2.2.2. ABTS .....	55
2.2.3. Fenoles Totales .....	56
2.3 CINÉTICA DE LIBERACIÓN.....	57
2.3.1 Cinética de liberación-variable presión.....	57
2.3.2. Cinética de liberación - variable temperatura .....	58
2.3.3 Cinética de liberación- variable flujo líquido .....	59
2.3.4 Cinética de liberación -variable relación.....	60

## INDICE DE TABLAS

### **CAPITULO 1**

TABLA 1.1 Compuestos fenólicos en piel de mango (mg/kg) de base seca.

### **CAPITULO 3**

TABLA 3.1 Condiciones de co-precipitación supercrítica antisolvente.

### **CAPITULO 4**

TABLA 4.1.1 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión (DPPH).

TABLA 4.1.2 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable temperatura (DPPH).

TABLA 4.1.3 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable flujo líquido (DPPH).

TABLA 4.1.4 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación (DPPH).

TABLA 4.2.1 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión (ABTS).

TABLA 4.2.2 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable temperatura (ABTS).

TABLA 4.2.3 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable flujo líquido (ABTS).

TABLA 4.2.4 Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación (ABTS).

TABLA 4.3.1 Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable presión.

TABLA 4.3.2 Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable temperatura.

TABLA 4.3.3 Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable flujo líquido.

TABLA 4.3.4 Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable relación.

## INDICE DE FIGURAS

### CAPITULO 4

- Fig. 4.1.1** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión.
- Fig. 4.1.2** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango variable temperatura.
- Fig. 4.1.3** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable Flujo Líquido.
- Fig. 4.1.4** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación extracto: polímero.
- Fig. 4.2.1** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión.
- Fig. 4.2.2** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable temperatura.
- Fig. 4.2.3** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable Flujo Líquido.
- Fig. 4.2.4** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango variable relación extracto: polímero.
- Fig. 4.3.1** Fenoles Totales de co-precipitado de mango - variable presión.
- Fig. 4.3.2** Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable temperatura.
- Fig. 4.3.3** Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable flujo líquido.
- Fig. 4.4.1** Cinética de liberación de co-precipitado de mango - variable presión.
- Fig.4.4.2** Cinética de liberación de co-precipitado de mango - variable temperatura.
- Fig.4.4.3** Cinética de liberación de co-precipitado de mango - variable flujo líquido.
- Fig.4.4.4** Cinética de liberación de co-precipitado de mango - variable relación.

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO 1: ESQUEMAS

- Figura 1.1** Determinación de fenoles totales
- Figura 1.2** Determinación de la actividad antioxidante (DPPH)
- Figura 1.3** Determinación de la actividad antioxidante (ABTS)
- Figura 1.4** Liberación de compuestos fenólicos en solución fisiológica

### ANEXO 2 RESULTADOS

- 2.1** Curvas de calibración
- 2.1.1** Curva de calibración DPPH
- 2.1.2** Curva de calibración ABTS
- 2.1.3** Curva de calibración fenoles totales
- 2.2** Actividad Antioxidante
- 2.2.1** Método DPPH
- 2.2.2** Método ABTS
- 2.2.3** Fenoles totales
- 2.3** Cinética de Liberación
- 2.3.1** Cinética de Liberación - Variable presión
- 2.3.2** Cinética de Liberación - Variable temperatura
- 2.3.3** Cinética de Liberación - Variable flujo liquido
- 2.3.4** Cinética de Liberación - Variable relación

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de los co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango y cuantificar la actividad antioxidante usando los métodos de DPPH, ABTS y el contenido de fenoles totales se realizó usando el método de Folin-Ciocalteu. La mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH se obtuvo a una concentración de  $831.5 \pm 1$   $\mu\text{mol ET/g Co}$ , por el método de ABTS se obtuvo a una concentración de  $585.0 \pm 1$   $\mu\text{mol ET/g Co}$  y el mayor contenido de fenoles totales se obtuvo a una concentración de  $0.342 \pm 0.2002$   $\text{mg GAE/100 g Co}$ . Los compuestos fenólicos empiezan a liberarse en la solución fisiológica a los 15 min y alcanza una liberación controlada hasta las 8 horas. Las mejores condiciones para los diferentes ensayos se muestran muchos más favorables en los co-precipitados obtenidos a una presión de 100 bar, una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , a un flujo líquido de  $1\text{mL/min}$ , y una relación extracto: polímero 1:1.5. Estos resultados nos indican que la técnica SAE es eficaz para mejorar la actividad de compuestos antioxidantes naturales.

**Palabras Claves:** co-precipitados supercríticos, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, técnica SAE.

## ABSTRAC

The objective of the this study was to evaluate the efficiency from supercritical co-precipitates of phenolic compounds of mango and to quantify the antioxidant activity using methods of DPPH, ABTS and total phenols content was performed using the Folin-Ciocalteu reagent. The best antioxidant activity by the DPPH method was obtained at a concentration of  $831.5 \pm 1 \mu\text{mol ET/g Co}$ , by the method of ABTS was obtained at a concentration of  $585.0 \pm 1 \mu\text{mol ET/g Co}$ , and the higher content of total phenols was obtained at a concentration of  $0.342 \pm 0.002 \text{ mg GAE/100g Co}$ . Phenolic compounds begin to be released in the physiological solution at 15 min and it reached liberation controlled up to 8 hours. The best conditions for the different tests show many more favorable in the co-precipitates obtained at a pressure of 100 bar, a temperature of  $40^{\circ}\text{C}$ , at a flow rate of fluid 1 mL/min, and a relationship excerpt: polymer 1:1.5. These results indicate that the SAE processing of natural extracts is effective for improving the activity of natural antioxidant compounds.

**Key words:** supercritical co-precipitates, phenolic compounds, antioxidant activity, SAE process

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la preocupación por el aprovechamiento de residuos ha tomado gran interés entre la comunidad científica y sobre todo a nivel industrial, en donde los procesos de transformación generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. Además, los consumidores son cada vez más conscientes de los problemas de salud relacionados con la dieta, por lo tanto exigen ingredientes naturales que sean seguros y promuevan beneficios sobre la salud, promoviendo cada vez más la aparición de "alimentos funcionales", o sea un alimento cuyo consumo contribuye a aportar beneficios sobre la salud, por encima del aporte estrictamente nutricional. En la actualidad existen numerosos estudios que demuestran que consumir una dieta rica en frutas y verduras pueden aportar muchos beneficios para la salud las cuales proporcionan la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Aruoma, 2003; Van Duyn y Pivonka, 2000).

El Fruto del mango (*Mangifera indica* L.) ha sido reconocido como buena fuente de compuestos bioactivos debido a sus propiedades antivirales, antibacterianas, analgésicas, antiinflamatorias y actividades inmunomoduladores (Makare et al., 2001). Algunos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos pueden mejorar los beneficios para la salud (Berardini et al., 2004, 2005a; Ribeiro et al., 2007); en particular, las xantonas y flavonoides tienen propiedades antioxidantes y actividades antiinflamatorias. Entre ellos, la mangiferina, xantona C- glucósido ha demostrado ser el constituyente predominante de los extractos de mango tanto en la piel como en el fruto, mostrando una multitud de efectos farmacológicos (Masibo y He, 2008). Los principales residuos del procesamiento de mango son la cáscara y la semilla. los cuales corresponden al 35-60% del peso total del fruto (Larrauri, Ruperez. Borroto & Saura-Calixto, 1996). Estos subproductos han sido reconocidos como fuente natural de compuestos fenólicos bioactivos; desde la piel la cual no se utiliza actualmente para un propósito comercial. su uso podría ser una oportunidad importante y sostenible para reducir la contaminación de los bio-residuos (Ajila. Rao et al. 2010).

El desarrollo de este tipo de productos, ha llevado a que se plantee la necesidad de extraer y concentrar antioxidantes y compuestos fenólicos a partir de fuentes vegetales. De hecho, existen diferentes métodos de extracción como es la utilización de solventes, que es una operación clásica aplicada en muchos procesos industriales, sin embargo, el interés cada vez más creciente de que con estas metodologías se obtengan productos más naturales, se impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento, en un corto periodo de tiempo y con bajo costo.

En este sentido, surgen procesos alternativos que se han desarrollado siguiendo la tendencia de extracción limpia, entre ellas las más destacadas es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), esta técnica ha tenido un gran desarrollo en los últimos años en las industrias química, farmacéutica y alimentaria debido a sus numerosas aplicaciones y ventajas. Sin embargo esta técnica presenta algunas limitaciones entre las cuales se puede citar que el CO<sub>2</sub> tiene una capacidad muy limitada para disolver compuestos polares y de alto peso molecular (Martín, González-Coloma et al. 2011).

La técnica de extracción antisolvente supercrítico de (SAE) ha propuesto superar estas limitaciones, SAE se basa en los mismos principios de la técnica SFE, que se ha utilizado ampliamente para estudiar la producción de partículas micrónicas y nanométricas de compuestos farmacéuticos con tamaño y distribución de partícula controlada (Reverchon 1999, Reverchon, Adami et al. 2008), sin embargo, tiene diferentes propósitos y enfoques.

Cuando se utiliza SAE en materia natural que contiene varias familias de compuestos, extraídos utilizando un solvente polar, como el etanol, SC-CO<sub>2</sub> los extractos del solvente líquido forman una solución, que pueden dar lugar a algunos compuestos solubles o parcialmente soluble en la mezcla formada (etanol, CO<sub>2</sub>) y se podría recuperar en el paso de la separación; mientras que el resto de compuestos, son principalmente de alto peso molecular y compuestos polares, son precipitados.

El desarrollo de sistemas de vehiculización y liberación controlada de compuestos activos es una de las estrategias de uso frecuente en la formulación de alimentos con propiedades funcionales. La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos activos puede dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y velocidad modulada (Arifin, y col., 2006; Mastromatteo, y col., 2010). La velocidad de liberación depende de factores internos y externos, tales como: geometría del sistema, tipo de matriz encapsulante, naturaleza del compuesto activo, cantidad de compuesto encapsulado, temperatura, solvente de liberación, velocidad de agitación, presión, pH (ácido, base, buffer), acción enzimática, entre otros (Pothakamury, y col., 1995; Siepmann, y col., 2008).

La necesidad del presente proyecto fue evaluar la eficiencia del co-precipitado y la capacidad antioxidante, consideradas características necesarias cuando un ingrediente pretende usarse como fuente natural de antioxidantes. El contenido de fenoles totales se realizó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi, (1965). Se evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH descrito por Bran-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones por Thaipong et al. (2006), y por el método ABTS descrito por Re et al. (1999) con algunas modificaciones por Pulido et al. (2003), también se logró determinar la liberación máxima de los compuestos fenólicos en una solución fisiológica.

## NOMENCLATURA

<b>Abs:</b>	Absorbancia
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>DPPH:</b>	2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>ABTS:</b>	2.2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
<b>FT</b>	Fenoles totales
<b>TROLOX:</b>	6-hydroxy-2.5.7.8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
<b>g:</b>	Gramo
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>μL :</b>	Microlitro
<b>μMol :</b>	Micromol
<b>N:</b>	Normal
<b>AA:</b>	Actividad Antioxidante
<b>μMol ET/ g Co:</b>	Micromoles equivalentes de trolox/ gramo de co-precipitado.
<b>mg GAE/ g Co:</b>	Miligramos equivalentes de ácido gálico / gramo de co-precipitado.

**CAPITULO 1**  
**REVISION DE LITERATURA**

## **1.1 Mango.**

El mango (*Mangifera indica*) pertenece a la familia de Anacardiaceae, es una fruta popular ampliamente cultivada en las regiones tropicales del mundo debido a su sabor dulce y su alto contenido nutritivo (Kim. Brecht et al. 2007). Actualmente el mango se considera como la quinta fruta de producción más grande en todo el mundo. Pakistán aporta el 76% en el mercado mundial con una producción de 177 mil toneladas (Abbasi. Iqbal et al. 2009). La mayoría de la fruta se consume en Estados Unidos (278.422 TM). Ha sido importada desde México (alrededor del 70 % en 2000), seguido por Brasil, Ecuador, Perú, Haití y Guatemala (Saúco 2009)

La corteza es una prometedora fuente de fitonutrientes como polifenoles, carotenoides y vitamina E y C. El componente químico principal que se encuentra en el extracto de la corteza es una xantona glicosilada llamada mangiferina (2-β-D-glucopiranosil-1.3.6.7-tetrahidroxi-9-xantona). Es un compuesto activo interesante con diversas propiedades farmacológicas tales como antioxidante, antitumoral, actividades antidiabéticas anti-alérgicas, anti-inflamatorias radioprotectoras, efectos inmunomoduladores y antimicrobianos (Wauthoz. Balde et al. 2007. Ling. Yap et al. 2009).

También presenta flavonoles, terpenoides, fitoesteroles, azúcares libres, polialcoholes y ácidos grasos, de los cuales más del 60 % son poliinsaturados. Además posee elementos importantes como calcio, selenio, cobre y zinc, los que tienen participación en los procesos de la cascada inflamatoria e inmunoreguladora. (Núñez Sellés. Guevara García et al. 2007).

### **1.1.1 Subproductos del mango.**

Los principales residuos del procesamiento de mango son la cáscara y la semilla, los cuales corresponden al 35-60% del peso total del fruto (Larrauri. Ruperez. Borroto & Saura-Calixto. 1996). Estos subproductos han sido reconocidos como fuente natural de compuestos fenólicos bioactivos; desde la piel la cual no se utiliza actualmente para un propósito comercial, su uso podría ser una oportunidad importante y sostenible para reducir la contaminación de los bio-residuos (Ajila. Rao et al. 2010). Las cáscaras de mango han demostrado ser una fuente rica de flavonol O- glicósido y xantona C- glucósido, galotaninos y derivados de benzofenona (Berardini. Carle et al. 2004. Ajila. Rao et al. 2010).

Adicionalmente, los extractos etanólicos de semilla de mango son un antimicrobiano de amplio espectro, más eficaces contra bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas. Su componente activo parece ser una estructura de tipo polifenólica. Sin embargo, su naturaleza exacta aún queda por dilucidar (Kabuki. Nakajima et al. 2000).

## **1.2. Compuestos fenólicos.**

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o incluso radiación ultravioleta. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres y glucósidos (Martínez Valverde. Periago et al. 2000).

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas se conocen más de 8000 compuestos distintos con diferentes estructuras y actividad. (Martínez et al. 2000). la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido siquímico (Ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) y el metabolismo de los fenilpropanoides (Robards. Prenzler et al. 1999).

Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, etc. En los alimentos, los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico, También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos (Martínez et al 2000).

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional, debido a sus propiedades biológicas se les han atribuido propiedades farmacológicas y médicas que se encuentran altamente relacionadas a contribuir al mantenimiento de la salud humana (Avello and Suwalsky 2006).

### **1.2.1 Compuestos fenólicos del mango.**

Se han encontrado alrededor de 12 flavonoides y xantonas que han sido identificadas en la piel de mango, las cuales se consideran como fuente principal de antioxidantes bioactivos (Ribeiro, Barbosa et al, 2008).

Las cáscaras de mango han demostrado ser una fuente rica de flavonol O- glicósido y xantona C- glucósido, galotanninos y derivados de benzofenona (Ajila et al, 2010, Bernardini et al, 2004, 2005b. Schieber y otros, 2003a),

**Tabla 1.2 Compuestos fenólicos en piel de mango (mg/kg) de base seca.**

<b>Compuesto</b>	<b>Peso (mg/kg)</b>
Mangiferin	1690.4
Mangiferin gallate	321.9
Isomangiferin	134.5
Isomangiferin gallate	82.0
Quercetin 3-O-galactoside	651.2
Quercetin 3-O-glucoside	557.7
Quercetin 3-O-xyloside	207.3
Quercetin 3-O-arabinopyranoside	101.5
Quercetin 3-O-arabinofuranoside	103.6
Quercetin 3-O-rhamnoside	20.1
Kaempferol 3-O-glucoside	36.1
Rhamnetin 3-O galactoside/glucoside	94.4
Quercetin	65.3
<b>Total Fenoles</b>	<b>4066,0</b>

Fuente: Berardini y otros (2005b).

Elaboración: La Autora

La mangiferina, xantona C- glucósido ha demostrado ser el constituyente predominante de los extractos de mango tanto en la piel como en el fruto, mostrando una multitud de efectos farmacológicos (Masibo y He, 2008).

### **1.3 Extracción de compuestos fenólicos.**

La recuperación de los polifenoles de las cáscaras de mango depende principalmente de la técnica de extracción utilizada y los disolventes relativos. Los disolventes utilizados con mayor frecuencia son: metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y mezclas de estos disolventes con agua (Dorta, Lobo et al. 2012). La extracción sólido-líquido es la técnica de extracción más usada, porque es fácil, más barata y no requiere de instrumentos sofisticados. Desde un punto de vista tecnológico esta técnica fácilmente se transfiere a Agroindustrias. (Martínez, Torres et al. 2012)

### **1.3.1 Precipitación supercrítica.**

La extracción con fluidos supercríticos (SFE), es una técnica que ha tenido un gran desarrollo en los últimos años en las industrias química, farmacéutica y alimentaria debido a sus numerosas aplicaciones y ventajas. Es una técnica de extracción benigna con el medio ambiente, eficiente para materiales sólidos, elimina el problema del disolvente tóxico residual en los productos, permite el uso temperaturas más bajas que conducen a un menor deterioro de los componentes térmicamente lábiles, retiene las características organolépticas de las materias a partir de especias, entre otras (Simándi, Oszagyán et al. 1998). Sin embargo esta técnica presenta algunas limitaciones entre las cuales se puede citar que el CO<sub>2</sub> tiene una capacidad muy limitada para disolver compuestos polares y de alto peso molecular (Martín, González-Coloma et al. 2011).

La técnica de extracción antisolvente supercrítico de (SAE) ha propuesto superar estas limitaciones, SAE se basa en los mismos principios de la técnica SFE, que se ha utilizado ampliamente para estudiar la producción de partículas micrónicas y nanométricas de compuestos farmacéuticos con tamaño y distribución de partícula controlada (Reverchon 1999, Reverchon, Adami et al. 2008), sin embargo, tiene diferentes propósitos y enfoques.

La utilización de esta técnica para el fraccionamiento polifenólico ha sido muy escasa. (Floris et al. 2010 y Marqués et al. 2013) se ha utilizado SAE para la recuperación de compuestos antioxidantes presentes en una solución líquida de subproductos de uva utilizando SC-CO<sub>2</sub> como antisolvente en condiciones moderadas de presión y temperatura (11 MPa, 40 C y 15 MPa y 40 C, respectivamente). El mismo principio también se ha utilizado para la co-precipitación de extractos de té verde (Sosa et al.. 2011) y para los antioxidantes de romero (Visentin et al.. 2012) para obtener protección contra degradación. En ambos casos, el proceso permitió la precipitación selectiva de 90% de polifenoles junto con un polímero biodegradable.

Esta técnica también presenta una ventaja adicional ya que permite obtener extractos precipitados fraccionados en macropartículas, y se conoce que la reducción del tamaño de partícula es el primer paso para mejorar la velocidad de disolución de compuestos poco solubles en agua para aplicaciones farmacéuticas o de alimentos. (Meneses, Caputo et al. 2015).

### **1.4 Antioxidantes.**

Los antioxidantes son sustancias que pueden prevenir o retrasar el daño oxidativo de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos por las especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen los radicales libres y no radicales tales como peróxidos de hidrógeno ( Saikat et al.. 2010 ). Según Pietta (2000), se cree que los antioxidantes fenólicos pueden neutralizar ROS

antes de que puedan producir daños. Es por esta razón que estos compuestos pueden ofrecer diversos beneficios para la salud (Van Duyn y Pivonka, 2000; Min et al. 2013).

La mayor parte de antioxidantes que se encuentran de manera abundante en las frutas son los polifenoles, vitamina C, A y E y los carotenoides, aunque se presentan en menor medida, en otras frutas (Lim et al., 2007).

Detrás de muchas enfermedades crónicas, cuya aparición es retrasada y su gravedad disminuida por consumo de alimentos de origen vegetal se encuentran procesos de estrés oxidativo mediados por radicales libres. El estrés oxidativo conduce progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células. Este estrés se podría definir como un desequilibrio entre los pro-oxidantes y/o radicales libres por una parte y los sistemas antioxidantes del organismo por otra. Estudios epidemiológicos sugieren que los antioxidantes de la dieta pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, arteriosclerosis, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas e incluso enfermedades respiratorias (Shaheen S. et al 2001).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante (Antolovich. M. et al 2002) ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Arena E. 2001). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH (Arnao. M. 2000; Antolovich. M. et al 2002; Brand-Williams. W. 1995). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química enzimática, o también eletroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Arnao. M. 2000).

### **1.5 Liberación controlada o de protección.**

El desarrollo de sistemas de vehiculización y liberación controlada de compuestos activos es una de las estrategias de uso frecuente en la formulación de alimentos con propiedades funcionales. La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos activos puede dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y velocidad modulada (Arifin. y col. 2006; Mastromatteo. y col. 2010). Las principales etapas

involucradas en el proceso de liberación, son: difusión del compuesto activo a la superficie, mecanismo de transporte desde la superficie de la matriz al medio y disolución del compuesto activo en el medio circundante (Pothakamury. y col.. 1995; Siepmann. y col.. 2012). La velocidad de liberación dependerá de factores internos y externos, tales como: geometría del sistema, tipo de matriz encapsulante, naturaleza del compuesto activo, cantidad de compuesto encapsulado, temperatura, solvente de liberación, velocidad de agitación, presión, pH (ácido, base, buffer), acción enzimática, entre otros (Pothakamury y col., 1995; Siepmann y col., 2008). Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo, son: difusión, hinchamiento, biodegradación/ erosión y presión osmótica. La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente (Barba, y col., 2009).

**CAPITULO 2**  
**OBJETIVOS**

## **2.1 Propósito u objetivo general de la investigación:**

- Evaluar la eficiencia de encapsulamiento y la actividad antioxidante de co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango.

## **2.2 Componente u objetivo específico de la investigación:**

- Determinar la concentración de fenoles totales por el método de Folin–Ciocalteu
- Determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH y ABTS
- Determinar la cantidad máxima de compuestos fenólicos liberada en solución fisiológica.

**CAPITULO 3**  
**MATERIALES Y METODOS**

### 3.1 Reactivos y equipos.

#### 3.1.1 Reactivos.

- El solvente utilizado fue de grado analítico: metanol para análisis (Merck)
- FENOLES TOTALES: Folín-Ciocalteu 2N (Sigma – Aldrich), carbonato de sodio(Merck), ácido gálico (Sigma)
- ABTS: 2.2-azinobis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácidosulfónico) (Sigma), persulfato de potasio (Sigma - Aldrich), ácido – 6 –hidroxi – (2. 5. 7. 8 tetrametilcromano – 2 – carboxílico) trólox (AldrichChemistry)
- DPPH: 2.2 difenil – 1 – pycrydrazyl (Sigma), ácido – 6 –hidroxi –(2. 5. 7. 8 tetrametilcromano – 2 –carboxílico)trolox (AldrichChemistry)
- LIBERACION DE COMPUESTOS FENOLICOS: Solución fisiológica (0.9 % NaCl en agua)
- EFICIENCIA DE ENCAPSULACION: PVP (Aldrich 856452, Mw 10.000). de uso farmacéutico.

#### 3.1.2 Equipos utilizados.

- Balanza analítica Tecnoescale
- Espectrofotómetro Visible Heñios  $\beta$
- Micropipetas Boeco
- Agitador Magnético kika
- Baño María kika

### 3.2 Muestras.

Las muestras utilizadas fueron los co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos del mango (*Mangifera indica* L.). Para los diferentes ensayos tanto de actividad antioxidante, fenoles totales así como para la eficiencia de encapsulamiento se realizó una dilución de 1000 ppm (5mg de co-precipitado en 5mL de metanol).

Las muestras estudiadas corresponden a diferentes condiciones de co-precipitación supercrítica las cuales se detallan a continuación en la tabla 3.1

**Tabla 3.1 Condiciones de co-precipitación supercrítica antisolvente**

BLOQUE	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)
A	100	40	1	1:1.5
	120	40	1	1:1.5
	150	40	1	1:1.5
B	100	35	1	1:1.5
	100	40	1	1:1.5
	100	45	1	1:1.5
C	100	40	0.5	1:1.5
	100	40	1	1:1.5
	100	40	1.5	1:1.5
D	100	40	1	1:1.5
	100	40	1	1:2
	100	40	1	1:2.5

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 3.3 Determinación de actividad antioxidante.

#### 3.3.1 Método DPPH.

El método DPPH se realizó empleando la técnica descrita por Bran-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). Se preparó una solución patrón disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, la misma que fue llevada a refrigeración hasta su uso. La solución de trabajo se preparó mezclando 10 mL de solución patrón con 45mL de metanol hasta obtener una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox con concentraciones entre 25 – 800  $\mu\text{M}$ . De cada concentración así como de cada muestra se tomó 150  $\mu\text{L}$  en un vial, se adicionó 2850  $\mu\text{L}$  de la solución trabajo de DPPH y se dejó reaccionar por 24 horas en obscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados en micro moles equivalentes de trólox por gramo de co-precipitado ( $\mu\text{MolET/g Co}$ ).

#### 3.3.2 Método ABTS.

Se empleó la técnica de Arnao et al. (2001), con algunas modificaciones descritas por Thapong et al (2006). Se prepararon dos soluciones: ABTS (0.0074 Molar) y persulfato de potasio (0.0026 Molar), la mezcla de estas se dejó reposar por 12 horas de tal forma que se obtuvo la solución patrón de ABTS, la solución de trabajo se preparó mezclando 1 mL de

solución patrón con 60 ml de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a una longitud de onda de 734 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox en concentraciones entre: 25 y 800  $\mu\text{M}$ . De cada concentración así como de cada muestra se tomó 150  $\mu\text{L}$  en un vial, se adicionó 2.85 mL de la solución trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 7 min en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados fueron expresados en micro moles equivalentes de trólox por gramo de co-precipitado ( $\mu\text{MolET/g Co}$ ).

### **3.4 Determinación de fenoles totales.**

En la determinación de la concentración de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones descritas por Kong et al. (2010) y Thaipong et al. (2006). Se preparó una solución 0.25 N de Folin (25 mL de Folin 2 N + 175 mL de agua destilada), una solución de carbonato de sodio 1N (2.64 g de  $\text{NaCO}_3$  aforados en 25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Se tomó 150  $\mu\text{L}$  de extracto, 2400  $\mu\text{L}$  de agua y 150  $\mu\text{L}$  de 0.25 N de Folin-Ciocalteu y agitamos durante 2 minutos. La mezcla se dejó reaccionar durante 3 minutos y a continuación se añadió 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1N) y se mezcló bien. La solución se dejó reposar durante 2 h en oscuridad. La absorbancia se midió a 725 nm usando un espectrofotómetro UV y se emplearon curvas estándar de ácido gálico a concentraciones entre: 0.01y 1 mg de ácido gálico. De cada concentración así como de cada muestra se tomó 150  $\mu\text{L}$  en un vial, 2400  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 150  $\mu\text{L}$  de Folin 0.25N, se agitó por 2 minutos y se dejó reaccionar por 3 minutos, luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (1N) y se dejó reposar las muestras durante 2 horas en la oscuridad para luego medir la absorbancia a una longitud de onda de 715nm.

### **3.5 Curvas de liberación y eficiencia de encapsulación.**

El ensayo de liberación de compuestos fenólicos en solución fisiológica (0.9% NaCl en agua) se realizó empleando un método adaptado de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP34. 2011). Se introdujo 20mg de cada co-precipitado en fundas elaboradas en papel filtro, se colocó en vasos de precipitación con 25 ml de NaCl 0.9% y se llevó a agitación a 125 rpm a una temperatura de 37 °C durante 8 horas. Se tomaron los sobrenadantes a diferentes tiempos: 15, 30, 45 minutos y luego cada hora hasta completar las 8 horas. Cada vez que se tomó el sobrenadante se volvió a colocar 25 ml del medio de liberación nuevo. Los sobrenadantes se colocaron en viales y fueron sometidos a refrigeración hasta realizar las pruebas de actividad antioxidante y fenoles totales.

Para la eficiencia de encapsulamiento se realizó un control que consistió en el polímero más el antioxidante de mango. El polímero utilizado fue PVP (Aldrich 856452. Mw 10.000), de uso farmacéutico.

La eficiencia de encapsulación se expresó como el porcentaje de fenoles totales medidos en el tiempo final respecto al contenido de fenoles totales máximo.

$$Ef. Encap. (\%) = \frac{\text{Contenido de FT en CP}}{\text{Contenido de FT en solución}} * 100$$

### **3.6 Análisis estadístico.**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como promedio  $\pm$  desviación estándar.

Para las curvas de liberación y eficiencia de encapsulación los ensayos se realizaron por duplicado y el resultado se expresó como promedio  $\pm$  desviación estándar.

Todos los ensayos se evaluaron por medio de un ANOVA con un nivel de significancia de 95% ( $P < 0.05$ ).

**CAPITULO 4**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1 Actividad antioxidante.

En el presente estudio se realizó la actividad antioxidante tomando en cuenta las variables de presión, temperatura, flujo y la relación extracto polímero.

Es importante destacar que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios.

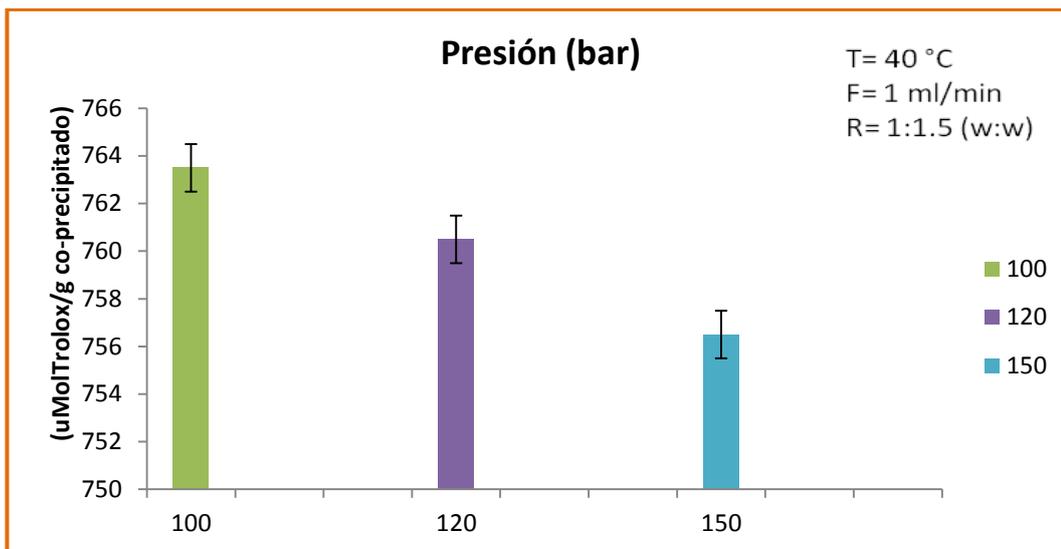
##### 4.1.1 Actividad Antioxidante método DPPH.

La tabla 4.1 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable presión, con valores constantes de temperatura (40°C), flujo líquido (1mL/min), relación (1:1.5).

**TABLA 4.1.1** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión.

Presión (bar)	Concentración (μMol ET/g Co)
100	763.5± 1
120	760.5± 1
150	756.5±1

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.1.1** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango – variable presión.

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora

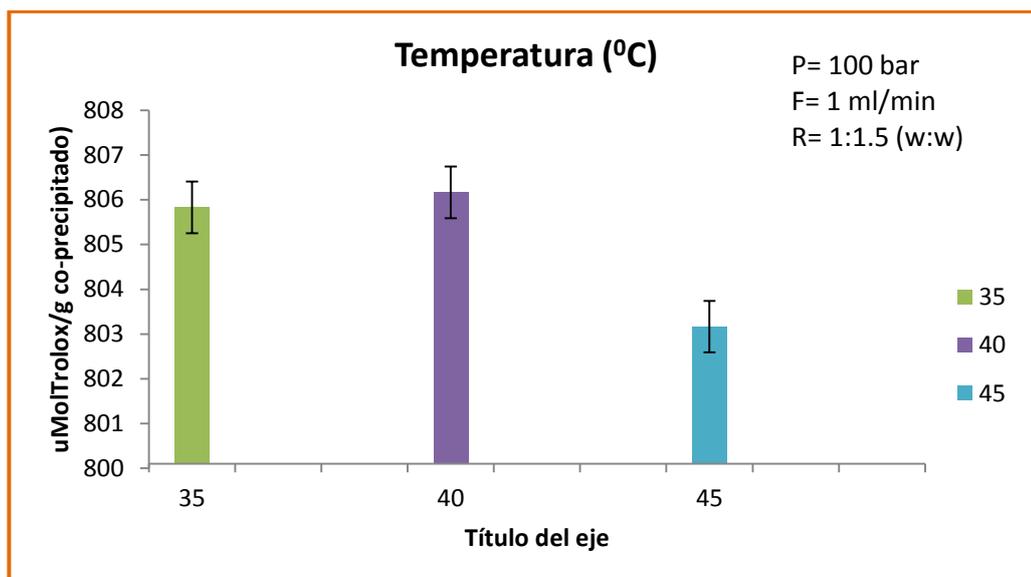
Como lo muestra la Fig. 4.1.1 la mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH se obtuvo a una presión de 100 bares con una concentración de  $763.50 \pm 1 \mu\text{mol ET/g Co}$ .

La tabla 4.1.2 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable temperatura con valores constantes de flujo líquido (1mL/min) y relación (1:1.5).

**TABLA 4.1.2** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango – variable temperatura.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Concentración (µMol ET/g Co)
100	35	805.83 ± 0.58
100	<b>40</b>	<b>806.16 ± 0.58</b>
100	45	803.16 ± 0.58

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.1.2** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango variable temperatura.

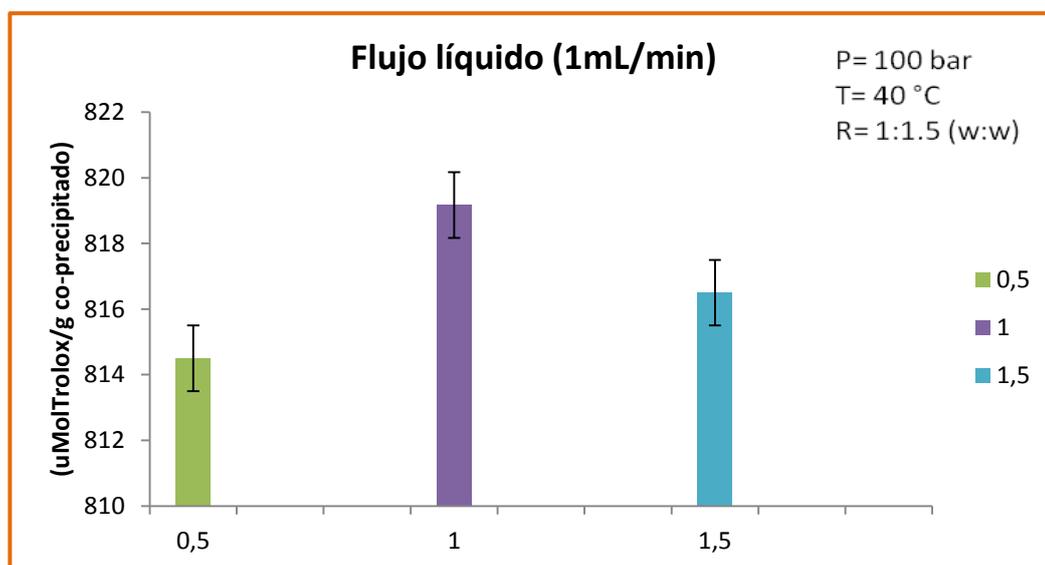
Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora

Como lo muestra la Fig. 4.1.2., la mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH se obtuvo a una temperatura de 40 °C con una concentración de 806.16 ± 0.58 µmol ET/g Co. La tabla 4.1.3 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable Flujo Líquido con valores constantes de relación extracto polímero (1:1.5).

**TABLA 4.1.3** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango – variable flujo líquido.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Concentración (µmol ET/g Co)
100	40	0.5	814.5 ± 1
100	40	<b>1</b>	<b>819.16 ± 0.58</b>
100	40	1.5	816.5 ± 1

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.1.3** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable Flujo Líquido.

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora

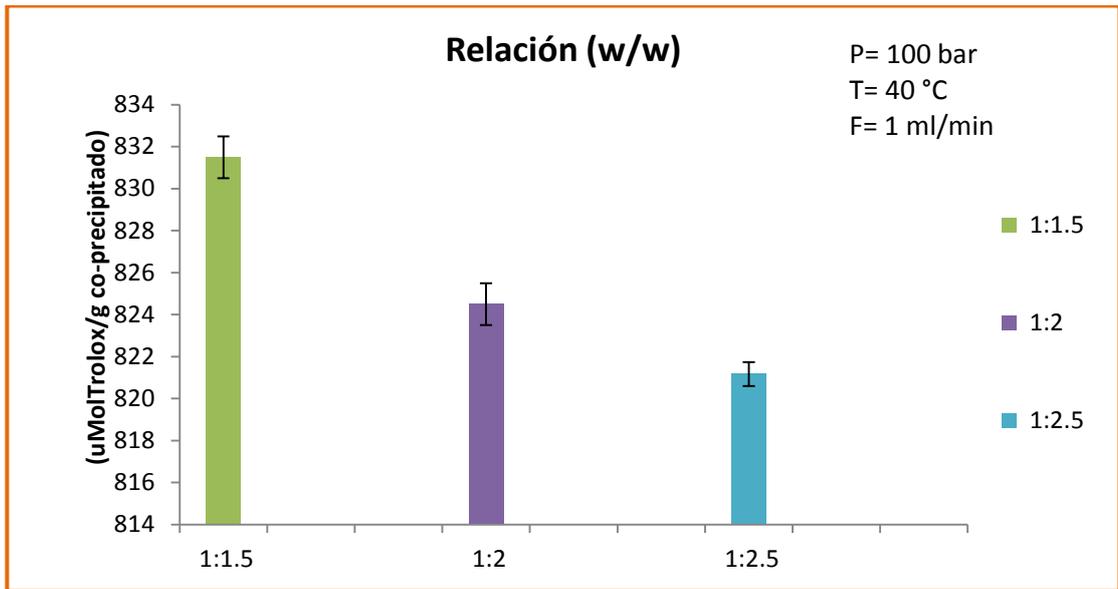
Como lo muestra la Fig. 4.1.3., la mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH se obtuvo a un flujo líquido de 1mL/min con una concentración de  $819.17 \pm 0.58 \mu\text{mol ET/g Co}$ .

La tabla 4.1.4 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable relación extracto: polímero.

**TABLA 4.1.4** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación extracto: polímero.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	Concentración (µmol ET/g Co)
100	40	1	<b>1:1.5</b>	<b>831.5 ± 1</b>
100	40	1	1:2	824.5 ± 1
100	40	1	1:2.5	821.17 ± 1

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.1.4** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación extracto: polímero.

Fuente: Anexo 2.2.1  
Elaboración: La autora

Como lo muestra la Fig. 4.1.4., la mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH, se obtuvo a una relación de 1:1.5 con una concentración de 831.50±1 µmol ET/g Co.

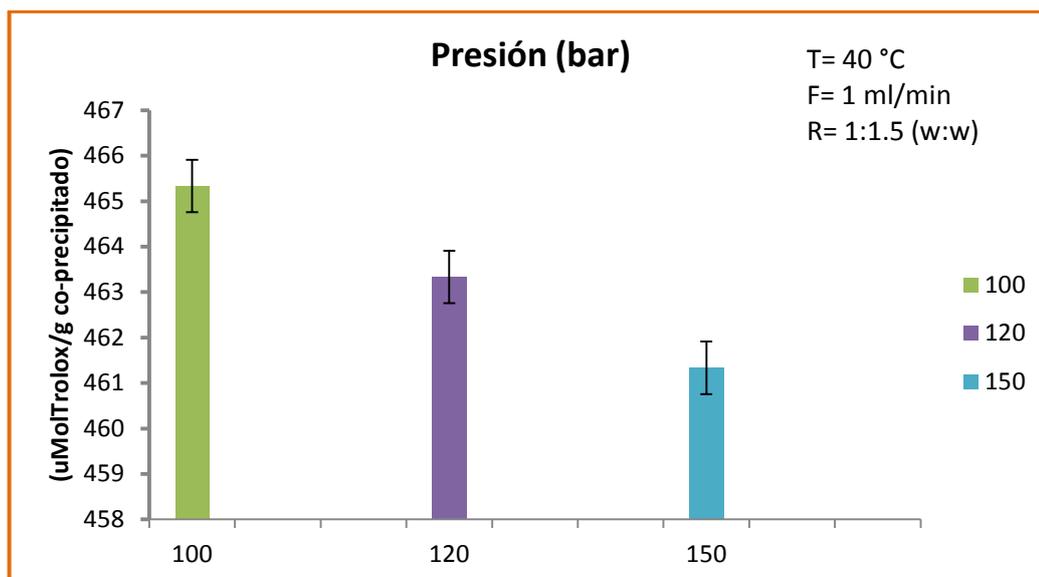
#### 4.2.1 Actividad Antioxidante método ABTS.

La tabla 4.2.1 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable presión con valores constantes de temperatura 40°C, flujo líquido 1mL/min y relación extracto polímero 1:1.5.

**TABLA 4.2.1** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión.

Presión (bar)	Concentración (µmol ET/g Co)
100	465.3±0.58
120	463.3±0.58
150	461.3±0.58

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.2.1** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable presión.

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora

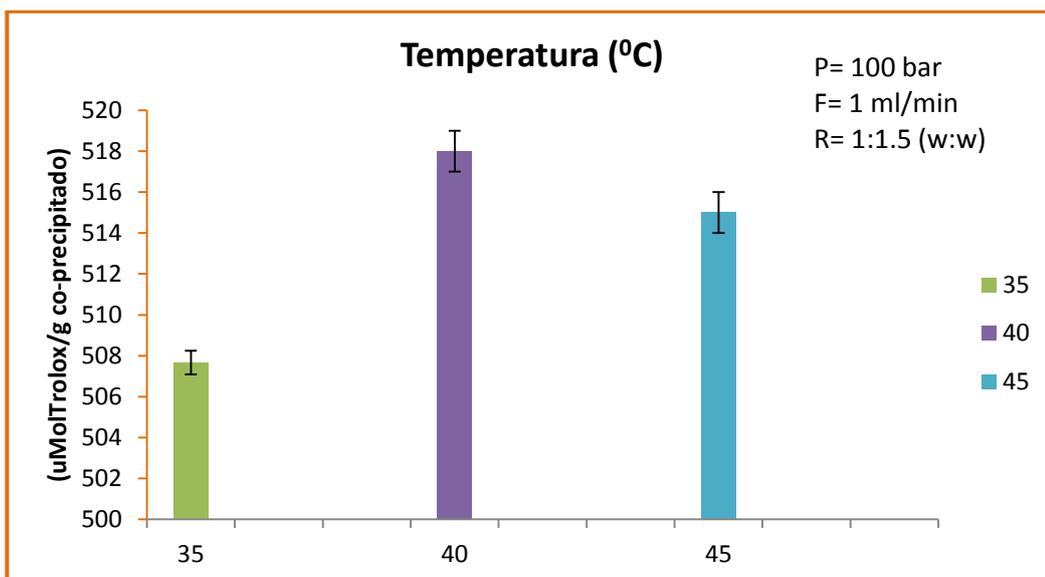
Como muestra la figura 4.2.1 la mejor actividad antioxidante realizada por el método ABTS según la variable presión es de 100 bares con una concentración de  $465.3 \pm 0.58 \mu\text{mol ET/g Co}$ .

La tabla 4.2.2 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable temperatura con valores constantes de flujo líquido 1mL/min y relación extracto polímero de 1:1.5.

**TABLA 4.2.2** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango – variable temperatura.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Concentración ( $\mu\text{mol ET/g Co}$ )
100	35	507.6 ± 0.58
100	<b>40</b>	<b>518.0 ± 1</b>
100	45	515.0 ± 1

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.2.2** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable temperatura.

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora

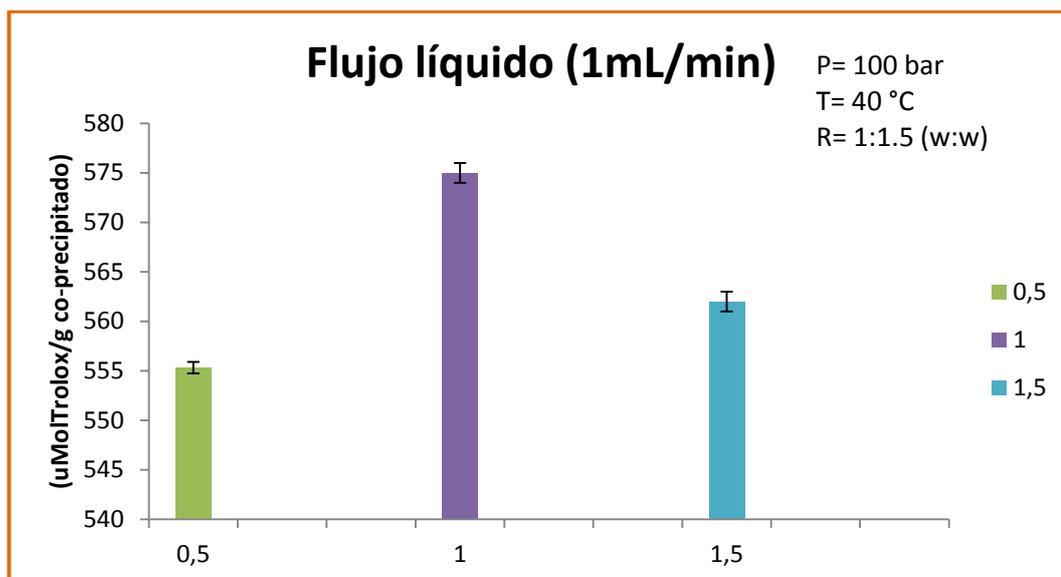
Como lo muestra la Fig. 4.2.2 la mejor AA realizada por el método ABTS según la variable temperatura es de 40 0C con una concentración de 518.0±1 µmol ET/g Co.

La tabla 4.2.3 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable Flujo Líquido con valores constantes de relación extracto polímero 1:1.5.

**TABLA 4.2.3** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable flujo líquido.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Concentración (µmol ET/g Co)
100	40	0.5	555.3±0.58
100	40	<b>1</b>	<b>575.0±1</b>
100	40	1.5	562.0±1

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.2.3** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango - variable Flujo Líquido.

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora

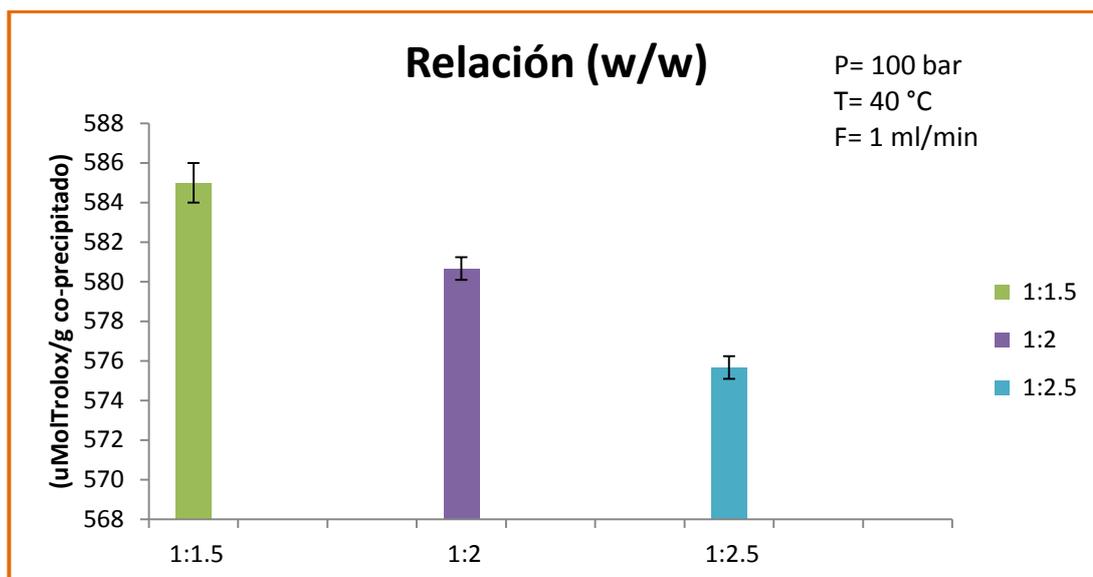
Como lo muestra la Fig. 4.2.3 la mejor AA según la variable flujo líquido es de 1 mL/min con una concentración de  $575.0 \pm 1 \mu\text{mol ET/g Co}$ .

La tabla 4.2.4 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable relación extracto: polímero.

**TABLA 4.2.4** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable relación extracto: polímero.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto: polímero (w:w)	Concentración ( $\mu\text{mol ET/g Co}$ )
100	40	1	<b>1:1.5</b>	<b>585.0 ± 1</b>
100	40	1	1:2	580.6 ± 0.58
100	40	1	1:2.5	575.6 ± 0.58

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.2.4** Actividad antioxidante de co-precipitado de mango variable relación.

Fuente: Anexo 2.2.2  
Elaboración: La autora

Como lo muestra la Fig.4.2.4 la mejor AA realizada por el método ABTS según la variable relación extracto: polímero es de 1:1.5 con una concentración de  $585.0 \pm 1 \mu\text{mol ET/g Co}$ .

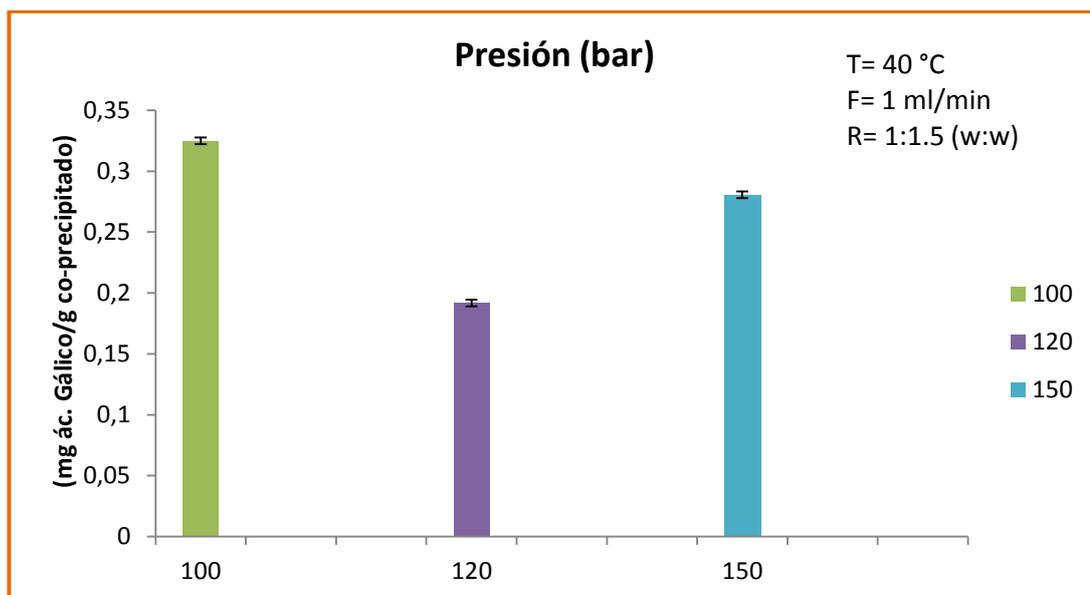
#### 4.3.1. Fenoles totales.

La tabla 4.3.1 muestra los resultados de fenoles totales obtenidos con respecto a la variable presión con valores constantes de temperatura  $40^{\circ}\text{C}$ , flujo líquido de  $1\text{mL/min}$ , relación extracto polímero 1:1.5.

**TABLA 4.3.1** Fenoles Totales de co-precipitado de mango – variable presión.

Presión (bar)	(mg GAE/ g Co)
100	$0.325 \pm 0.002$
120	$0.191 \pm 0.002$
150	$0.280 \pm 0.002$

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.3.1** Fenoles Totales de co-precipitado de mango - variable presión.

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora

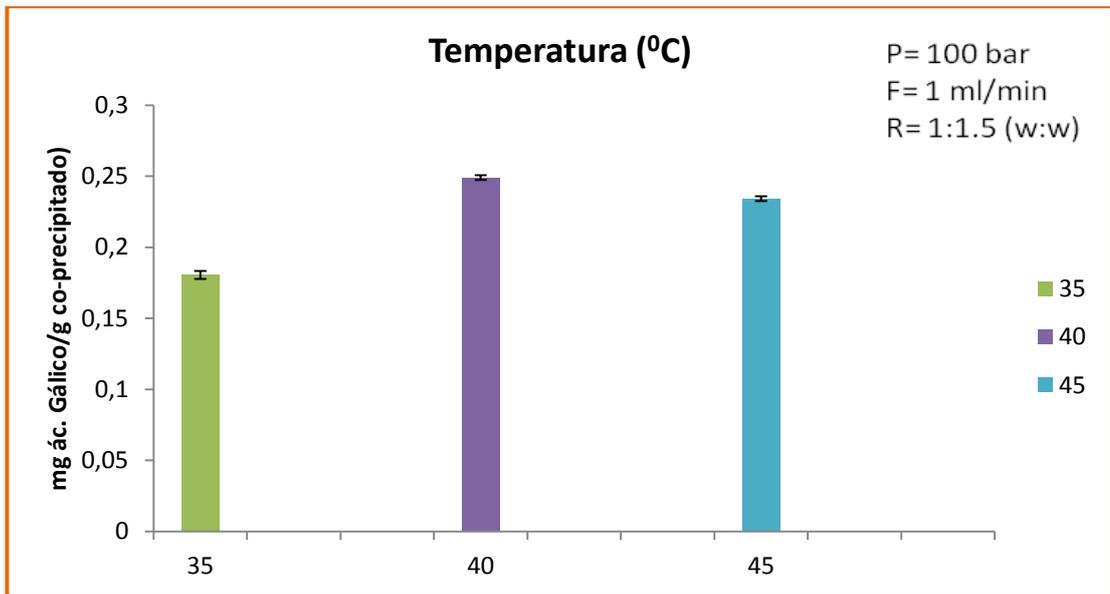
Como lo muestra la Fig. 4.3.1 el mayor contenido de Fenoles totales según la variable presión es de 100 bares con una concentración de  $0.325 \pm 0.002$  mg GAE/ g Co.

La tabla 4.3.2 muestra los resultados de actividad antioxidante obtenidos con respecto a la variable temperatura.

**TABLA 4.3.2** Actividad Antioxidante de co-precipitado de mango - variable temperatura.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	(mg GAE/ g Co)
100	35	0.181 ± 0.002
100	<b>40</b>	<b>0.249 ± 0.001</b>
100	45	0.234 ± 0.001

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.3.2** Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable temperatura.

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora

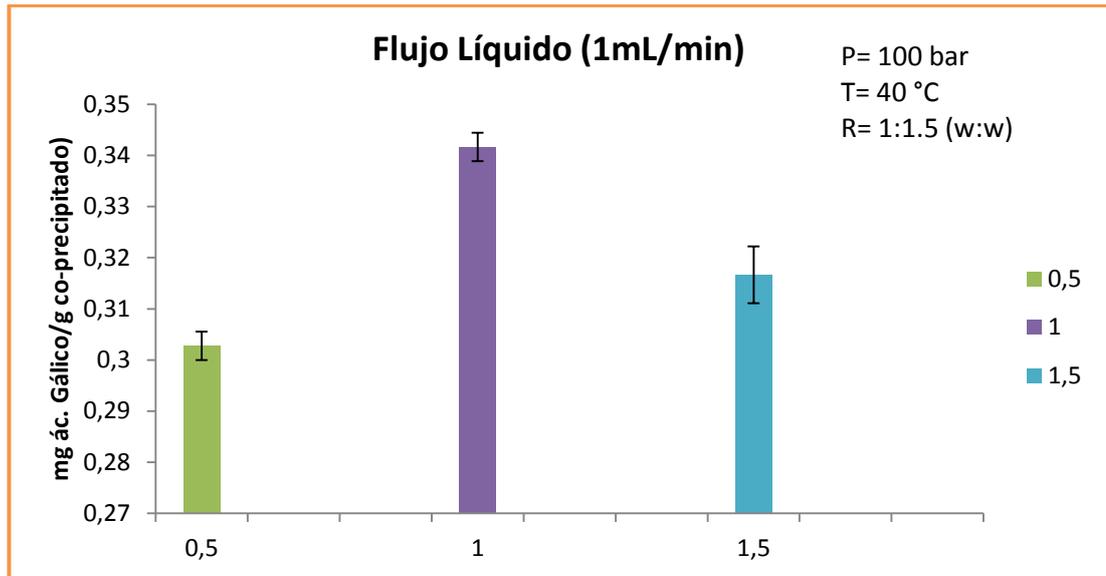
Como lo muestra la Fig. 4.3.2 la mayor cantidad de fenoles totales según la variable temperatura se obtuvo a 35°C con una concentración de 0.249±0.001 mg GAE/ g Co.

La tabla 4.3.3 muestra los resultados de fenoles totales obtenidos con respecto a la variable Flujo Líquido.

**TABLA 4.3.3** Fenoles Totales de co-precipitado de mango variable flujo líquido.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	(mg GAE/ g Co)
100	40	0.5	0.303±0.002
100	40	<b>1</b>	<b>0.342±0.002</b>
100	40	1.5	0.316±0.005

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.3.3** Fenoles totales de co-precipitado de mango – variable flujo líquido.

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora

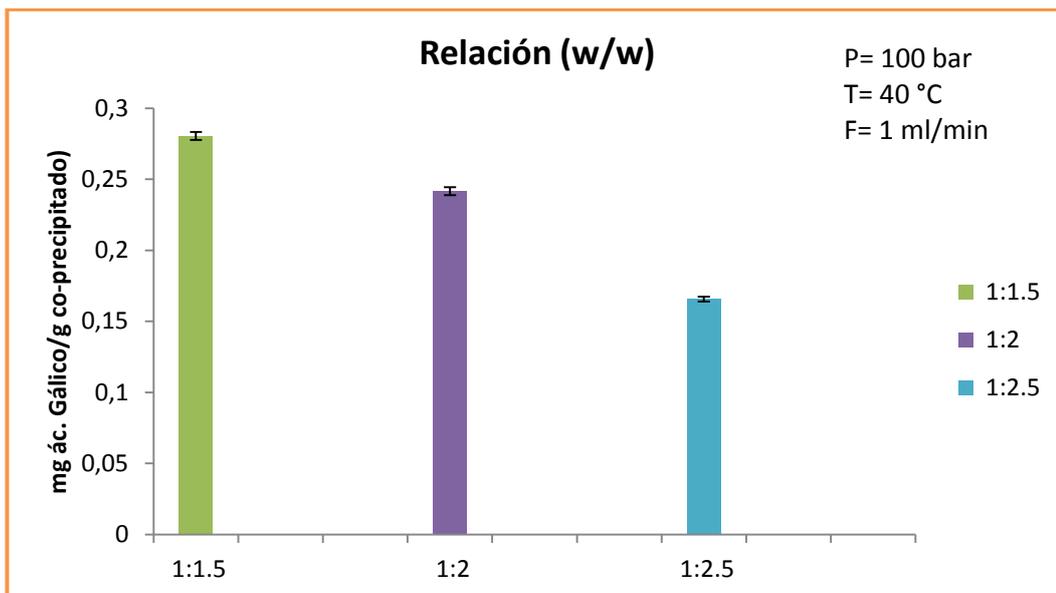
Como lo muestra la Fig. 4.3.3 la mayor cantidad de fenoles totales según la variable flujo líquido se obtuvo a 1mL/min con una concentración de  $0.342 \pm 0.002$  mg GAE/ g Co.

La tabla 4.3.4 muestra los resultados de fenoles totales obtenidos con respecto a la variable relación extracto: polímero.

**TABLA 4.3.4** Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable relación extracto: polímero.

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	(mg GAE/ g Co)
100	40	1	<b>1:1.5</b>	<b>0.280±0.002</b>
100	40	1	1:2	0.241±0.002
100	40	1	1:2.5	0.165±0.001

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora

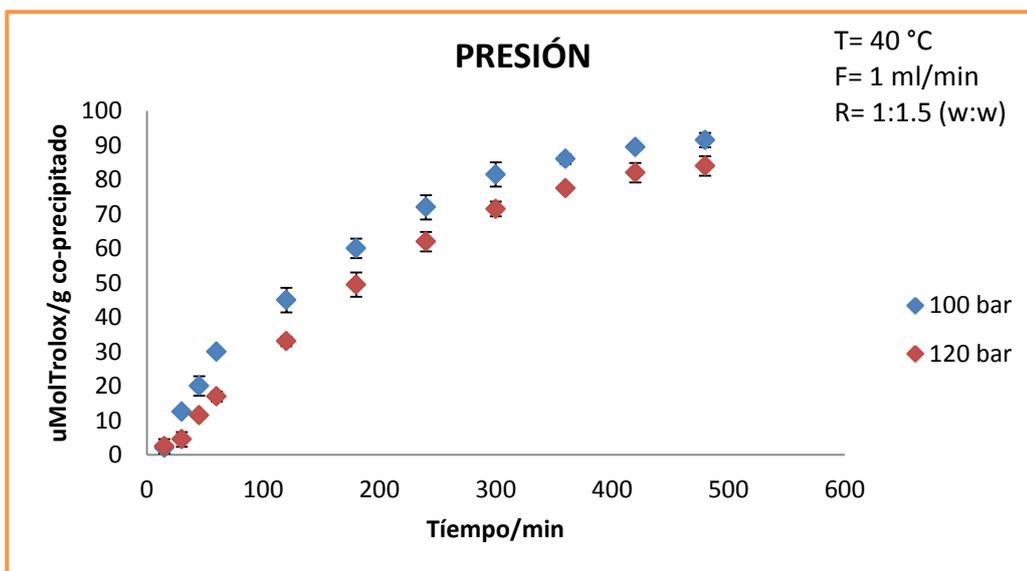


**Fig. 4.3.4** Fenoles totales de co-precipitado de mango - variable relación.

Fuente: Anexo 2.2.3  
Elaboración: La autora

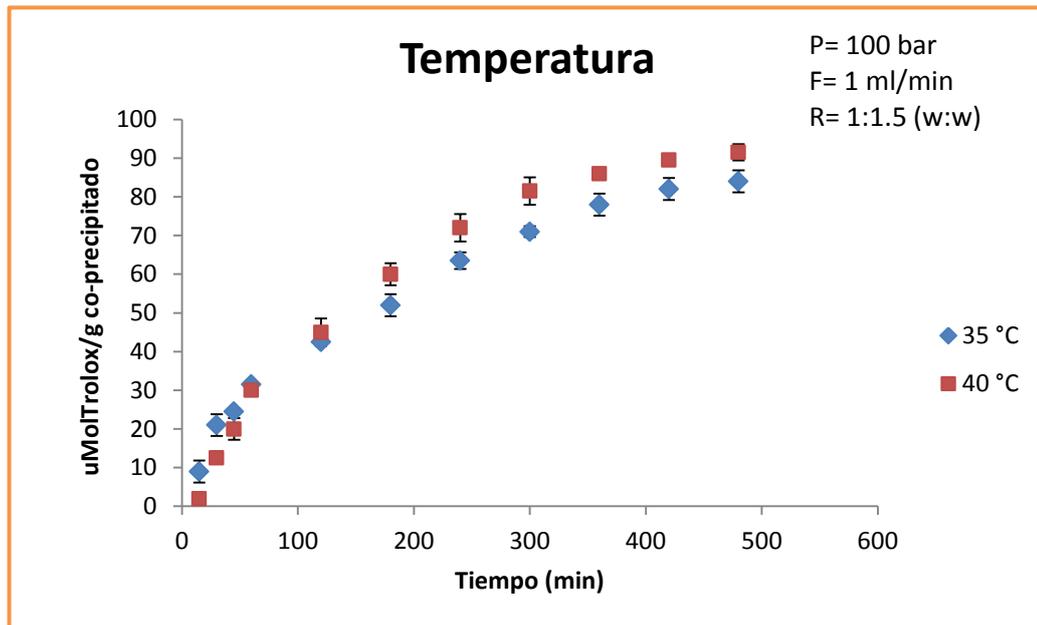
Como lo muestra la Fig. 4.3.4 la mayor cantidad de fenoles totales según la variable relación extracto polímero se obtuvo a 1:1.5 con una concentración de  $0.280 \pm 0.002$  mg GAE/ g Co.

#### 4.4.1 Cinética de liberación.



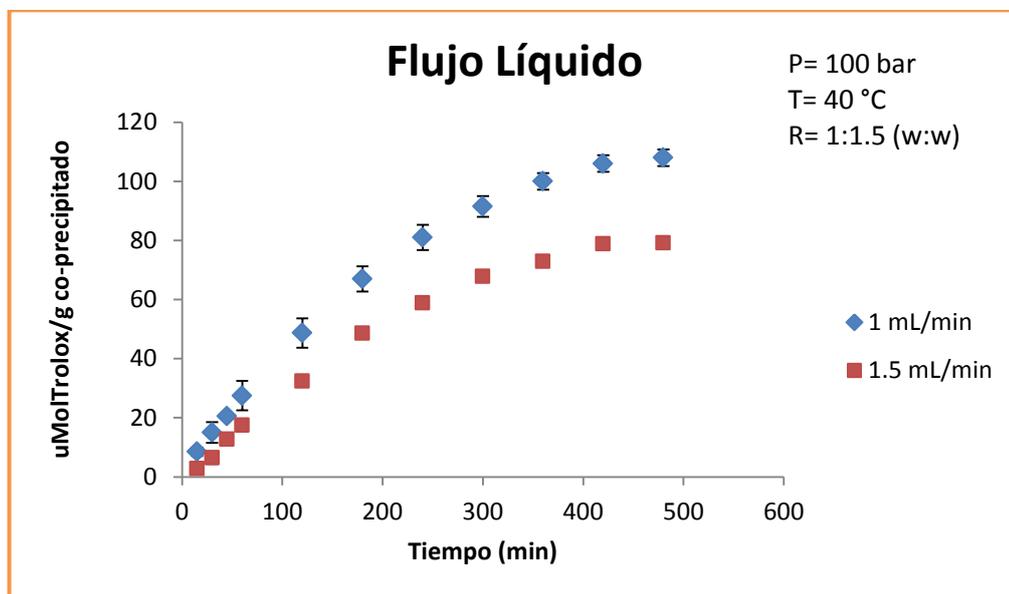
**Fig. 4.4.1** Cinética de liberación de co-precipitados de mango- variable presión.

Fuente: Anexo 2.3.1  
Elaboración: La autora



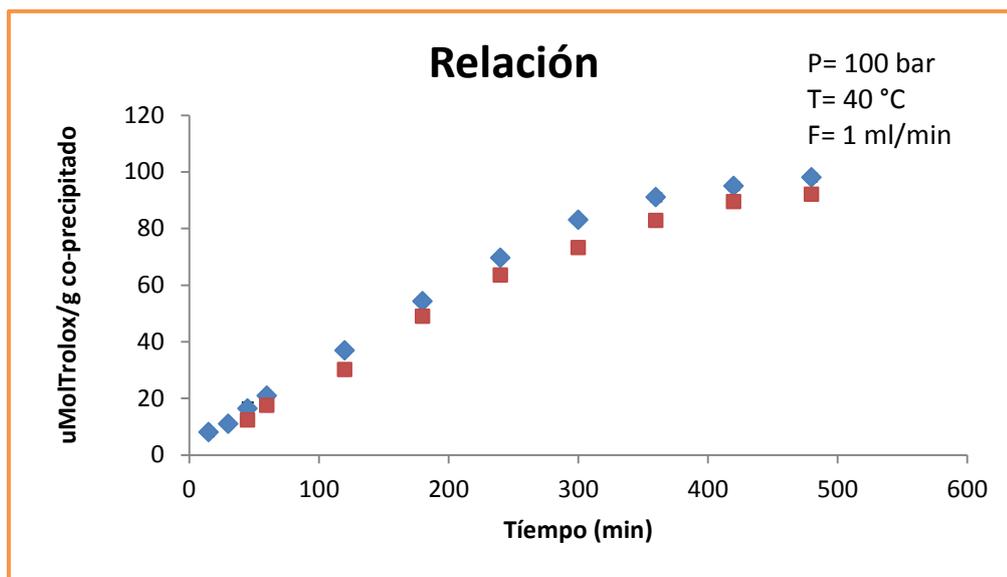
**Fig. 4.4.2** Cinética de liberación de co-precipitados de mango- variable temperatura.

Fuente: Anexo 2.3.2  
Elaboración: La autora



**Fig. 4.4.3** Cinética de liberación de co-precipitados de mango- variable flujo líquido.

Fuente: Anexo 2.3.3  
Elaboración: La autora



**Fig.4.4.4** Cinética de liberación de co-precipitados de mango- variable relación.

Fuente: Anexo 2.3.4  
Elaboración: La autora

Con respecto a la cinética de liberación los compuestos fenólicos en la solución fisiológica empiezan a liberarse a los 15 min, y siguen liberándose de manera controlada hasta alcanzar las 8 horas (480min). Como podemos observar también es más favorable la liberación de los co-precipitados obtenidos a una presión de 100 bar como lo muestra la Fig.4.4.1, una temperatura de 40°C como lo muestra la Fig.4.4.2, a un flujo líquido de 1mL/min como lo muestra la Fig. 4.4.3, y una relación extracto: polímero 1:1.5 como lo muestra la Fig.4.4.4.

#### **Discusión de resultados.**

La influencia de presión y temperatura son los parámetros más relevantes dentro del proceso antisolvente supercrítico. La regla general del proceso antisolvente supercrítico cuando mayor es la presión, mayor el poder del disolvente y menor es la selectividad de extracción (Simándi., 1998), con respecto a la temperatura de extracción en los casos de los compuestos termolábiles los valores se deben establecer en el intervalo de 35-50 °C en las proximidades del punto crítico y tan bajo como sea posible para evitar la degradación (Fornarie T. et al 2012).

Con respecto a nuestros resultados se observó que las mejores condiciones de extracción de los co-precipitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango se obtuvieron a una presión de 100 bares, una temperatura de 40 °C, flujo líquido de 1ml/min y una relación extracto: polímero de 1:1.5.

Existen diversos estudios realizados por medio de la técnica antisolvente supercrítico aunque existe escasa bibliografía con lo que se refiere a los co-precipitados de mango. En el estudio realizado por Meneses M. et al (2015) en donde se utilizó SAE para la recuperación de antioxidantes de subproductos de mango, este proceso permitió la recuperación de cerca del 90% de compuestos fenólicos y la mejor recuperación se obtuvo a 40°C y 100 Bar., dichos resultados se comparan con los realizados en el presente estudio en donde la mejor extracción la obtuvimos en las mismas condiciones de presión y temperatura.

En otro estudio realizado por Franceschi E. et al (2008) utilizan la técnica de co-precipitación supercrítica para la precipitación de  $\beta$ -caroteno y PHBV en donde los experimentos se realizaron en un rango de presión de 80 a 120 Bar., y una temperatura fija de 40°C obteniendo los mejores resultados a una presión de 100 Bar., al igual que nuestros resultados.

En lo que se refiere a la actividad antioxidante realizada por el método DPPH en el trabajo realizado por Meneses M. et al (2015) se obtuvo una concentración de 851.9  $\mu$ Mol TE/g y comparando con nuestros resultados en los cuales obtuvimos la mejor actividad antioxidante con una concentración de 831.50  $\mu$ Mol es un poco menor a la obtenida en el estudio pero mucho mayor a la obtenida por Martínez et al (2012) la cual se realizó en cascara de mango en donde se obtuvo 47.1  $\mu$ Mol TE/g.

Con lo que respecta a cinética de liberación en un estudio realizado por Fernández. et al (2008) la liberación de los compuestos fenólicos empieza a partir de los 5 min, y termina en un estado estacionario hasta alcanzar un tiempo máximo de 2 horas, la liberación se vio mucho más favorable en los extractos obtenidos bajo condiciones supercríticas de presión (100 bar) y temperatura (40°C), al igual que nuestros resultados la liberación es más favorable a las mismas condiciones de presión y temperatura supercríticas aunque no se puede comparar lo primero ya que nuestro tiempo de liberación fue a 8 horas y los compuestos empiezan a liberarse a los 15 min esto puede deberse a que no se utilizó el mismo medio de liberación.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo se concluyó en lo siguiente:

- La mejor actividad antioxidante realizada por el método DPPH se obtuvo a una presión de 100 bar con una concentración de  $763.5 \pm 1$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ , a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  con una concentración de  $806.17 \pm 0.58$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ , a un flujo líquido de 1mL/min con una concentración de  $819.17 \pm 0.58$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$  y una relación extracto polímero con una concentración de  $831.50 \pm$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ .
- La mejor actividad antioxidante realizada por el método ABTS se obtuvo a una presión de 100 bar con una concentración de  $465.3 \pm 0.58$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ , a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  con una concentración de  $518.0 \pm 1$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ , a un flujo líquido de 1mL/min con una concentración  $575.0 \pm 1$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ , y una relación extracto polímero con una concentración de  $585.0 \pm 0.58$   $\mu\text{Mol ET/g Co}$ .
- El mayor contenido de fenoles totales se obtuvo a una presión de 100 bar con una concentración de  $0.325 \pm 0.002$  mg GAE/ g Co, a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  con una concentración de  $0.249 \pm 0.001$  mg GAE/ g Co, a un flujo líquido de 1mL/min con una concentración  $0.342 \pm 0.002$  mg GAE/ g Co de y una relación extracto polímero de 1:1.5 con una concentración de  $0.281 \pm 0.02$  mg GAE/ g Co.
- Con respecto a la cinética de liberación los compuestos fenólicos en la solución fisiológica empiezan a liberarse a los 15 min y siguen liberándose de manera controlada hasta alcanzar las 8 horas (480min), y resulta más favorable la liberación de los co-precitados supercríticos de compuestos fenólicos de mango obtenidos a una presión de 100 bar, una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , a un flujo líquido de 1mL/min, y una relación extracto: polímero 1:1.5.

## **RECOMENDACIONES**

Para futuras investigaciones, se recomienda realizar la cinética de liberación en varios medios de liberación estos pueden ser simulando un fluido digestivo, o simulando un fluido gastrointestinal para obtener resultados más efectivos sobre el comportamiento de liberación de dichos compuestos.

## BIBLIOGRAFIA

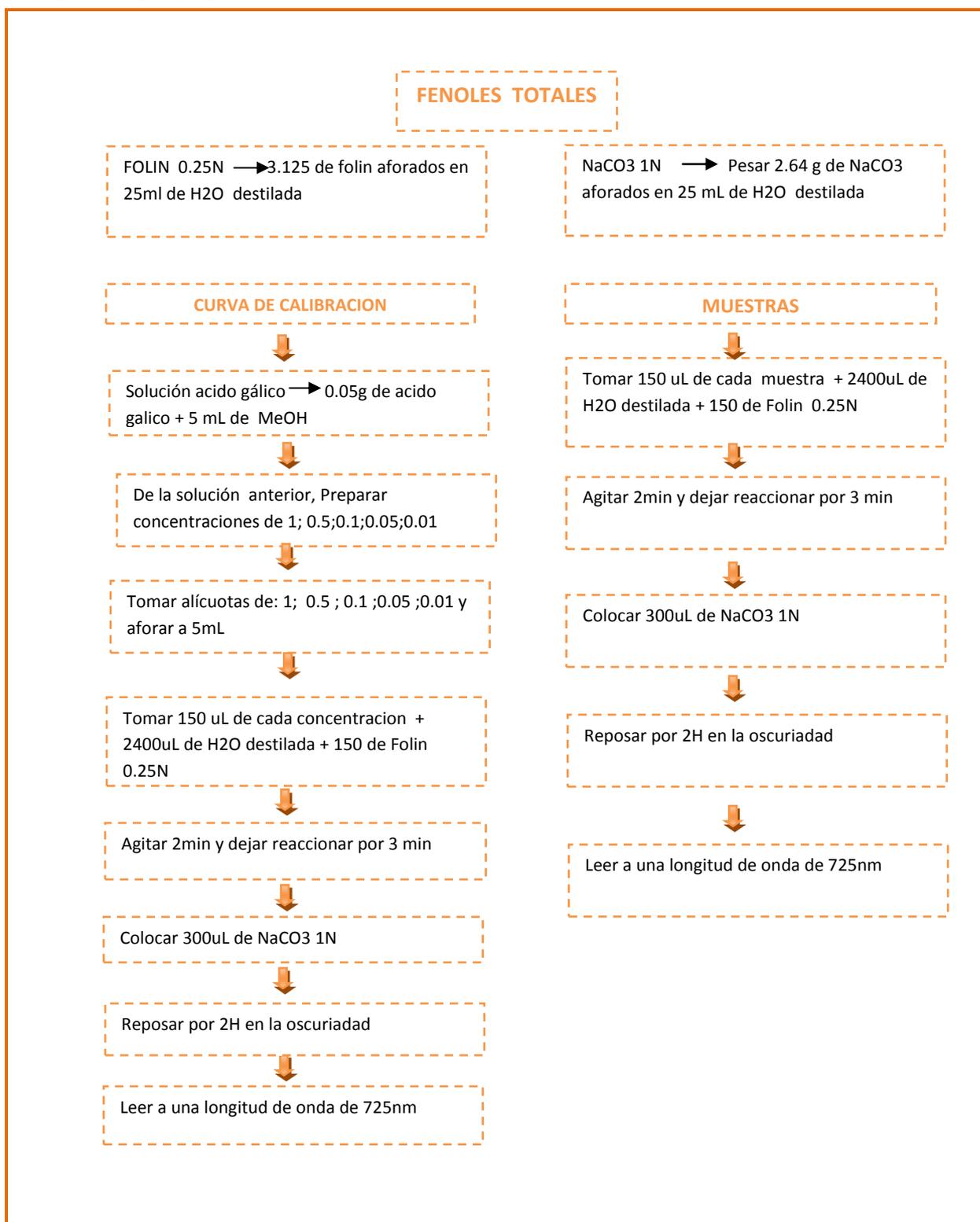
- Abbasi. N. A.. et al. (2009). "Postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L.) fruit as affected by chitosan coating." Pak. J. Bot **41**(1): 343-357.
- Ajila. C.. et al. (2010). "Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts." Food and Chemical Toxicology **48**(12): 3406-3411.
- Avello. M. and M. Suwalsky (2006). "Radicales libres. antioxidantes naturales y mecanismos de protección." Atenea (Concepción)(494): 161-172.
- Berardini. N.. et al. (2004). "Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv.'Tommy Atkins') peels. pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **18**(19): 2208-2216.
- Berardini. N.. et al. (2005). "Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics." Innovative Food Science & Emerging Technologies **6**(4): 442-452.
- Dorta. E.. et al. (2012). "Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties." Journal of food science **77**(1): C80-C88.
- Fornari. T.. Ruiz-Rodriguez. A.. Vicente. G.. Vázquez. E.. García-Risco. M. R.. & Reglero. G. (2012). Kinetic study of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different plants from Lamiaceae family. *The Journal of Supercritical Fluids*. **64**. 1-8.
- Fernández-Ponce, M.T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., 2012. Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *J. Supercrit. Fluids* **72**, 168–175.
- Floris, T., Filippino, G., Scrugli, S., Pinna, M.B., Argiolas, F., Argiolas, A., Murru, M., Reverchon, E., 2010. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. *J. Supercrit. Fluids* **54** (2), 165–170.
- Han, D.D., Chen, C.J., Zhang, C., Zhang, Y., Tang, X., 2010. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **51** (1), 260–263.
- Hou, S.Y., Wang, F., Li, Y.M., Li, Y., Wang, M.Q., Sun, D.J., Sun, C.H., 2012. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration. *Food Chem.* **132** (1), 289–294.
- Joung, S.N., Yoo, C.W., Shin, H.Y., Kim, S.Y., Yoo, K.-P., Lee, C.S., Huh, W.S., 2001. Measurements and correlation of high-pressure VLE of binary CO<sub>2</sub>-alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol). *Fluid Phase Equilib.* **185** (1–2), 219–230.

- Khan, R.S., Grigor, J., Winger, R., Win, A., 2013. Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends Food Sci. Technol.* 30 (1), 27–37.
- Kabuki. T.. et al. (2000). "Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds." *Food Chemistry* **71**(1): 61-66.
- Kim. Y.. et al. (2007). "Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage." *Food Chemistry* **105**(4): 1327-1334.
- Ling. L. T.. et al. (2009). "Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant." *Food Chemistry* **113**(4): 1154-1159.
- Makare, N., Bodhankar, S., Rangari, V., 2001. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J. Ethnopharmacol.* 78 (2–3).
- Martín. L.. et al. (2011). "Supercritical antisolvent fractionation of ryanodol from *Persea indica*." *The Journal of Supercritical Fluids* **60**: 16-20.
- Martínez. R.. et al. (2012). "Chemical. technological and in vitro antioxidant properties of mango. guava. pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate." *Food Chemistry* **135**(3): 1520-1526.
- Martínez Valverde. I.. et al. (2000). "Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta." *Arch. Latinoam. Nutr* **50**(1): 5-18.
- Meneses. M. A.. et al. (2015). "Antioxidant phenolic compounds recovery from *Mangifera indica* L. by-products by supercritical antisolvent extraction." *Journal of Food Engineering* **163**: 45-53.
- Núñez Sellés. A. J.. et al. (2007). "Experiencias de la terapia antioxidante con Vimang en la atención primaria de salud en Cuba." *Revista Cubana de Salud Pública* **33**(3): 0-0.
- Reverchon. E. (1999). "Supercritical antisolvent precipitation of micro-and nanoparticles." *The Journal of Supercritical Fluids* **15**(1): 1-21.
- Reverchon. E.. et al. (2008). "Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: interpretation of results." *The Journal of Supercritical Fluids* **47**(1): 70-84.
- Ribeiro. S.. et al. (2008). "Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties." *Food Chemistry* **110**(3): 620-626.

- Robards. K.. et al. (1999). "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits." Food Chemistry **66**(4): 401-436.
- Saúco. V. G. (2009). El cultivo del mango. Mundi-Prensa Libros.
- Simándi. B.. et al. (1998). "Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin." Food Research International **31**(10): 723-728.
- Tsimidou. M. (1998). "Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect." Italian Journal of Food Science **10**(2): 99-116.
- Wauthoz. N.. et al. (2007). "Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone. mangiferin." International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences **1**(2): 112-119.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N., 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.* **46** (2), 505–513.
- Wu, T.-H., Yen, F.-L., Lin, L.-T., Tsai, T.-R., Lin, C.-C., Cham, T.-M., 2008. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **346** (1–2), 160–168.
- Yang, L., Huang, J.-M., Zu, Y.-G., Ma, C.-H., Wang, H., Sun, X.-W., Sun, Z., 2011. Preparation and radical scavenging activities of polymeric procyanidin nanoparticles by a supercritical antisolvent (SAS) process. *Food Chem.* **128** (4), 1152–1159.
- Yen, F.-L., Wu, T.-H., Tzeng, C.-W., Lin, L.-T., Lin, C.-C., 2010. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. *J. Agric. Food Chem.* **58** (12), 7376– 7382.
- Zabet, G., Moraes, M., Meireles, M.A., 2014. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from botanic matrices: experimental data, process parameters and economic evaluation. *Recent Patents Eng.* **6** (3), 182–206.

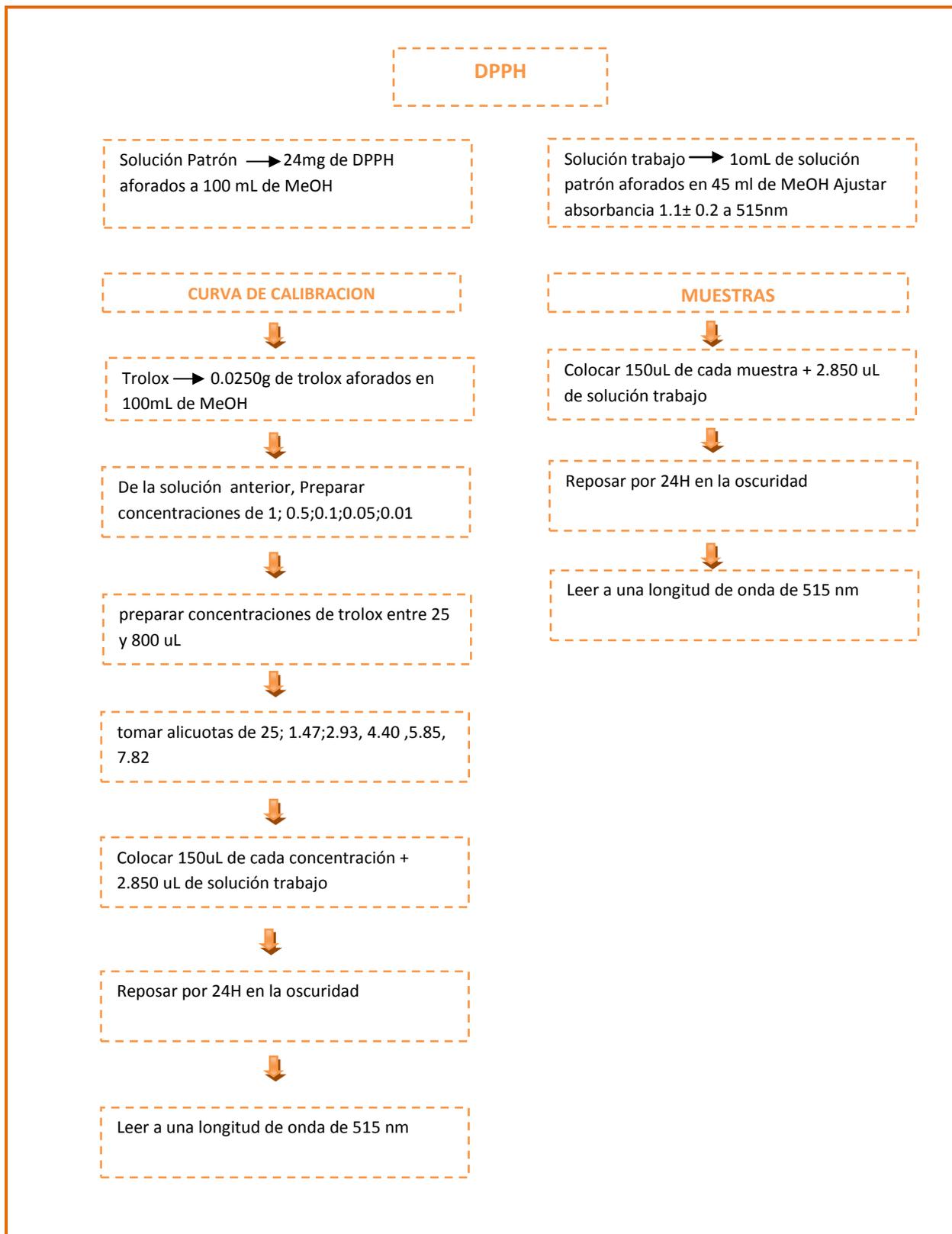
## **ANEXOS**

## ANEXO 1: ESQUEMAS



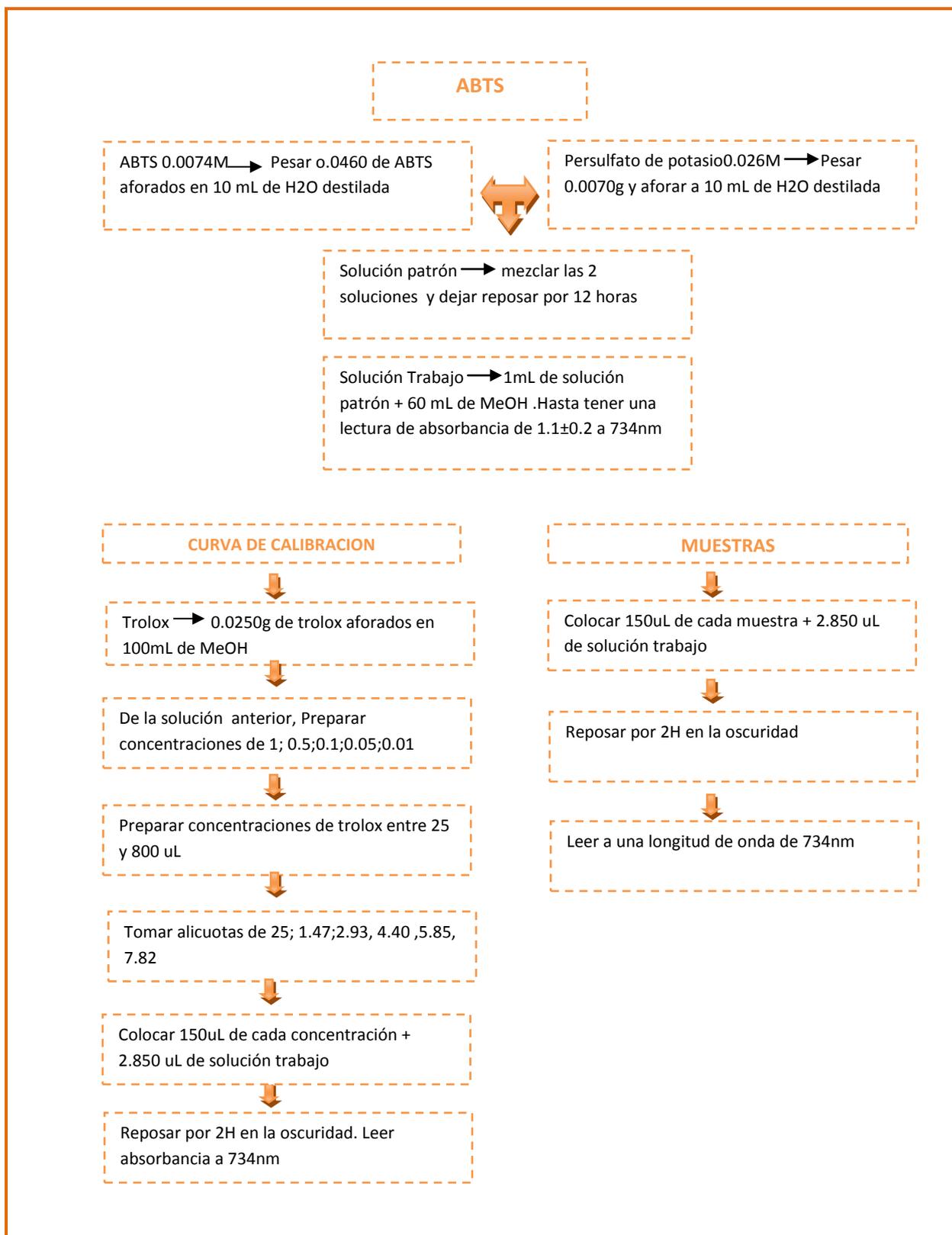
**Figura 1.1** Determinación de fenoles totales.

Fuente: experimentación  
Elaboración: La autora



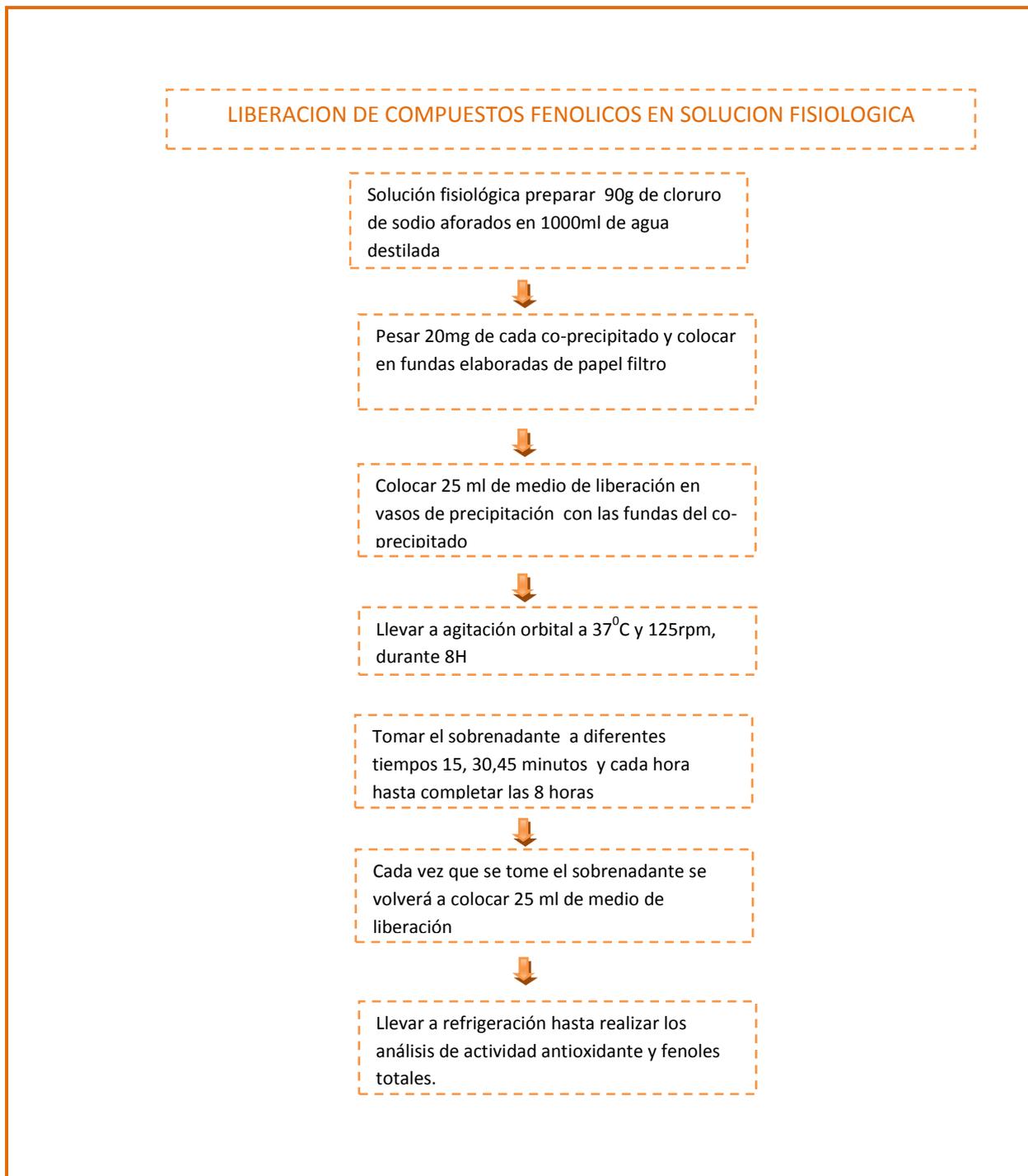
**Figura 1.2** Determinación de la actividad antioxidante (DPPH).

Fuente: experimentación  
Elaboración: La autora



**Figura 1.3** Determinación de la actividad antioxidante (ABTS).

Fuente: experimentación  
Elaboración: La autora



**Figura 1.4** Liberación de compuestos fenólicos en solución fisiológica.

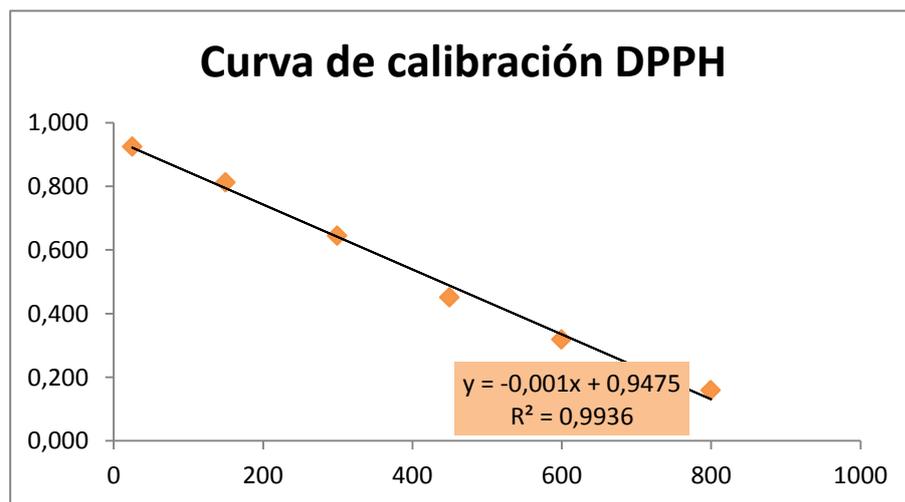
Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

## ANEXO 2 RESULTADOS

### 2.1 Curvas de calibración.

#### 2.1.1 Curva de Calibración DPPH

Concentración $\mu$ Mol	Absorbancia nm	Promedio
25,06	0.925	0.925
	0.924	
	0.925	
149.99	0.813	0.813
	0.812	
	0.813	
299.98	0.645	0.645
	0.644	
	0.645	
499.97	0.451	0.451
	0.450	
	0.451	
600	0.319	0.319
	0.318	
	0.319	
800	0.159	0.159
	0.158	
	0.159	



Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.1.1.2 Cálculo Curva de Calibración DPPH

DPPH } 24 mg  $\Rightarrow$  aforados a 100mL MeOH

Trolox }  $C_{14}H_{18}O_4$   
 250.29g/100mL  $\times$  1Mol  
 0.0250g/100mL  $\times$  x  
 X=0.0009988 Mol  $\Rightarrow$  998.84uMol

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 800 \cdot 25$$

$$X = 20.02 \text{ mL}$$



$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 600 \cdot 25$$

$$X = 15.01 \text{ mL}$$



$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 480 \cdot 25$$

$$X = 1.26 \text{ mL}$$



$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 300 \cdot 25$$

$$X = 7.90 \text{ mL}$$

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 150 \cdot 25$$

$$X = 3.75 \text{ mL}$$

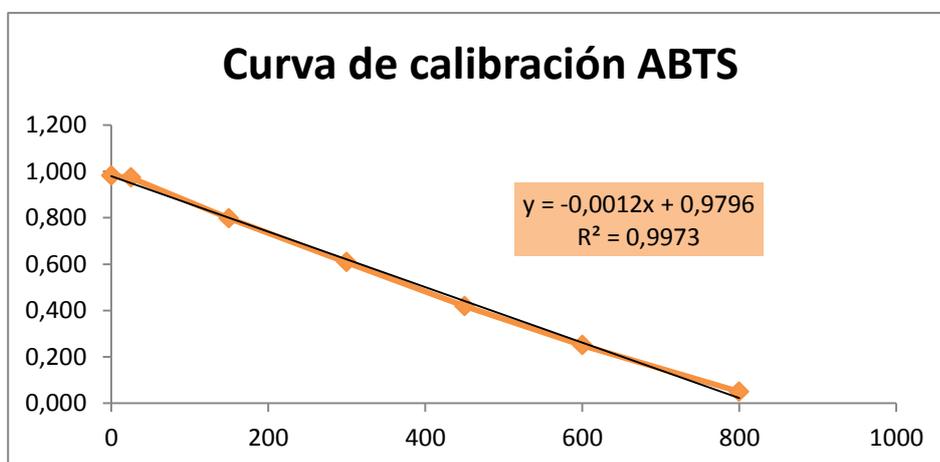
$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$998.84 \cdot x = 25 \cdot 25$$

$$X = 0.625 \text{ mL}$$

## 2.1.2 Curva de Calibración ABTS

Concentración μ Mol	Absorbancia nm	Promedio
25.06	0.973	0.973
	0.972	
	0.973	
149.99	0.797	0.797
	0.798	
	0.797	
299.98	0.608	0.608
	0.607	
	0.608	
499.97	0.419	0.419
	0.420	
	0.419	
600	0.250	0.250
	0.251	
	0.250	
800	0.050	0.050
	0.049	
	0.050	



Fuente: Experimentación  
 Elaboración: La autora

### 2.1.2.1 Cálculo Curva de Calibración ABTS.

**ABTS**

$$\begin{array}{ccc} 514.62\text{g} & 1\text{Mol} & 3.8081\text{g} \\ X & \times & x \\ & 0.0074\text{Mol} & \times \\ & & 1000\text{mL} \\ & & 25\text{mL} \\ X=3.8081\text{g} & & x=0.0952\text{g} \end{array}$$

**Persulfato de potasio**

$$\begin{array}{ccc} 240.24\text{g} & 1\text{Mol} & 0.6246 \\ X & \times & x \\ & 0.0026\text{M} & \times \\ & & 1000\text{mL} \\ & & 25\text{mL} \\ X=0.6246\text{g} & & x=0.0156\text{g} \end{array}$$

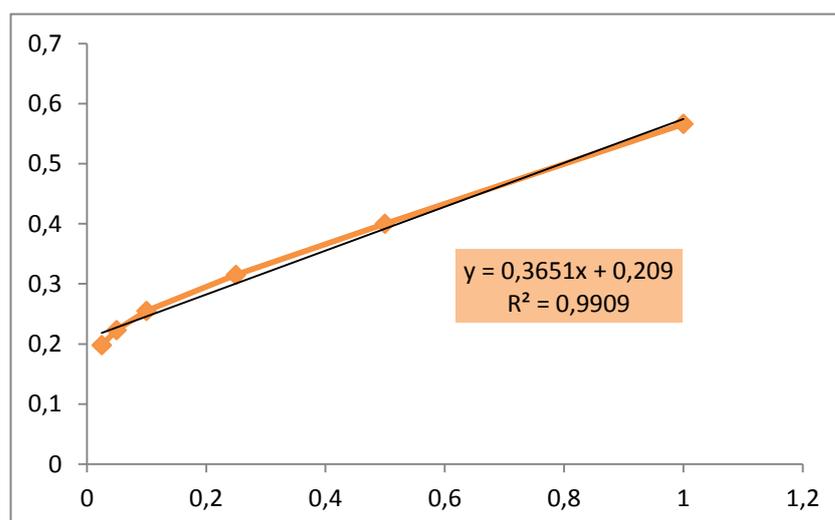
**Trolox**

$$\begin{array}{ccc} & & \text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4 \\ 250.29\text{g}/100\text{mL} & \times & 1\text{Mol} \\ 0.0250\text{g}/100\text{mL} & \times & x \\ X=0.0009988\text{ Mol} & \Rightarrow & 998.84\text{uMol} \end{array}$$

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$
$998.84 \cdot x = 800 \cdot 25$	$998.84 \cdot x = 600 \cdot 25$	$998.84 \cdot x = 480 \cdot 25$
$X = 20.02$	$X = 15.01$	$X = 1.26$
		$\Downarrow$
$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$
$998.84 \cdot x = 300 \cdot 25$	$998.84 \cdot x = 150 \cdot 25$	$998.84 \cdot x = 25 \cdot 25$
$X = 7.90$	$X = 3.75$	$X = 0.625$

### 2.1.3 Curva de Calibración Fenoles Totales.

Concentración $\mu$ Mol	Absorbancia nm	Promedio
1	0.566	0.566
	0.565	
	0.566	
0.5	0.440	0.440
	0.439	
	0.440	
0.25	0.349	0.349
	0.348	
	0.349	
0.05	0.288	0.288
	0.287	
	0.288	
0.025	0.254	0.254
	0.254	
	0.253	
0.01	0.186	0.186
	0.186	
	0.185	



Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.1.3.1 Cálculo Curva de Calibración Fenoles Totales.

Folin	$C1.V1=C2.V2$ $(2N). (x)= (0.25 N). (25)$ $X =3.125\text{mL} \rightarrow \text{aforados en 25mL de H}_2\text{O}$				
Carbonato de Sodio	<table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="text-align: right;">1.0597</td> <td style="text-align: left;">1000mL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">x</td> <td style="text-align: center;"><del>25mL</del></td> </tr> </table> $x = 2.64\text{g} \rightarrow \text{Aforados 25 mL de H}_2\text{O}$	1.0597	1000mL	x	<del>25mL</del>
1.0597	1000mL				
x	<del>25mL</del>				
Ácido Gálico	<table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="text-align: right;">2mg</td> <td style="text-align: left;">1mL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">x</td> <td style="text-align: center;"><del>25mL</del></td> </tr> </table> $X=0.005\text{mg}$	2mg	1mL	x	<del>25mL</del>
2mg	1mL				
x	<del>25mL</del>				

#### Concentraciones

$$C1.V1=C2.V2$$

	S1	⇒ 5mg/5mL	⇒ 1mg/mL	⇒ 1000ppm
)	S2	⇒ 0.5mg/mL	⇒ 2.5mg S1 + 2.5 MeOH	
)	S3	⇒ 0.25 mg/mL	⇒ 2.5mg S2 + 2.5 MeOH	
)	S4	⇒ 0.1 mg/mL	⇒ 2 mg S3 + 3 MeOH	
)	S5	⇒ 0.05mg/mL	⇒ 2.5mg S4 + 2.5 MeOH	
)	S6	⇒ 0.025mg/mL	⇒ 2.5mg S5 + 2.5 MeOH	

## 2.2 Actividad antioxidante.

### 2.2.1. DPPH.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	LECTURA	X	Concentración (μMol ET/g Co)
A	100	40	1	1:1.5	0.185	762.5	<b>763.5 ± 1</b>
					0.183	764.5	
					0.184	763.5	
	120	40	1	1:1.5	0.188	759.5	760.5 ± 1
					0.187	760.5	
					0.186	761.5	
	150	40	1	1:1.5	0.191	756.5	756.5 ± 1
					0.190	757.5	
					0.192	755.5	
B	100	35	1	1:1.5	0.141	806.5	805.83 ± 0.58
					0.142	805.5	
					0.142	805.5	
	100	40	1	1:1.5	0.141	806.5	<b>806.16 ± 0.58</b>
					0.141	806.5	
					0.142	805.5	
	100	45	1	1:1.5	0.145	802.5	803.16 ± 0.58
					0.144	803.5	
					0.144	803.5	
C	100	40	0.5	1:1.5	0.134	813.5	814.5 ± 1
					0.132	815.5	
					0.133	814.5	
	100	40	1	1:1.5	0.129	818.5	<b>819.16 ± 0.58</b>
					0.128	819.5	
					0.128	819.5	
	100	40	1.5	1:1.5	0.130	817.5	816.5 ± 1
					0.132	815.5	
					0.131	816.5	
D	100	40	1	1:1.5	0.117	830.5	<b>831.5 ± 1</b>
					0.116	831.5	
					0.115	832.5	
	100	40	1	1:2	0.124	823.5	824.5 ± 1
					0.122	825.5	
					0.123	824.5	
	100	40	1	1:2.5	0.127	820.5	821.17 ± 1
					0.126	821.5	
						0.126	821.5

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.2.2. ABTS.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	LECTURA	X	Concentración (μMol ET/g Co)
A	100	40	1	1:1.5	0.531	466	465.3±0.58
					0.532	465	
					0.533	465	
	120	40	1	1:1.5	0.534	463	463.3±0.58
					0.534	463	
					0.533	464	
	150	40	1	1:1.5	0.535	462	461.3±0.58
					0.536	461	
					0.534	461	
B	100	35	1	1:1.5	0.489	508	507.6±0.58
					0.489	508	
					0.490	507	
	100	40	1	1:1.5	0.479	518	518.0±1
					0.480	517	
					0.478	519	
	100	45	1	1:1.5	0.481	516	515.0±1
					0.482	515	
					0.483	514	
C	100	40	0.5	1:1.5	0.442	555	555.3±0.58
					0.441	556	
					0.442	555	
	100	40	1	1:1.5	0.422	575	575.0±1
					0.421	576	
					0.423	574	
	100	40	1.5	1:1.5	0.436	561	562.0±1
					0.435	562	
					0.434	563	
D	100	40	1	1:1.5	0.412	585	585.0±1
					0.413	584	
					0.411	586	
	100	40	1	1:2	0.417	580	580.6±0.58
					0.416	581	
					0.416	581	
	100	40	1	1:2.5	0.421	576	575.6±0.58
					0.422	575	
					0.421	576	

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.2.3. Fenoles Totales.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	LECTURA	X	(mg GAE/100g Co)
A	100	40	1	1:1.5	0.325	0.322	<b>0.325±0.002</b>
					0.326	0.325	
					0.327	0.328	
	120	40	1	1:1.5	0.279	0.194	0.191±0.002
					0.277	0.189	
					0.278	0.192	
	150	40	1	1:1.5	0.31	0.281	0.280±0.002
					0.309	0.278	
					0.311	0.283	
B	100	35	1	1:1.5	0.275	0.183	0.181±0.002
					0.273	0.178	
					0.274	0.181	
	100	40	1	1:1.5	0.295	0.239	<b>0.249±0.001</b>
					0.294	0.236	
					0.293	0.233	
	100	45	1	1:1.5	0.293	0.233	0.234±0.001
					0.294	0.236	
					0.293	0.233	
C	100	40	0.5	1:1.5	0.305	0.267	0.303±0.002
					0.302	0.258	
					0.301	0.256	
	100	40	1	1:1.5	0.332	0.342	<b>0.342±0.002</b>
					0.333	0.344	
					0.331	0.339	
	100	40	1.5	1:1.5	0.321	0.311	0.316±0.005
					0.323	0.317	
					0.325	0.322	
D	100	40	1	1:1.5	0.310	0.281	<b>0.280±0.002</b>
					0.309	0.278	
					0.311	0.283	
	100	40	1	1:2	0.296	0.242	0.241±0.002
					0.297	0.244	
					0.295	0.239	
	100	40	1	1:2.5	0.269	0.167	0.165±0.001
					0.269	0.167	
					0.268	0.164	

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

## 2.3 Cinética de liberación

### 2.3.1 Cinética de liberación-variable presión.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto: polímero (w:w)	Tiempo (min)	Concentración (u Mol Trolox/g co-precipitado)
A	100	40	1	1:1.5	15	2 ± 0
					30	12.5 ± 0.70
					45	20 ± 2.82
					60	30 ± 0.70
					120	45 ± 3.54
					180	60 ± 2.83
					240	72 ± 3.54
					300	81.5 ± 3.54
					360	86 ± 1.41
					420	89.5 ± 0.71
					480	91.5 ± 2.12
B	120	40	1	1:1.5	15	2 ± 2.12
					30	5 ± 2.12
					45	11.5 ± 0.71
					60	17 ± 1.41
					120	33 ± 1.41
					180	49.5 ± 3.53
					240	62 ± 2.82
					300	71.5 ± 2.12
					360	77.5 ± 0.70
					420	82 ± 2.82
					480	84 ± 2.82

Fuente: Experimentación

Elaboración: La autora

### 2.3.2. Cinética de liberación - variable temperatura.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto: polímero (w:w)	Tiempo (min)	Concentración (u Mol Trolox/g co-precipitado)
A	100	40	1	1:1.5	15	2 ± 0
					30	12.5 ± 0.70
					45	20 ± 2.82
					60	30 ± 0.70
					120	45 ± 3.54
					180	60 ± 2.83
					240	72 ± 3.54
					300	81.5 ± 3.54
					360	86 ± 1.41
					420	89.5 ± 0.71
B	100	45	1	1:1.5	15	2 ± 2.12
					30	5 ± 2.12
					45	11.5 ± 0.71
					60	17 ± 1.41
					120	33 ± 1.41
					180	49.5 ± 3.53
					240	62 ± 2.82
					300	71.5 ± 2.12
					360	77.5 ± 0.70
					420	82 ± 2.82
480	84 ± 2.82					

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.3.3 Cinética de liberación- variable flujo líquido.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	Tiempo (min)	Concentración (uMolTrolox/g co-precipitado)
A	100	40	1	1:1.5	15	8.5 ± 1.41
					30	15 ± 3.53
					45	20.5 ± 0.70
					60	27.5 ± 4.94
					120	48.7 ± 4.94
					180	67 ± 4.24
					240	81 ± 4.24
					300	91.5 ± 3.53
					360	100 ± 2.82
					420	106 ± 2.82
					480	108 ± 2.82
B	120	45	1.5	1:1.5	15	2.8 ± 1.41
					30	6.5 ± 2.12
					45	12.8 ± 1.41
					60	17.5 ± 1.41
					120	32.4 ± 1.41
					180	48.6 ± 1.41
					240	58.9 ± 2.12
					300	67.8 ± 0.70
					360	72.59 ± 0.70
					420	78.9 ± 2.82
					480	79.2 ± 2.82

Fuente: Experimentación  
Elaboración: La autora

### 2.3.4 Cinética de liberación-variable relación extracto polímero.

Bloques	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo líquido (mL/min)	Relación extracto:polímero (w:w)	Tiempo (min)	Concentración (uMolTrolox/g co-precipitado)
A	100	40	1	1:1.5	15	2 ± 0
					30	12.5 ± 0.70
					45	20 ± 2.82
					60	30 ± 0.70
					120	45 ± 3.54
					180	60 ± 2.83
					240	72 ± 3.54
					300	81.5 ± 3.54
					360	86 ± 1.41
					420	89.5 ± 0.71
B	120	45	1	1:2.5	15	2 ± 2.12
					30	5 ± 2.12
					45	11.5 ± 0.71
					60	17 ± 1.41
					120	33 ± 1.41
					180	49.5 ± 3.53
					240	62 ± 2.82
					300	71.5 ± 2.12
					360	77.5 ± 0.70
					420	82 ± 2.82
480	84 ± 2.82					

**Fuente:** Experimentación

**Elaboración:** La autora