



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

**Optimización de parámetros de extracción de compuestos antioxidantes
en firigüelo (*Vigna unguiculata*)**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Samaniego Burneo, Fabiana Judith

DIRECTORA: Guamán Balcázar, María del Cisne, Mg. Sc.

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 DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister Sc.

Guamán Balcázar, María del Cisne

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Optimización de parámetros de extracción de compuestos antioxidantes en firigüelo (*Vigna unguiculata*)**” realizado por Samaniego Burneo Fabiana Judith, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2016

f).....
Mg. Sc. María del Cisne Guamán Balcázar
DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

C.I:

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Fabiana Judith Samaniego Burneo declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Optimización de parámetros de extracción de compuestos antioxidantes en firiguelo (*Vigna unguiculata*)”, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo la Mg. Sc. 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”

f).....

Fabiana Judith Samaniego Burneo

1104680754

DEDICATORIA

A Dios, arquitecto del universo por haberme dado la vocación y la fuerza para seguir esta noble carrera.

A mis padres Renato y Judith, quienes han sido mi mayor motivación, apoyándome durante todos los años de mi vida, por ayudarme con los recursos necesario para poder culminar mi carrera.

A mis hermanos Renato, Santiago, Juan Pablo, José Elías y María Judith que con igual cariño han sabido motivarme para seguir mi camino.

A mi abuelo Gustavo Samaniego quien ha podido guiarme y aconsejarme en toda mi carrera.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme ser parte de ella, a todos los docentes que me ayudaron a crecer y formarme profesionalmente.

A la Mgtr. María del Cisne Guamán, Directora de mi tesis, quien ha podido brindarme su amistad y asimismo impartir sus extensos conocimientos, experiencias y su motivación guiándome para el desarrollo del presente trabajo.

A la Mgtr. Ruth Martínez y Dr. Miguel Ángel Meneses por su colaboración como miembros de mi tribunal.

A mi mejor amiga y compañera Lizett del Cisne Cevallos por todos estos 5 años de estudio compartidos, por sus ánimos, y su apoyo incondicional todo el tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	1
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS.....	9
LISTA DE ABREVIATURA.....	11
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN.....	15
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1.1 El frijol castilla (<i>Vigna unguiculata</i>)	6
1.2 Valor nutritivo y composición química.....	6
1.3 Usos y aplicaciones	7
1.4 Antioxidantes y Radicales libres	7
1.5 Fenoles totales	9
1.6 Determinación de capacidad antioxidante	10
1.6.1 ABTS.....	10
1.6.2 FRAP.....	10
1.6.3 DPPH.....	11
1.7 Optimización de condiciones de extracción	11
1.7 Diseño experimental de superficie de respuesta.....	12
1.9 Cinética de extracción	13

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Preparación y obtención de la materia prima.....	17
3.2 Determinación del contenido de humedad.....	17
3.3 Preparación de extractos.....	17
3.4 Determinación de fenoles totales	19
3.5 Determinación de actividad antioxidante	19
3.5.1 Método ABTS.	20
3.5.2 Método FRAP.	20
3.5.3 Método DPPH.	21
3.6 Análisis estadístico y optimización.....	22
3.7 Cinética de extracción	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
4.1 Desarrollo del método	25
4.2 Fenoles totales.....	26
4.2.1 Optimización de las condiciones de extracción.	26
4.2.2 Resultados cinética de extracción.....	28
4.3 ABTS.....	30
4.3.1 Optimización de las condiciones de extracción.	30
4.3.2 Resultados cinética de extracción.....	31
4.4 FRAP	32
4.4.1 Optimización de las condiciones de extracción.	32
4.4.2 Resultados cinética de extracción.....	34
4.5 DPPH	35
4.5.1 Optimización de las condiciones de extracción.	35
4.5.2 Resultados cinética de extracción.....	37
CONCLUSIONES.....	39

RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: El frijol castilla (<i>Vigna unguiculata</i>).....	6
Figura 2: Clasificación de los antioxidantes.	8
Figura 3: Reacción de fenoles	9
Figura 4: Reacción del método ABTS	10
Figura 5: Reacción del método FRAP	11
Figura 6: Reacción del método DPPH	11
Figura 7: Procedimiento para fenoles totales mediante el método Folin- Ciocalteu.....	19
Figura 8: Procedimiento para el método ABTS	20
Figura 9: Procedimiento para el método FRAP	21
Figura 10: Procedimiento para el método DPPH.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de frijol castilla	6
Tabla 2: Comparación del presente trabajo con estudios similares	13
Tabla 3: Variables que se utilizó para la preparación de extractos	18
Tabla 4: Diseño Box- Behnked.....	23
Tabla 5: Resultados de la cuantificación de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP.....	25
Tabla 6: Valores óptimos de fenoles totales para temperatura y relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para la optimización de % etanol	27
Tabla 7: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta fenoles totales.....	27
Tabla 8: Valores óptimos de ABTS para solvente y temperatura y condiciones de trabajo para la optimización muestra/solvente	30
Tabla 9: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta ABTS.	31
Tabla 10: Valores óptimos de FRAP para solvente y temperatura y condiciones de trabajo para relación muestra/solvente	33
Tabla 11: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta FRAP.	34
Tabla 12: Valores óptimos para solvente, temperatura y relación muestra/solvente de DPPH	36
Tabla 13: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta DPPH.....	36
Tabla 14: Valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Diagrama estandarizado de Pareto para Fenoles Totales	26
Gráfica 2: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para fenoles totales.....	28
Gráfica 3: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el método de fenoles totales.	29
Gráfica 4: Diagrama estandarizado de Pareto para ABTS	30
Gráfica 5: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para ABTS.	31
Gráfica 6: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos ABTS.	32
Gráfica 7: Diagrama estandarizado de Pareto para FRAP	33
Gráfica 8: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para FRAP.	34
Gráfica 9: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos FRAP.....	35
Gráfica 10: Diagrama estandarizado de Pareto para DPPH.....	36
Gráfica 11: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos DPPH.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Determinación del porcentaje de humedad	49
ANEXO 2: Datos de cuantificación de fenoles totales.....	50
ANEXO 3: Cuantificación de actividad antioxidante, ABTS.....	55
ANEXO 4: Cuantificación de actividad antioxidante, FRAP	60
ANEXO 5: Cuantificación de actividad antioxidante, DPPH	66
ANEXO 6: Resultados de optimización y su posterior análisis de fenoles totales	71
ANEXO 7: Resultado de optimización y su posterior análisis de ABTS	74
ANEXO 8: Resultados de optimización y su posterior análisis de FRAP	77
ANEXO 9: Resultados de cinética y su posterior análisis de Fenoles Totales	80
ANEXO 10: Resultados de cinética y su posterior análisis de ABTS	83
ANEXO 11: Resultados de cinética y su posterior análisis de FRAP	86
ANEXO 12: Resultados de cinética y su posterior análisis de DPPH.....	89

ANEXO 13: Ecuación de modelado de fenoles totales	93
ANEXO 14: Ecuación de modelado de los métodos ABTS, DPPH y FRAP	94

LISTA DE ABREVIATURA

Abs: Absorbancia

b: Intersección

Conc: Concentración

CV: Coeficiente de variación

°C: grados centígrados

EtOH: Etanol

g: Gramo

H: Hora

H₂O: Agua

L: Litro

M/S: muestra/solvente

M: Molar

m: Pendiente

MeOH: Metanol

mg EAG/100g: Miligramos equivalentes de ácido gálico/100 gramos de muestra

mg: Miligramo

min: Minuto

mL: Mililitro

N: Normal

nm: Nanómetro

PM: Promedio

%: Porcentaje

REP: Repetición

SD: Desviación estándar

Sol: Solvente

Temp: Temperatura

μL: Microlitro

μmol ET/g: Micromoles equivalentes de Trolox/ gramo de muestra

Vol: Volumen

x: Concentración

y: Absorbancia

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el firigüelo (*Vigna unguiculata*) como fuente de antioxidantes. La muestra fue proveniente del cantón Macará, provincia de Loja. El contenido de fenoles totales se midió por el método Folin- Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos ABTS, DPPH y FRAP. Los resultados obtenidos fueron 299.401 ± 3.59 mg EAG/100 g en contenido fenólicos, y 46.18 ± 0.29 $\mu\text{mol ET/g}$, 135.32 ± 2.55 $\mu\text{mol ET/g}$ y 16.34 ± 0.33 $\mu\text{mol ET/g}$ de actividad antioxidante mediante ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente. Las condiciones óptimas de extracción para fenoles totales determinadas fueron: solvente agua, relación muestra/solvente 14.28 g/90 mL, temperatura 60°C y 30 minutos. Y las condiciones para la actividad antioxidante de ABTS fueron: 40% de etanol, relación muestra/solvente 10 g/90 mL, temperatura 20°C y 30 minutos. Para DPPH: 54% de etanol, relación muestra/solvente 16.66 g/83.34 mL, temperatura 36°C y 30 minutos. Y para FRAP: 40% de etanol, relación muestra/solvente 6.66 g/90 mL, temperatura 46°C y 30 minutos.

Palabras Claves: firigüelo, actividad antioxidante, optimización, fenoles totales

ABSTRACT

In this research the firigüelo (*Vigna unguiculata*) was evaluated as a source of antioxidants. The sample was from the canton Macará, Loja province. The content of total phenols by Folin Ciocalteu method and the antioxidant activity by ABTS, DPPH and FRAP methods was measured. The results obtained were 299.401 ± 3.59 mg EAG / 100 g in phenolic content, and 46.18 ± 0.29 $\mu\text{mol ET/g}$, 135.32 ± 2.55 $\mu\text{mol ET/g}$ and 16.34 ± 0.33 $\mu\text{mol ET/g}$ of antioxidant activity using ABTS, DPPH and FRAP, respectively. The optimum extraction conditions for certain total phenols were: solvent water sample / solvent 14.28 g/90 mL, temperature 60°C and 30 minutes. And the conditions for the antioxidant activity of ABTS were: 40% ethanol, sample / solvent 10 g/90 mL, temperature 20°C and 30 minutes. To DPPH: 54% ethanol, sample / solvent 16.66 g/83.34 mL, temperature 36°C and 30 minutes. And FRAP: 40% ethanol, sample / solvent 1:15, temperature 46°C and 30 minutes.

Keywords: firigüelo, antioxidant activity, optimization, total phenols

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son los productos agrícolas que más se consumen en el Ecuador, entre ellas la más conocida y de mayor demanda es el frejol seco y el frejol tierno, por este motivo tiene un gran mercado potencial, siendo un cultivo tradicional que beneficia económicamente a numerosas familias de pequeños productores mediante la venta de productos en los mercados de abastos, ayudando a miles de consumidores por su alto contenido nutricional. Dentro de la familia de las leguminosas se encuentra el firigüelo (*Vigna unguiculata*) cuya producción y demanda es limitada, debido a que se tiene poco conocimiento de su valor nutricional. Este cultivo se lo siembra en tierras calientes y templadas, principalmente en pequeños valles de la provincia de Loja, en los cantones de Pindal, Zapotillo y Macará, a una altitud entre 835 m.s.n.m. en la zona alta y a 182 m.s.n.m. en la zona baja, con una temperatura que fluctúa entre 25° C a 30° C. El firigüelo por su alto valor nutritivo es una alternativa para sustituir el consumo de proteína de origen animal que hoy en día es difícil adquirir por su alto costo (Labarca, Mora, Silva, Bracho, & Rincón, 1999; Trujillo, 2007).

El firigüelo también llamado frijol castilla o caupí (*Vigna unguiculata*) es una de las leguminosas fundamentales en la alimentación por su contenido de proteína (23%), carbohidratos (56%), grasa (1.6%), fibra (4%), minerales (3.5%) y vitaminas (De Gouveia, Bolívar, López, Salih, & Pérez, 2005; B. Rodríguez & López, 2009).

La composición química del frijol caupí presenta diversos grupos de metabolitos secundarios con actividad antioxidante beneficiosa para la salud humana, tales como taninos, polifenoles, saponinas, flavonoides, fenilpropanoides, alcaloides y compuestos esteroidales (Vargas, Villamil, Murillo, Murillo, & Solanilla, 2012). Los antioxidantes son uno de los componentes principales para el organismo, los mismos que ayudan a protegerlo de la acción de los radicales libres, que son los causante de los procesos de envejecimiento y algunas enfermedades. (Gutiérrez, Ledesma, García, & Grajales, 2007). Por lo cual la finalidad del presente trabajo de investigación es dar a conocer a la sociedad sobre la potencialidad del firigüelo (*Vigna unguiculata*) como fuente antioxidante, optimizando los parámetros de extracción, cuantificando fenoles totales y su capacidad antioxidante.

Para el desarrollo de la investigación, la muestra fue proveniente del cantón Macará, provincia de Loja; a la misma se le realizó una reducción del tamaño de partícula, y luego una extracción por maceración dinámica utilizando como variables % etanol, temperatura y relación muestra/solvente. A los extractos obtenidos se les determinó el contenido de fenoles totales por el método Folin- Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos ABTS, DPPH y FRAP.

El presente documento se encuentra dividido en 6 secciones, la primera sección se expone la revisión de literatura, en la segunda sección se da conocer los objetivos planteados, en la tercera sección se presenta la metodología con la que fue realizada, en la cuarta sección se analiza y discute los resultados obtenidos, en la quinta sección se detallan las conclusiones y en la sexta sección las recomendaciones.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 El frijol castilla (*Vigna unguiculata*)

El frijol castilla (figura 1) también conocido como Caupí es de la familia fabácea perteneciente a la especie *Vigna unguiculata*. Se origina en África Occidental, actualmente se cultiva en Asia, Oceanía, Medio Oriente, al sur de Europa, África, América Central y América del Sur (Ehlers & Hall, 1997).



Figura 1: El frijol castilla (*Vigna unguiculata*)
Fuente: Autora

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) menciona que 27.4 millones de hectáreas se cultivan de frijol de diferentes especies. En el año 2010 la producción mundial de esta especie fue de 23.2 millones de toneladas, siendo un record (AREX, 2010).

1.2 Valor nutritivo y composición química

En la tabla 1 se indican los principales nutrientes de los granos de frijol castilla:

Tabla 1: Composición química de frijol castilla

Componentes nutricionales	Frijol Castilla (mg/100g)
Proteína cruda	20300.00
Hierro	13.80
Zinc	6.40
Potasio	1977.00
Fósforo	2607.00

Fuente: Vargas et al. (2012)

De acuerdo a su composición en metabolitos secundarios contiene fenoles a concentraciones desde 0,04 mg/100 g hasta 934,38 mg/100 g (Cai, Hettiarachchy, & Jalaluddin, 2003; J. Gutiérrez, Romo, & Serna, 2011; Okwu & Orijji, 2007), los polifenoles que se encuentran en el exocarpo oscilan entre 587 y 987 mg/100 g, entre más intenso sea el color de la cáscara del firigüelo se obtendrá mayor presencia de polifenoles (D. Almeida, Greiner, Furtunado, Trigueiro, & Araújo, 2008; Punia & Preet, 2000), la concentración de taninos se encuentra entre 0,33 a 874 mg/100 g (Duranti, 2006) y los alcaloides oscilan entre 1,28 a 1,50 mg/100 g (Okwu & Orijji, 2007).

1.3 Usos y aplicaciones

- ✓ Es usado como forraje para la alimentación del ganado (Timko et al., 2008).
- ✓ Los residuos de esta leguminosa son usados como abono verde de cultivos para mejorar el suelo en áreas cañeras costeras, ya que es un excelente fijador de nitrógeno (Ehlers & Hall, 1997).
- ✓ Es usado como alimento para el consumo humano. En la población rural de la India preparan sus alimentos con firigüelo acompañado con arroz cocido, así mismo en ocasiones la semilla tostada se la usa como sustituto de café. De igual manera en el sur del Ecuador se lo consume en menestras y sopas con guineo; considerado como un alimento rico en proteínas y otros nutrientes por sus altas cantidades (Ehlers & Hall, 1997; Labarca et al., 1999; Siddhuraju & Becker, 2007).
- ✓ En África y en India el licor de cocción de las semillas de frijol castilla se lo utiliza como un remedio potencial para el resfriado común (Siddhuraju & Becker, 2007).

1.4 Antioxidantes y Radicales libres

Los antioxidantes son cualquier sustancia que retrasa o inhibe el daño oxidativo a una molécula diana. Las moléculas antioxidantes pueden reaccionar con los radicales libres individuales y son capaces de neutralizarlos por medio de la donación de uno de sus propios electrones (Jacob, 1995).

Además los antioxidantes previenen el daño celular y del tejido, actúan defendiendo contra los radicales libres (Jacob, 1995). Sun (1990) señala que son anticancerígenos, inhibiendo tanto en la etapa de iniciación y la etapa de promoción/transformación de la carcinogénesis, protegiendo las células contra el daño oxidativo. En la figura 2 se puede apreciar la clasificación de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

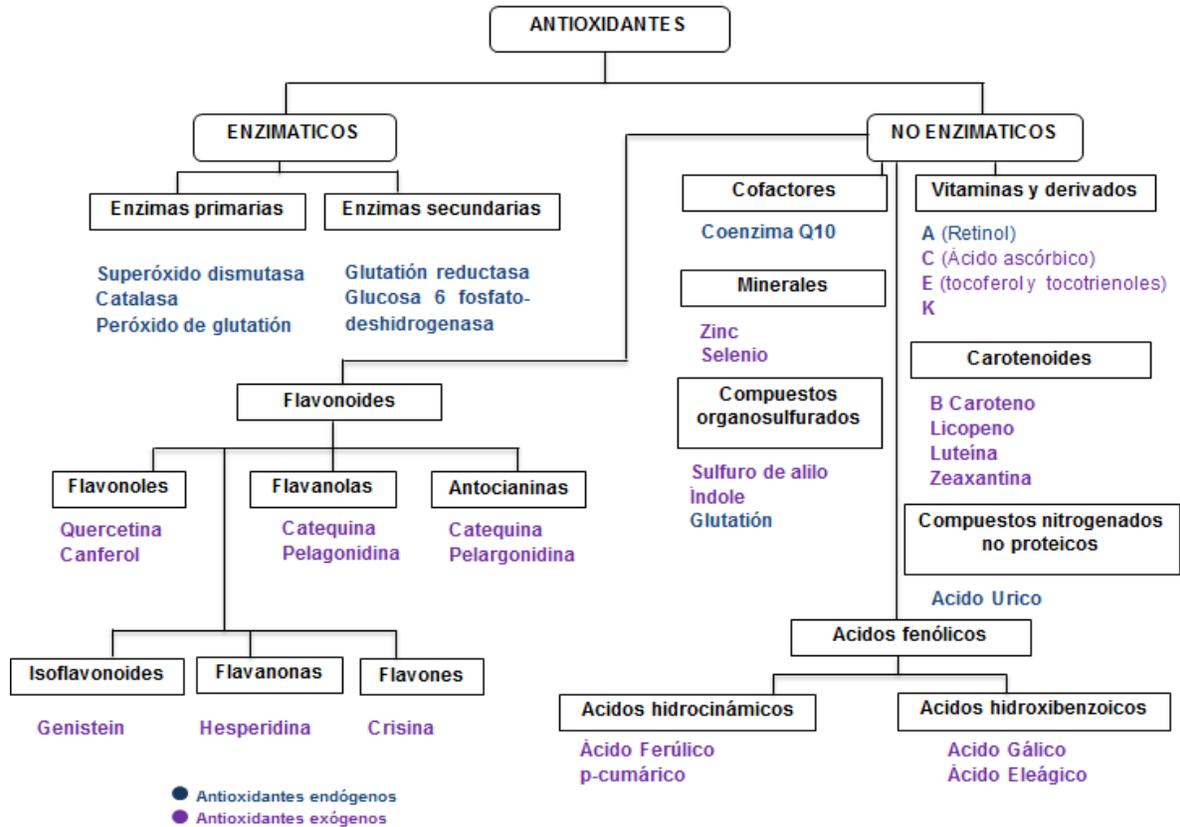


Figura 2: Clasificación de los antioxidantes.
Fuente: Carochó & Ferreira (2013)

Los radicales libres son moléculas químicas que en su estructura atómica muestran en el orbital externo un electrón desapareado o impar, generándose así una molécula inestable. Estos circulan por todo el organismo con el fin de atraer un electrón de las moléculas estables, consiguiendo así su estabilidad electroquímica. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (V. Gutiérrez, 2002; Olinescu & Smith, 2002; J. M. Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001).

La acumulación de radicales libres en el cuerpo genera un fenómeno llamado estrés oxidativo, este proceso es la ruptura del equilibrio que debe haber en factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993; V. Gutiérrez, 2002), así mismo algunas moléculas biológicas como el ARN, ADN y enzimas, pueden ser susceptibles al daño oxidativo. Este mecanismo desencadena algunas enfermedades crónicas y degenerativas como

problemas gástricos, artritis reumatoide, trastornos autoinmunes, cáncer, cataratas, envejecimiento, neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares (Pham, Hua, & Pham, 2008).

Los radicales libres se clasifican en:

- **Radicales libres inorgánicos o primarios:** Se dan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno (V. Gutiérrez, 2002).
- **Radicales libres orgánicos o secundarios.** Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí (V. Gutiérrez, 2002).
- **Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno:** Se originan de un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de otras sustancias (V. Gutiérrez, 2002).

1.5 Fenoles totales

La técnica de Folin-Ciocalteu menciona que los fenoles poseen la capacidad para reaccionar con agentes oxidantes.

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Figura 3) dando un color azul propio de la reacción con fenoles (García, Fernández, & Fuentes, 2012). El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con diferentes tipos de fenoles (complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico) ya que contienen molibdato y tungstato sódico (Peterson, 1979). El color azul intenso se produce por la transferencia de electrones a un pH básico, por lo que reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, éste color es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen, 1985).

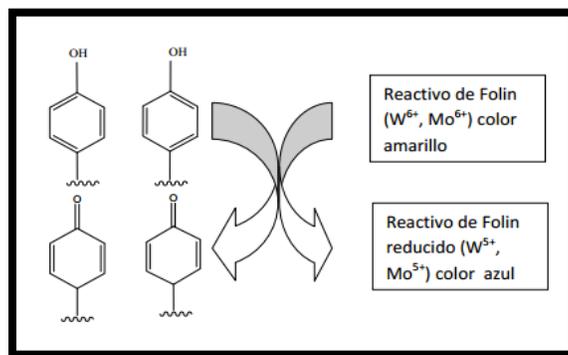


Figura 3: Reacción de fenoles
Fuente: García et al. (2012)

1.6 Determinación de capacidad antioxidante

Los diferentes métodos como ABTS, DPPH y FRAP entre otros que se utilizan, difieren en: el agente oxidante, en el sustrato utilizado, tiempo de evaluación, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Coba, Tivi, & Vidari, 2010).

1.6.1 ABTS.

Ensayo 2,2'-azinobis (ácido 3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos o lipofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes del plasma (Pellegrini et al., 1999).

El monocatión radical pre-formado de 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) se genera por la oxidación de ABTS con persulfato potásico y se reduce en presencia de tales antioxidantes donadores de hidrógeno (figura 4). Las influencias tanto de la concentración de antioxidante y la duración de la reacción en la inhibición de la absorción catión radical se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante (Pellegrini et al., 1999).

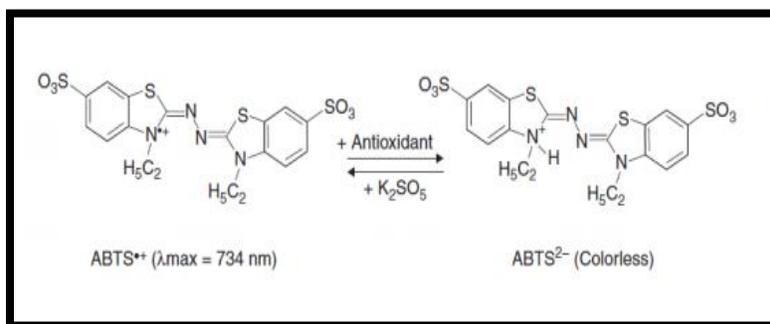


Figura 4: Reacción del método ABTS
Fuente: Venkatachalam et al. (2012)

1.6.2 FRAP.

Cerón et al. (2011) mencionan que el método FRAP reduce moléculas de Fe III a Fe II (el cual es menos antioxidante) por la capacidad que presentan los polifenoles (figura 5), para formar un complejo azul con tripidil triazina (TPTZ).

Además Medina (2010) dice que mientras la muestra analizada contenga más antioxidantes, va a ver mayor concentración de Fe II y por lo tanto una mayor absorbancia.

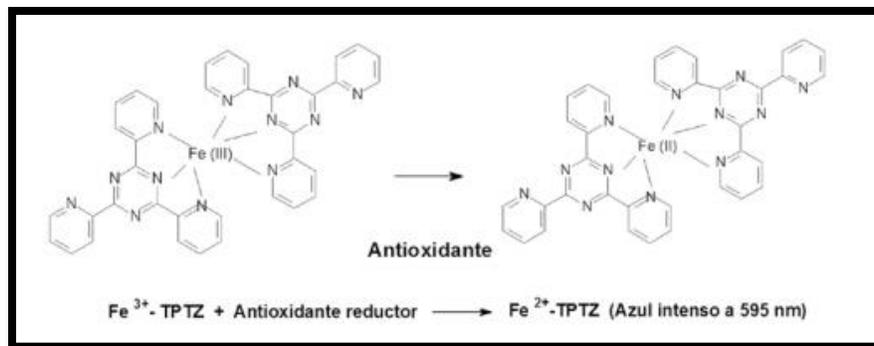


Figura 5: Reacción del método FRAP
Fuente: Prior et al. (2005)

1.6.3 DPPH.

El método DPPH consiste en estabilizar los radicales libres 2,2-difenil-1-picril hidrazilo al reaccionar con sustancias donadoras de Hidrógeno (H+). En presencia de un antioxidante o un radical disminuye la absorbancia y se ve reflejada en un cambio de color de violeta intenso virando a amarillo pálido (figura 6) (Casanova, 2012; Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011).

Este método presenta una buena estabilidad a ciertas condiciones ya que hay la presencia de un radical libre (Casanova, 2012).

A través de este método se pueden medir compuestos que sean de naturaleza lipofílica (Krishnaiah et al., 2011).

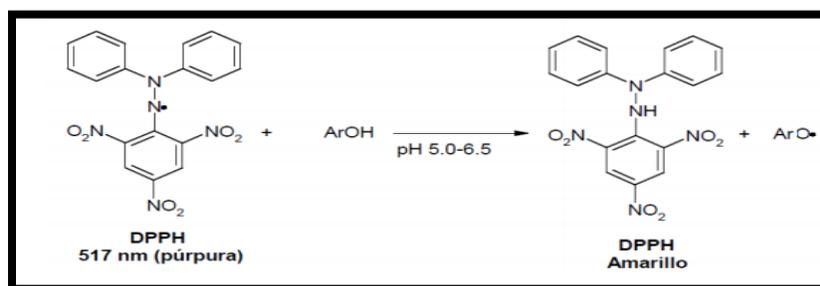


Figura 6: Reacción del método DPPH
Fuente: Casanova (2012)

1.7 Optimización de condiciones de extracción

El término optimización se refiere a la mejora del rendimiento de un sistema, proceso, o un producto con el fin de obtener las mejores condiciones para aplicarlas. La optimización se ha utilizado comúnmente como un medio para descubrir las condiciones en las que

debe aplicar un procedimiento que produce la mejor respuesta posible (M. Almeida, Erthal, Padua, Silveira, & Am, 2008).

Algunos factores influyen en el proceso de extracción de una muestra como es el método de extracción, el tipo de solvente, temperatura, pH, tamaño de partícula, relación muestra/solvente y tiempo de extracción; por lo que es importante determinar las mejores condiciones de extracción (Chirinos, Rogez, Campos, Pedreschi, & Larondelle, 2007). Así mismo con la finalidad de disminuir el gasto por mano de obra, solventes, energía y tiempo, es importante que de entre todas las variables, se elija las que tienen mayor grado de importancia, dependiendo del tipo de muestra y compuestos a extraer. Spigno et al.(2007) señalan que la temperatura como el tiempo de extracción son parámetros importantes a optimizar incluso para minimizar el coste energético del proceso. En un estudio descrito por Gómez et al. (2008) mencionan que la temperatura es un factor importante a tomar en cuenta pues a temperaturas demasiado altas pueden comenzar a producirse la degradación de los compuestos fenólicos de interés. Por otra parte, en otro estudio descrito por Rockenbach et al. (2008) indican que el tipo de solvente puede afectar a la polaridad, la transferencia de electrones y átomos de hidrógeno, que es un aspecto clave para la medición de la capacidad antioxidante.

1.7 Diseño experimental de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, basadas en el ajuste de una ecuación polinómica de los datos experimentales, que deben describir el comportamiento de un conjunto de datos con el objetivo de hacer previsiones estadísticas. Se puede también aplicar cuando una respuesta o un conjunto de respuestas de interés son influenciados por varias variables con el objetivo de optimizar simultáneamente los niveles de estas variables para conseguir el mejor rendimiento del sistema (M. Almeida et al., 2008).

Existen algunos estudios en los cuales han utilizado la metodología de superficie de respuesta como una herramienta para la optimización de una respuesta de un conjunto de factores o variables independientes, que se puede mostrar como una superficie (Sun, Xu, Zhang, Hu, & Zeng, 2011).

En la tabla 2 se puede observar estudios similares donde se realizó la optimización de diferentes parámetros de extracción, utilizando como variable de respuesta la medición de fenoles totales y actividad antioxidante.

Tabla 2: Comparación del presente trabajo con estudios similares

Referencia Bibliográfica	Parámetros de optimización	Variable respuesta	Muestra
Gómez et al. (2008)	Temperatura, solvente, relación m/s y pH	Fenoles totales	Orujos de uva
Bucic-Kójico et al. (2009)	Temperatura y solvente	Fenoles totales y DPPH	Uva
Wani et al. (2015)	Temperatura, solvente, relación m/s y pH	Fenoles totales y DPPH	Fruto seco albaricoque
Liyana & Shahidi (2005)	Temperatura y tiempo	ABTS y DPPH	Trigo

Elaboración: La autora

1.9 Cinética de extracción

La cinética de extracción de fenoles totales y la actividad antioxidante es un parámetro de gran de importancia, ya que podría alterar las características del extracto final (Librán, Mayor, Garcia-castello, & Vidal-brotons, 2013). Se realiza con el fin de optimizar el proceso de extracción, disminuir el tiempo de procesamiento y reducir el consumo de energía (Pradal, Vauchel, Decossin, Dhulster, & Dimitrov, 2016). En un estudio realizado por Gómez et al. (2008) mencionan que el tiempo de extracción es una de las variables más importantes que se deben tomar en cuenta ya que puede existir una mayor o menor extracción de los compuestos de interés. Por otro lado, Galvan et al. (2012) indican que el tiempo de extracción es un parámetro que debe optimizarse para minimizar el consumo de energía y reducir costos, factores que resultan de gran beneficio en una investigación.

En varias investigaciones han realizado la cinética de extracción luego de haber optimizado algunos parámetros considerados más importantes, con la finalidad de reducir costos de reactivos y materias, y tiempo de trabajo por parte de los investigadores (W Setyaningsih, Palma, & Barroso, 2012; Widiastuti Setyaningsih, Saputro, Fernández, & Palma, 2015).

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

OBJETIVO GENERAL

- Contribuir a la población con la revalorización de los productos tradicionales, favoreciendo el consumo local y el futuro aprovechamiento industrial del frejol (*Vigna unguiculata*)

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Optimizar los parámetros de extracción de antioxidantes
- Cuantificación de fenoles totales y la capacidad antioxidante mediante los métodos como ABTS, DPPH y FRAP del frejol (*Vigna unguiculata*)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación y obtención de la materia prima

El firigüelo (*Vigna unguiculata*) fue proveniente del cantón Macará, provincia de Loja. La reducción del tamaño de partícula del grano deshidratado y libre de impurezas se la realizó en un molino ultracentrífugo Retsch ZM200 a una velocidad de trabajo de 1400 rpm. La harina fue empacada a vacío y almacenada a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

3.2 Determinación del contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó según el método AOAC Official Method 925.10 con modificaciones. Se colocaron cápsulas vacías de porcelana en la estufa a $130^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, luego se llevaron al desecador durante 30 minutos y se pesaron (m), posteriormente se pesaron 2 g de muestra de firigüelo en las cápsulas previamente secadas (m_1), colocándolas en la estufa durante 1 hora; las muestras se enfriaron por 30 minutos en el desecador y seguidamente se pesaron, el procedimiento se lo repitió continuamente hasta alcanzar un peso constante ($m_1 - m_2$), es decir que exista diferencia de 1 mg entre el peso anterior y el peso actual (Horwitz & Latimer, 2005).

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

Siendo:

m_1 : Peso cápsula y muestra

m_2 : Peso de la muestra seca

m : Peso cápsula vacía

Los cálculos realizados se muestran en el Anexo 1

3.3 Preparación de extractos

Se realizó la preparación de 15 extractos, utilizando como variables: relación muestra/solvente, temperatura y porcentaje de etanol.

Se trabajó con 10 g/90 mL, 20 g/80 mL, 25 g/75 mL relación muestra/solvente (no se trabajó con una relación muestra/solvente menor a 25 g/75 mL porque la muestra no se homogenizó con el solvente), 20, 40 y 60°C, y 40, 60 y 80% etanol (tabla 3).

Tabla 3: Variables que se utilizó para la preparación de extractos

Variables	-1	0	1
Solvente (%EtOH)	40	60	80
Temperatura (°C)	20	40	60
Muestra/solvente (g/mL)	10/90	20/80	25/75

Elaboración: La autora

La extracción se realizó con maceración dinámica a la temperatura, relación muestra/solvente y % etanol correspondiente durante 1 hora. Seguidamente se centrifugó por 30 minutos a 2800 rpm se separaron las dos fases, y el sobrenadante se almacenó a -20°C, este sobrenadante se utilizó en la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante.

3.4 Determinación de fenoles totales

El método Folin-Ciocalteu fue utilizado para la determinación de compuestos fenólicos totales (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra. El procedimiento se encuentra detallado en la figura 7, y en el anexo 2 se muestran los cálculos realizados y los factores de dilución con los que se trabajaron los 15 extractos.

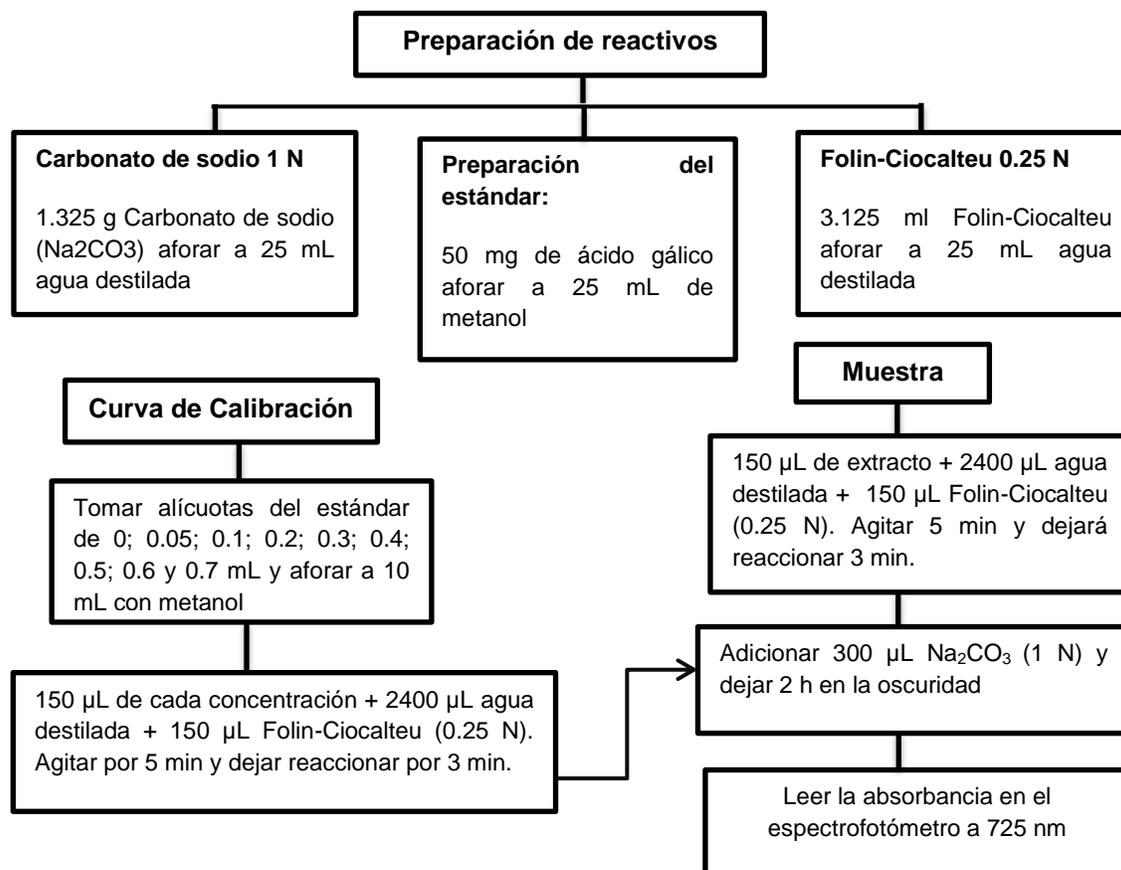


Figura 7: Procedimiento para fenoles totales mediante el método Folin- Ciocalteu

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.5 Determinación de actividad antioxidante

Para la realización de estos ensayos se tomó a consideración los estudios realizado por Thaipong et al. (2006), en el cual se describe los tres métodos que se utilizaron para cuantificar la actividad antioxidante: ABTS, DPPH y FRAP.

3.5.1 Método ABTS.

Para medir la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos o lipofílicos (Pellegrini et al., 1999) se utilizó el ensayo ABTS, se utilizó el procedimiento de Arnao et al. (2001) con algunas modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra. El procedimiento se encuentra detallado en la figura 8, en el anexo 3 se muestran los cálculos y los factores de dilución con los que se trabajaron los 15 extractos.

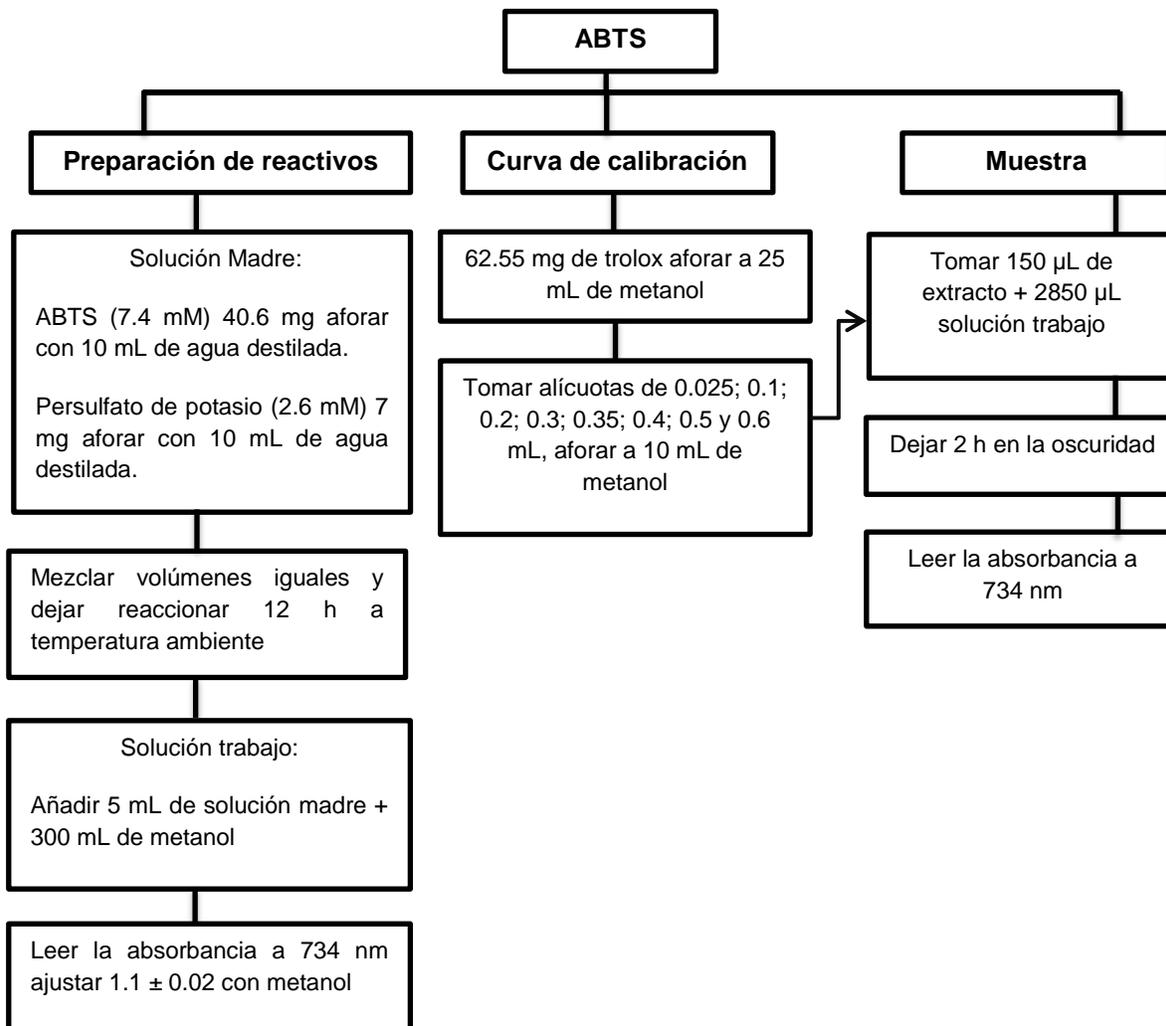


Figura 8: Procedimiento para el método ABTS

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

Elaboración: La autora

3.5.2 Método FRAP.

Para la cuantificación de actividad antioxidante por el método FRAP se utilizó la metodología de Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones de Thaipong et al. (2006). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo

de muestra. La metodología se encuentra en la figura 9, y en el Anexo 4 se encuentran los cálculos realizados, y los factores de dilución con lo que se trabajó los 15 extractos.

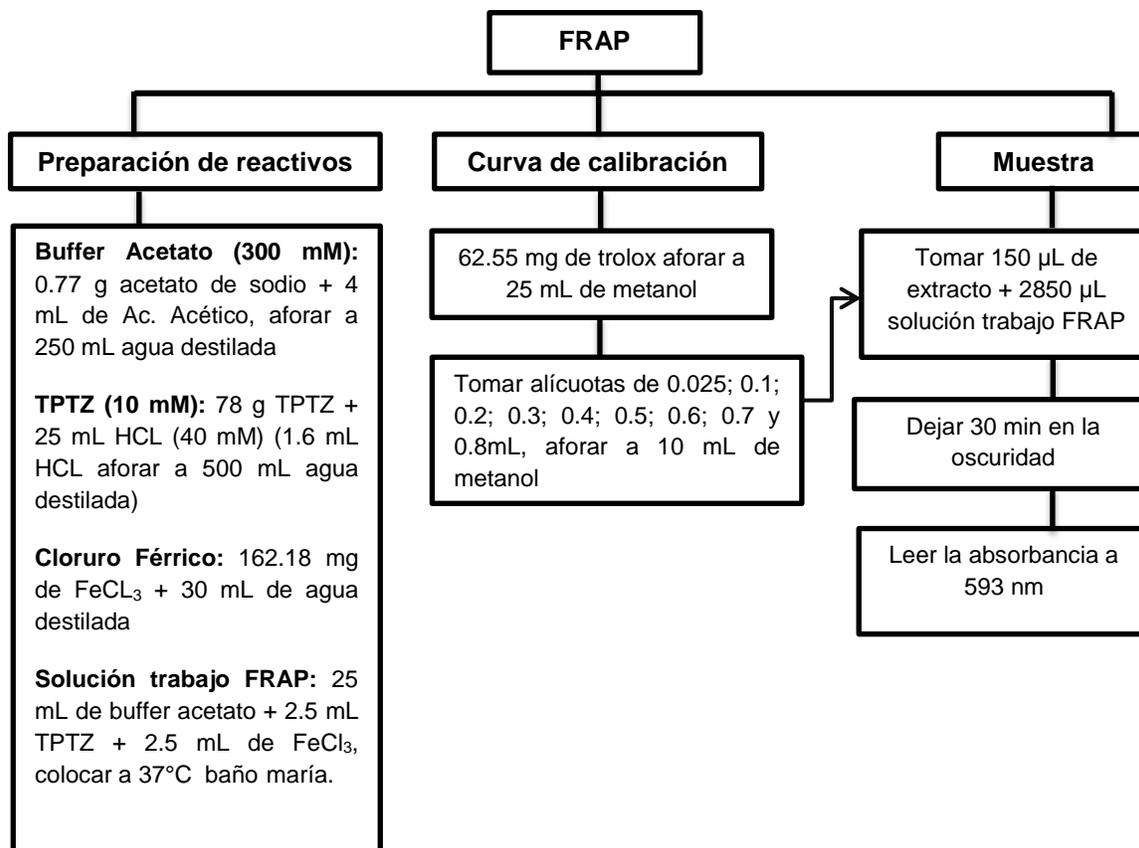


Figura 9: Procedimiento para el método FRAP
Fuente: Benzie & Strain (1996); Thaipong et al. (2006)
Elaboración: La autora

3.5.3 Método DPPH.

Para medir compuestos que sean de naturaleza lipofílica se utilizó el ensayo DPPH, siguiendo la metodología de Brand et al. (1995) con algunas modificaciones realizadas por Thaipong et al. (2006). Los resultados se expresaron como micromoles equivalente de Trolox por gramo de muestra. La metodología se encuentra en la figura 10, y en el anexo 5 los cálculos realizados y los factores de dilución con los que se trabajaron los 15 extractos.

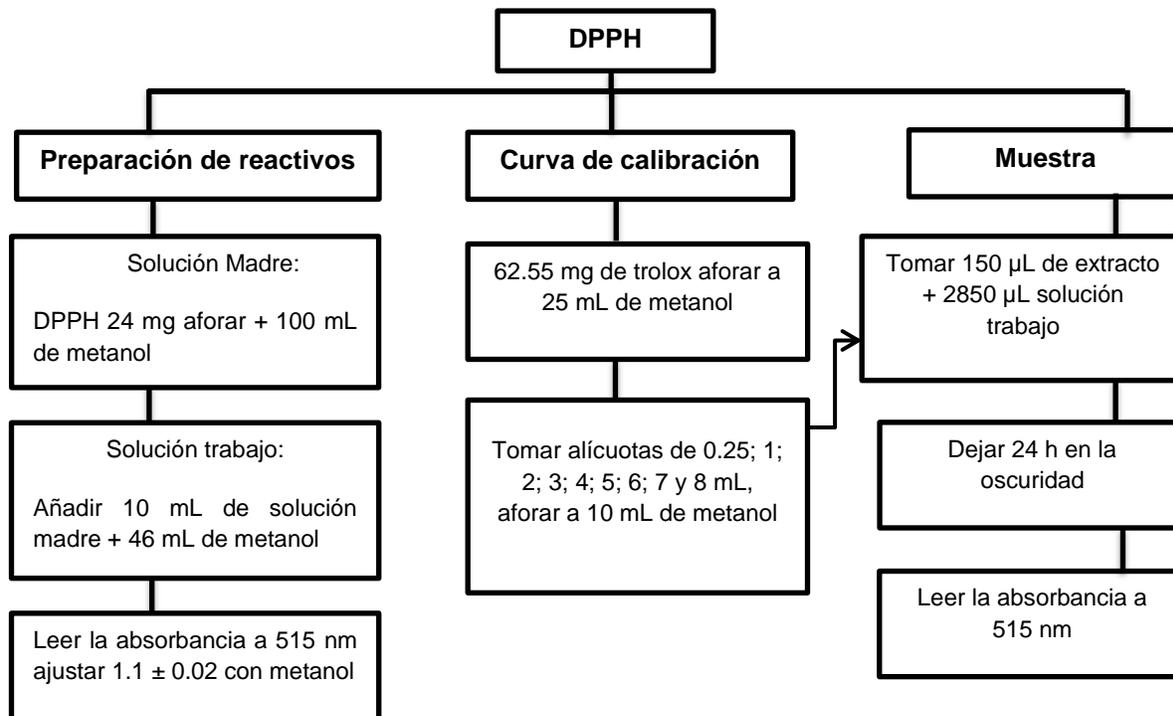


Figura 10: Procedimiento para el método DPPH

Fuente: Brand et al. (1995); Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.6 Análisis estadístico y optimización

Se utilizó un diseño Box- Behnked, utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI, en la tabla 4 se muestran las combinaciones de las variables (% de etanol, temperatura y relación muestra/solvente). Es importante mencionar que los resultados de optimización se encuentran en los anexos 6, 7 y 8.

Tabla 4: Diseño Box- Behnked

Extractos	Variables		
	Solvente (% EtOH)	Temperatura (°C)	Relación muestra/solvente (g/mL)
1	1	1	0
2	0	-1	1
3	-1	0	1
4	0	0	0
5	1	0	1
6	0	0	0
7	1	0	-1
8	-1	-1	0
9	0	1	1
10	0	0	0
11	-1	0	-1
12	0	-1	-1
13	1	-1	0
14	-1	1	0
15	0	1	-1

Las variables temperatura, solvente y relación muestra solvente fueron continuas

Elaboración: La autora

3.7 Cinética de extracción

Para la cinética de extracción se trabajó con 6 tiempos (30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min) utilizando las condiciones óptimas de extracción como temperatura, muestra/solvente y % de etanol. Los ensayos se realizaron por triplicado los cuales se detallan en el anexo 9, 10, 11 y 12.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Desarrollo del método

Para el diseño se incluyeron puntos extremos y centrales de las diferentes variables estudiadas. En la tabla 5 se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP, donde se puede observar que el valor más alto de fenoles totales se encuentran entre las temperaturas más altas (60°C), el % de etanol intermedio (40%) y relación muestra/solvente en el punto extremo intermedio (20 g/80 mL). En el método ABTS el valor más alto se encuentran entre las temperaturas más bajas (20°C), % de etanol intermedio (60%) y relación muestra/solvente en el punto extremo menor (10 g/90 mL). El valor más alto para el método DPPH se encuentran en los puntos extremos más altos (60°C y 60%) para la temperatura y solvente, y en el punto extremo menor (10 g/90 mL) para relación muestra/solvente. Y en el caso del método FRAP el valor más alto se encuentra la temperatura y el solvente en los puntos intermedios (40°C y 40%), y la relación muestra/solvente en el punto extremo menor (10 g/90 mL).

Tabla 5: Resultados de la cuantificación de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP

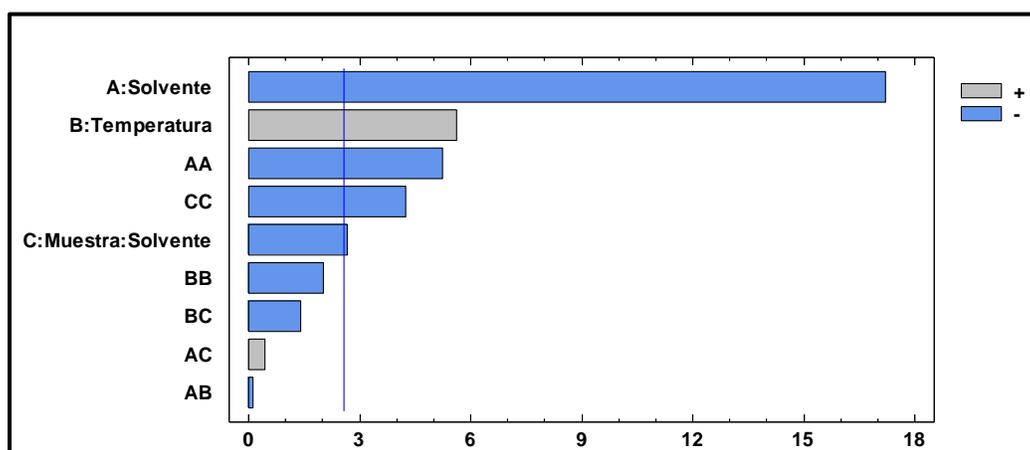
N°	Variables			Resultados			
	Sol	Temp	M/S	Fenoles totales	ABTS	DPPH	FRAP
	% EtOH	°C	g/mL	mg EAG/100 g	µmol ET/g	µmol ET/g	µmol ET/g
1	80	60	20/80	76.45 ± 3.53	10.95 ± 0.33	63.64 ± 0.99	4.62 ± 0.20
2	60	20	25/75	98.93 ± 9.55	12.72 ± 0.23	58.41 ± 4.67	6.40 ± 0.18
3	40	40	25/75	141.30 ± 3.71	25.28 ± 0.24	89.76 ± 1.91	9.83 ± 0.08
4	60	40	20/80	149.90 ± 11.31	17.90 ± 0.28	115.28 ± 0.85	8.74 ± 0.09
5	80	40	25/75	59.21 ± 3.18	8.41 ± 0.06	37.53 ± 0.53	3.31 ± 0.33
6	60	40	20/80	145.40 ± 7.77	17.54 ± 0.13	128.48 ± 2.55	9.66 ± 0.07
7	80	40	10/90	66.57 ± 1.27	16.36 ± 0.36	50.91 ± 1.15	4.25 ± 0.01
8	40	20	20/80	152.40 ± 24.74	29.53 ± 1.26	134.28 ± 3.96	10.10 ± 0.19
9	60	60	25/75	120.30 ± 4.77	19.05 ± 0.42	93.21 ± 4.24	7.41 ± 0.09
10	60	40	20/80	138.40 ± 6.36	17.30 ± 0.04	123.68 ± 1.98	8.91 ± 0.24
11	40	40	10/90	155.70 ± 2.38	27.57 ± 0.58	81.09 ± 2.86	12.08 ± 0.53
12	60	20	10/90	106.54 ± 5.96	63.11 ± 0.88	75.20 ± 2.70	6.59 ± 0.04
13	80	20	20/80	47.10 ± 5.83	9.54 ± 0.23	30.82 ± 1.77	2.58 ± 0.03
14	40	60	20/80	183.40 ± 9.19	26.60 ± 0.92	15.49 ± 0.25	9.05 ± 0.63
15	60	60	10/90	150.07 ± 16.71	26.67 ± 0.88	135.32 ± 2.55	10.52 ± 0.58

Elaboración: La autora

4.2 Fenoles totales

4.2.1 Optimización de las condiciones de extracción.

En la gráfica 1 se muestra el diagrama de Pareto el cual permite asignar un orden de prioridades para las variables (solventes, temperatura y muestra/solvente) que presentan influencia. Se puede observar que el solvente (% etanol), la temperatura y la muestra/solvente presentan influencia significativa. Se observa también que hay influencia significativa en la interacción solvente- solvente y muestra/solvente- muestra/solvente.



El color azul representa que a menor cantidad de % etanol, relación muestra y temperatura, mayor cantidad de fenoles totales. El color gris significa que a mayor cantidad de % etanol, relación muestra solvente y temperatura, mayor cantidad de fenoles de totales.

Gráfica 1: Diagrama estandarizado de Pareto para Fenoles Totales

Elaboración: La autora

Ya que el solvente (% etanol), temperatura y la relación muestra/solvente fueron las variables que afectaron a la extracción y según los resultados del diagrama de Pareto (gráfica 1) predice que a menor cantidad de etanol, mayor extracción de fenoles totales; se trabajó con concentraciones de 40% (límite inferior), 20% de etanol y agua. A pesar que a mayor temperatura mayor extracción se decidió trabajar hasta 60°C porque fue fácil el control de la misma al momento de la extracción. Y por último para la relación muestra/solvente se encuentra dentro de los límites seleccionados 14.28 g/90 mL. Los valores óptimos y las condiciones con las que se trabajaron se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Valores óptimos de fenoles totales para temperatura y relación muestra/solvente y condiciones de trabajo para la optimización de % etanol

Factor	Óptimo	Trabajar
Solvente	40%	20%, 40%, H ₂ O
Temperatura	60°C	60°C
Muestra/Solvente	14.28 g /90 mL.	14.28 g /90 mL.

Elaboración: La autora

El modelo matemático que arrojó el análisis de superficie de respuesta (tabla 7), indica la relación entre la concentración de etanol y la cantidad de fenoles totales extraídos. Los parámetros de extracción obtenidos fueron cuadráticos.

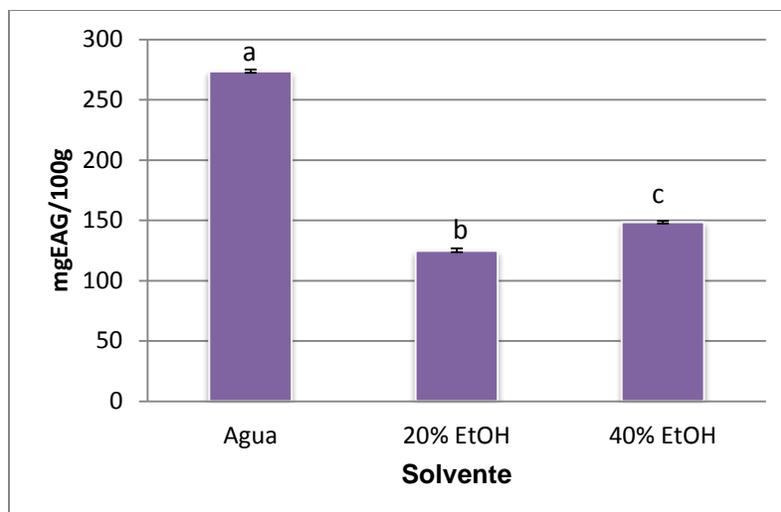
Tabla 7: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta fenoles totales

Respuesta	Ecuación de segundo orden
Fenoles totales mg EAG/100g	$y = 144,567 - 47,9325 * X_1 + 15,6578 * X_2 - 7,39406 * X_3 - 21,4955 * X_1^2 - 0,4125 * X_1 * X_2 + 1,75875 * X_1 * X_3 - 8,23365 * X_2^2 - 5,54062 * X_2 * X_3 - 17,3736 * X_3^2$

X_1 = solvente, X_2 = temperatura, X_3 = relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

Luego de realizar las extracción con 40%, 20% de etanol y agua los resultados mostrados en la gráfica 2, indican que el solvente óptimo para extraer una mayor cantidad de fenoles totales fue el agua.



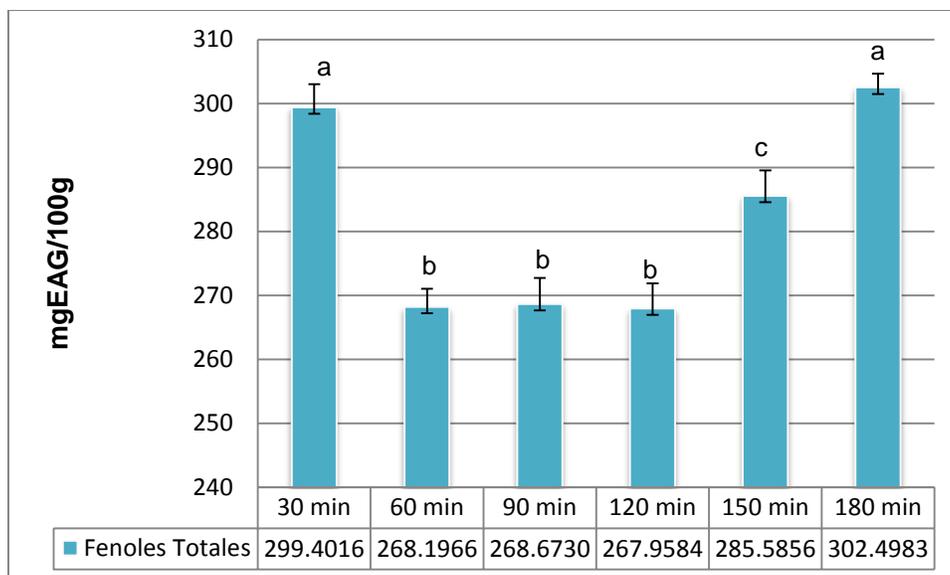
Gráfica 2: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para fenoles totales. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.2.2 Resultados cinética de extracción

En la gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos de fenoles totales a diferentes tiempos. Se puede observar que en el tiempo de 3 horas hay una mayor extracción, sin embargo no existe diferencia significativa con el valor de 30 minutos. La disminución de fenoles totales a partir de 30 min a 60 min, puede deberse a que el firiguelo contiene compuestos fenólicos como flavonoides (Makoi, Belane, Chiphango, & Dakora, 2010) susceptibles a la temperatura de trabajo 60°C. Se puede observar que desde 60 min hay un incremento en la extracción de fenoles totales. No podemos afirmar que haya existido una degradación de compuestos ya que se necesitaría un análisis de HPLC en cada uno de los tiempos de extracción para esto.

Cabe destacar que las condiciones que se determinaron en la extracción de fenoles totales, se tomó de referencia para los métodos de actividad antioxidante ABTS, DPPH y FRAP.



Gráfica 3: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el método de fenoles totales. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa

Elaboración: La autora.

Las condiciones finales de extracción para fenoles totales fueron: relación muestra/solvente 14.28 g/90 mL, solvente agua, temperatura 60°C y 30 minutos.

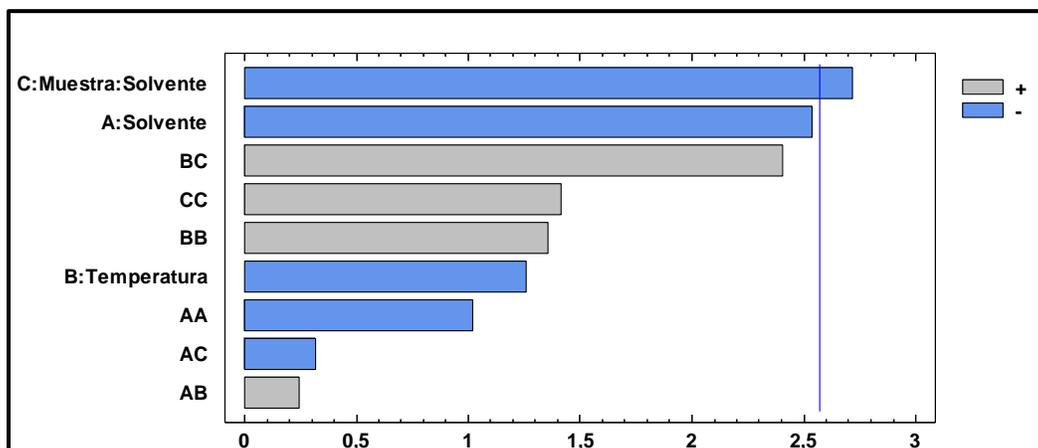
En un estudio realizado por Aguilera et al. (2013) sobre la actividad antioxidante de varias especies de legumbres, entre esas el firigüelo, donde se trabajó con maceración dinámica, con diferente solvente metanol y una temperatura de 20°C, reporta que el contenido de fenoles totales fue de 330 ± 0.11 mg EAG/100 g, si comparamos este valor con el obtenido se aprecia un valor similar a pesar que se trabajó a diferentes condiciones. En otro estudio realizado en India por Kamath et al.(2015) se utilizó para la obtención de extracto de firigüelo acetona, teniendo como resultado 65 ± 0.05 mg EAG/100 g, este valor es menor al obtenido, esto puede ser porque se trabajó con diferentes solventes.

En relación a otras legumbres como el frijol rojo y la haba los resultados obtenidos fueron 2260 ± 0.6 mg EAG/100 g y 2390 ± 0.6 mg EAG/100 g respectivamente, reportados por Ryszard et al. (2004); el firigüelo presenta menor cantidad de fenoles totales, debido a la composición química que presentan cada una de las legumbres mencionadas.

4.3 ABTS

4.3.1 Optimización de las condiciones de extracción.

En la gráfica 4 se presenta el diagrama de Pareto, el cual permite asignar un orden de prioridades para las variables (solvente, temperatura y muestra/solvente) en la extracción de antioxidantes. Se puede observar únicamente que la variable relación muestra/solvente presenta influencia significativa



El color azul representa que a menor cantidad de % etanol, relación muestra y temperatura, mayor extracción de antioxidantes. El color gris significa que a mayor cantidad de % etanol, relación muestra solvente y temperatura, mayor extracción de antioxidantes.

Gráfica 4: Diagrama estandarizado de Pareto para ABTS

Elaboración: La autora

Ya que la relación muestra/solvente fue la única variable que afectó en la extracción y según el diagrama de Pareto (gráfica 4) predice que se debe trabajar una relación muestra/solvente menor 10 g/90 mL, se escogió trabajar con 10 g/90 mL, 6.66 g/90 mL y 5 g/90 mL. Para las extracciones se trabajó con las condiciones óptimas determinadas de solvente (40%) y la temperatura (20°C) (tabla 8).

Tabla 8: Valores óptimos de ABTS para solvente y temperatura y condiciones de trabajo para la optimización muestra/solvente

Factor	Óptimo	Trabajar
Solvente	40%	40%
Temperatura	20°C	20°C
Muestra/Solvente	1:10	10 g/90 mL, 6.66 g/90 mL, 5 g/90 mL

Elaboración: La autora

El modelo matemático que arrojó el análisis de superficie de respuesta (tabla 9), indica la relación entre la relación muestra/solvente y la actividad antioxidante. Los parámetros de extracción obtenidos fueron cuadráticos.

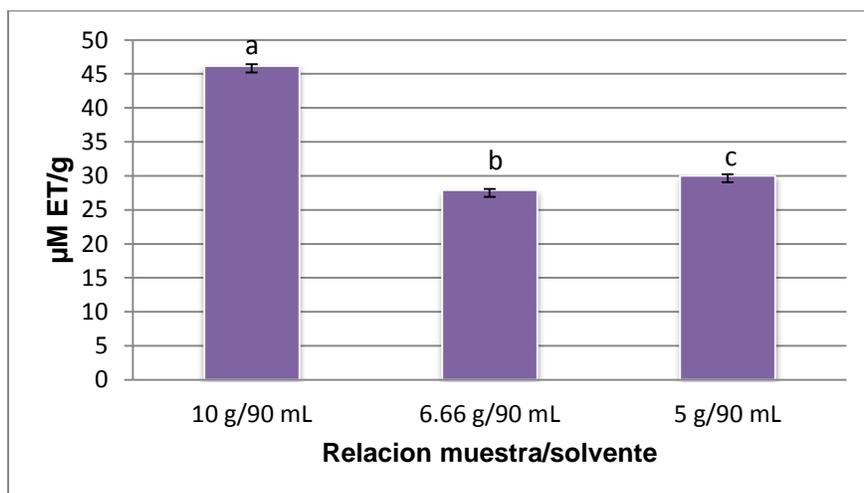
Tabla 9: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta ABTS.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
ABTS $\mu\text{M ET/g}$	$y = 17,5836 - 7,96524 * X_1 - 3,95365 * X_2 - 8,53226 * X_3 - 4,70521 * X_1^2 + 1,08231 * X_1 * X_2 - 1,41779 * X_1 * X_3 + 6,27623 * X_2^2 + 10,6915 * X_2 * X_3 + 6,53018 * X_3^2$

$X_1 =$ solvente, $X_2 =$ temperatura, $X_3 =$ relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

Los resultados mostrados en la gráfica 5, indican que la relación muestra/solvente 10 g/90 mL es el valor en la que se obtuvo mayor actividad antioxidante.

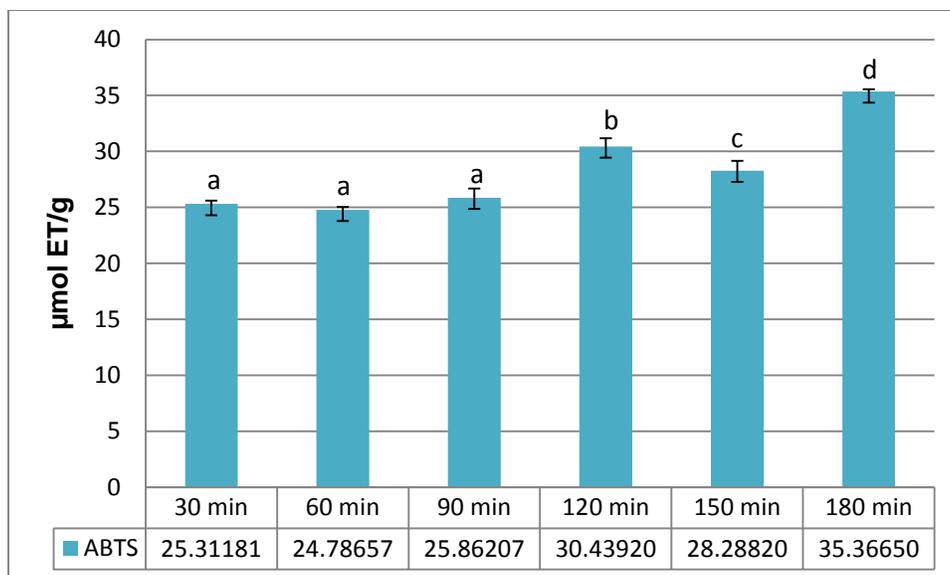


Gráfica 5: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para ABTS. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.3.2 Resultados cinética de extracción.

En la gráfica 6 se muestran los resultados obtenidos del método ABTS a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min. Se puede observar que en el tiempo de 3 horas hay una mayor extracción, comparando con los otros tiempos es diferente estadísticamente, sin embargo como el fin de obtener un solo tiempo para todos los métodos de determinación de capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) se escogió 30 minutos ($25.31 \pm 0.28 \mu\text{mol ET/g}$).



Gráfica 6: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos ABTS. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora.

Las condiciones finales de extracción de ABTS fueron: relación muestra/solvente 10 g/90 mL, solvente 40% de etanol, temperatura 20°C y 30 minutos.

En un estudio realizado en India por Marathe et al. (2012) sobre la actividad antioxidante de varias especies de legumbres, entre esas el firigüelo, donde utilizó como solvente metanol para la obtención de extractos de la muestra el resultado del análisis ABTS fue 46.26 ± 1.44 $\mu\text{mol ET/g}$, comparando este valor con los resultados de nuestro análisis (46.18 ± 0.29 $\mu\text{mol ET/g}$) es similar, a pesar que se trabajó con diferentes solventes y condiciones.

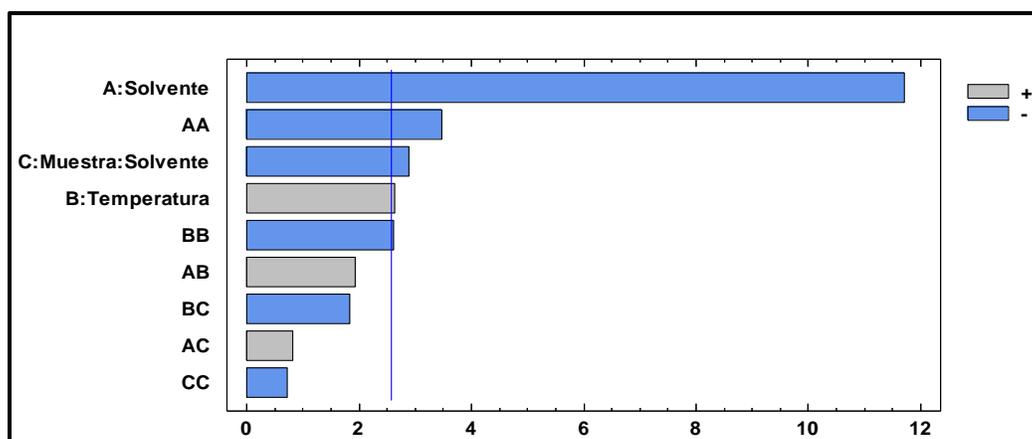
En relación con otras legumbres como la zarandaja y la arveja los resultados obtenidos fueron 6.178 ± 0.05 $\mu\text{mol ET/g}$ y 6.901 ± 0.132 $\mu\text{mol ET/g}$ respectivamente, reportados por Marathe et al. (2012); el firigüelo presenta mayor actividad antioxidante.

4.4 FRAP

4.4.1 Optimización de las condiciones de extracción.

En la gráfica 7 se muestra el diagrama de Pareto el cual permite asignar un orden de prioridades para las variables (solventes, temperatura y muestra/solvente) en la extracción de antioxidantes. Se puede observar que el solvente (etanol), la muestra/solvente y la

temperatura presentan influencia. Se observa también que hay influencia significativa en la interacción solvente- solvente.



El color azul representa que a menor cantidad de % etanol, relación muestra y temperatura, mayor extracción de antioxidantes. El color gris significa que a mayor cantidad de % etanol, relación muestra solvente y temperatura, mayor extracción de antioxidantes.

Gráfica 7: Diagrama estandarizado de Pareto para FRAP

Elaboración: La autora

Ya que el solvente (etanol), relación muestra/solvente y temperatura fueron las variables que afectaron a la extracción y según el diagrama de Pareto (gráfica 7) predice que se debe trabajar una relación muestra/solvente menor 10 g/90 mL. Las extracciones se realizaron con los parámetros detallados en la tabla 10.

Tabla 10: Valores óptimos de FRAP para solvente y temperatura y condiciones de trabajo para relación muestra/solvente

Factor	Óptimo	Trabajar
Solvente	40%	40%
Temperatura	46°C	46°C
Muestra/Solvente	1:10	10 g/90 mL, 6.66 g/90 mL, 5 g/90 mL

Elaboración: La autora

El modelo matemático que arrojó el análisis de superficie de respuesta (tabla 11), indica la relación entre la relación muestra/solvente y la actividad antioxidante. Los parámetros de extracción obtenidos fueron cuadráticos

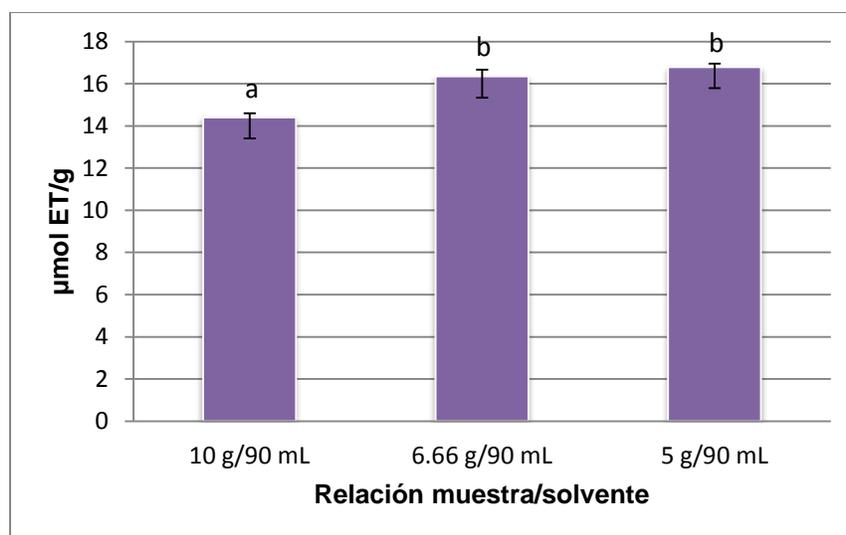
Tabla 11: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta FRAP.

Respuesta	Ecuación de segundo orden
FRAP $\mu\text{M ET/g}$	$y = 9,10519 - 3,28944 * X_1 + 0,742309 * X_2 - 0,812698 * X_3 - 1,4393 * X_1^2 + 0,770694 * X_1 * X_2 + 0,327208 * X_1 * X_3 - 1,07991 * X_2^2 - 0,731979 * X_2 * X_3 - 0,296839 * X_3^2$

$X_1 =$ solvente, $X_2 =$ temperatura, $X_3 =$ relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

Los resultados mostrados en la gráfica 8 indican que la relación muestra/solvente 5 g/95 mL es diferente estadísticamente a 10 g/90 mL, pero similar a 6.66 g/90 mL, por esta razón se escogió 6.66 g/90 mL.

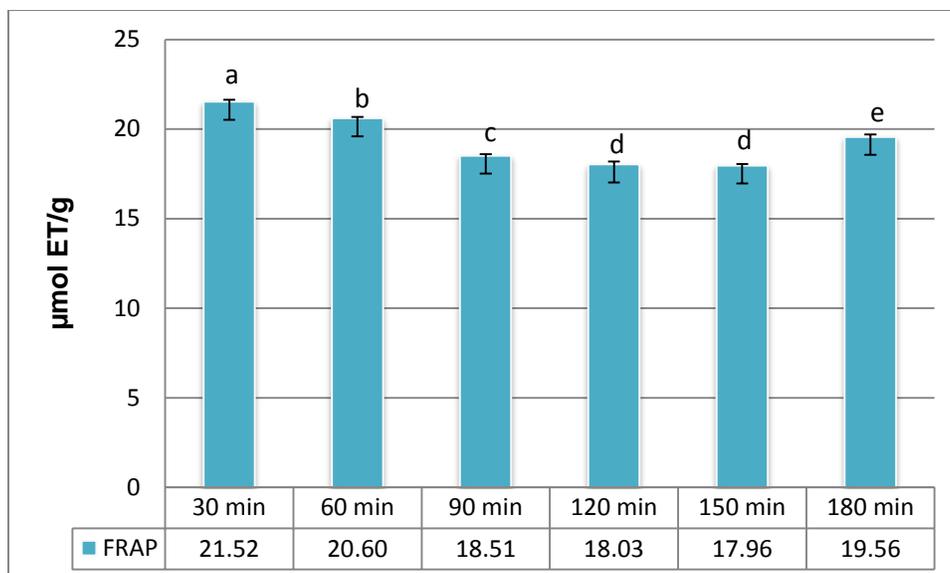


Gráfica 8: Parámetros obtenidos de las condiciones de optimización de extracción para FRAP. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora

4.4.2 Resultados cinética de extracción

En la gráfica 9 se muestran los resultados obtenidos de FRAP a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min. Se puede observar que en el tiempo de 30 minutos ($21.52 \pm 0.12 \mu\text{mol ET/g}$) hay una mayor extracción, comparando con los otros tiempos es estadísticamente diferente.



Gráfica 9: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos FRAP. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora.

Las condiciones finales de extracción de FRAP fueron: relación muestra/solvente 6.66g/90 mL, solvente 40% etanol, temperatura 46°C y 30 minutos.

En un estudio realizado en Pakistan por Zia-ul-haq et al. (2013) se analizó la actividad antioxidante del firigüelo, donde se utilizó como solvente metanol para la obtención del extracto, teniendo un resultado de 19.4 ± 0.2 µmol ET/g, por lo tanto si comparamos este valor es mayor con el obtenido 16.34 ± 0.33 µmol ET/g, debido a que se trabajó con diferentes solventes y condiciones.

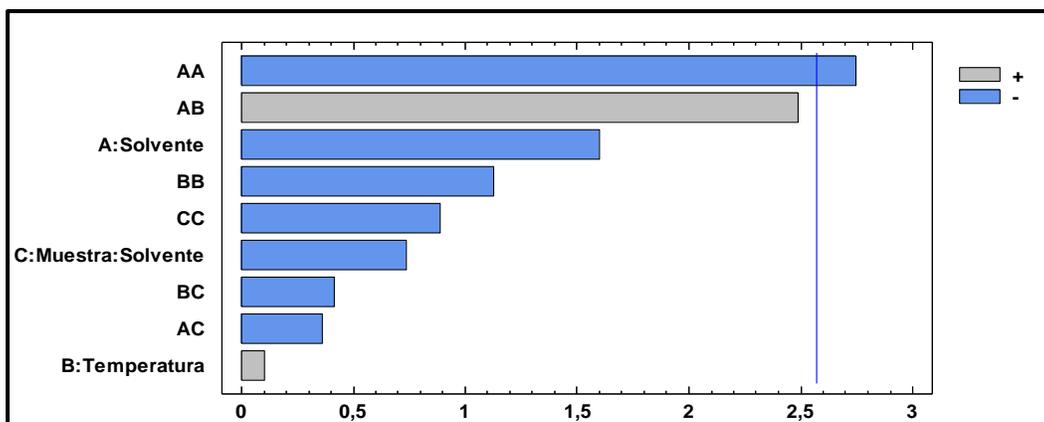
En relación a otras legumbres como el arvejas verdes y frijol común los resultados obtenidos fueron 5.81 ± 0.25 µmol ET/g y 10.22 ± 0.30 µmol ET/g respectivamente, reportados por Marathe et al. (2012); se puede observar que con el resultado obtenido el firigüelo presenta mayor actividad antioxidante.

4.5 DPPH

4.5.1 Optimización de las condiciones de extracción.

En la gráfica 10 se muestra el diagrama de Pareto el cual permite asignar un orden de prioridades para las variables (solvente, temperatura y muestra/solvente). Se puede observar que el solvente (etanol), la muestra/solvente y la temperatura no presentan

influencia significativa. Se observa también que hay influencia significativa en la interacción solvente- solvente.



El color azul representa que a menor cantidad de % etanol, relación muestra y temperatura mayor extracción de antioxidantes. El color gris significa que a mayor cantidad de % etanol, relación muestra solvente y temperatura mayor extracción de antioxidantes.

Gráfica 10: Diagrama estandarizado de Pareto para DPPH.

Elaboración: La autora

En la tabla 12 se muestran el resultado de los valores óptimos, los cuales se encuentran dentro de los límites establecidos, por lo que las condiciones a trabajar son 54% de etanol, relación muestra/solvente 16.66 g/83.34 mL y una temperatura de 36°C.

Tabla 12: Valores óptimos para solvente, temperatura y relación muestra/solvente de DPPH

Factor	Óptimo
Solvente	54%
Temperatura	36°C
Muestra/Solvente	16.66 g/83.34 mL

Elaboración: La autora

El modelo matemático que arrojo el análisis de superficie de respuesta (tabla 13), indica la relación entre la relación muestra/solvente y la actividad antioxidante. Los parámetros de extracción obtenidos fueron cuadráticos

Tabla 13: Ecuación de segundo orden de la variable respuesta DPPH.

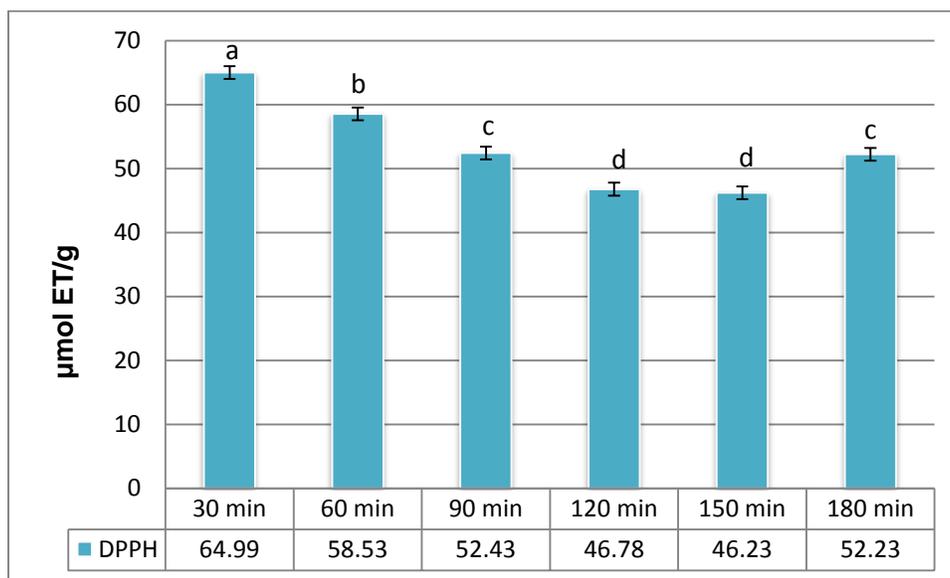
Respuesta	Ecuación de segundo orden
DPPH μ M ET/g	$y = 122,48 - 17,2144 * X_1 + 1,1185 * X_2 - 7,95037 * X_3 - 43,5661 * X_1^2 + 37,903 * X_1 * X_2 - 5,51325 * X_1 * X_3 - 17,8569 * X_2^2 - 6,33 * X_2 * X_3 - 14,0906 * X_3^2$

$X_1 =$ solvente, $X_2 =$ temperatura, $X_3 =$ relación muestra/solvente

Elaboración: La autora

4.5.2 Resultados cinética de extracción

En la gráfica 11 se muestran los resultados obtenidos de DPPH a diferentes tiempos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min y 180 min. Se puede observar que en el tiempo de 30 minutos ($64.98 \pm 1.35 \mu\text{mol ET/g}$) hay una mayor extracción, comparando con los otros tiempos es estadísticamente diferente.



Gráfica 11: Resultados que se obtuvieron a diferentes tiempos durante la obtención del extracto de firigüelo, por el métodos DPPH. Las letras iguales no hay diferencia significativa, letras diferentes existe diferencia significativa.

Elaboración: La autora.

Las condiciones finales de extracción DPPH fueron: relación muestra/solvente 16.66 g/83.34 mL, solvente 54% de etanol, temperatura 36°C y 30 minutos.

En un estudio realizado por Aguilera et al. (2013) sobre varias especies de legumbres, entre esas el firigüelo, se determinó un valor de DPPH de $8.7 \mu\text{mol ET/g}$, utilizando maceración dinámica, solvente metanol y temperatura ambiente. En otro estudio realizado en Pakistan por Zia-ul-haq et al. (2013) utilizó también metanol para la obtención del extracto, teniendo un resultado de $32.5 \pm 0.2 \mu\text{mol ET/g}$, comparando estos dos estudios se puede mencionar que el método determinado en la presente investigación posee un valor superior.

Al comparar los resultados obtenidos por Xu et al. (2007) de otras leguminosas como las arvejas amarillas $2.65 \pm 0.10 \mu\text{mol ET/g}$ y lentejas $19.64 \pm 0.10 \mu\text{mol ET/g}$, se puede observar que los resultado obtenidos presenta mayor actividad antioxidante.

En los resultados obtenidos hasta el momento hemos determinado las condiciones óptimas de forma individual para cada uno de los métodos, debido a esto y con la finalidad de determinar un solo método de extracción, en la tabla 14, se realizó la sustitución de las condiciones óptimas de cada uno de los métodos en las ecuaciones 1, 2, 3 y 4.

Tabla 14: Valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de fenoles totales, ABTS, DPPH y FRAP

Condiciones óptimas	Fenoles Totales		ABTS		DPPH		FRAP	
	Valor óptimo ($\mu\text{mol ET/g}$)	Perdida en Porcentaje (%)	Valor óptimo ($\mu\text{mol ET/g}$)	Perdida en Porcentaje (%)	Valor óptimo ($\mu\text{mol ET/g}$)	Perdida en Porcentaje (%)	Valor óptimo ($\mu\text{mol ET/g}$)	Perdida en Porcentaje (%)
Fenoles Totales	181.95*	---	22.94	59.52	42.68	66.01	10.59	11.14
ABTS	130.98	28.01	56.66*	--	102.61	18.28	9.68	18.76
DPPH	152.98	15.92	23.03	59.36	125.57*	--	9.87	17.16
FRAP	168.87	7.188	30.09	46.90	72.89	41.95	11.91*	--

*Valor óptimo

Elaboración: La autora

Al analizar los resultados de la tabla 14 se puede observar que existe una gran pérdida en comparación con los valores óptimos de cada método. Y revisando los resultados obtenidos en las 15 extracciones realizadas (tabla 5), se evidenció menores pérdidas, por lo que se decidió probar con otras condiciones, para esto se analizó los valores más altos de fenoles totales y actividad antioxidante obtenidos. Entre 40 y 60% de etanol, se escogió 40% de etanol, ya que en las condiciones óptimas para ABTS y FRAP fue 40%, para la temperatura de entre 20 a 60°C, se eligió 20°C, ya que es más fácil el control a esta temperatura al momento de la extracción, y para la relación muestra/solvente los valores más altos se encontraron entre 20 g/80 mL y 10 g/90 mL, se escogió 10 g/90 mL. Al sustituir las condiciones que se decidieron probar (40% de etanol, temperatura 20°C y relación muestra/solvente 10 g/90 mL) en las ecuaciones de superficie de respuesta de los 4 métodos, se pudo observar que hubo una menor pérdida del porcentaje con respecto al valor óptimo, en fenoles totales fue del 26.93%, de ABTS 0.29%, DPPH 22.69% y FRAP 15.93%. En el anexo 13 y 14 se encuentra detallada la pérdida del porcentaje por cada método.

CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas para la cuantificación de fenoles totales durante la obtención del extracto de firigüelo, fueron: relación muestra/solvente 14.28 g/90 mL temperatura 20°C, solvente agua.
- Las condiciones óptimas para la actividad antioxidante de ABTS fueron: 40% de etanol, relación muestra/solvente 10 g/90 mL, temperatura 20°C. Para DPPH: 54% de etanol, relación muestra/solvente 16.66 g/83.34 mL, temperatura 36°C. Y FRAP: 40% de etanol, relación muestra/solvente 6.66 g/90 mL, temperatura 46°C.
- Las condiciones finales de extracción determinada para los 4 métodos en base a las ecuaciones de diseño fueron: 40% de etanol, relación muestra/solvente 10 g/90 mL, temperatura 20°C y 30 minutos.
- El tiempo óptimo de extracción de firigüelo mediante el método de fenoles totales y actividad antioxidante ABTS, DPPH y FRAP fue de 30 minutos.
- Aplicando las condiciones óptimas de extracción el firigüelo (*Vigna unguiculata*) presenta 299.40 ± 3.59 mg EAG/100g en contenido fenólico, y 25.31 ± 0.28 $\mu\text{mol ET/g}$, 64.98 ± 1.35 $\mu\text{mol ET/g}$ y 21.52 ± 0.12 $\mu\text{mol ET/g}$ de actividad antioxidante mediante ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones se recomienda realizar un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para identificar los compuestos fenólicos que se encuentren presentes en el firigüelo.
- Establecer mejor el diseño experimental ya que en la relación muestra/solvente no se trabajó con valores equidistantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, Y., Jime, T., Ben, V., Herrera, T., Cuadrado, C., Mart, M., & Mart, A. (2013). Changes in Nonnutritional Factors and Antioxidant Activity during Germination of Nonconventional Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(31), 8120–8125.
- Almeida, D., Greiner, R., Furtunado, D., Trigueiro, I., & Araújo, M. da P. N. (2008). Content of some antinutritional factors in bean cultivars frequently consumed in Brazil. *International Journal of Food Science & Technology*, *43*(2), 243–249. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01426.x>
- Almeida, M., Erthal, R., Padua, E., Silveira, L., & Am, L. (2008). Talanta Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *76*, 965–977. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(17), 7915–7922.
- AREX. (2010). Frijol De Castilla. Retrieved from http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil_comercial/PERFIL_COMERCIAL_LEG_Canario.pdf. Fecha de acceso: 15 de febrero del 2016
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*, 239–244.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70–76.
- Brand, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, *28*, 25–30.
- Bucic-Kójico, A., Planinic, M., Tomas, S., Jokobek, L., & Seruga, M. (2009). Original article Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Journal of Food Science and Technology*, *44*(12), 2394–2401. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>
- Cai, R., Hettiarachchy, N., & Jalaluddin, M. (2003). High-performance liquid

- chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *Journal of agricultural and food chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1623–1627. <http://doi.org/10.1021/jf020867b>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants , prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. *Journal Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Casanova, A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L . y su capacidad antioxidante. *UCV-SCIENTIA*, 4(1), 161–175.
- Cerón, I., Higueta, J., & Cardona, C. (2011). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5, 17–26.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217–225. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005>
- Coba, P., Tivi, L. M., & Vidari, G. (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *La Granja*, 11(1), 22–30.
- De Gouveia, M., Bolivar, A., López, M., Salih, A., & Pérez, H. (2005). Participación de agricultores en la selección de materiales genéticos de frijol (*vigna unguiculata*) evaluados en suelos ácidos de la Parroquia Espino estado Guárico (Venezuela). *Revista de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, (54), 113–129.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67–82. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>
- Ehlers, J. D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 187–204. [http://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00031-2](http://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00031-2)
- Galvan, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>

- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2012). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universidad politecnica de valencia*. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia Martínez et al.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia_Martinez_et_al.pdf?sequence=1)
- Gómez, A., Muñoz, C., Gutiérrez, H., García, I., & Romero, G. (2008). Optimización de la extracción de compuestos fenólicos naturales a partir de orujos de uva.
- Gutiérrez, Ledesma, García, & Grajales. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas , México. *Revista Cubana de Salud Publica*, 33(1), 0–0.
- Gutiérrez, J., Romo, I., & Serna, S. (2011). Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 290–297. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.004>
- Gutiérrez, V. (2002). Daño oxidativo , radicales libres y antioxidantes. *Revista cubana de medicina*, 31(2), 126–133.
- Horwitz, W., & Latimer, G. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (18th ed.). USA: AOAC Internacional.
- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15(5), 755–766. [http://doi.org/10,1016/0271-5317\(95\)00041-G](http://doi.org/10,1016/0271-5317(95)00041-G)
- Julkunen, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213–217. <http://doi.org/10.1021/jf00062a013>
- Kamath, S. D., Arunkumar, D., Avinash, N. G., & Samshuddin, S. (2015). Determination of total phenolic content and total antioxidant activity in locally consumed food stuffs in Moodbidri , Karnataka , India. *Advances in Applied Science Research*, 6(6), 99–102.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 217–233. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Labarca, M. V, Mora, S. C., Silva, S. F., Bracho, B., & Rincón, C. C. De. (1999).

- Optimización de riego en frijol *Vigna unguiculata* (L .) Walp en suelos de la altiplanicie de Maracaibo. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 16(3), 306–317.
- Librán, C. M., Mayor, L., Garcia-castello, E. M., & Vidal-brotons, D. (2013). Polyphenol extraction from grape wastes : Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences*, 4(9), 56–62.
- Liyana-pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Journal of Food Chemistry*, 93, 47–56. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>
- Makoi, J. H. J. R., Belane, A. K., Chimphango, S. B. M., & Dakora, F. D. (2010). Seed flavonoids and anthocyanins as markers of enhanced plant defence in nodulated cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 118(1), 21–27. <http://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.03.012>
- Marathe, S. A., Rajalakshmi, V., Jamdar, S. N., & Sharma, A. (2012). Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2005–2012. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.039>
- Medina, L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. Retrieved from http://www.autodidacta.anpebadajoz.es/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf. Fecha de acceso: 18 de marzo del 2016.
- Okwu, D. ., & Oriji, B. . (2007). Phytochemical Composition and Nutritional Quality of *Glycine max* and *Vigna Unguiculata* (L.) Walp. *American Journal of Food Technology*, 2(6), 512–520.
- Olinescu, R., & Smith, T. (2002). *Free radicals in medicine*. Nova Publishers.
- Pellegrini, N., Re, R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Peterson, G. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry,

- Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, 100(2), 201–220. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90222-7](http://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90222-7)
- Pham, L., Hua, H., & Pham, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96.
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 32, 137–146. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.001>
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <http://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Punia, D., & Preet, K. (2000). Proximate composition, phytic acid, polyphenols and digestibility (in vitro) of four brown cowpea varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(3), 189–193. <http://doi.org/10.1080/09637480050029692>
- Rockenbach, I. I., Silva, G. L. D., Rodrigues, E., Kuskoski, E. M., & Fett, R. (2008). Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota-different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28, 238–244.
- Rodríguez, B., & López, M. (2009). Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de un ultisol de la altiplanicie del estado guarico, 59(4), 381–386.
- Rodríguez, J. M., Menéndez, J. R., & Trujillo, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1), 36–44.
- Ryszard, A., Troszynska, A., Barylko, N., & Shahidi, F. (2004). Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11, 278–286.
- Setyaningsih, W., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). A new microwave-assisted extraction method for melatonin determination in rice grains. *Journal of Cereal*

Science, 56(2), 340–346. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.02.012>

Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Fernández, G., & Palma, M. (2015). Determination of Melatonin in Rice (*Oryza sativa*) Grains by Pressurized Liquid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1107–1715. <http://doi.org/10.1021/jf505106m>

Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10–19. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.004>

Spigno, G., Tramelli, L., & Faveri, D. M. D. F. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200–208. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>

Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(6), 583–599. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90156-D](http://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90156-D)

Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., & Zeng, X. (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 311–320. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.038>

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (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>

Timko, M., Rushton, P., Laudeman, T., Bokowiec, M., Chipumuro, E., Cheung, F., & Chen, X. (2008). Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. *BMC Genomics*, 9(1), 103. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-103>

Trujillo, C. V. (2007). Estandarización del método de selección de gametos en la F1 de cruza dobles para resistencia múltiple a enfermedades en fréjol común (*Phaseolus Vulgaris* L.). Santa Catalina, INIAP, 2006.

Vargas, A., Villamil, L., Murillo, E., Murillo, A., & Solanilla, J. (2012). Caracterización

fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol cauí *Vigna Unguiculata* L. cultivado en Colombia. *Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 19(1), 320–321.

Venkatachalam, H., Nayak, Y., & Jayashree, B. S. (2012). Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 3(3), 216–219.

Wani, S. M., Jan, N., Wani, T. A., Ahmad, M., & Masoodi, F. A. (2015). Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L .) using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.006>

Xu, B. ., Yuan, S. ., & Chang, S. K. . (2007). Comparative Analyses of Phenolic Composition , Antioxidant Capacity , and Color of Cool Season. *Journal of Food Science*, 72(2), 167–177. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00261.x>

Zia-ul-haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., & De Feo, V. (2013). Antioxidant Activity of the Extracts of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Cultivars Commonly Consumed in Pakistan. *Journal Molecules*, 18(2), 2005–2017. <http://doi.org/10.3390/molecules18022005>

ANEXOS

ANEXO 1: Determinación del porcentaje de humedad

	Muestra 1	Muestra 2
Cápsula Vacía	31.0103	23.3746
Muestra	33.0112	25.3785
Peso 1	33.0007	25.2142
Peso 2	32.9042	25.1930
Peso 3	32.8939	25.1845
Peso 4	32.8743	25.1802
Peso 5	32.8421	25.1732
Peso 6	32.8265	25.1661
Peso 7	32.8132	25.1572
Peso 8	32.7956	25.1513
Peso 9	32.7849	25.1433
Peso 10	32.7843	25.1429
Peso 11	32.7844	25.1428
Humedad	11.33	11.75
Promedio	11.54%	

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

Siendo:

m_1 : Peso cápsula y muestra

m_2 : Peso de la muestra seca

m : Peso cápsula vacía

✓ **Cálculo para la Muestra 1**

$$\%Humedad = \frac{33.0112 - 32.7844}{33.0112 - 31.0103} \times 100$$

$$\%Humedad = \frac{0.2268}{2.0009} \times 100$$

$$Humedad = 11.33\%$$

✓ **Cálculo para la Muestra 2**

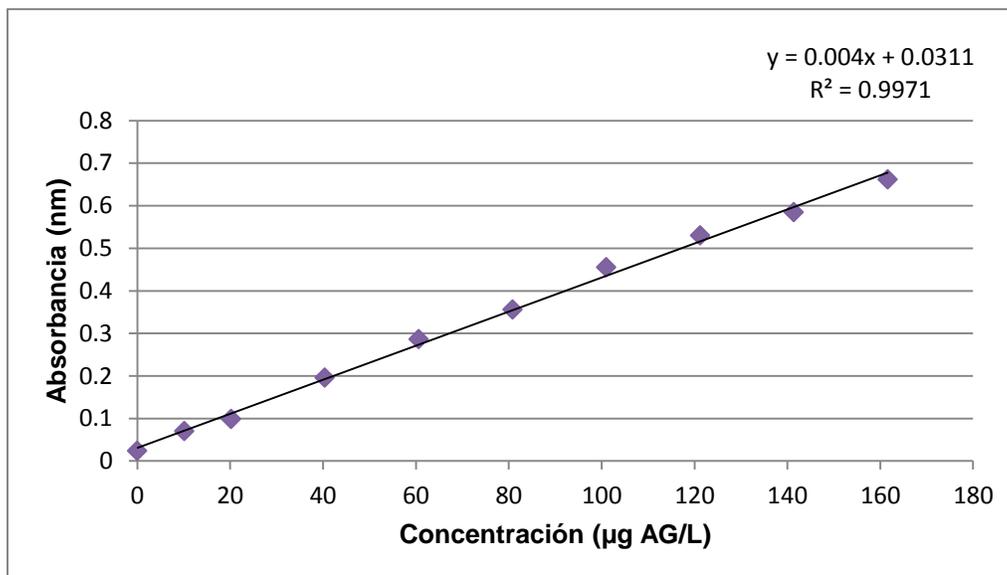
$$\%Humedad = \frac{25.3784 - 25.1428}{25.3784 - 23.3746} \times 100$$

$$\%Humedad = \frac{0.2356}{2.0038} \times 100$$

$$Humedad = 11.75\%$$

ANEXO 2: Datos de cuantificación de fenoles totales

a. Curva de calibración de ácido gálico



W AG (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. Madre (mg/L)	(µg AG/L)
0.05	170.12	99	25	2.02	2020.20	202020.02

Conc. AG (mg/L)	Alícuotas (mL)	Aforo (mL)	Absorbancia (nm)
0.00	0	10	0.024
10.10	0.05	10	0.07
20.20	0.1	10	0.099
40.40	0.2	10	0.196
60.61	0.3	10	0.286
80.81	0.4	10	0.356
101.01	0.5	10	0.455
121.21	0.6	10	0.53
141.41	0.7	10	0.585
161.62	0.8	10	0.662

b. Datos de la cuantificación de fenoles totales

N°	Variables			Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (mg/L)	Conc. (mgEAG/100g)	PM (mgEAG/100g)	SD	CV
	Sol.	Temp	M/S		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.323	10	90				72.98	65.68	66.58	1.27	1.91
				0.331	10	90	--	--	--	74.98	67.48			
2	0	0	0	0.173	20	80	1	9	10	35.48	141.90	149.90	11.31	7.55
				0.189	20	80	1	9	10	39.48	157.90			
3	0	0	0	0.171	20	80	1	9	10	34.98	139.90	145.40	7.78	5.35
				0.182	20	80	1	9	10	37.73	150.90			
4	0	0	0	0.165	20	80	1	9	10	33.48	133.90	138.40	6.36	4.60
				0.174	20	80	1	9	10	35.73	142.90			
5	-1	0	-1	0.171	10	90	1	4	5	34.98	157.39	155.70	2.39	1.53
				0.168	10	90	1	4	5	34.23	154.01			
6	-1	0	1	0.216	25	75	1	9	10	46.23	138.68	141.30	3.71	2.63
				0.223	25	75	1	9	10	47.98	143.93			
7	1	0	1	0.183	25	75	1	4	5	37.98	56.96	59.21	3.18	5.37
				0.195	25	75	1	4	5	40.98	61.46			
8	-1	1	0	0.208	20	80	1	9	10	44.23	176.90	183.40	9.19	5.01
				0.221	20	80	1	9	10	47.48	189.90			
9	1	1	0	0.179	20	80	1	4	5	36.98	73.95	76.45	3.54	4.62
				0.189	20	80	1	4	5	39.48	78.95			
10	0	1	-1	0.154	10	90	1	4	5	30.73	138.26	150.08	16.71	11.13
				0.175	10	90	1	4	5	35.98	161.89			
11	0	1	1	0.187	25	75	1	9	10	38.98	116.93	120.30	4.77	3.97
				0.196	25	75	1	9	10	41.23	123.68			

12	1	-1	0	0.203	20	80	2	3	5	42.98	42.98	47.10	5.83	12.39
				0.236	20	80	2	3	5	51.23	51.23			
13	-1	-1	0	0.166	20	80	1	9	10	33.73	134.90	152.40	24.75	16.24
				0.201	20	80	1	9	10	42.48	169.90			
14	0	-1	-1	0.213	10	90	2	3	5	45.48	102.32	106.54	5.97	5.60
				0.228	10	90	2	3	5	49.23	110.76			
15	0	-1	1	0.154	25	75	1	9	10	30.73	92.18	98.93	9.55	9.65
				0.172	25	75	1	9	10	35.23	105.68			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura	20	40	60
Relación muestra/Solvente	10 g/90 mL	20 g/80 mL	25 g/75 mL

c. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ Solución Madre

$$\begin{array}{ccc} 20\text{mg AG} & \times & 10\text{mL MeOH} \\ X & & 25\text{mL MeOH} \end{array}$$

$$X = 50\text{mg Acido Gálico}$$

✓ Folin- Ciocalteu

$$V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{0.25N \times 25\text{mL}}{2N}$$

$$V_1 = 3.125\text{mL}$$

✓ Carbonato de sodio (Na_2CO_3)

Peso Molecular

$$\text{Na: } 23 \times 2 = 46$$

$$\text{Ca: } 12 \times 1 = 12$$

$$\text{O: } 16 \times 3 = 48$$

$$\hline 106 \text{ g/mol} / 2 = 53\text{g}$$

$$\begin{array}{ccc} 53\text{g} & \times & 1000\text{mL} \\ X & & 25\text{mL} \end{array}$$

$$X = 1.325\text{g de } \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ aforar a } 25\text{mL de MeOH}$$

d. Cálculo para la determinación de concentración

La concentración se expresó miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra, para esto se realizaron los siguientes cálculos.

Estos cálculos se los utiliza también para la optimización y cinética.

Tomando como ejemplo la absorbancia del primer extracto, se reemplaza los valores de la pendiente (m) e intersección (b) de la curva de calibración

✓ Ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

Siendo:

y: Absorbancia (nm)

m: Pendiente

x: Concentración

b: Intersección

Se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y - b}{m}$$
$$x = \frac{0.323 - 0.0311}{0.004}$$
$$x = 72.9750 \text{ mg/L}$$

Para determinar la concentración se muestra lo siguiente:

- ✓ Sin factor de dilución (primer extracto):

$$\begin{array}{l} 72.9750 \text{ mg} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1000 \text{ mL} \\ \diagdown 90 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 6.5678 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{l} 6.5678 \text{ mg} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 10 \text{ g} \\ \diagdown 100 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 65.6775 \text{ mg EAG/100g}$$

- ✓ Con factor de dilución (segundo extracto):

$$\begin{array}{l} 35.4750 \text{ mg} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1000 \text{ mL} \\ \diagdown 10 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0.3548 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{l} 0.3548 \text{ mg} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1 \text{ mL} \\ \diagdown 80 \text{ mL} \end{array}$$

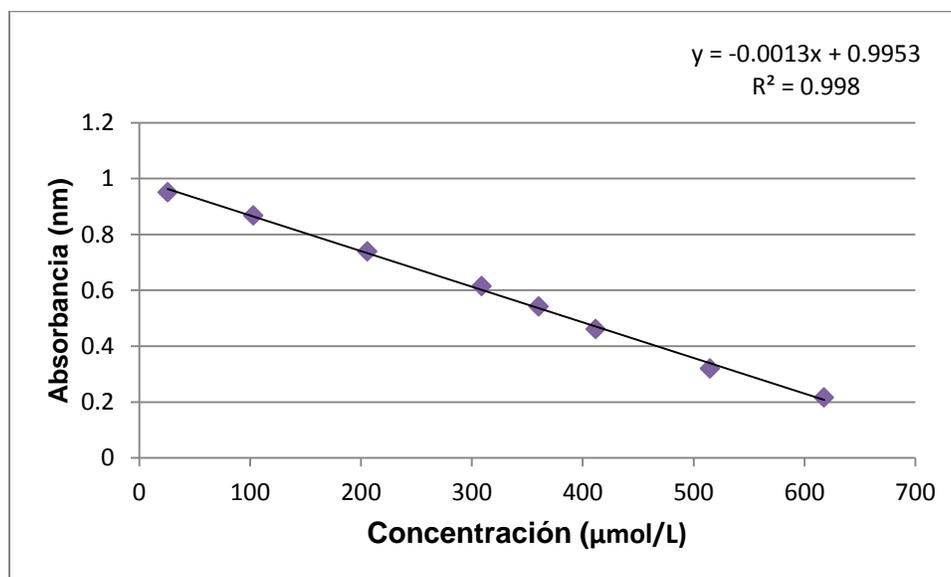
$$X = 28.38 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{l} 28.38 \text{ mg} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 20 \text{ g} \\ \diagdown 100 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 141.90 \text{ mg EAG/100g}$$

ANEXO 3: Cuantificación de actividad antioxidante, ABTS

a. Curva de Calibración de Trolox



W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	Conc. Madre (g/L)	$\mu\text{mol/L}$
0.0625	250.29	97	25	2.57	10297.33

Trolox (μmol)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Trolox ($\mu\text{mol/L}$)	Abs (nm)
25	0.025	10	25.74	0.951
100	0.1	10	102.97	0.868
200	0.2	10	205.95	0.739
300	0.3	10	308.92	0.615
350	0.35	10	360.41	0.542
400	0.4	10	411.89	0.461
500	0.5	10	514.87	0.32
600	0.6	10	617.84	0.216

b. Datos de cuantificación del método ABTS

N°	Variables			Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
	Sol	Temp	M/S		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.515	10	90	1	4	5	369.46	16.63	16.37	0.37	2.24
				0.530	10	90	1	4	5	357.92	16.11			
2	0	0	0	0.407	20	80	1	9	10	452.54	18.10	17.90	0.28	1.58
				0.420	20	80	1	9	10	442.54	17.70			
3	0	0	0	0.422	20	80	1	9	10	441.00	17.64	17.55	0.13	0.74
				0.428	20	80	1	9	10	436.38	17.46			
4	0	0	0	0.434	20	80	1	9	10	431.77	17.27	17.30	0.04	0.25
				0.432	20	80	1	9	10	433.31	17.33			
5	-1	0	-1	0.591	10	90	1	9	10	311.00	27.99	27.57	0.59	2.13
				0.603	10	90	1	9	10	301.77	27.16			
6	-1	0	1	0.554	25	75	1	24	25	339.46	25.46	25.29	0.24	0.97
				0.560	25	75	1	24	25	334.85	25.11			
7	1	0	1	0.629	25	75	1	9	10	281.77	8.45	8.41	0.07	0.78
				0.633	25	75	1	9	10	278.69	8.36			
8	-1	1	0	0.641	20	80	1	24	25	272.54	27.25	26.60	0.92	3.48
				0.658	20	80	1	24	25	259.46	25.95			
9	1	1	0	0.647	20	80	1	9	10	267.92	10.72	10.95	0.33	2.98
				0.632	20	80	1	9	10	279.46	11.18			
10	0	1	-1	0.601	10	90	1	9	10	303.31	27.30	26.67	0.88	3.30
				0.619	10	90	1	9	10	289.46	26.05			
11	0	1	1	0.576	25	75	1	19	20	322.54	19.35	19.05	0.42	2.23
				0.589	25	75	1	19	20	312.54	18.75			

12	1	-1	0	0.792	20	80	1	14	15	156.38	9.38	9.54	0.23	2.39
				0.785	20	80	1	14	15	161.77	9.71			
13	-1	-1	0	0.501	20	80	1	19	20	380.23	30.42	29.53	1.26	4.27
				0.530	20	80	1	19	20	357.92	28.63			
14	0	-1	-1	0.535	10	90	1	19	20	354.08	63.73	63.11	0.88	1.40
				0.544	10	90	1	19	20	347.15	62.49			
15	0	-1	1	0.437	25	75	1	9	10	429.46	12.88	12.72	0.23	1.80
				0.451	25	75	1	9	10	418.69	12.56			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura	20	40	60
Relación muestra/Solvente	10 g/90 mL	20 g/80 mL	25 g/75 mL

c. Cálculos para la preparación de reactivos

✓ **Solución madre ABTS**

Peso molecular: 548.68 g/mol

$$\begin{array}{l} 548.68 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1\text{M} \\ 0.0074\text{M} \end{array}$$

$$X = 4.060 \text{ g}$$

$$\begin{array}{l} 4.060 \text{ g} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000\text{mL} \\ 10\text{mL} \end{array}$$

X = 0.04 g ó 40.6mg de ABTS aforar a 10mL de agua destilada

✓ **Persulfato de potasio**

Peso molecular: 270.322 g/mol

$$\begin{array}{l} 270.322 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1\text{M} \\ 0.00264\text{M} \end{array}$$

$$X = 0.70 \text{ g}$$

$$\begin{array}{l} 0.7028 \text{ g} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000\text{mL} \\ 10\text{mL} \end{array}$$

X = 0.007g o 7mg de persulfato de potasio aforar a 10mL de agua destilada

✓ **Troxol**

Peso molecular: 250.29 g/mol

$$\begin{array}{l} 250.29 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1\text{M} \\ 0.01\text{M} \end{array}$$

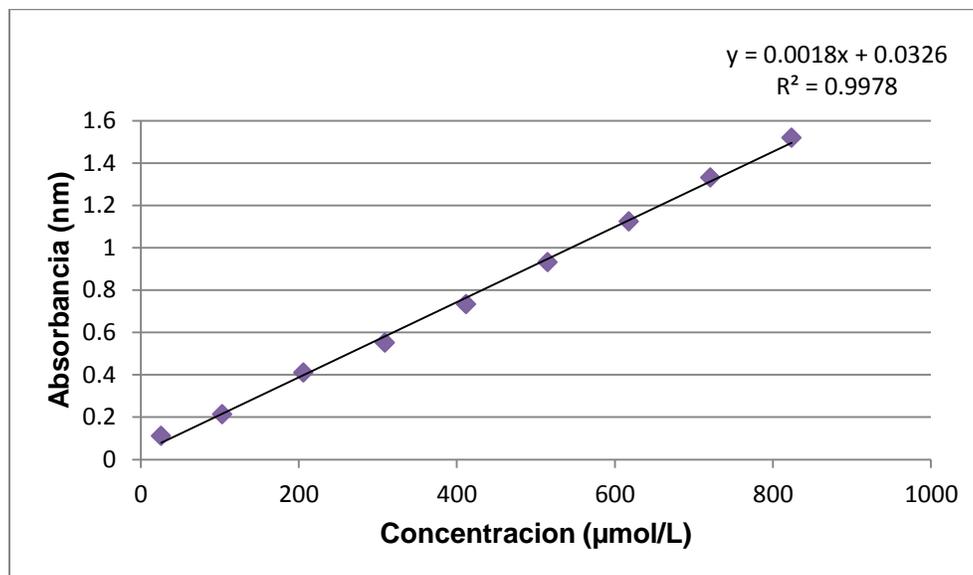
$$X = 2.50 \text{ g}$$

$$\begin{array}{l} 2.502 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000\text{mL} \\ 25\text{mL} \end{array}$$

X = 0.06 g o 62.55 mg de trolox aforar a 25mL de MeOH

ANEXO 4: Cuantificación de actividad antioxidante, FRAP

a. Curva de calibración de Trolox



W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	Conc. Madre (g/L)	Conc. (µmolTrolox/L)
0.062	250.29	97	25	2.57	10297.33

Trolox (µmol/L)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Abs (nm)
25.74	0.025	10	0.112
102.97	0.1	10	0.214
205.95	0.2	10	0.41
308.92	0.3	10	0.551
411.89	0.4	10	0.734
514.87	0.5	10	0.931
617.84	0.6	10	1.124
720.81	0.7	10	1.331
823.79	0.8	10	1.519

b. Datos de cuantificación del método FRAP

N°	Variables			Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV	
	Sol.	Temp	M/S	Abs (nm)	Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)						Vol. Total (mL)
1	1	0	-1	0.881	10	90	--	--	--	471.33	4.24	4.25	0.01	0.33
				0.885	10	90				473.56	4.26			
2	0	0	0	0.423	20	80	1	9	10	216.89	8.68	8.74	0.09	1.08
				0.429	20	80	1	9	10	220.22	8.81			
3	0	0	0	0.470	20	80	1	9	10	243.00	9.72	9.66	0.08	0.81
				0.465	20	80	1	9	10	240.22	9.61			
4	0	0	0	0.426	20	80	1	9	10	218.56	8.74	8.91	0.24	2.65
				0.441	20	80	1	9	10	226.89	9.08			
5	-1	0	-1	0.501	10	90	1	4	5	260.22	11.71	12.09	0.53	4.39
				0.531	10	90	1	4	5	276.89	12.46			
6	-1	0	1	0.626	25	75	1	9	10	329.67	9.89	9.83	0.08	0.84
				0.619	25	75	1	9	10	325.78	9.77			
7	1	0	1	0.458	25	75	1	4	5	236.33	3.55	3.31	0.34	10.15
				0.401	25	75	1	4	5	204.67	3.07			
8	-1	1	0	0.460	20	80	1	9	10	237.44	9.50	9.05	0.63	6.94
				0.420	20	80	1	9	10	215.22	8.61			
9	1	1	0	0.435	20	80	1	4	5	223.56	4.47	4.62	0.20	4.43
				0.461	20	80	1	4	5	238.00	4.76			
10	0	1	-1	0.437	10	90	1	4	5	224.67	10.11	10.52	0.58	5.54
				0.470	10	90	1	4	5	243.00	10.94			
11	0	1	1	0.473	25	75	1	9	10	244.67	7.34	7.41	0.09	1.27
				0.481	25	75	1	9	10	249.11	7.47			

12	1	-1	0	0.492	20	80	2	3	5	255.22	2.55	2.58	0.04	1.37
				0.501	20	80	2	3	5	260.22	2.60			
13	-1	-1	0	0.481	20	80	1	9	10	249.11	9.96	10.10	0.19	1.87
				0.493	20	80	1	9	10	255.78	10.23			
14	0	-1	-1	0.557	10	90	2	3	5	291.33	6.56	6.59	0.04	0.67
				0.562	10	90	2	3	5	294.11	6.62			
15	0	-1	1	0.409	25	75	1	9	10	209.11	6.27	6.40	0.18	2.76
				0.424	25	75	1	9	10	217.44	6.52			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura	20	40	60
Relación muestra/Solvente	10 g/90 mL	20 g/80 mL	25 g/75 mL

c. **Calculo para la preparación de reactivos**

✓ **Buffer acetato 300 mM**

$$\begin{array}{ccc} 31 \text{ g Acetato de sodio} & \times & 1000\text{mL} \\ X & & 250\text{mL} \end{array}$$

X=0.77g de acetato de sodio

$$\begin{array}{ccc} 16 \text{ mL Ácido acético} & \times & 1000\text{mL} \\ X & & 250\text{mL} \end{array}$$

X=4 ml ácido acético

✓ **Ácido Clorhídrico (HCl)**

Peso molecular: 36.5 g/mol

$$\begin{array}{ccc} 36.5 \text{ g/mol} & \times & 1\text{M} \\ X & & 0.04\text{M} \end{array}$$

X=1.46g

$$\begin{array}{ccc} 1.46 \text{ g} & \times & 1000\text{mL} \\ X & & 500\text{mL} \end{array}$$

X=0.73 g

$$V = m/d$$

$$V = 0.73\text{g}/1.199$$

$$V = 0.6088$$

$$\begin{array}{ccc} 0.6088 \text{ ml} & \times & 37\% \\ X & & 100\% \end{array}$$

X=1.64 ml aforar a 500ml de agua destilada

✓ **TPTZ**

Peso molecular: 312.3 g/mol

$$\begin{array}{ccc} 312.3 \text{ g/mol} & \times & 1\text{M} \\ X & & 0.01\text{M} \end{array}$$

X= 3.12 g

$$\begin{array}{l} 3.1233 \text{ g} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ ml} \\ 25 \text{ ml} \end{array}$$

X=0.078 g o 78 mg aforar con 25 ml de HCl

✓ **Cloruro Férrico**

Peso molecular: 270.2 g/mol

$$\begin{array}{l} 270.2 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \end{array} \begin{array}{l} 1 \text{ M} \\ 0.02 \text{ M} \end{array}$$

X= 5.40 g

$$\begin{array}{l} 5.406 \text{ g} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ mL} \\ 30 \text{ mL} \end{array}$$

X= 0.162 g o 162.18 mg + 30 mL de agua destilada

d. Cálculo para la determinación de concentración

La concentración se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra, para esto se realizaron los siguientes cálculos.

Estos cálculos se los utiliza también para la optimización y cinética.

Tomando como ejemplo la absorbancia del primer extracto, se reemplaza los valores de la pendiente (m) e intersección (b) de la curva de calibración

✓ **Ecuación de la recta**

$$y = mx + b$$

Siendo:

y: Absorbancia (nm)

m: Pendiente

x: Concentración

b: Intersección

Se despeja la concentración (x):

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

$$x = \frac{0.881 - 0.0326}{0.0018}$$

$$x = 471.33 \mu\text{mol/L}$$

Para determinar la concentración se muestra lo siguiente:

- ✓ Sin factor de dilución (primer extracto):

$$\begin{array}{l} 471.33 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1000\text{mL} \\ \diagdown 90 \text{ mL} \end{array}$$

$X = 42.42 \mu\text{mol}$

$$\begin{array}{l} 42.42 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 10 \text{ g} \\ \diagdown 1 \text{ g} \end{array}$$

$X = 4.24 \mu\text{mol ET/g}$

- ✓ Con factor de dilución (segundo extracto):

$$\begin{array}{l} 216.8889 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1000 \text{ mL} \\ \diagdown 10 \text{ mL} \end{array}$$

$X = 2.17 \mu\text{mol}$

$$\begin{array}{l} 2.1688 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 1 \text{ mL} \\ \diagdown 80 \text{ mL} \end{array}$$

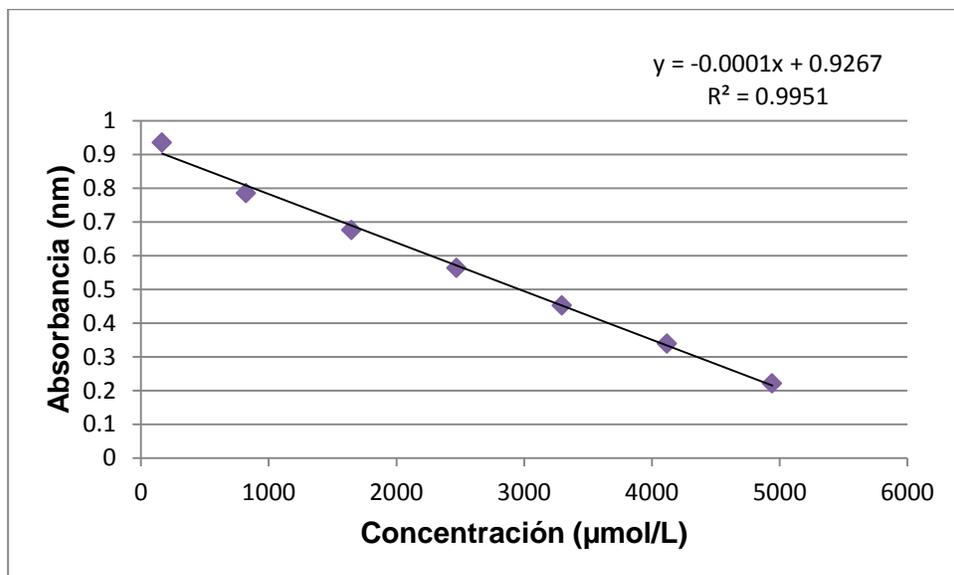
$X = 173.50 \mu\text{mol}$

$$\begin{array}{l} 173.504 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup 20 \text{ g} \\ \diagdown 1 \text{ g} \end{array}$$

$X = 8.67 \mu\text{mol ET/g}$

ANEXO 5: Cuantificación de actividad antioxidante, DPPH

a. Curva de calibración de Trolox



W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	(µmol/L)
0.0625	250.29	97	25	2.58	10297.33

Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Trolox (µmol/L)	Abs (nm)
0.4	25	164.76	0.935
2	25	823.78	0.785
4	25	1647.57	0.676
6	25	2471.36	0.563
8	25	3295.15	0.452
10	25	4118.93	0.339
12	25	4942.72	0.221

b. Datos de cuantificación del método DPPH

N°	Variables			Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmolET/g)	PM (µmolET/g)	SD	CV
	Sol.	Temp	M/S		Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	1	0	-1	0.352	10	90	--	--	--	5747.00	51.72	50.91	1.15	2.25
				0.370	10	90				5567.00	50.10			
2	0	0	0	0.637	20	80	1	9	10	2897.00	115.88	115.28	0.85	0.74
				0.640	20	80	1	9	10	2867.00	114.68			
3	0	0	0	0.601	20	80	1	9	10	3257.00	130.28	128.48	2.55	1.98
				0.610	20	80	1	9	10	3167.00	126.68			
4	0	0	0	0.614	20	80	1	9	10	3127.00	125.08	123.68	1.98	1.60
				0.621	20	80	1	9	10	3057.00	122.28			
5	-1	0	-1	0.751	10	90	1	4	5	1757.00	79.07	81.09	2.86	3.53
				0.742	10	90	1	4	5	1847.00	83.12			
6	-1	0	1	0.623	25	75	1	9	10	3037.00	91.11	89.76	1.91	2.13
				0.632	25	75	1	9	10	2947.00	88.41			
7	1	0	1	0.674	25	75	1	4	5	2527.00	37.91	37.53	0.53	1.41
				0.679	25	75	1	4	5	2477.00	37.16			
8	-1	1	0	0.535	20	80				3917.00	15.67	15.49	0.25	1.64
				0.544	20	80				3827.00	15.31			
9	1	1	0	0.605	20	80	1	4	5	3217.00	64.34	63.64	0.99	1.56
				0.612	20	80	1	4	5	3147.00	62.94			
10	0	1	-1	0.622	10	90	1	4	5	3047.00	137.12	135.32	2.55	1.88
				0.630	10	90	1	4	5	2967.00	133.52			
11	0	1	1	0.606	25	75	1	9	10	3207.00	96.21	93.21	4.24	4.55
				0.626	25	75	1	9	10	3007.00	90.21			

12	1	-1	0	0.606	20	80	2	3	5	3207.00	32.07	30.82	1.77	5.74
				0.631	20	80	2	3	5	2957.00	29.57			
13	-1	-1	0	0.584	20	80	1	9	10	3427.00	137.08	134.28	3.96	2.95
				0.598	20	80	1	9	10	3287.00	131.48			
14	0	-1	-1	0.584	10	90	2	3	5	3427.00	77.11	75.20	2.70	3.60
				0.601	10	90	2	3	5	3257.00	73.28			
15	0	-1	1	0.721	25	75	1	9	10	2057.00	61.71	58.41	4.67	7.99
				0.743	25	75	1	9	10	1837.00	55.11			

VARIABLES	-1	0	1
% Solvente EtOH	40	60	80
Temperatura	20	40	60
Relación muestra/Solvente	10 g/90 mL	20 g/80 mL	25 g/75 mL

c. **Cálculos para la preparación de los reactivos**

✓ **Solución Madre DPPH**

$$\begin{array}{ccc} 24\text{mg} & \diagdown & 100\text{ml MeOH} \\ & \times & \\ X & \diagup & 50\text{ml} \end{array}$$

X= 12mg de DPPH aforar en 50ml de MeOH

d. **Cálculo para la determinación de concentración**

La concentración se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra, para esto se realizaron los siguientes cálculos.

Estos cálculos se los utiliza también para la optimización y cinética.

Tomando como ejemplo la absorbancia del primer extracto, se reemplaza los valores de la pendiente (m) e intersección (b) de la curva de calibración

✓ **Ecuación de la recta**

$$y = mx + b$$

Siendo:

y: Absorbancia (nm)

m: Pendiente

x: Concentración

b: Intersección

Se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y - b}{m}$$
$$x = \frac{0.352 - 0.9267}{-0.0001}$$

$$x = 5747 \mu\text{mol/L}$$

Para determinar la concentración se muestra lo siguiente:

✓ Sin factor de dilución (primer extracto):

$$\begin{array}{ccc} 5747 \mu\text{mol} & \diagdown & 1000\text{mL} \\ & \times & \\ X & \diagup & 90 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 571.23 \mu\text{mol}$$

$$\begin{array}{ccc} 517.23 \mu\text{mol} & \diagdown & 10 \text{ g} \\ & \times & \\ X & \diagup & 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 51.72 \mu\text{mol ET/g}$$

✓ Con factor de dilución (segundo extracto):

$$\begin{array}{l} 2897 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ mL} \\ 10 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 28.97 \mu\text{mol}$$

$$\begin{array}{l} 28.97 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1 \text{ mL} \\ 80 \text{ mL} \end{array}$$

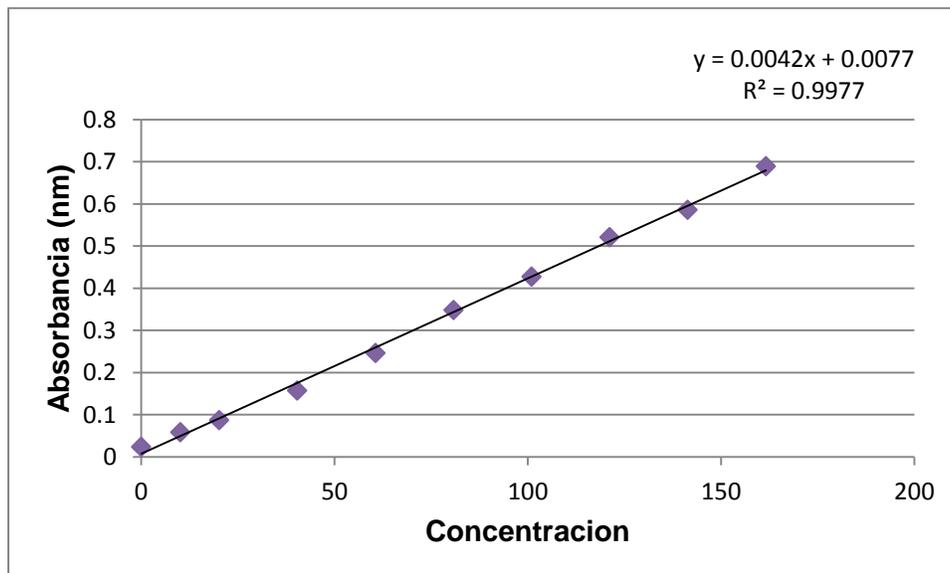
$$X = 2317.6 \mu\text{mol}$$

$$\begin{array}{l} 2317.6 \mu\text{mol} \\ X \end{array} \begin{array}{l} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \begin{array}{l} 20 \text{ g} \\ 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 115.88 \mu\text{mol ET/g}$$

ANEXO 6: Resultados de optimización y su posterior análisis de fenoles totales

a. Curva de calibración



W AG (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. Madre (mg/L)	($\mu\text{g AG/L}$)
0.05	170.12	99	25	2.02	2020.20	2020202.02

Conc. AG (mg/L)	Abs (nm)	Alicuotas (mL)	Aforo (mL)
0	0.0234	0	10
10.10	0.058	0.05	10
20.20	0.087	0.1	10
40.40	0.157	0.2	10
60.60	0.246	0.3	10
80.80	0.348	0.4	10
101.01	0.427	0.5	10
121.21	0.521	0.6	10
141.41	0.586	0.7	10
161.62	0.689	0.8	10

b. Datos de optimización

N°	Variables (EtOH) 60°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (mg/L)	Conc. (mgEAG/100g)	PM (mgEAG/100g)	SD	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	0%	0.392	14.28	85.72	1	4	5	91.50	274.63	273.56	1.52	0.55
		0.389	14.28	85.72	1	4	5	90.79	272.48			
2	20%	0.352	14.28	85.72	2	3	5	81.98	123.02	124.63	2.27	1.82
		0.361	14.28	85.72	2	3	5	84.12	126.24			
3	40%	0.425	14.28	85.72	2	3	5	99.36	149.11	148.39	1.01	0.68
		0.421	14.28	85.72	2	3	5	98.40	147.68			

c. Análisis de optimización

REP 1	REP 2	PROMEDIO	SD	CV
274.63	272.48	273.56	1.52	0.55
123.02	126.24	124.63	2.27	1.82
149.11	147.68	148.39	1.01	0.68

- ✓ Análisis de 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	546.04	273.02	0.57
Fila 2	2	250.87	125.43	1.29
Fila 3	2	296.07	148.03	0.26
Columna 1	3	546.40	182.13	6237.47
Columna 2	3	546.58	182.19	6401.69

- ✓ Análisis de 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	25276.21	2	12638.11	11938.53	8.3755E-05	19
Columnas	0.01	1	0.01	0.01	0.95	18.51
Error	2.12	2	1.06			
Total	25278.33	5				

LSD

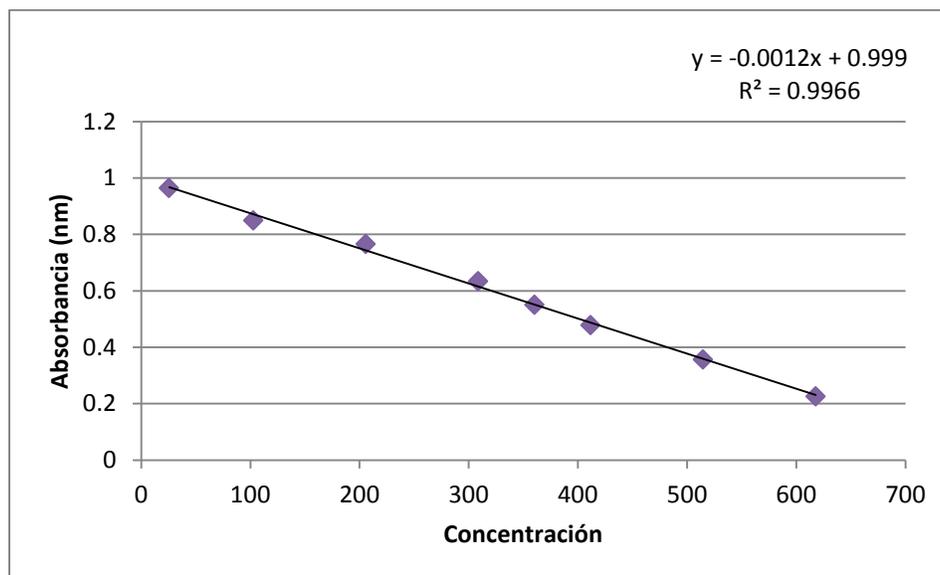
6.21	1.15	7.17
------	------	-------------

		0%	20%	40%
	1641.33	1641.33	747.77	890.34
0%	1641.33	0	893.56	750.99
20%	747.77	893.56	0	142.57
40%	890.34	750.99	142.57	0

Todos son estadísticamente diferentes

ANEXO 7: Resultado de optimización y su posterior análisis de ABTS

a. Curva de calibración



W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	Conc. Madre (g/L)	µmol/L
0.0625	250.29	97	25	2.58	10297.33

Trolox (µmol)	Alícuotas (mL)	Aforo (mL)	Trolox (µmol/L)	Abs (nm)
25	0.025	10	25.74	0.964
100	0.1	10	102.97	0.849
200	0.2	10	205.95	0.766
300	0.3	10	308.92	0.634
350	0.35	10	360.41	0.551
400	0.4	10	411.89	0.478
500	0.5	10	514.87	0.357
600	0.6	10	617.84	0.226

b. Datos de optimización

N°	Variables (EtOH) 20°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	44%	0.590	10	90	1	14	15	340.83	46.01	46.18	0.24	0.52
		0.587	10	90	1	14	15	343.33	46.35			
2	44%	0.523	6.66	93	1	4	5	396.67	27.80	27.91	0.17	0.59
		0.519	7	93	1	4	5	400.00	28.03			
3	44%	0.618	5	95	1	4	5	317.50	30.16	30.04	0.17	0.56
		0.621	5.00	95	1	4	5	315.00	29.93			

c. Análisis de optimización

REP 1	REP 2	PROMEDIO	SD	CV
46.01	46.35	46.18	0.24	0.52
27.80	28.03	27.91	0.17	0.59
30.16	29.93	30.04	0.17	0.56

- ✓ Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	92.36	46.18	0.06
Fila 2	2	55.83	27.91	0.03
Fila 3	2	60.09	30.04	0.03
Columna 1	3	103.97	34.66	98.11
Columna 2	3	104.31	34.77	101.50

- ✓ Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	399.12	2	199.56	4250.89	0.0002	19
Columnas	0.02	1	0.02	0.40	0.59	18.51
Error	0.09	2	0.05			
Total	399.23	5				

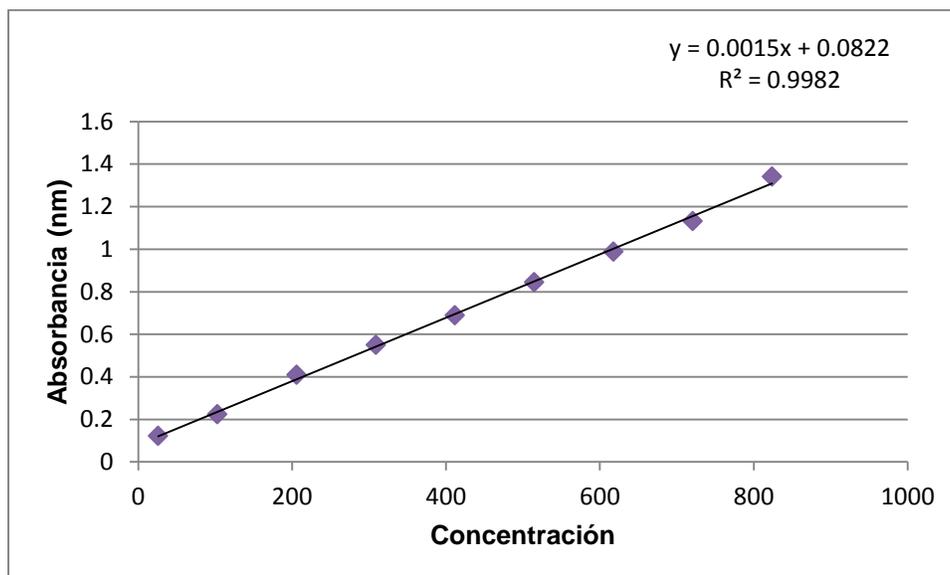
LSD 6.21 0.18 **1.10**

		1:10	1:15	1:20
		46.18	27.91	30.04
1:10	46.18	0	18.27	16.14
1:15	27.91	18.27	0	2.13
1:20	30.04	16.14	2.13	0

Todos son estadísticamente diferentes

ANEXO 8: Resultados de optimización y su posterior análisis de FRAP

a. Curva de calibración



W Trolox (g)	Peso Mol (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	Conc. (µmolTrolox/L)
0.0625	250.29	97	25	2.58	10297.33

Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Trolox (µmol/L)	Abs (nm)
0.025	10	25.74	0.122
0.1	10	102.97	0.224
0.2	10	205.95	0.409
0.3	10	308.92	0.551
0.4	10	411.89	0.69
0.5	10	514.87	0.845
0.6	10	617.84	0.988
0.7	10	720.81	1.132
0.8	10	823.79	1.341

b. Datos de optimización

N°	Variables (EtOH) 46°C	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	40%	0.567	10	90	1	4	5	323.20	14.54	14.41	0.19	1.32
		0.558	10	90	1	4	5	317.20	14.27			
2	40%	0.427	6.66	93.34	1	4	5	229.87	16.11	16.34	0.33	2.02
		0.437	6.66	93.34	1	4	5	236.53	16.58			
3	40%	0.609	5	95	2	3	5	351.20	16.68	16.79	0.16	0.93
		0.616	5	95	2	3	5	355.87	16.90			

c. Análisis de optimización

REP 1	REP 2	PROMEDIO	SD	CV
14.54	14.27	14.40	0.19	1.32
16.11	16.58	16.34	0.33	2.02
16.68	16.90	16.79	0.16	0.93

- ✓ Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	2	28.82	14.41	0.04
Fila 2	2	32.68	16.34	0.11
Fila 3	2	33.59	16.79	0.02
Columna 1	3	47.33	15.78	1.22
Columna 2	3	47.75	15.92	2.05

- ✓ Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	6.41	2	3.21	45.52	0.02	19
Columnas	0.03	1	0.03	0.41	0.59	18.51
Error	0.14	2	0.07			
Total	6.58	5				

LSD 6.21 0.22 **1.34**

		1:10	1:15	1:20
		14.41	16.34	16.79
1:10	14.41	0	1.93	2.38
1:15	16.34	1.93	0	0.45
1:20	16.79	2.38	0.45	0

Relación 1:20 no hay diferencia estadísticamente a relación 1:15
 Relación 1:10 es diferente estadísticamente a relación 1:15

ANEXO 9: Resultados de cinética y su posterior análisis de fenoles totales

Las condiciones que se escogió para trabajar fueron relación 1:7, 0% de etanol y temperatura 60°C

a. Datos de cinética

N°	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (mg/L)	Conc. (mgEAG/100g)	PM (mgEAG/100g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30min	0.426	14.28	85.72	1	4	5	99.60	298.93	299.40	3.60	1.20
		0.422	14.28	85.72	1	4	5	98.64	296.07			
		0.432	14.28	85.72	1	4	5	101.02	303.21			
2	1hora	0.387	14.28	85.72	1	4	5	90.31	271.06	268.20	2.86	1.07
		0.383	14.28	85.72	1	4	5	89.36	268.20			
		0.379	14.28	85.72	1	4	5	88.40	265.34			
3	1h:30 min	0.379	14.28	85.72	1	4	5	88.40	265.34	268.67	4.06	1.51
		0.382	14.28	85.72	1	4	5	89.12	267.48			
		0.390	14.28	85.72	1	4	5	91.02	273.20			
4	2 horas	0.383	14.28	85.72	1	4	5	89.36	268.20	267.96	3.94	1.47
		0.388	14.28	85.72	1	4	5	90.55	271.77			
		0.377	14.28	85.72	1	4	5	87.93	263.91			
5	2h:30 min	0.413	14.28	85.72	1	4	5	96.50	289.64	285.59	3.94	1.38
		0.402	14.28	85.72	1	4	5	93.88	281.77			
		0.407	14.28	85.72	1	4	5	95.07	285.35			
6	3 horas	0.434	14.28	85.72	1	4	5	101.50	304.64	302.50	2.14	0.71
		0.428	14.28	85.72	1	4	5	100.07	300.35			
		0.431	14.28	85.72	1	4	5	100.79	302.50			

b. Análisis de cinética

TIEMPO	REP1	REP2	REP3	PM	SD	CV
30min	298.93	296.07	303.21	299.40	3.60	1.20
1H	271.06	268.20	265.34	268.20	2.86	1.07
1H30	265.34	267.48	273.20	268.67	4.06	1.51
2H	268.20	271.77	263.91	267.96	3.94	1.47
2H30	289.64	281.77	285.35	285.59	3.94	1.38
3H	304.64	300.35	302.50	302.50	2.14	0.71

El mejor tiempo para la extracción de Fenoles Totales es 30 minutos

✓ Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	898.20	299.40	12.93
Fila 2	3	804.58	268.19	8.17
Fila 3	3	806.01	268.67	16.51
Fila 4	3	803.87	267.95	15.49
Fila 5	3	856.75	285.58	15.49
Fila 6	3	907.49	302.49	4.59
Columna 1	6	1697.79	282.96	287.95
Columna 2	6	1685.64	280.94	206.80
Columna 3	6	1693.50	282.25	312.67

✓ Análisis de 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	3903.44	5	780.68	58.37	4.4877E-07	3.32
Columnas	12.65	2	6.32	0.47	0.63	4.10
Error	133.74	10	13.37			
Total	4049.83	17				

LSD

2.27	2.58	5.85
------	------	-------------

		30min	1h	1h30	2h	2h30	3h
		299.40	268.19	268.67	267.95	285.58	302.49
30min	299.40	0	31.20	30.72	31.44	285.58	3.09
1h	268.19	31.20	0	0.4	0.23	17.38	34.30
1h30	268.67	30.72	0.47	0	0.71	16.91	33.82
2h	267.95	31.44	0.23	0.71	0	17.62	34.53
2h30	285.58	13.81	17.38	16.91	17.62	0	16.91
3h	302.49	3.09	34.30	33.82	34.53	16.91	0

30min es diferente estadísticamente a 1H, 1H30, 2H y 2H30
 30min no es diferente estadísticamente con 3H
 1H no es diferente estadísticamente con 1H30 y 2H
 1H es diferente estadísticamente a 2H30 y 3H
 1H30 es diferente estadísticamente con 2H30 y 3H
 1H30 no es diferente estadísticamente a 1H y 2H
 2H es diferente estadísticamente con 2H30 y 3H
 2H30 es diferente estadísticamente a 3H

ANEXO 10: Resultados de cinética y su posterior análisis de ABTS

Las condiciones que se escogió para trabajar fueron relación 1:7, 0% de etanol y temperatura 60°C

a. Datos de cinética

N°	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30min	0.666	14.28	85.72	1	14	15	277.50	24.99	25.31	0.28	1.12
		0.660	14.28	85.72	1	14	15	282.50	25.44			
		0.659	14.28	85.72	1	14	15	283.33	25.51			
2	1 hora	0.672	14.28	85.72	1	14	15	272.50	24.54	24.79	0.26	1.06
		0.669	14.28	85.72	1	14	15	275.00	24.76			
		0.665	14.28	85.72	1	14	15	278.33	25.06			
3	1h:30 min	0.663	14.28	85.72	1	14	15	280.00	25.21	25.86	0.82	3.18
		0.658	14.28	85.72	1	14	15	284.17	25.59			
		0.642	14.28	85.72	1	14	15	297.50	26.79			
4	2 horas	0.601	14.28	85.72	1	14	15	331.67	29.86	30.44	0.75	2.47
		0.597	14.28	85.72	1	14	15	335.00	30.16			
		0.582	14.28	85.72	1	14	15	347.50	31.29			
5	2h:30 min	0.625	14.28	85.72	1	14	15	311.67	28.06	28.29	0.88	3.13
		0.632	14.28	85.72	1	14	15	305.83	27.54			
		0.609	14.28	85.72	1	14	15	325.00	29.26			
6	3 horas	0.53	14.28	85.72	1	14	15	390.83	35.19	35.37	0.19	0.53
		0.525	14.28	85.72	1	14	15	395.00	35.57			
		0.528	14.28	85.72	1	14	15	392.50	35.34			

b. Análisis de cinética

TIEMPO	REP1	REP2	REP3	PM	SD	CV
30min	24.98	25.43	25.51	25.31	0.28	1.12
1H	24.53	24.76	25.06	24.78	0.26	1.06
1H30	25.21	25.58	26.78	25.86	0.82	3.18
2H	29.86	30.16	31.28	30.43	0.75	2.46
2H30	28.06	27.53	29.26	28.28	0.88	3.12
3H	35.19	35.56	35.34	35.36	0.18	0.53

El mejor tiempo de extracción fue 30 minutos

✓ Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	75.93	25.31	0.08
Fila 2	3	74.35	24.78	0.06
Fila 3	3	77.58	25.86	0.67
Fila 4	3	91.31	30.43	0.56
Fila 5	3	84.86	28.28	0.78
Fila 6	3	106.09	35.36	0.03
Columna 1	6	167.85	27.97	16.80
Columna 2	6	169.05	28.17	16.96
Columna 3	6	173.25	28.87	15.60

✓ Análisis de 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	245.15	5	49.03	281.92	2.0164E-10	3.32
Columnas	2.68	2	1.34	7.71	0.0094	4.10
Error	1.73	10	0.17			
Total	249.57	17				

LSD 2.63 0.34 **0.89**

		30min	1h	1h30	2h	2h30	3h
		25.31	24.78	25.86	30.43	28.28	35.36
30min	25.31	0	0.52	0.55	5.12	28.28	10.05
1h	24.78	0.52	0	1.07	5.65	3.50	10.57
1h30	25.86	0.55	1.07	0	4.57	2.42	9.50
2h	30.43	5.12	5.65	4.57	0	2.15	4.92
2h30	28.28	2.97	3.50	2.42	2.15	0	7.07
3h	35.36	10.05	10.57	9.50	4.92	7.07	0

30min no es diferente estadísticamente con 1H y 1H30
 30min es diferente estadísticamente a 2H, 2H30 y 3H
 1H es diferente estadísticamente a 2H, 2H30 y 3H
 1H30 es diferente estadísticamente a 2H, 2H30 y 3H
 2H es diferente estadísticamente a 2H30 y 3H
 2H30 es diferente estadísticamente a 3H

ANEXO 11: Resultados de cinética y su posterior análisis de FRAP

Las condiciones que se escogió para trabajar fueron relación 1:7, 0% de etanol y temperatura 60°C

a. Datos de cinética

N°	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30min	0.620	14.28	85.72	1	9	10	358.53	21.52	21.52	0.12	0.56
		0.617	14.28	85.72	1	9	10	356.53	21.40			
		0.623	14.28	85.72	1	9	10	360.53	21.64			
2	1hora	0.599	14.28	85.72	1	9	10	344.53	20.68	20.60	0.08	0.39
		0.595	14.28	85.72	1	9	10	341.87	20.52			
		0.597	14.28	85.72	1	9	10	343.20	20.60			
3	1h:30 min	0.544	14.28	85.72	1	9	10	307.87	18.48	18.51	0.08	0.45
		0.543	14.28	85.72	1	9	10	307.20	18.44			
		0.547	14.28	85.72	1	9	10	309.87	18.60			
4	2 horas	0.537	14.28	85.72	1	9	10	303.20	18.20	18.03	0.16	0.90
		0.529	14.28	85.72	1	9	10	297.87	17.88			
		0.532	14.28	85.72	1	9	10	299.87	18.00			
5	2h:30 min	0.529	14.28	85.72	1	9	10	297.87	17.88	17.96	0.08	0.45
		0.533	14.28	85.72	1	9	10	300.53	18.04			
		0.531	14.28	85.72	1	9	10	299.20	17.96			
6	3 horas	0.57	14.28	85.72	1	9	10	325.20	19.52	19.56	0.14	0.74
		0.568	14.28	85.72	1	9	10	323.87	19.44			
		0.575	14.28	85.72	1	9	10	328.53	19.72			

b. Análisis de cinética

TIEMPO	REP1	REP2	REP3	PM	SD	CV
30min	21.52	21.40	21.64	21.52	0.12	0.55
1H	20.68	20.52	20.60	20.60	0.08	0.38
1H30	18.48	18.44	18.60	18.50	0.08	0.45
2H	18.20	17.88	18.00	18.02	0.16	0.89
2H30	17.88	18.04	17.96	17.96	0.08	0.44
3H	19.52	19.44	19.72	19.56	0.14	0.73

El mejor tiempo para la extracción fue 30 minutos

✓ Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	64.56	21.52	0.01
Fila 2	3	61.80	20.60	0.0064
Fila 3	3	55.52	18.50	0.0069
Fila 4	3	54.08	18.02	0.02
Fila 5	3	53.88	17.96	0.0064
Fila 6	3	58.68	19.56	0.02
Columna 1	6	116.28	19.38	2.15
Columna 2	6	115.72	19.28	2.05
Columna 3	6	116.52	19.42	2.24

✓ Análisis de 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	32.15	5	6.43	606.43	4.4835E-12	3.32
Columnas	0.05	2	0.02	2.65	0.11	4.10
Error	0.10	10	0.01			
Total	32.31	17				

LSD 2.63 0.08 **0.22**

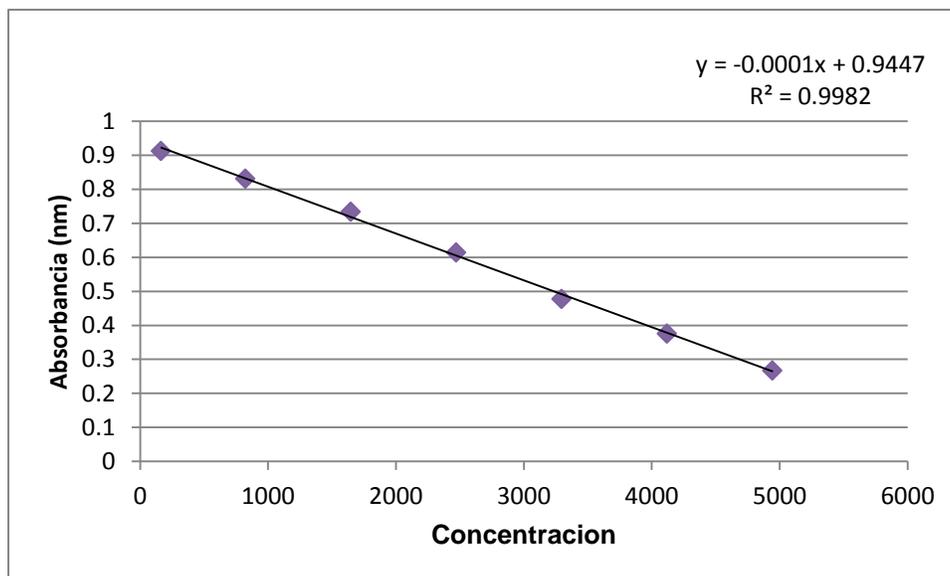
		30min	1h	1h30	2h	2h30	3h
		21.52	20.60	18.50	18.02	17.96	19.56
30min	21.52	0	0.92	3.01	3.49	17.96	1.96
1h	20.60	0.92	0	2.09	2.57	2.64	1.04
1h30	18.50	3.01	2.09	0	0.48	0.54	1.05
2h	18.02	3.49	2.57	0.48	0	0.06	1.53
2h30	17.96	3.56	2.64	0.54	0.06	0	1.60
3h	19.56	1.96	1.04	1.05	1.53	1.60	0

30min es diferente estadísticamente a 1H, 1H30, 2H, 2H30 y 3H
 1H es diferente estadísticamente a 1H30, 2H, 2H30 y 3H
 1H30 es diferente estadísticamente a 2H, 2H30 y 3H
 2H es diferente estadísticamente a 3H
 2H no es diferente estadísticamente con 2H30
 2H30 es diferente estadísticamente a 3H

ANEXO 12: Resultados de cinética y su posterior análisis de DPPH

Las condiciones que se escogió para trabajar fueron relación 1:7, 0% de etanol y temperatura 60°C

a. Curva de calibración



W Trolox (g)	Peso Mol(g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (mL)	Conc. Madre (g/L)	(µmol/L)
0.0625	250.29	97	25	2.58	10297.33

Alicuotas (mL)	Aforo (mL)	Trolox (µmol/L)	Abs (nm)
0.4	25	164.76	0.912
2	25	823.79	0.831
4	25	1647.57	0.734
6	25	2471.36	0.614
8	25	3295.15	0.478
10	25	4118.93	0.376
12	25	4942.72	0.267

b. Datos de cinética

N°	Variables	Abs (nm)	Muestra solvente		Factor de Dilución			Conc. (µmol/L)	Conc. (µmol ET/g)	PM (µmol ET/g)	DS	CV
			Muestra (g)	Solvente (mL)	Vol. Extracto (mL)	Vol. Solvente (mL)	Vol. Total (mL)					
1	30min	0.503	14.28	85.72	2	3	5	4417.00	66.29	64.99	1.35	2.08
		0.511	14.28	85.72	2	3	5	4337.00	65.09			
		0.521	14.28	85.72	2	3	5	4237.00	63.58			
2	1hora	0.560	14.28	85.72	2	3	5	3847.00	57.73	58.53	0.83	1.41
		0.549	14.28	85.72	2	3	5	3957.00	59.38			
		0.555	14.28	85.72	2	3	5	3897.00	58.48			
3	1h:30 min	0.602	14.28	85.72	2	3	5	3427.00	51.43	52.43	0.98	1.86
		0.589	14.28	85.72	2	3	5	3557.00	53.38			
		0.595	14.28	85.72	2	3	5	3497.00	52.48			
4	2 horas	0.634	14.28	85.72	2	3	5	3107.00	46.63	46.78	1.28	2.74
		0.624	14.28	85.72	2	3	5	3207.00	48.13			
		0.641	14.28	85.72	2	3	5	3037.00	45.58			
5	2h:30 min	0.64	14.28	85.72	2	3	5	3047.00	45.73	46.23	0.62	1.35
		0.632	14.28	85.72	2	3	5	3127.00	46.93			
		0.638	14.28	85.72	2	3	5	3067.00	46.03			
6	3 horas	0.597	14.28	85.72	2	3	5	3477.00	52.18	52.23	1.13	2.16
		0.604	14.28	85.72	2	3	5	3407.00	51.13			
		0.589	14.28	85.72	2	3	5	3557.00	53.38			

c. Análisis de cinética

TIEMPO	REP1	REP2	REP3	PM	SD	CV
30min	66.28	65.08	63.58	64.98	1.35	2.08
1H	57.73	59.38	58.48	58.53	0.82	1.41
1H30	51.42	53.37	52.47	52.42	0.97	1.86
2H	46.62	48.12	45.57	46.77	1.28	2.74
2H30	45.72	46.92	46.02	46.22	0.62	1.35
3H	52.17	51.12	53.37	52.22	1.12	2.15

El mejor tiempo de extracción fue de 30 minutos

✓ Análisis de 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	3	194.95	64.98	1.83
Fila 2	3	175.59	58.53	0.68
Fila 3	3	157.28	52.42	0.95
Fila 4	3	140.33	46.77	1.64
Fila 5	3	138.67	46.22	0.39
Fila 6	3	156.68	52.22	1.26
Columna 1	6	319.97	53.32	58.98
Columna 2	6	324.03	54.00	49.00
Columna 3	6	319.52	53.25	49.17

✓ Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	774.28	5	154.85	134.73	7.7096E-09	3.32
Columnas	2.04	2	1.02	0.89	0.44	4.10
Error	11.49	10	1.14			
Total	787.83	17				

LSD 2.63 0.88 **2.31**

		30min	1h	1h30	2h	2h30	3h
		64.98	58.53	52.42	46.77	46.22	52.22
30min	64.98	0	6.45	12.55	18.20	46.22	12.75
1h	58.53	6.45	0	6.10	11.75	12.30	6.30
1h30	52.42	12.55	6.10	0	5.65	6.20	0.20
2h	46.77	18.20	11.75	5.65	0	0.55	5.45
2h30	46.22	18.75	12.30	6.20	0.55	0	6.00
3h	52.22	12.75	6.30	0.20	5.45	6.00	0

30min es diferente estadísticamente a 1H, 1H30, 2H, 2H30 y 3H
 1H es diferente estadísticamente a 1H30, 2H, 2H30 y 3H
 1H30 es diferente estadísticamente a 2H y 2H30
 1H30 no es diferente estadísticamente a 3H
 2H es diferente estadísticamente a 3H
 2H no es diferente estadísticamente con 2H30
 2H30 es diferente estadísticamente a 3H

ANEXO 13: Ecuación de modelado de fenoles totales

Tomando como ejemplo se reemplazó los valores de las condiciones finales extracción del método ABTS en la ecuación de superficie de respuesta de fenoles totales.

Condiciones finales de ABTS:

- ✓ Solvente (-0.810815)
- ✓ Temperatura (-1)
- ✓ Relación muestra/solvente (-1)

Ecuación de modelado de Fenoles Totales

$$y = 144,567 - 47,9325 * \text{Solvente} + 15,6578 * \text{Temperatura} - 7,39406 * \text{Muestra/solvente} - 21,4955 * \text{Solvente}^2 - 0,4125 * \text{Solvente} * \text{Temperatura} + 1,75875 * \text{Solvente} * \text{Muestra/solvente} - 8,23365 * \text{Temperatura}^2 - 5,54062 * \text{temperatura} * \text{Muestra/solvente} - 17,3736 * \text{Muestra/solvente}^2$$

$$y = 144,567 - 47,9325 * (-0.810815) + 15,6578 * (-1) - 7,39406(-1) - 21,4955 * (-0.810815)^2 - 0,4125 * (-0.810815) * (-1) + 1,75875 * (-0.810815) * (-1) - 8,23365 * (-1)^2 - 5,54062 * (-1) * (-1) - 17,3736 * (-1)^2$$

$$y = 130.97974 \text{ mg EAG/100g}$$

Luego se saca el porcentaje del valor óptimo de fenoles totales con el valor del resultado anterior

$$181.947 - 130.979 = 51$$

$$\begin{array}{ccc} 181.947 \text{ mg EAG/100g} & & 100\% \\ & \times & \\ 51 \text{ mg EAG/100g} & & X \end{array}$$

$$X = 28.03 \%$$

Se presentan los valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de fenoles totales

Ecuación del modelado de fenoles totales					
Condiciones óptimas	Solvente	Temperatura	Muestra/solvente	Valor óptimo (mg EAG/100g)	Perdida en Porcentaje (%)
ABTS	-0.810815	-1	-1	130.98	28.01
DPPH	-0.298256	-0.255594	-0.166394	152.98	15.92
FRAP	-0.999682	0.320934	-1	168.86	7.18
Análisis	-1	-1	-1	132.93	26.93

ANEXO 14: Ecuación de modelado de los métodos ABTS, DPPH y FRAP

Tomando como ejemplo se reemplazó los valores de las condiciones finales extracción del método Fenoles Totales en la ecuación de superficie de respuesta de ABTS.

Condiciones finales de Fenoles Totales:

- ✓ Solvente (-1)
- ✓ Temperatura (1)
- ✓ Relación muestra/solvente (-0.422865)

Ecuación de modelado del método ABTS

$$y = 17,5836 - 7,96524 * \text{Solvente} - 3,95365 * \text{Temperatura} - 8,53226 * \text{Muestra:Solvente} - 4,70521 * \text{Solvente}^2 + 1,08231 * \text{Solvente} * \text{Temperatura} - 1,41779 * \text{Solvente} * \text{Muestra:Solvente} + 6,27623 * \text{Temperatura}^2 + 10,6915 * \text{Temperatura} * \text{Muestra:Solvente} + 6,53018 * \text{Muestra:Solvente}^2$$

$$y = 17,5836 - 7,96524 * (-1) - 3,95365 * (1) - 8,53226 * (-0.422865) - 4,70521 * (-1)^2 + 1,08231 * (-1) * (1) - 1,41779 * (-1) * (-0.422865) + 6,27623 * (1)^2 + 10,6915 * (1) * (-0.422865) + 6,53018 * (-0.422865)^2$$

$$y = 22.938 \text{ } \mu\text{mol ET/g}$$

Luego se saca el porcentaje del valor óptimo de ABTS con el valor del resultado anterior

$$56.550 - 22.938 = 33.72$$

$$\begin{array}{r} 56.660 \text{ } \mu\text{mol ET/g} \\ 33.72 \text{ } \mu\text{mol ET/g} \end{array} \quad \begin{array}{l} \diagup 100\% \\ \diagdown X \end{array}$$

$$X = 59.52\%$$

Se presentan los valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de ABTS

Ecuación del modelado de ABTS					
Condiciones óptimas	Solvente	Temperatura	Muestra/solvente	Valor óptimo ($\mu\text{mol ET/g}$)	Perdida en Porcentaje (%)
Fenoles Totales	-1	1	-0.422865	22.93	59.51
DPPH	-0.298256	-0.255594	-0.166394	23.02	59.35
FRAP	-0.999682	0.320934	-1	30.08	46.89
Análisis	-1	-1	-1	56.49	0.29

Se presentan los valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de DPPH

Ecuación del modelado de DPPH					
Condiciones óptimas	Solvente	Temperatura	Muestra/solvente	Valor óptimo (μmol ET/g)	Perdida en Porcentaje (%)
Fenoles Totales	-1	1	-0.422865	42.67	66.01
ABTS	-0.810815	-1	-1	102.61	18.28
FRAP	-0.999682	0.320934	-1	72.89	41.95
Análisis	-1	-1	-1	97.07	22.69

Se presentan los valores óptimos teóricos y la pérdida en porcentaje de FRAP

Ecuación del modelado de FRAP					
Condiciones óptimas	Solvente	Temperatura	Muestra/solvente	Valor óptimo (μmol ET/g)	Perdida en Porcentaje (%)
Fenoles Totales	-1	1	-0.422865	10.58	11.14
ABTS	-0.810815	-1	-1	9.67	18.76
DPPH	-0.298256	-0.255594	-0.166394	9.86	17.15
Análisis	-1	-1	-1	10.01	15.93