



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

---

**Tema: Extracción simultánea de polifenoles totales y flavonoides totales en hojas de *Fragaria spp.***

---

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. El estudio es parte de los proyectos de investigación financiados por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Técnica de Ambato:

**Proyecto de fresas** “Resistencia inducida en *Fragaria spp.* al ataque de *Tetranychus urticae koch* (Acari: *Tetranychidae*)” Facultad de Ciencias Agropecuarias. Resolución HCU 0480-CU-P-2018.

**Proyecto de Canje de Deuda Ecuador-España** “Fortalecimiento de la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos (UOITA) para la investigación tecnología e innovación en el área de alimentos, con el fin de promover la generación y el desarrollo de empresas agroindustriales en la Zona 3 del país; y monitorear el contenido de metales pesados en los cultivos afectados por las cenizas provenientes de las erupciones volcánicas del Tungurahua. (FITA-UOITA)” Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Resolución HCU 0939-CU-P-2016.

**Proyecto de polifenoles** “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usadas en el Ecuador. Resolución HCU 0206-CU-P-2018.

**Autora:** Magdalena Lizbeth Sailema Ortiz

**Tutor:** Ph.D Jorge Alexander Briceño Carrasquel

**Ambato – Ecuador**

**Julio – 2019**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

**Ph.D. Jorge Alexander Briceño Carrasquel**

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 22 de abril de 2019



Ph.D. Jorge Alexander Briceño Carrasquel

CI: 175840407-1

**Tutor**

## DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Magdalena Lizbeth Sailema Ortiz, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Magdalena Lizbeth Sailema Ortiz

C.I. 180440170-9

**Autora**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad a las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



---

Presidente del Tribunal



---

Ph.D Morales Acosta Dayana Cristina

C.I. 180413557-0



---

MSc. Molina Sánchez José Isaac

C.I. 180375230-0

Ambato, 30 de mayo de 2019

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Magdalena Lizbeth Sailema Ortiz', is written over a horizontal line.

Magdalena Lizbeth Sailema Ortiz

C.I. 180440170-9

**Autora**

## DEDICATORIA

A mis padres, Gloria y Juan, por su esfuerzo y por hacer de mí y de mis hermanas mejores personas, por inculcarnos valores y enseñanzas. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A mis hermanas: Ligia, Norma, Dora y Silvia, por ser las mejores amigas que la vida me regaló. Gracias por estar siempre pendientes de mí.

Mis padres y hermanas han sido un apoyo fundamental en mi formación profesional y personal, me brindaron confianza, consejos, la oportunidad y recursos para lograrlo. Gracias por estar siempre en los momentos más difíciles, entregándome su amor desinteresado y paciencia.

Los amo

**Maggy**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por la vida de mis padres, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que más me aman, gracias a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa quienes han creído en mí siempre, siendo un ejemplo de superación, sacrificio y humildad.

Al Doctor Jorge Briceño, por darme la oportunidad y la confianza desde el inicio para el desarrollo del proyecto, por su paciencia, dedicación y tiempo brindado, gracias por compartir su experiencia y conocimientos a lo largo de este tiempo.

A todos los maestros de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, en especial al Ingeniero Mario Álvarez e Ingeniera Mónica Silva, por sus consejos y ayuda. A mis calificadores Dra. Dayana Morales y MSc. Isaac Molina por su predisposición y colaboración durante este proceso.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus alegrías, tristezas y experiencias. En especial a mis amigas y amigos: Soledad, Viviana, Naty, David, Sebas y Ángel, quienes formaron parte de mi vida a lo largo de esta etapa; gracias por su amistad, ánimos y apoyo incondicional.

Gracias a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por ser parte de mi formación profesional y al Laboratorio de Canje de Deuda donde realicé la parte experimental de la investigación.

**¡GRACIAS A TODOS!**

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1.1    Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1    Componentes químicos de las plantas .....	1
1.1.2    Producción de metabolitos secundarios frente al estrés en las plantas ..	3
1.1.3    Fresa ( <i>Fragaria spp.</i> ) .....	4
1.1.4    Extractos vegetales .....	4
1.1.5    Extracción .....	4
1.1.6    Condiciones de operación en la extracción .....	5
1.1.7    Cuantificación de polifenoles y flavonoides por absorción molecular ..	6
1.2    OBJETIVOS .....	7
1.2.1    Objetivo General .....	7
1.2.2    Objetivos Específicos .....	7
1.3    Hipótesis .....	7
1.3.1    Hipótesis nula .....	7
1.3.2    Hipótesis alternativa .....	7
1.4    Señalamiento de variables de la hipótesis .....	7
1.4.1    Variable independiente .....	7
1.4.2    Variable dependiente .....	8
<b>CAPÍTULO II</b> .....	9
<b>METODOLOGÍA</b> .....	9
2.2 Equipos .....	9
2.3 Reactivos .....	10
2.4 Metodología .....	10
2.4.1    Materia prima .....	10
2.4.2    Reducción del tamaño de partícula .....	11
2.4.3    Métodos de extracción .....	11
2.4.4    Análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-VIS .....	13
<b>CAPÍTULO III</b> .....	15



<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
3.1 Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu .....	15
3.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio.....	15
3.3 Maceración .....	16
3.4 Agitación magnética.....	17
3.5 Agitación e incubación de microplacas.....	18
3.5.1 Polaridad del disolvente .....	18
3.5.2 Temperatura .....	20
3.5.3 Tiempo de extracción.....	20
3.6 Ultrasonido .....	22
3.6.1 Número de ciclos hasta agotar el material vegetal.....	23
3.7 Método propuesto: Extracción asistida por ultrasonido .....	24
3.7.1 Validación del método propuesto.....	26
3.8 Verificación de hipótesis .....	30
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	30
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	31
4.1 Conclusiones .....	31
4.2 Recomendaciones .....	32
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33
<b>ANEXOS</b> .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido de PFT y FnT aplicando diferentes metodologías de extracción. ....	17
<b>Tabla 2</b> Comparación de la concentración de polifenoles y flavonoides totales con el método final de extracción.....	26
<b>Tabla 3</b> Ensayo de recuperación de ácido gálico y quercetina.....	28
<b>Tabla 4</b> Contenido de polifenoles y flavonoides totales en variedades de fresa.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura básica y tipos de polifenoles (Lizárraga, Hernández, González y Basilio, 2018) .....	2
<b>Figura 2</b> Estructura básica y tipos de flavonoides. (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002). .....	3
<b>Figura 3</b> Muestras de <i>Fragaria</i> spp. liofilizadas .....	11
<b>Figura 4</b> Fotografía de la molienda (A) y tamizado (B) de las muestras de <i>Fragaria</i> spp. ....	11
<b>Figura 5</b> Curva de calibración con ácido gálico como estándar de referencia seguido a 760 nm. ....	15
<b>Figura 6</b> Curva de calibración con quercetina como estándar de referencia seguido a 510 nm. ....	16
<b>Figura 7</b> Efecto del disolvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles totales (A) y flavonoides totales (B) en los extractos. ....	19
<b>Figura 8</b> Influencia del tiempo de extracción a 50°C mediante un agitador/incubador microplacas. Contenido de polifenoles totales y flavonoides totales en hojas de fresa. ....	21
<b>Figura 9</b> Influencia del tiempo de extracción a 50°C mediante ultrasonido. Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los extractos de fresa. ....	22
<b>Figura 10</b> Efecto de los ciclos de extracción sobre los rendimientos de extracción de polifenoles totales (A) y flavonoides totales (B). ....	24
<b>Figura 11</b> Curva de adición de estándar de polifenoles totales a 760 nm (A) y flavonoides totales a 510 nm (B). ....	27
<b>Figura 12</b> Evaluación de la estabilidad de polifenoles y flavonoides totales en días de almacenamiento a 4°C. ....	29

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación I.</b> Cuantificación Polifenoles Totales, PFT. ....	13
<b>Ecuación II</b> Cuantificación Flavonoides Totales, FnT. ....	14
<b>Ecuación III</b> F calculado, $F_{cal}$ .....	37
<b>Ecuación IV</b> F tabulado, $F_{tab}$ .....	37
<b>Ecuación V</b> t calculado, $t_{cal}$ .....	38
<b>Ecuación VI</b> t tabulado, $t_{tab}$ .....	38

## RESUMEN

Los polifenoles y flavonoides totales (PFT y FnT) presentes en las plantas constituyen un grupo de metabolitos secundarios considerados antioxidantes naturales con múltiples beneficios biológicos para el ser humano. El objetivo del presente trabajo fue optimizar una metodología para la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales en hojas de fresa (*Fragaria spp.*). Se evaluaron: la cantidad de material vegetal, tipo de disolvente (metanol 100%, metanol:agua 75:25, etanol 100%, etanol:agua 75:25 y agua 100%), temperatura (40, 50 y 70°C), tiempo, número de ciclos y método de extracción. La combinación de estos parámetros resultó fundamental para alcanzar el objetivo propuesto. La cuantificación de PFT y FnT en los extractos se hizo por formación de especies coloreadas, empleando como patrones ácido gálico (GA) y quercetina (QT), usando el método de Folin Ciocalteu a 760 nm y cloruro de aluminio a 510 nm respectivamente. Los resultados obtenidos por agitación magnética, agitador/incubador de microplacas y ultrasonido fueron comparados en base a los alcanzados por maceración durante 96 horas con metanol 99,97% a temperatura ambiente donde se obtuvo el mayor rendimiento (60,0±0,4 mg GA/g hoja seca y 181,2±0,8 mg QT/g hoja seca). Así, fue desarrollada una metodología rápida con tres ciclos de 5 minutos, asistida con ultrasonido a 50°C, libre de efecto matriz y con una recuperación entre 101 (es este valor correcto) y 99%, con mínimo uso de reactivos (1 mL etanol:agua 75:25 y 0,1 g hoja seca), alcanzando una concentración para PFT de 62,7±0,5 mg GA/g hoja seca y para FnT de 187,4±0,2 mg QT/g hoja seca.

### Palabras clave

Etanol, *Fragaria spp.*, metanol, flavonoides totales, polifenoles totales, ultrasonido.

## ABSTRACT

The polyphenols and total flavonoids (PFT and FnT) present in the plants constitute a group of secondary metabolites considered natural antioxidants with multiple biological benefits for humans. The objective of the present work was to optimize a methodology for the simultaneous extraction of polyphenols and total flavonoids in strawberry leaves (*Fragaria* spp.). The amount of plant material, type of solvent (methanol 100%, methanol: water 75:25, ethanol 100%, ethanol: water 75:25 and water 100%), temperature (40, 50 and 70°C), time, number of cycles and extraction method were evaluated. The combination of these parameters was fundamental to reach the proposed objective. The quantification of PFT and FnT in the extracts was done by the formation of colored species using gallic acid (GA) and quercetin (QT) as standards, through the Folin Ciocalteu method at 760 nm and aluminum chloride at 510 nm respectively. The results obtained by magnetic stirring, microplate shaker/incubator and ultrasound were compared based on those achieved by maceration for 96 hours with 99,97% methanol at room temperature where the highest yield was obtained (60,0±0,4 mg GA/g dry leaf and 181,2± 0,8 mg QT/g dry leaf). Thus, a rapid methodology was developed with three cycles of 5 minutes, assisted with ultrasound at 50°C, free of matrix effect and with a recovery between 101 and 99%, with minimum use of reagents (1 mL ethanol: water 75:25 and 0,1 g dry leaf), reaching a concentration for PFT of 62,7±0,5 mg GA/g dry leaf and for FnT of 187,4±0,2 mg QT/g dry leaf.

### Keywords

Ethanol, *Fragaria* spp., methanol, total flavonoids total polyphenols, ultrasound.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Antecedentes investigativos

Se han propuesto distintas metodologías para llevar a cabo la extracción de polifenoles y flavonoides a partir de plantas, las cuales difieren en cuanto a variables de operación, tales como: temperatura, tipo de disolvente, tiempo de extracción y relación material vegetal-disolvente. La combinación más apropiada de estos parámetros es fundamental para lograr mejores resultados en el contenido de polifenoles y flavonoides totales (**Valdés, Cruz y Comet, 2015**).

Por otro lado **Pérez-Pérez et al. (2014)**, mencionan que el estado fenológico de una planta para obtener un mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales corresponde a las hojas jóvenes.

##### 1.1.1 Componentes químicos de las plantas

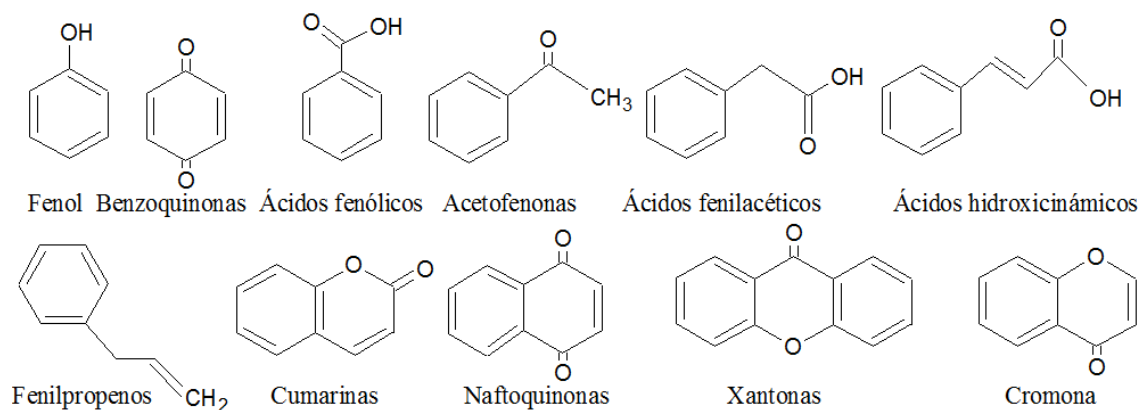
###### Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios tienen una distribución limitada en el reino de las plantas, ya que son compuestos químicos que no cumplen funciones esenciales en ellas, a diferencia de los metabolitos primarios, los cuales se encuentran en todo el reino vegetal. Los metabolitos secundarios se agrupan en: fenoles, terpenoides y compuestos nitrogenados o alcaloides (**Ávalos y Pérez, 2009**).

###### Compuestos fenólicos

Se caracterizan por tener un anillo aromático que posee al menos un radical hidroxilo (Figura 1). Además, son grupos químicamente heterogéneos formados por

alrededor de 10.000 compuestos y pueden ser solubles en agua, disolventes orgánicos o insolubles cuando forman polímeros de gran tamaño (Taiz y Zeiger, 2002).



**Figura 1** Estructura básica y tipos de polifenoles (Lizárraga, Hernández, González y Basilio, 2018)

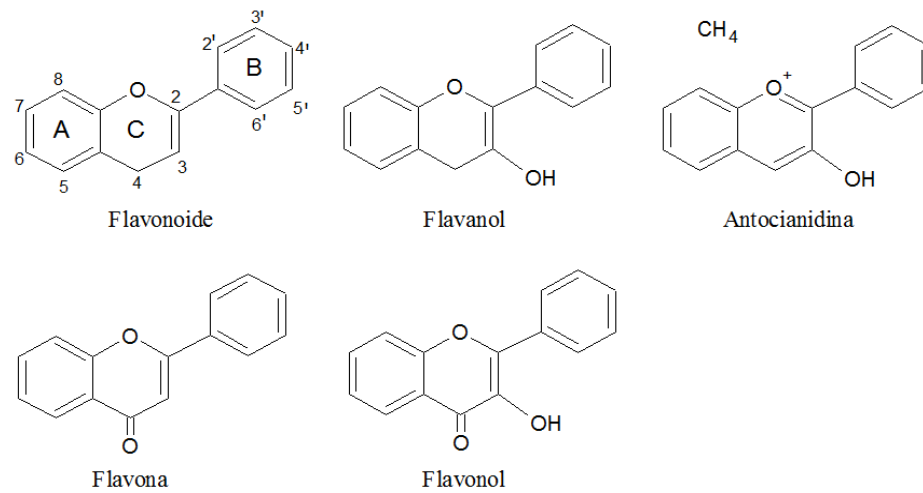
Existen dos grandes grupos de compuestos polifenólicos: ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y flavonoides (flavonoles, antocianos y taninos) (Martínez de Toda Fernandez, 2002).

Los polifenoles protegen a las plantas y al organismo humano contra los daños oxidativos. Estos son esenciales en la dieta humana debido a sus propiedades antioxidantes, las cuales previenen el daño tisular por radicales libres, ya sea evitando su formación, eliminándolos o promoviendo su descomposición (Peña-Cerda et al., 2017). Estos compuestos también tienen efectos antiinflamatorios porque bloquean las enzimas específicas que causan la inflamación en el organismo (Chasquibol et al., 2003). Finalmente, los polifenoles en las plantas sirven como defensa frente a herbívoros y patógenos, también funcionan como soporte mecánico atrayendo a polinizadores y dispersores de semillas (Taiz y Zeiger, 2002).

### Flavonoides

Son compuestos de bajo peso molecular formados por dos anillos de fenilo A y B, unidos por un anillo de pirano heterocíclico C (Figura 2), al que se le pueden adicionar grupos oxhidrilos, metilos, azúcares, entre otros, generando así: flavonoles,

flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002).



**Figura 2** Estructura básica y tipos de flavonoides. (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002).

Estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. En las plantas, los flavonoides son esenciales para su desarrollo y buen funcionamiento, protegiéndolas contra agentes agresores externos como: radiación UV, microorganismos y distintos animales herbívoros (Bedascarrasbure, Maldonado, Alvarez y Rodríguez, 2004).

### 1.1.2 Producción de metabolitos secundarios frente al estrés en las plantas

Las plantas han desarrollado distintos mecanismos de defensa que les permiten responder ante cualquier tipo de estrés presente en el entorno. Se distinguen dos tipos de estrés en las plantas: estrés abiótico, provocado por factores medio ambientales y estrés biótico, producido por la acción de agentes patogénicos, animales y otros vegetales (Ávalos y Pérez, 2009).

Las plantas producen metabolitos secundarios los cuales regulan la actividad metabólica en respuesta a las variaciones ambientales causadas por la época del año, daños ocasionados por plagas, etc??. En caso de lesiones, estrés o para protegerse del medio ambiente, los metabolitos secundarios aumentan la rigidez de la pared celular (Pérez-Pérez et al., 2014).

### 1.1.3 Fresa (*Fragaria spp.*)

La fresa es una planta herbácea vivaz de climas frescos, aunque también existen variedades adaptadas a zonas cálidas. Es una fruta no climatérica, altamente apreciada por los consumidores debido a sus excelentes propiedades organolépticas. Taxonómicamente se encuentra en la división *Magnoliophyta*, de la clase *Magnoliopsida*, de la familia *Rosaceae* y su género es *Fragaria* (**Beltrán, Ramos y Álvarez, 2010**).

La fresa contiene varios compuestos bioactivos, incluyendo una gran variedad de compuestos fenólicos: 41% antocianinas, 28% de flavan-3-oles, 14% de elagitaninos, 13% de ácidos cinámicos, 3% de flavonoides y 1% de ácido elágico (**Park et al., 2017**).

### 1.1.4 Extractos vegetales

Son soluciones de principios activos que se han extraído de una matriz (**Zapata, 2002**), para lo cual se emplea un disolvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro disolvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (**Santamaría, González y Astorga, 2015**).

### 1.1.5 Extracción

Es la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, mediante uno o varios disolventes, obteniéndose dos componentes: la disolución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo.

Entre las operaciones de extracción están:

- Extracción líquido-líquido
- Extracción líquido-sólido

#### **Extracción líquido-sólido**

Es una operación unitaria, la cual consiste en remover un compuesto de interés presente en una matriz sólida, utilizando un líquido como disolvente, que debe ser



capaz de disolver el soluto o parte de él. Dentro de la industria, la maceración, percolación y Soxhlet son los procedimientos de extracción básicos (Ullauri, 2010).

### **Maceración**

La maceración es un proceso fisicoquímico complejo durante el cual se extraen principalmente compuestos fenólicos, particularmente antocianos y taninos, entre otras sustancias (aromáticas, nitrogenadas, polisacáridos, etc.). Como producto de la maceración se obtiene el sólido ausente de esencias y el extracto de interés (Casassa *et al.*, 2006).

### **Agitación magnética**

Involucra un campo magnético giratorio para causar movimiento al agitar la solución dentro del recipiente de extracción. Aquí se sumerge una barra magnética recubierta de teflón en la solución de extracción. El movimiento de la barra de agitación es impulsado por un imán giratorio en el dispositivo del agitador que se encuentra debajo del recipiente de extracción (Sarkar & Ghosh, 2017).

### **Agitador/incubador de microplacas**

Ofrece un control exacto de la temperatura, alcanza un régimen de revoluciones de hasta 1500rpm, el diseño exclusivo del soporte térmico de microplacas asegura el calentamiento homogéneo. La temperatura siempre exacta aumenta la fiabilidad en los ensayos que requieren temperaturas elevadas (Medical Expo, 2019).

### **Ultrasonido**

Es una técnica basada en la conversión de la energía eléctrica a mecánica por medio de ondas sonoras pulsadas con una frecuencia de 40kHz, lo cual genera en la célula una compresión y descompresión rápida con oscilaciones inestables, produciendo perforaciones en la pared lo que permite la liberación y disposición de los metabolitos de interés (Bermúdez, Oliveira, Seliado y Arêdes, 2013).

#### **1.1.6 Condiciones de operación en la extracción**

##### **Tamaño de partícula**

Ejerce una influencia significativa en el rendimiento del proceso, debido a que un menor tamaño genera un mayor porcentaje de sólidos extraíbles, los cuales permiten una mayor recuperación de compuestos bioactivos (**Osorio y Meireles, 2013**).

### **Disolvente**

Debe ser capaz de solubilizar el analito y minimizar la co-extracción de otros componentes. Además, su alta polaridad debe permitirle (o le permite) romper la membrana celular, mejorando así el proceso de extracción (**Runnqvist et al., 2010**).

### **Temperatura**

Es el parámetro principal responsable de la aceleración del proceso de extracción, haciéndolo más eficiente. Las altas temperaturas disminuyen la viscosidad del disolvente, lo que ayuda a su penetración dentro de la matriz y en consecuencia la mejora del proceso de extracción de iones (**Santos, Veggi y Meireles, 2012**).

### **Tiempo**

La duración de la extracción es importante para mejorar la eficiencia y garantizar la extracción de la mayoría de los compuestos con alto rendimiento (**Zhu, Wang, Liu, Xia y Tang, 2010**). Los períodos de contacto prolongados entre la matriz y disolvente permiten una mayor penetración del disolvente en los nano y micro poros, obteniéndose una mayor solvatación de los compuestos (**Osorio & Meireles, 2013**).

#### **1.1.7 Cuantificación de polifenoles y flavonoides por absorción molecular**

Las reacciones colorimétricas son ampliamente utilizadas en el método espectrofotométrico UV/VIS, el cual es fácil de realizar, rápido, aplicable en el uso de laboratorio de rutina y de bajo costo (**Blainski, Lopes y De Mello, 2013**). La cuantificación de PFT en los extractos se realiza por la formación de un complejo coloreado azul empleando como patrones ácido gálico (GA), usando el método de Folin Ciocalteu, midiéndose a una longitud de onda de 760 nm. Para los FnT el complejo formado es de color anaranjado. Se emplean como patrones quercetina (QT) usando el método de Folin Ciocalteu a 760 nm y cloruro de aluminio y se mide a 510 nm.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

- Optimizar una metodología para la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales en hojas de fresa (*Fragaria spp.*).

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Seleccionar el disolvente más adecuado para la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales.
- Ajustar la relación óptima de materia vegetal-disolvente para la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales.
- Seleccionar la temperatura óptima para el proceso de extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales.

## **1.3 Hipótesis**

### **1.3.1 Hipótesis nula**

El método de extracción aplicado no influye en el contenido de metabolitos secundarios (polifenoles totales y flavonoides totales) extraídos de las hojas de *Fragaria spp.* estudiadas.

### **1.3.2 Hipótesis alternativa**

El método de extracción aplicado si influye en el contenido de metabolitos secundarios (polifenoles totales y flavonoides totales) extraídos de las hojas de *Fragaria spp.* estudiadas.

## **1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **1.4.1 Variable independiente**

- Materia prima (hojas de *Fragaria spp.*).
- Metodología de extracción.
- Metodología de cuantificación.

#### **1.4.2 Variable dependiente**

- Contenido de polifenoles totales
- Contenido de flavonoides totales

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1 Materiales**

- Balones de aforo de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL.
- Vasos de precipitación (100 y 250 mL).
- Frascos estériles plásticos de 100 mL.
- Magnetos, varilla de agitación, espátulas.
- Tamiz 250  $\mu\text{m}$  de acero inoxidable (STANDARD SIEVE SERIES, USA).
- Tubos de microcentrífuga de 2 mL (Eppendorf).
- Pipetas, micropipetas de volumen fijo y volumen variable.
- Probetas (10 y 100 mL).
- Recipiente de vidrio de 10 mL.
- Celda de cuarzo de espectrofotómetro.
- Mortero y pistilo de cerámica.
- Gradilla plástica para tubos Eppendorf.
- Película de parafina de plástico (parafilm).
- Guantes de látex.
- Rotuladores, esferos, lápiz.
- Toallas absorbentes, bolsas herméticas.
- Mascarilla.
- Cronómetro.
- Libreta para anotaciones.

#### **2.2 Equipos**

- Balanza analítica (METTLER TOLEDO XPE204, USA).
- Plancha de calentamiento con agitación magnética (IKA C-MGA HS7, USA).
- Microcentrífuga refrigerada (BUNSEN FINSEN-R 1800RPM 24088 XG, España).

- Sistema para obtención de agua Milli Q (Thermo Scientific, Inglaterra, UK).
- Espectrofotómetro UV-VISIBLE (Thermo Scientific Evolution 201, España).
- Vórtex (Labnet Vortex Mixer S0200, USA).
- Ultra Low Temperature Freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  (BINDER UF V 500, USA).
- Refrigeradora  $-4^{\circ}\text{C}$  (LG GS65SPP1, Ecuador).
- Estufa (BINDER ED 240L, Alemania).
- Baño ultrasonido (BRANSON 2800, México).
- Agitador/incubador microplacas (ESCO. ProvoCell™, Madrid).

### 2.3 Reactivos

- Cloruro de aluminio 99,0% (LOBA CHEMIE, Mumbai, India).
- Nitrito de sodio 98,0% (LOBA CHEMIE, Mumbai, India).
- Hidróxido de sodio 99,0% (MERCK EMSURE, Darmstadt, Alemania).
- Carbonato de sodio 99,5% (MERCK, Darmstadt, Alemania).
- Ácido gálico 97,5–102,5% (SIGMA-ALDRICH, China).
- Quercetina hidratada 95,0% (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA).
- Folin & Cicalteu 2N (SIGMA-ALDRICH, USA).
- Metanol (MERCK EMSURE, Darmstadt, Alemania).
- Alcohol etílico absoluto 99,85% (J.T. BAKER, USA).

### 2.4 Metodología

#### 2.4.1 Materia prima

Se usaron hojas de fresa (*Fragaria spp.*) cultivadas en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

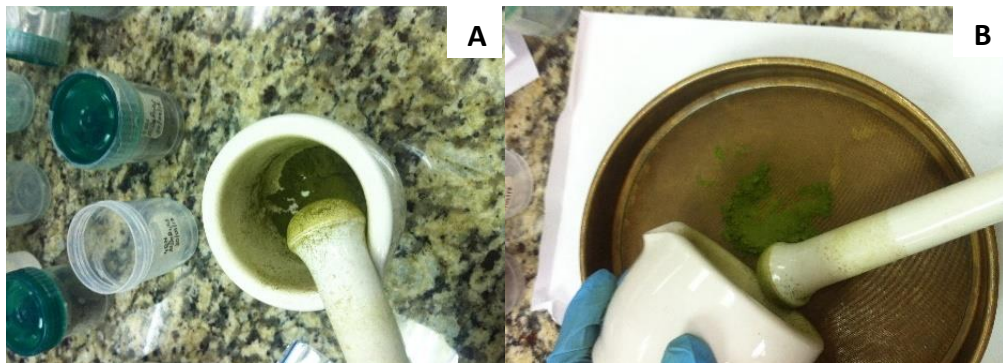
Las muestras se recolectaron en frascos estériles, los cuales fueron almacenados en el ultracongelador (BINDER) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras fueron liofilizadas (Figura 3). El estudio se realizó en tres variedades de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch): Albión, Monterrey y Festival.



**Figura 3** Muestras de *Fragaria spp.* liofilizadas

#### 2.4.2 Reducción del tamaño de partícula

Las hojas de fresa (*Fragaria spp.*) liofilizadas se trituraron a mano con un mortero de porcelana y se tamizaron empleando un tamiz de malla N°60 (Standard Sieve Series, USA), hasta obtener una muestra homogénea de polvo con un tamaño de partícula menor a 250  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Posteriormente se almacenaron en bolsas herméticas en un lugar seco para su posterior análisis.



**Figura 4** Fotografía de la molienda (A) y tamizado (B) de las muestras de *Fragaria spp.*

#### 2.4.3 Métodos de extracción

Se compararon cuatro métodos de extracción: maceración, agitación magnética, agitación mediante un agitador/incubador de microplacas y ultrasonido.

#### **2.4.3.1 Maceración**

En la literatura consultada, la extracción de polifenoles totales y flavonoides totales se realiza comúnmente con metanol como disolvente, es por ello que se procedieron a evaluar dos condiciones: metanol 100% y metanol:agua 75:25 v/v. En un frasco plástico estéril de 100 mL se añadieron 5 g de hojas de fresa seca y el disolvente evaluado en una proporción material vegetal/disolvente 1/10 en todos los casos y se dejó macerar por 24 y 96 horas, respectivamente. Posteriormente se procedió a centrifugar por 5 minutos a 420 rpm, se extrajo el sobrenadante y se evaporó el disolvente durante cuatro horas en una estufa a 40°C. Finalmente, los extractos se llevaron a un volumen de 25 mL usando agua Milli-Q, almacenándolos en frascos de 50 mL a 4°C hasta su análisis. Se realizaron tres réplicas de este experimento.

#### **2.4.3.2 Polaridad del disolvente**

La evaluación de este parámetro ocupó tres disolventes y sus mezclas: metanol 100%, metanol:agua 75:25, etanol 100%, etanol:agua 75:25 y agua 100%. En lo sucesivo cuando se mencione metanol 100% y etanol 100% se refiere a metanol 99,97% y etanol 99,85%.

#### **2.4.3.3 Extracción asistida**

Para acelerar el proceso de extracción fueron empleadas tres maneras distintas de extracción: agitación magnética (IKA C-MGA HS7, USA) a temperatura ambiente por 10 minutos, con un agitador/incubador de microplacas (Esco. ProvoCell™, Madrid) a 50°C por 10 minutos y con ultrasonido (Branson 2800, México) a 40 kHz a 50°C por 5 minutos.

#### **2.4.3.4 Procedimiento general de extracción**

Considerando la cantidad de material vegetal disponible se trabajó de forma general como sigue. En tubos de microcentrífuga de 2 mL se pesó 0,1 g de hoja seca y se agregó 1 mL del disolvente evaluado. A continuación, se aplicó la forma de



extracción a evaluar durante el tiempo estudiado. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 3869 rpm con una microcentrífuga (BUNSEN FINSEN, España). El sobrenadante obtenido se evaporó por 150 minutos a 40°C en una estufa (BINDER ED 240L, Alemania). Finalmente, el residuo obtenido se llevó a 5 mL con agua Milli-Q y se conservó a 4°C hasta su posterior análisis. Se realizaron tres réplicas de cada experimento.

#### 2.4.3.5 Agotamiento del material vegetal

Una vez establecidos los valores de las variables de operación: etanol:agua 75:25 asistido con ultrasonido a 50°C, se procedió a realizar extracciones sucesivas para estimar el número de extracciones necesarias hasta agotar el material vegetal.

#### 2.4.4 Análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-VIS

##### Cuantificación de polifenoles totales

Se utilizó el método de Folin Ciocalteu descrito por **Kong, Mat-Junit, Aminudin, Ismail y AbdμL-Aziz (2012)** con modificaciones. Para trazar la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar de referencia. Se mezcló 50 μL del extracto con 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 2 N. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min, se agregó 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,7 M y finalmente se aforó a 5 mL usando agua Milli-Q. Después de dos horas de reacción en la oscuridad, la absorbancia del color azul resultante se midió a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific- Evolution 201, España). El contenido de PFT se determinó por triplicado mediante la **Ec. I** comparando directamente la señal de las muestras frente a la de los patrones de ácido gálico (GA).

**Ecuación I.** Cuantificación Polifenoles Totales, PFT.

$$PFT = \frac{A_{760} - b_1}{m_1} \times \frac{FD}{g_H} \quad \text{Ec. I}$$

Donde:

*PFT*: Polifenoles totales expresados en mg GA/g de hoja seca,

$A_{760}$ : Absorbancia medida a 760 nm,

$m_1$  y  $b_1$ : Pendiente e intercepto de la recta de regresión del calibrado con GA.

*FD*: comprende el factor de dilución

*g<sub>H</sub>*: gramos de hoja seca empleada.

### **Cuantificación de flavonoides totales**

Se hizo mediante el método colorimétrico que emplea cloruro de aluminio y quercetina (QT) descrito por **Kong et al. (2012)** con modificaciones. Se mezcla 250 µL del extracto con 150 µL de NaNO<sub>2</sub> 5% y se incuba durante 6 minutos antes de adicionar 300 µL de AlCl<sub>3</sub> 10%. Después de 5 min, se añade a la mezcla 1 mL de NaOH 1 M y se afora a 5 mL con agua Milli-Q. El contenido de FnT se determina por triplicado mediante la **Ec. II** comparando directamente la señal de las muestras frente a la señal de los patrones de QT.

#### **Ecuación II** Cuantificación Flavonoides Totales, FnT.

$$FnT = \frac{A_{510} - b_2}{m_2} \times \frac{FD}{g_H} \quad \text{Ec. II}$$

Donde:

*FnT*: Flavonoides totales expresados en mg QT/g de hoja seca,

$A_{510}$ : Absorbancia medida a 510 nm,

$m_2$  y  $b_2$ : Pendiente e intercepto de la recta de regresión del calibrado con QT.

*FD*: comprende el factor de dilución

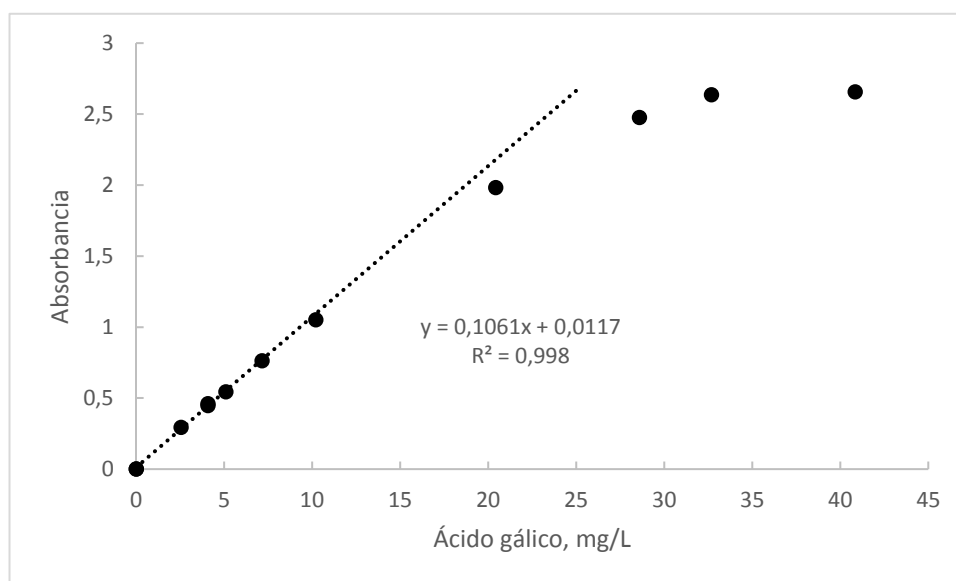
*g<sub>H</sub>*: gramos de hoja seca empleada.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se realizó una curva de calibración empleando como estándar ácido gálico. Para ello, se preparó una solución 1000 mg/L y a partir de los puntos del calibrado mediante diluciones apropiadas. Se encontró una linealidad de la absorbancia frente a la concentración de ácido gálico para concentraciones comprendidas entre 1-7 mg/L. En la Figura 5 se representa una curva de calibración típica. Con esta recta de regresión se cuantificó el contenido de PFT en las muestras y los resultados fueron expresados en mg de GA/g de hoja seca.

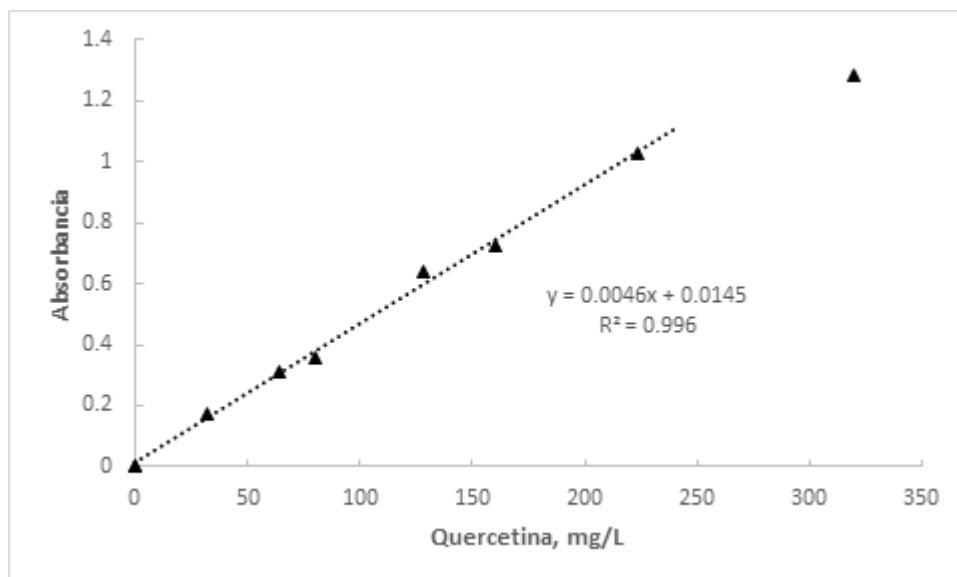


**Figura 5** Curva de calibración con ácido gálico como estándar de referencia seguido a 760 nm.

#### 3.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio

Se trazó una curva de calibración empleando como estándar quercetina. Para ello, se preparó una solución de 3200 mg/L y a partir de ahí los puntos del calibrado mediante diluciones apropiadas. Se encontró una linealidad de la absorbancia frente a la concentración de quercetina para concentraciones comprendidas entre 30-200 mg/L.

En la Figura 6 se representa una curva de calibración típica. La recta de regresión resultante se empleó para la determinación de FnT en las hojas de fresa y el contenido de FnT expresado como mg de QT/g de hoja seca.



**Figura 6** Curva de calibración con quercetina como estándar de referencia seguido a 510 nm.

### 3.3 Maceración

Se evaluaron dos niveles de la cantidad de materia vegetal manteniendo la proporción 1:10 (materia vegetal/volumen del extractante). Para la maceración por 96 horas se añadieron 5g/50mL de disolvente y 0,5g/5mL de disolvente para la maceración por 24 horas. Los disolventes empleados fueron: metanol 100% y metanol:agua 75:25. En la Tabla 1 se muestra el contenido de PFT y FnT de los extractos obtenidos aplicando distintos métodos de extracción. Se encontró que para la maceración por 96 horas en metanol 100% se alcanzó la mayor concentración de PFT ( $60,03 \pm 0,38$  mg GA/g hoja seca) y FnT ( $181,18 \pm 0,78$  mg QT/g hoja seca). Sin embargo, la maceración es un procedimiento poco práctico de emplear en laboratorios de rutina ya que: (a) implica largos períodos de tiempo (24 – 96 horas) y (b) emplea una gran cantidad de materia vegetal y disolvente. Debido a ello, se han utilizado otras metodologías de extracción que se ajusten a una jornada de trabajo, con lo cual se debe disminuir el tiempo de extracción y de análisis.

**Tabla 1.** Contenido de PFT y FnT aplicando diferentes metodologías de extracción.

<b>Método de extracción</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Polifenoles totales mg GA/g hoja seca</b>	<b>Flavonoides totales mg QT/g hoja seca</b>
<b>5 g/50 mL de disolvente</b>			
<b>Maceración 96 horas</b>	Metanol 100%	60,03 ± 0,38	181,18 ± 0,78
	Metanol:agua 75:25	56,02 ± 0,33	166,43 ± 0,26
<b>0,5 g/5 mL de disolvente</b>			
<b>Maceración 24 horas</b>	Metanol 100%	56,55 ± 0,30	175,83 ± 1,57
	Metanol:agua 75:25	46,83 ± 1,08	151,77 ± 3,25
<b>0,1 g/1 mL de disolvente</b>			
<b>Agitación magnética 10 min</b>	Metanol 100%	44,82 ± 0,79	101,14 ± 1,29
	Etanol 100%	20,38 ± 0,53	57,73 ± 1,28
	Agua 100%	30,31 ± 0,15	80,31 ± 0,30
	Metanol:agua 75:25	32,25 ± 0,65	85,48 ± 2,25
	Etanol:agua 75:25	33,93 ± 0,07	90,79 ± 0,58

Se reporta la media de tres réplicas y la incertidumbre se expresa como desviación estándar.

### 3.4 Agitación magnética

Todos los ensayos fueron realizados conservando la relación materia vegetal-disolvente 1:10 p/v. Con la finalidad de trabajar con menor cantidad de materia vegetal y ocasionar el menor daño posible a la planta cuando sea colectada la muestra, se seleccionaron 0,1 g de hoja seca en 1 mL de disolvente usando agitación magnética como método de extracción a temperatura ambiente (19°C). Aquí se evaluó la influencia de los disolventes indicados en el apartado 2.4.3.2.

Para metanol 100% y agitación magnética 10 minutos se alcanzó una mayor concentración PFT y FnT, mientras que el disolvente menos eficiente para la

extracción de estos metabolitos fue el etanol 100% (Tabla 1). Resultados similares fueron obtenidos por **Sarkar y Ghosh, (2017)**, quienes obtuvieron una concentración de polifenoles de 48,63 mg GA/g muestra seca para los extractos de las semillas de tamarindo obtenidas por agitación magnética.

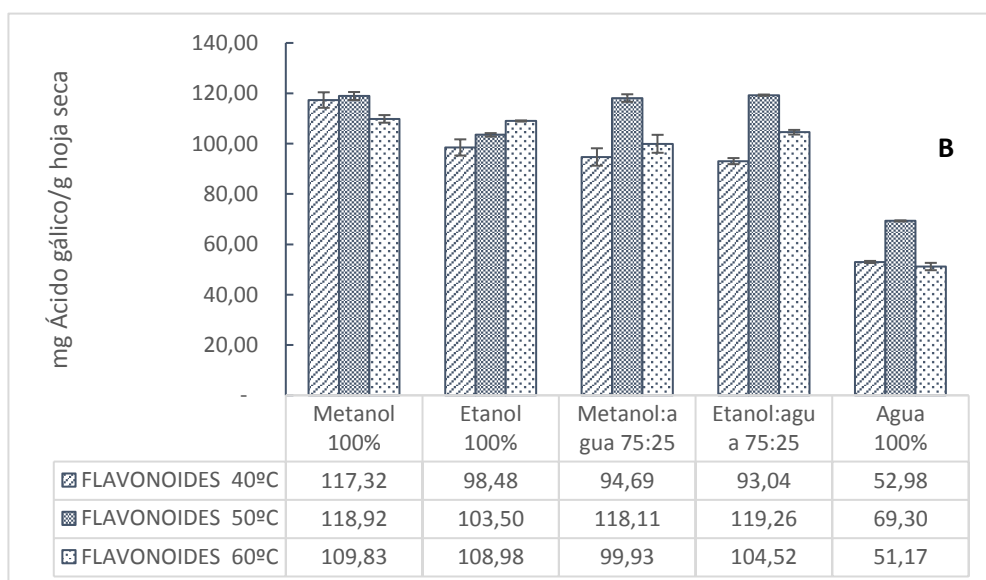
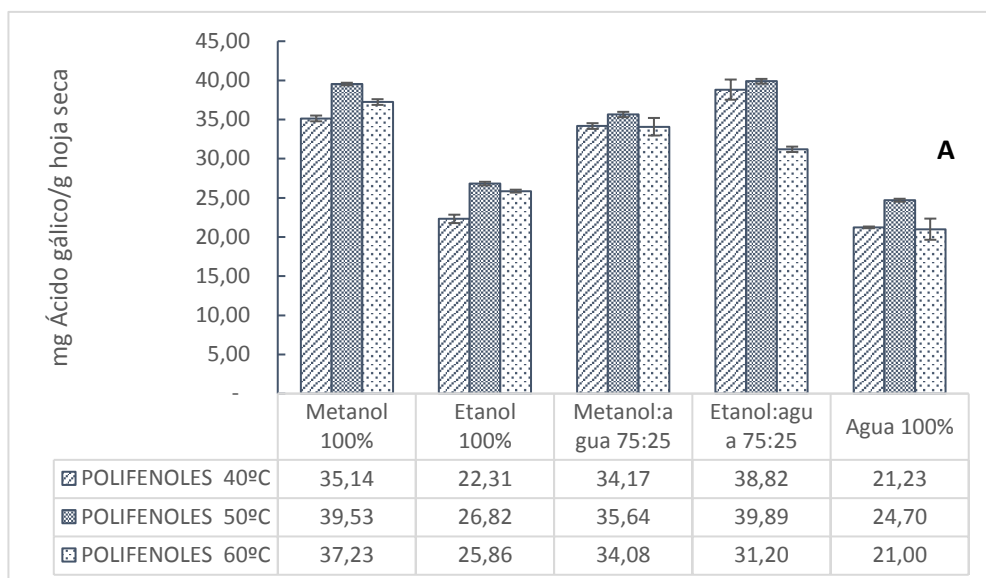
Sin embargo, el rendimiento con esta metodología solo alcanza un 75 % y 56 % de PFT y FnT respectivamente en comparación con los valores obtenidos por maceración. En ese sentido, se probaron otras estrategias de extracción con la finalidad de adecuar este método de extracción a un laboratorio de rutina.

### **3.5 Agitación e incubación de microplacas**

En vista de que el incremento de la temperatura mejora la eficiencia de extracción debido a que aumenta la velocidad de difusión y solubilidad de los analitos en el disolvente, se procedió a acelerar la extracción mediante un agitador/incubador microplacas. Con este método de extracción propuesto se evaluó: la polaridad del disolvente, temperatura y tiempo de extracción.

#### **3.5.1 Polaridad del disolvente**

La selección del disolvente adecuado es uno de los pasos importantes en el proceso de extracción ya que debe ser altamente selectivo, **Runnqvist et al. (2010)** menciona que el disolvente debe ser capaz de solubilizar el analito y minimizar la co-extracción de otros componentes de la matriz. Aquí se emplearon los disolventes descritos en el apartado 2.4.3.2. Por otra parte, se conoce que la temperatura es responsable de la aceleración del proceso de extracción (**Santos, Veggi y Meireles, 2012**), es por ello que las extracciones se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (40, 50 y 60°C). En la Figura 7 (A y B) se muestra el efecto del disolvente y la temperatura empleada sobre la extracción de PFT y FnT.



**Figura 7** Efecto del disolvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles totales (A) y flavonoides totales (B) en los extractos. Se reporta el promedio de tres réplicas y las barras de error expresan la desviación estándar.

De las condiciones empleadas en este apartado, se encontró que a 50°C los sistemas etanol:agua 75:25 y metanol 100%, mostraron mayor capacidad de extracción de PFT y FnT. Por otro lado, el disolvente que presentó menor capacidad de extracción fue el agua 100% a 60°C. Este comportamiento se puede explicar considerando que, en la extracción, el tipo de disolvente empleado determina el tipo de compuestos a extraer, la capacidad de extracción de los compuestos depende de la polaridad del disolvente, en este sentido al haber obtenido mayor concentración de PFT y FnT con

la mezcla etanol:agua 75:25 revela que existe una variedad de compuestos que son más solubles en esta mezcla que en los otros disolventes. Los resultados de este estudio coinciden con los reportados por **Diem et al (2013)** y **Muñoz et al (2015)**. Por otro lado, desde un punto de vista toxicológico el etanol y agua son más seguros que el metanol (**Huh, Hong y Hong, 2004**), por lo que se considera un disolvente ambientalmente amigable y relativamente seguro para la salud humana.

### **3.5.2 Temperatura**

El efecto de la temperatura en la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales fue investigado para 40, 50 y 60°C. Aquí se logró establecer la temperatura óptima de extracción la cual fue 50°C obteniendo una mayor concentración de PFT y FnT. Además, se demostró que el etanol y el agua, son ineficientes a bajas temperaturas pero pueden ser mucho más eficientes a elevadas temperaturas (**Yong y Howard, 2003**), mejorando así la eficiencia de extracción a mayor temperatura ya que aumenta la difusión y solubilidad de los analitos en el disolvente, sin embargo, a temperaturas <50°C no se logra extraer la máxima cantidad de compuestos y por otro lado se ha demostrado que a temperaturas >50°C causa la degradación de PFT y FnT como se puede observar en la Figura 7 donde se aprecia un descenso en la concentración de PFT y FnT a 60°C, lo cual concuerda con los trabajos de **Santos, Veggi y Meireles (2012)** y **Brglez, Knez, Škerget, Knez y Bren (2016)**.

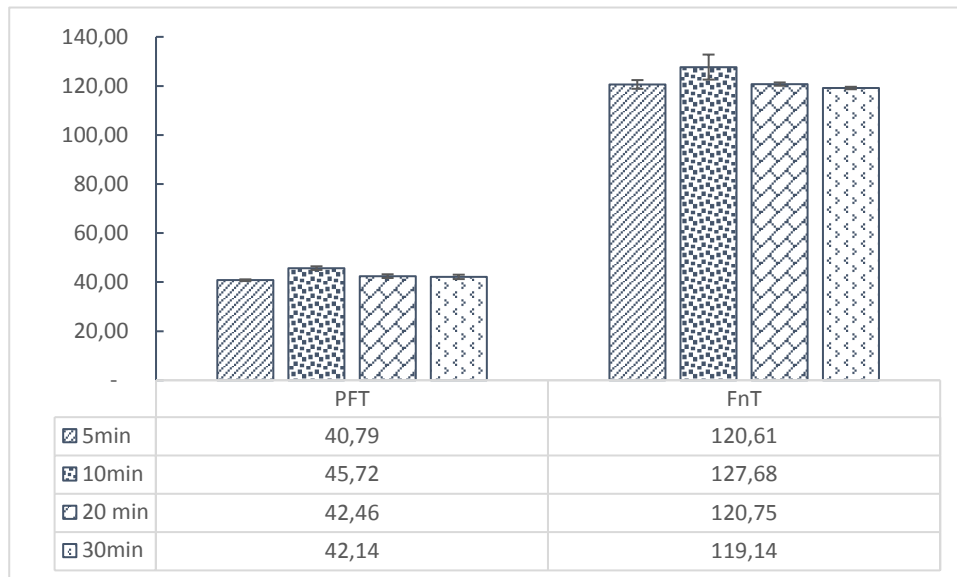
En resumen, el mejor rendimiento fue con etanol:agua 75:25 como disolvente y una temperatura de 50°C sin embargo, solo se alcanzó un 66% tanto para PFT como para FnT comparado con los valores obtenidos por maceración, por lo que se continuó la optimización modificando las otras variables.

### **3.5.3 Tiempo de extracción**

Se realizaron ensayos con 5, 10, 20 y 30 min para establecer el tiempo óptimo de extracción. Los resultados obtenidos de las concentraciones de PFT y FnT se muestran en la Figura 8. Se encontró el mejor rendimiento en el proceso de extracción durante 10 min alcanzando a extraer  $45,72 \pm 0,74$  mg GA/g hoja seca y  $127,68 \pm 5,10$  mg Quercetina/g hoja seca; a partir de ese tiempo el contenido de PFT y FnT tiende a



descender, probablemente debido a que estos compuestos comienzan a degradarse. Esto va en consonancia con otros estudios donde se demuestra que la combinación de altas temperaturas y largos tiempos de extracción pueden inducir a la degradación de los compuestos y la matriz (Brglez, Knez, Škerget, Knez y Bren, 2016).



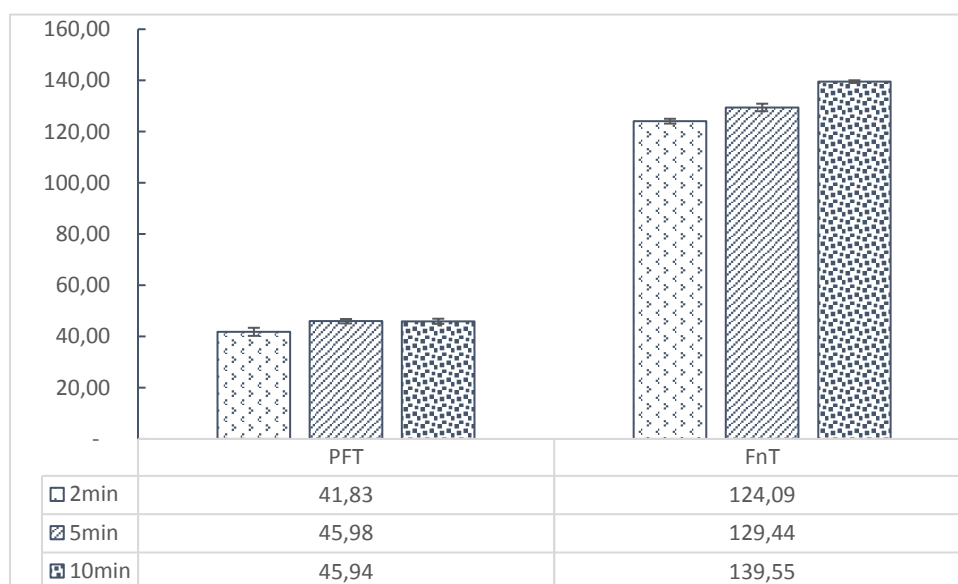
**Figura 8** Influencia del tiempo de extracción a 50 °C mediante un agitador/incubador microplacas. Contenido de polifenoles totales y flavonoides totales en hojas de fresa.

Se reporta el promedio de tres réplicas y las barras de error expresan la desviación estándar.

Hasta este punto ha resultado favorable la extracción por 10 minutos a 50°C y etanol:agua 75:25. Sin embargo se continuó la optimización de la extracción empleando ultrasonido puesto que el rendimiento obtenido solo alcanza un 76 % para PFT y 70% para FnT comparado con los valores obtenidos por maceración.

### 3.6 Ultrasonido

Manteniendo las otras variables ya optimizadas, es decir: 0,1 g de material vegetal, 1 mL de etanol:agua 75:25 y temperatura 50°C. Se evaluó la extracción asistida por ultrasonido para mejorar la eficiencia de la extracción. El tiempo considerado fue de 2, 5 y 10 minutos los resultados se muestran en la Figura 9, se consiguió que para 5 y 10 minutos no hubo diferencias significativas con un criterio de 95% de confianza. En este sentido, el tiempo de sonicación seleccionado fue de 5 minutos, para el que se obtuvo una concentración para PFT de  $45,98 \pm 0,86$  GA/g hoja seca y para FnT de  $129,44 \pm 1,47$  mg QT/g hoja seca.



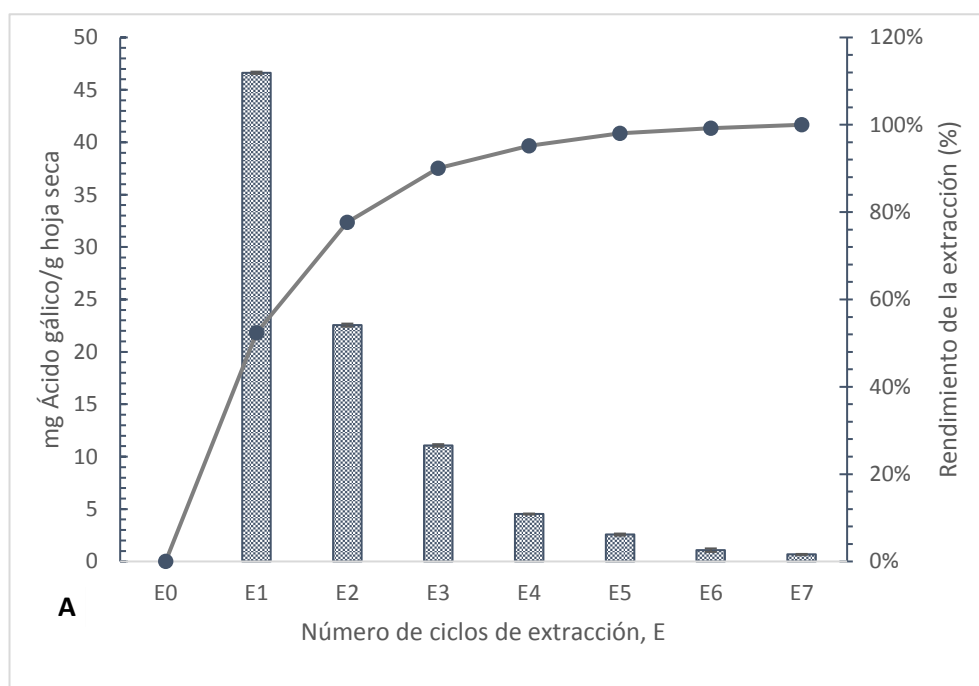
**Figura 9** Influencia del tiempo de extracción a 50°C mediante ultrasonido. Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los extractos de fresa. Se reporta el promedio de tres réplicas y las barras de error expresan la desviación estándar.

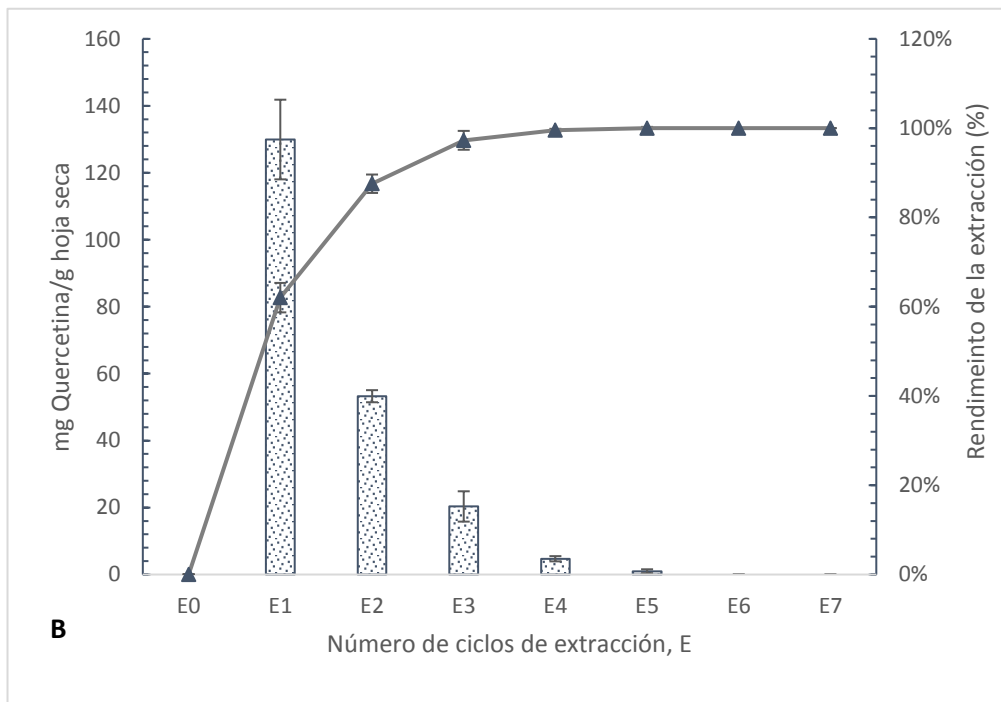
En las mejores condiciones hasta ahora se ha conseguido alcanzar un rendimiento del 77% para PFT y 71% para FnT respecto a las obtenidas con el proceso de maceración, por lo que se continuó la optimización realizando extracciones sucesivas hasta agotar el material vegetal.

### 3.6.1 Número de ciclos hasta agotar el material vegetal

Se procedió a determinar el número de ciclos de extracción el cual es un factor importante ya que existe una relación directamente proporcional es decir cuanto más ciclos existen, mayor será la eficiencia de la extracción, sin embargo el consumo del disolvente también será mayor (Ma *et al.*, 2014).

En la Figuras 10 (A y B), se muestra las concentraciones de PFT y FnT respectivamente manteniendo las condiciones obtenidas en el apartado 3.6. Los extractos se analizaron por separado encontrando que la mayor parte de la extracción para ambos metabolitos ocurre en el primer ciclo de extracción alcanzando una concentración de PFT de  $46,63 \pm 0,11$  mg GA/g hoja seca y  $129,93 \pm 11,89$  mg QT/g hoja seca para FnT. En los ciclos posteriores se extraen cantidades menores de ambos metabolitos como consecuencia del agotamiento del material vegetal hasta observar que para el cuarto ciclo lo extraído de estos metabolitos es mínimo en comparación con el primer ciclo. En ese sentido, para 3 ciclos de extracción se obtuvo un rendimiento de 97,27% para PFT y 90,08% para FnT.





**Figura 12** Efecto de los ciclos de extracción sobre los rendimientos de extracción de polifenoles totales (A) y flavonoides totales (B). Se reporta el promedio de tres réplicas y las barras de error expresan la desviación estándar.

Para ambos metabolitos se consideró mezclar el producto de 3 ciclos de extracción con el fin de obtener un solo extracto con un rendimiento  $\geq 90\%$ .

### 3.7 Método propuesto: Extracción asistida por ultrasonido

Teniendo en cuenta las condiciones de extracción anteriormente analizadas tales como: cantidad de material vegetal, consumo de disolvente, temperatura óptima, tiempo de extracción, número de ciclos y método de extracción, se estableció el método final para la extracción simultánea de PFT y FnT en hojas de secas de fresa el cual fue el asistido por ultrasonido con tres ciclos de extracción cada uno de 5 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  empleando una mezcla de etanol:agua 75:25 v/v.

Se propone realizar la extracción de la siguiente manera:

- a. Pesar 0,1 g del polvo fino de las hojas secas de fresa con tamaño de partícula menor a 250  $\mu\text{m}$  en un tubo de microcentrífuga de 2 mL,
- b. Agregar 1 mL de etanol:agua 75:25 v/v al tubo del paso “a”,
- c. Colocar en el baño de maría a 50°C y sonicar por 5 min,
- d. Centrifugar por 5 min a 3869 rpm,
- e. Recuperar el sobrenadante en un recipiente de vidrio de 10 mL,
- f. Repetir los pasos “b” al “d” dos veces más,
- g. Evaporar las tres fracciones colectadas en una estufa a 40°C por 150 minutos para eliminar el disolvente,
- h. Aforar a 5 mL con agua Milli-Q y almacenar en frascos de 10 mL en un refrigerador a 4°C hasta su posterior análisis.

Al comparar los resultados correspondientes a los cuatro métodos de extracción evaluados se consiguió que la extracción asistida por ultrasonido fue más eficiente ya se consigue extraer la mayor cantidad de metabolitos y a su vez se logró reducir la cantidad de materia vegetal, cantidad de disolvente y tiempo de extracción (Tabla 2), esto se debe a que la sonicación convierte la energía eléctrica a mecánica por medio de ondas sonoras pulsadas con frecuencia 40kHz, lo cual genera en la célula una compresión y descompresión rápida con oscilaciones inestables, produciendo perforaciones en la pared lo que permite la liberación y disposición de los metabolitos de interés (**Bermúdez, Oliveira, Seliado y Arêdes, 2013**).

En resumen, el rendimiento con esta metodología supera ligeramente los obtenidos con maceración en 104% para PFT y 103% para FnT.

Por otro lado, para comprobar la eficiencia del método propuesto se realizó el análisis del efecto matriz y el estudio de recuperación.

**Tabla 2** Comparación de la concentración de polifenoles y flavonoides totales con el método final de extracción.

Método de extracción	Disolvente	Tiempo	Temperatura	Número de ciclos	PFT (mg GA/g hoja seca)	FnT (mg QT/g hoja seca)
<b>Maceración</b>	Metanol 100%	96 horas	Ambiente	1	60,03 ± 0,38	181,18 ± 0,78
	Metanol:agua 75:25				56,02 ± 0,33	166,43 ± 0,26
	Metanol 100%	24 horas	Ambiente	1	56,55 ± 0,30	175,83 ± 1,57
	Metanol:agua 75:25				46,83 ± 1,08	151,77 ± 3,25
<b>Agitación magnética</b>	Etanol:agua 75:25	10 min	Ambiente	1	33,93 ± 0,07	90,79 ± 0,58
<b>Agitación con temperatura</b>	Etanol:agua 75:25	10 min	50°C	1	45,72 ± 0,74	127,68 ± 5,10
<b>Ultrasonido</b>	Etanol:agua 75:25	5 min	50°C	3	62,66 ± 0,55	187,45 ± 0,22

Se reporta la media de tres réplicas y la incertidumbre se expresa como desviación estándar.

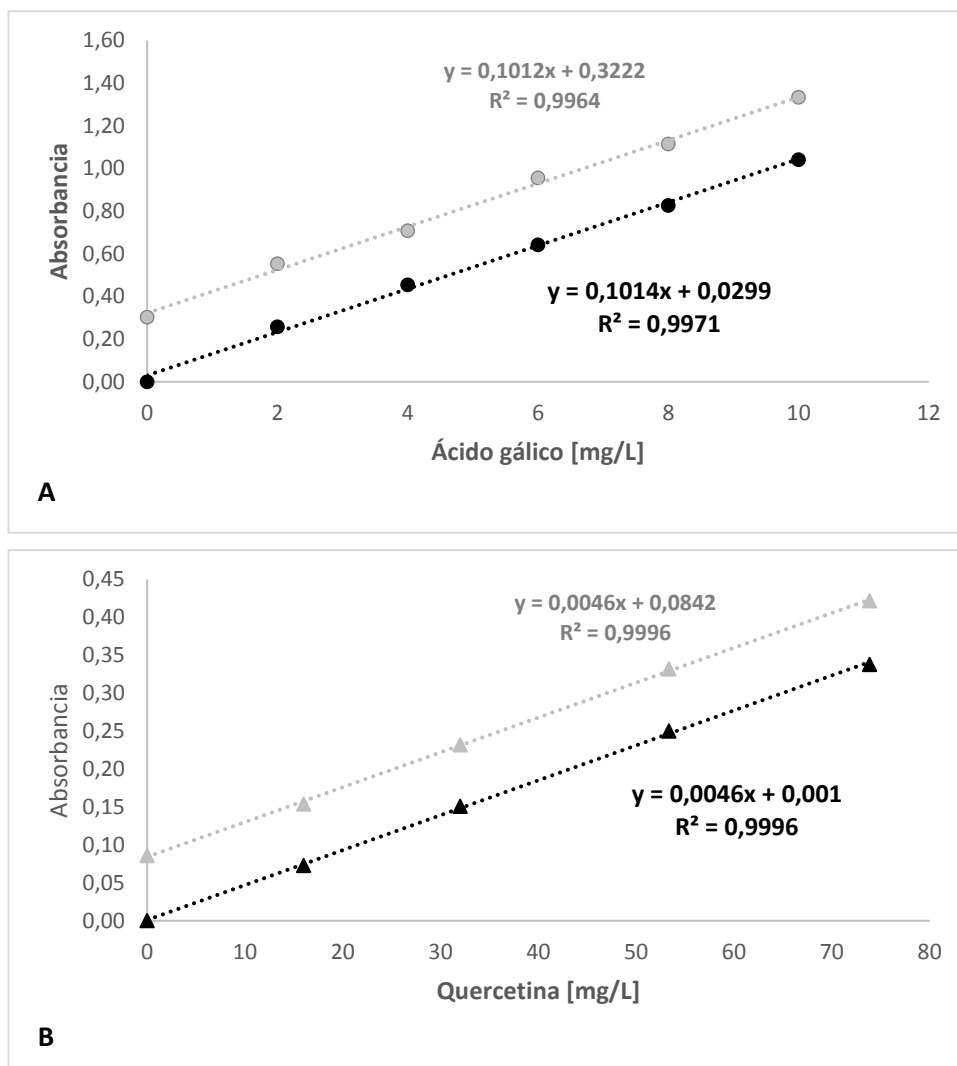
### 3.7.1 Validación del método propuesto

#### Efecto matriz

Con el fin de garantizar la eficiencia del método utilizado, se realizó una calibración por adición estándar, esto se realizó agregando volúmenes precisos de una solución conocida del patrón a la muestra para determinar la concentración de los analitos estudiados en presencia del resto de compuestos del material vegetal, los cuales pudieran interferir con su señal analítica.

Para la elaboración de la curva con adición estándar se añadió cantidades conocidas del extracto acumulado de los tres ciclos de extracción (10 µL para PFT y 30 µL para FnT) en un volumen de 5 mL, en la Figura 11 (A y B) se muestra que entre las pendientes no hay diferencias significativas lo que implica que no existe efecto

matriz esto se corroboró al realizar los ensayos estadísticos de F (Fisher) y t (T-Student) para un  $\alpha = 0,05$  (ANEXO I y II respectivamente).



**Figura 16** Curva de adición de estándar de polifenoles totales a 760 nm (A) y flavonoides totales a 510 nm (B).

Al realizar la comparación de las dos rectas de calibrado de PFT y FnT usando ácido gálico y quercetina respectivamente como estándares de referencia, se obtuvo para el ensayo F un valor de  $F_{cal} (1,004) < F_{tab} (9,605)$  para PFT y para FnT se obtuvo  $F_{cal} (1,005) < F_{tab} (39,00)$  confirmando que las varianzas de las pendientes son homogéneas.

Se concluye que las pendientes son estadísticamente comparables mediante el ensayo t para varianzas homogéneas donde se obtuvo para PFT un valor de  $t_{cal}$  ( $4,52 \times 10^{-04}$ )  $< t_{tab}$  (2,23) y para FnT un valor de  $t_{cal}$  ( $6,16 \times 10^{-05}$ )  $< t_{tab}$  (2,31), demostrando así que no hay diferencias significativas a un nivel de 95% de confianza.

### Estudio de recuperación

El estudio de recuperación para los PFT y FnT se realizó mediante la adición de 20 mg de GA y 50 mg de QT a 1 g de hoja seca (Anexo III), determinados por espectroscopia UV-visible después de la extracción empleando el método propuesto en el apartado 3.7. En la Tabla 3 se muestra los resultados de recuperación para GA y QT que fueron de  $101 \pm 4\%$  y  $99 \pm 1\%$  respectivamente, lo que significa valores aceptables para el ensayo puesto que se encuentran dentro de los criterios de aceptación de 98-102% (Rodríguez, Pellerano, Romero, Acevedo y Vásquez, 2012).

**Tabla 3** Ensayo de recuperación de ácido gálico y quercetina.

Patrón	Metabolitos	Inicial (mg)	Añadido (mg)	Recuperado (mg)	% Recuperado
Ácido gálico	PFT	$58,32 \pm 2,364$	20	$78,42 \pm 0,967$	$101 \pm 4\%$
Quercetina	FnT	$174,028 \pm 0,493$	50	$223,387 \pm 0,665$	$99 \pm 1\%$

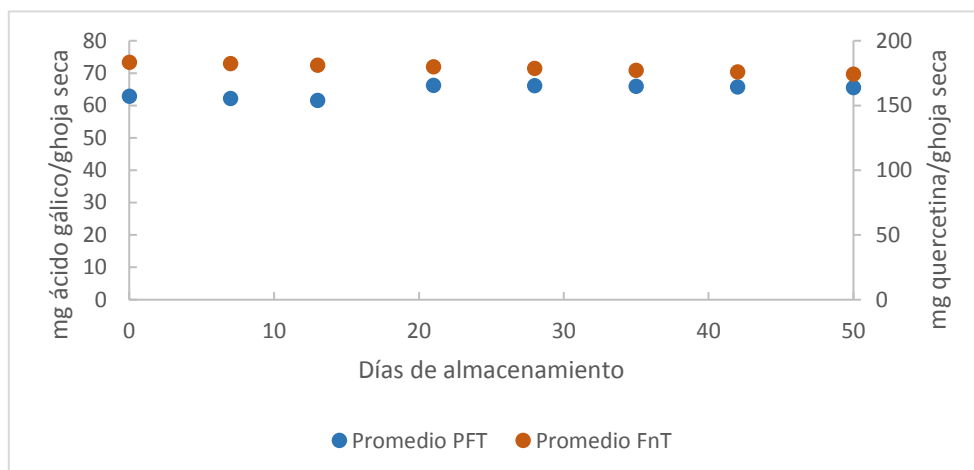
Se reporta la media de tres réplicas y la incertidumbre se expresa como desviación estándar.

Una vez realizado el estudio del efecto matriz y establecido el porcentaje de recuperación de PFT y FnT, se puede decir que el método propuesto es adecuado para determinar estos metabolitos en hojas de fresa.

### Estabilidad

Los extractos fueron almacenados en un refrigerador a 4°C, se siguió su estabilidad mediante la determinación del contenido de PFT y FnT durante 50 días. En la Figura 12 se muestra la evaluación de la estabilidad de los extractos en la cual se observa que para el día 13 existe un ligero descenso en la concentración para PFT y posteriormente se recupera con tendencia hacia los valores iniciales.





**Figura 18** Evaluación de la estabilidad de polifenoles y flavonoides totales en días de almacenamiento a 4°C.

### Empleo del método propuesto

Como etapa final, se procedió a cuantificar el contenido de PFT y FnT presentes de tres variedades de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch): Albión (ALD), Monterrey (MOND) y Festival (FESD).

De los resultados mostrados en la Tabla 4 se desprende que el mayor contenido de PFT y FnT corresponde a la muestra MOND con un contenido de  $43,85 \pm 0,12$  mg GA/g hoja seca y  $157,55 \pm 0,69$  mg QT/g hoja seca respectivamente. Mientras que el menor contenido se encontró en ALD con un contenido de PFT y FnT de  $26,62 \pm 0,14$  mg GA/g hoja seca y  $117,50 \pm 0,29$  mg QT/g hoja seca respectivamente.

**Tabla 4** Contenido de polifenoles y flavonoides totales en variedades de fresa

Variedad de fresa	mg Ácido gálico/g hoja seca	mg Quercetina/g hoja seca
ALD	$26,62 \pm 0,14$	$117,50 \pm 0,29$
FESD	$36,94 \pm 0,03$	$154,03 \pm 1,07$
MOND	$43,85 \pm 0,12$	$157,55 \pm 0,69$

Se reporta la media de tres réplicas y la incertidumbre se expresa como desviación estándar.

ALD: Albión, FESD: Festival, MOND: Monterrey (variedades de fresa)

### **3.8 Verificación de hipótesis**

Con base a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa mostrando que el método de extracción aplicado si influye en el contenido de metabolitos secundarios (polifenoles totales y flavonoides totales) extraídos de las hojas de *Fragaria spp.* estudiadas.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Fue posible la extracción simultánea de polifenoles y flavonoides totales en hojas de fresa (*Fragaria spp.*) con una metodología (a) rápida aplicando tres ciclos de 5 minutos a 50°C y etanol:agua 75:25 asistido con ultrasonido (b) mínima cantidad de muestra (c) libre de efecto matriz y (d) con una recuperación de ácido gálico y quercetina adecuada para los fines propuestos.
- Se seleccionó etanol:agua 75:25 como disolvente en base al rendimiento de la extracción de los polifenoles y flavonoides totales.
- Se ajustó a 0,1 g de hoja seca con la finalidad de trabajar con menor cantidad de materia vegetal y ocasionar el menor daño posible a la planta cuando sea colectada la muestra manteniendo la relación materia vegetal-disolvente a 1/10 p/v.
- La temperatura óptima para el proceso fue de 50°C logrando extraer la mayor cantidad polifenoles y flavonoides totales, evitando su degradación.
- Se redujeron el tiempo de extracción, número de ciclos y cantidad de reactivos. Los extractos así obtenidos fueron estables a 4°C por 50 días, siendo una metodología amigable con el medio ambiente con miras a ser empleadas en laboratorios de rutina.

## **4.2 Recomendaciones**

- Evaluar la estabilidad de los extractos en otras condiciones de almacenamiento.
- Realizar el perfil de polifenoles y flavonoides mediante HPLC para hacer la caracterización cualitativa y cuantitativa de los extractos y así poder explicar en detalle lo observado en la estabilidad de los extractos.
- Al trabajar con material vegetal evitar largos períodos de almacenamiento y temperaturas desfavorables que puedan degradar el contenido de polifenoles y flavonoides totales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. <https://doi.org/1989-3620>
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A., & Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del prooleos argentino. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23, 369–372.
- Beltrán, A., Ramos, M., & Alvarez, M. (2010). Estudio de la Vida Útil de Fresas (*Fragaria vesca*) Mediante Tratamiento con Radiación Ultravioleta de Onda Corta (UV-C). *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(2), 17–24.
- Bermúdez, J., Oliveira, M., Seliado, J., & Arêdes, M. (2013). Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *scenedesmus sp*. *Tumbaga*, 79, 65–79.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Brglez, E., Knez, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21, 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Casassa, F., Sari, S., Avagnin, S., Díaz, M., Jofre, V., Fanzone, M., & Catania, C. (2006). *Influencia de dos técnicas de maceración sobre la. Viticultura/Enología Profesional* (Vol. 109).
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., & Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química E Ingeniería Química*, 6(2), 9–20. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2009000800010>
- Diem, Q., Angkawijaya, E., Tran-Nguyen, P. L., Huong, L., Soetaredjo, F., Ismadji,

- S., & Ju, Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content , total flavonoids content , and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Huh, Y. S., Hong, T. H., & Hong, W. H. (2004). Effective Extraction of Oligomeric Proanthocyanidin (OPC) from Wild Grape Seeds. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(6), 471–475.
- Kong, K. W., Mat-Junit, S., Aminudin, N., Ismail, A., & Abdul-Aziz, A. (2012). Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chemistry*, 134(1), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.150>
- Ma, C., Yang, L., Li, W., Yue, J., Li, J., & Zu, Y. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction of Arabinogalactan and Dihydroquercetin Simultaneously from *Larix gmelinii* as a Pretreatment for Pulping and Papermaking. *PLOS ONE*, (August 2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114105>
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 6, 271–278.
- Martínez de Toda Fernandez, F. (2002). Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. *Revsita de Enologia*. Retrieved from [http://www.acenologia.com/ciencia59\\_1.htm](http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm)
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L. C., Rendón, M., Chaparro, M., & Otálvaro, Á. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46, 38–46. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>
- Osorio, F., & Meireles, A. (2013). Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. *Food and Public Health*, 3(6), 289–303. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20130306.05>
- Park, D., Park, Y., Lee, Y. H., Choi, I., Park, K. C., Park, S. U., ... Park, N. Il. (2017). A Comparative Study of Phenolic Antioxidant Activity and Flavonoid

Biosynthesis-Related Gene Expression Between Summer and Winter Strawberry Cultivars. *Food Science*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13600>

Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., ... Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry*, 215, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.159>

Pérez-Pérez, E., Ettiene, G., Marín, M., Casassa-Padron, A., Silva, N., Raga, J., ... Medina, D. (2014). Determination of total phenols and flavonoids in guava leaves (*Psidium guajava* L.) E. *Rev.peru.biol*, 31(1), 60–77.

Rodríguez, S., Pellerano, R., Romero, C., Acevedo, H., & Vásquez, F. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Tumbaga*, 7, 55–71.

Runnqvist, H., Bak, S. A., Hansen, M., Styrisshave, B., Halling, B., & Björklund, E. (2010). Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction — Are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography A*, 1217, 2447–2470. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.046>

Santamaría, C., González, A., & Astorga, F. (2015). Extractos vegetales reducción del estrés. In *nutriNews* (pp. 75–80).

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>

Sarkar, A., & Ghosh, U. (2017). Effect of extraction temperature and technique on phenolic compounds and antioxidant activity of *Tamarindus indica* seeds. *Research Journal of Recent Sciences*, 6(2), 10–15.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (Tercera Ed). Sunderland SinauerAssociates. Chapter 13.

- Ullaury, P. (2010). *Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido*. Ecuador: Recitela. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B5Ksb5i1nl4C&oi=fnd&pg=PA4&dq=extraccion+liquido+sólido&ots=VEprvEnniT&sig=V9lpvbBqcOi2DV6-oDKbBnE5\\_s8#v=onepage&q=extraccion+liquido+sólido&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B5Ksb5i1nl4C&oi=fnd&pg=PA4&dq=extraccion+liquido+sólido&ots=VEprvEnniT&sig=V9lpvbBqcOi2DV6-oDKbBnE5_s8#v=onepage&q=extraccion+liquido+sólido&f=false)
- Valdés, G., Cruz, L., & Comet, R. (2015). Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *CENIC. Ciencias Químicas ISSN*., 46, 135–145. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181643224032%0A>
- Yong, Z., & Howard, L. (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5207–5213.
- Zapata, P. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. Retrieved from [https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjmh7L7tsDSAhWINSYKHY8AdQQFghCMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.ub.edu%2Fcentredopatents%2Fpdf%2Fdoc\\_dilluns\\_CP%2Fpardo\\_patentesextractosplantas.pdf&usg=AFQjCNH2-53F3bUCtI](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjmh7L7tsDSAhWINSYKHY8AdQQFghCMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.ub.edu%2Fcentredopatents%2Fpdf%2Fdoc_dilluns_CP%2Fpardo_patentesextractosplantas.pdf&usg=AFQjCNH2-53F3bUCtI)
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3(2), 90–97. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9091-2>



## ANEXOS

### ANEXO I Ensayo F (Fisher).

En este apartado se muestra la ecuación que se utilizó para el cálculo del ensayo F (Fisher) para demostrar si las varianzas de las pendientes son homogéneas o no.

**Ecuación III** *F calculado,  $F_{cal}$*

$$F_{cal} = \frac{S_{b1}^2}{S_{b2}^2} \quad \text{Ec. III}$$

Donde:

$F_{cal}$ : F calculado

$S_{b1}^2$  y  $S_{b2}^2$ : Varianza de las pendientes

**Ecuación IV** *F tabulado,  $F_{tab}$*

$$F_{tab\ 95\%,v_1,v_2}$$

$$v_1 = n_1 - 2$$

$$v_2 = n_2 - 2$$

Donde:

$F_{tab}$ : F tabulado.

$v_1$  y  $v_2$ : Grados de libertad del numerador y denominador.

$n_1$  y  $n_2$ : Número de datos

## ANEXO II. Ensayo t (T-student)

En este apartado se muestra la ecuación que se utilizó para el cálculo del ensayo t para varianzas homogéneas y demostrar si las pendientes son estadísticamente similares o no.

**Ecuación V** *t* calculado,  $t_{cal}$

$$t_{cal} = \frac{[b_1 - b_2]}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}} \quad \text{Ec. V}$$

Donde:

$t_{cal}$ : F calculado

$S_{b_1}^2$  y  $S_{b_2}^2$ : Varianza de las pendientes

$b_1$  y  $b_2$ : Pendientes de las dos rectas

**Ecuación VI** *t* tabulado,  $t_{tab}$

$$t_{tab \ 95\%, n_1 + n_2 - 2 \ g.l} \quad \text{Ec. VI}$$

Donde:

$t_{tab}$ : t tabulado.

$n_1$  y  $n_2$  : Número de datos

$g.l$  : Grados de libertad

**ANEXO III.** Contenido de polifenoles y flavonoides totales recuperados

<b>Método de extracción</b>	<b>A. Gálico (mg)</b>	<b>Quercetina (mg)</b>	<b>Hojas de fresa (g)</b>	<b>Polifenoles totales 760nm</b>	<b>Flavonoides totales 510 nm</b>	<b>mg GA/g de hoja seca</b>	<b>mg QT/g hoja seca</b>
<b>Blanco</b>	---	---	0,1000	5,997	5,036	56,28	174,716
	---	---	0,1000	6,477	5,010	60,80	173,838
	---	---	0,1000	6,377	4,998	59,86	173,398
<b>A. gálico</b>	20,00	---	0,1000	8,397	5,008	78,90	173,736
	20,00	---	0,1000	8,327	5,015	78,24	173,984
	20,00	---	0,1000	8,367	5,029	78,61	174,497
<b>Quercetina</b>	---	50,00	0,1000	5,987	6,447	56,18	223,753
	---	50,00	0,1000	5,977	6,463	56,09	224,302
	---	50,00	0,1000	6,467	6,416	60,71	222,655
<b>A. gálico y quercetina</b>	20,00	50,00	0,1000	8,347	6,432	78,42	223,204
	20,00	50,00	0,1000	8,477	6,447	79,65	223,753
	20,00	50,00	0,1000	8,167	6,416	76,73	222,655