



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



---

Optimización del proceso de extracción de carotenoides obtenidos a partir de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L).

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Alex Giovanni Amancha Laura

**Tutor:** PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato - Ecuador

Enero - 2021

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Orestes Darío López Hernández

### **CERTIFICA**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 17 de diciembre de 2020

---

PhD. Orestes Darío López Hernández

C.C. 175478486-4

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Alex Giovanni Amancha Laura, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Alex Giovanni Amancha Laura

C.C. 180484459-3

**AUTOR**

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

Los suscritos Docentes Calificadores, aprueban el presente trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con 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

---

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

C.C. 180360185-3

---

MSc. Danae Fernández Rivero

C.C. 175718120-9

Ambato, 11 de enero de 2021

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación 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 Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, 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.



---

Alex Giovanni Amancha Laura

C.C. 180484459-3

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*“Bendito el hombre que confía en el SEÑOR  
y pone su confianza en Él”*

*Jeremías 17:7*

*El presente proyecto de investigación se lo dedico a mis padres, Giovanni Amancha e Isabel Laura. Ellos han sido la motivación más grande en mi vida, me han forjado como un hombre de bien, me han inculcado la fe en Dios y me han brindado su apoyo y amor incondicional. Sin importar los momentos de dificultad, hemos batallado para salir adelante, la vida no me alcanzará para pagarles todo lo que han realizado por mí.*

*A mi hermana Melanie, quien me ha brindado su cariño y comprensión, y a la cual amo con todo mi corazón.*

*A mis abuelitos, Augusto Laura y Luz Chato, ejemplo de humildad y esfuerzo, me han enseñado que lo más importante en la vida siempre será la familia, de ellos nunca me ha faltado amor, un plato de comida, apoyo y felicidad.*

*A la memoria de mi abuelita Carmen Guangasig, mi “Mamita Carmen”, que hoy brilla muy alto en el cielo, y sé que estará muy feliz de ver a su primer nieto profesional.*

*A mis primos Gustavo y Daniel, quienes me enseñaron que en la vida nunca hay que rendirse y que a pesar de los momentos más oscuros, jamás se debe perder la fe y la esperanza.*

## AGRADECIMIENTO

*“Si Dios me ha seguido amando a pesar de todos mis errores,  
es que no hay hombre que no merezca su amor”.*

*A Dios y Nuestra Santísima Virgen María, por permitirme alcanzar mis sueños, por darme la vida, la salud y una familia. En los momentos más difíciles de este largo caminar nunca me dejaron caer, y a pesar de todos mis errores y defectos, siempre me han brindado misericordia y consuelo.*

*Un agradecimiento a mi padre Giovanni, quien me forjó en carácter y esfuerzo; a mi madre Isabel quién siempre me ha inculcado el respeto, amor y solidaridad para con los demás. Ustedes me enseñaron lo que no se aprende en una Universidad, la mejor ciencia, y por ustedes hoy estoy en este lugar.*

*Además, agradezco al PhD. Orestes López por todo su apoyo, paciencia y conocimientos aportados para que el presente proyecto sea culminado con éxito.*

*Un agradecimiento a los docentes que formaron parte de mi vida académica, los cuales me forjaron en muchos aspectos que, sin duda, me servirán en mi vida personal y profesional.*

*Agradezco a mis amigos/as: Jhoni, Jefferson, Kevin, Jennifer, Jessica, Cristina, Alexandra y Jackeline, con los/as cuales he pasado momentos alegres y tristes. Supimos sobrellevar en las dificultades y hoy nos merecemos esta pequeña parte de la vida llamada Felicidad.*

*A todos quienes formaron parte de mi vida y aunque hoy no están a mi lado, agradezco por el cariño que siempre recibí de su parte, porque sin duda alguna, Dios siempre me acercó a personas maravillosas.*

# ÍNDICE GENERAL

## CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	15
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>17</b>
<b>EL PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
1.1. Tema de investigación .....	17
1.2. Justificación .....	17
1.3. Objetivos .....	19
1.3.1. Objetivo general.....	19
1.3.2. Objetivos específicos .....	19
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>20</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1. Antecedentes investigativos.....	20
2.1.1. Mastuerzo ( <i>Tropaeolum majus</i> L).....	20
2.1.1.1. Hábitat y descripción geográfica.....	20
2.1.1.2. Descripción botánica.....	20
2.1.1.3. Taxonomía .....	22
2.1.1.4. Compuestos bioactivos de <i>Tropaeolum majus</i> L. ....	22
2.1.2. Carotenoides: Estructura y características .....	23
2.1.2.1. Factores que influyen en la estabilidad de los carotenoides.....	24
2.1.3. Función de los antioxidantes frente al estrés oxidativo.....	25
2.1.3.1. Estrés oxidativo.....	25
2.1.3.2. Mecanismo de acción de los antioxidantes .....	27
2.1.4. Extracción de componentes bioactivos .....	27
2.1.5. Espectrofotometría UV-Visible: Ley de Lambert-Beer .....	28
2.1.6. Diseño de experimentos: Metodología de superficie de respuesta (MSR) .....	29



2.1.6.1.	Diseño 3 <sup>n</sup> para ajustar la superficie de respuesta .....	30
2.1.6.2.	Gráficas de superficie de respuesta .....	31
2.2.	Hipótesis .....	32
2.2.1.	Hipótesis nula.....	32
2.2.2.	Hipótesis alternativa.....	32
2.3.	Variables de la hipótesis .....	32
2.3.1.	Variables dependientes .....	32
2.3.2.	Variables independientes .....	32
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>33</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>		<b>33</b>
3.1.	Recursos Materiales .....	33
3.1.1.	Materiales de laboratorio .....	33
3.1.2.	Equipos .....	33
3.1.3.	Reactivos.....	33
3.2.	Métodos.....	34
3.2.1.	Recolección del material vegetal .....	34
3.2.2.	Tratamiento del material vegetal.....	34
3.2.3.	Obtención de los extractos de carotenoides .....	34
3.2.4.	Análisis de los extractos.....	35
3.2.5.	Análisis del contenido de carotenoides totales.....	36
3.2.6.	Análisis estadístico para optimizar el contenido de carotenoides .....	37
3.2.7.	Análisis estadístico para evaluar la eficiencia de extracción .....	40
3.2.9.	Obtención del extracto concentrado de carotenoides .....	41
<b>CAPÍTULO IV .....</b>		<b>42</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>42</b>
4.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	42
4.1.1.	Obtención de los extractos de carotenoides .....	42
4.1.2.	Análisis estadístico aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta.....	46
4.1.3.	Análisis de la eficiencia de extracción .....	51

4.1.4. Obtención del extracto concentrado de carotenoides .....	58
4.2. Verificación de hipótesis.....	59
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>60</b>
5.1. Conclusiones .....	60
5.2. Recomendaciones .....	61
<b>Bibliografía .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del mastuerzo .....	22
Tabla 2. Contenido de carotenos totales presentes en la flor de mastuerzo .....	37
Tabla 3. Diseño experimental $3^2$ .....	38
Tabla 4. Niveles codificados para un diseño de superficie de respuesta $3^2$ .....	39
Tabla 5. Contenido de carotenos totales de la flor anaranjada de mastuerzo presentes en los extractos líquidos .....	43
Tabla 6. Análisis de varianza para la extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo ....	46
Tabla 7. Valores de respuesta óptima .....	48
Tabla 8. Eficiencia de extracción para el Factor A .....	51
Tabla 9. Eficiencia de extracción para el Factor B .....	52
Tabla 10. Análisis de varianza para la eficiencia de extracción de carotenoides.....	53
Tabla 11. Deseabilidad individual y global de las respuestas óptimas .....	57
Figura 16. Gráfico de deseabilidad para la extracción de carotenoides la flor de mastuerzo	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la flor anaranjada del mastuerzo ( <i>Tropaeolum majus</i> L) .....	21
Figura 2. Pétalos de flores de mastuerzo ( <i>Tropaeolum majus</i> L) en sus tres variedades: a) Flor anaranjada b) Flor amarilla c) Flor roja.....	21
Figura 3. Estructura de carotenos: a) licopeno y xantofilas: b) luteína.....	23
Figura 4. Grupos terminales (anillos cíclicos y acíclicos) de los carotenoides.....	24
Figura 5. Mejor tratamiento y punto óptimo de operación .....	30
Figura 6. Gráficas de superficie de respuesta: a) plana b) montaña c) valle d) silla. ....	31
Figura 7. Diagrama de barras con error estándar correspondiente a la concentración de carotenoides. ....	44
Figura 8. Intervalos de confianza de 95% de Tukey para comparaciones múltiples .....	45
Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que influyen en la extracción de carotenoides. ....	47
Figura 10. Gráfica de superficie de respuesta estimada de los factores que influyen en la extracción del contenido de carotenoides .....	49
Figura 11. Gráfico de prueba de múltiples rangos de Tukey para el Factor A. <i>Leyenda. % E.E:</i> .....	52
Figura 12. Gráfico de prueba de múltiples rangos de Tukey .....	53
Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que influyen en la eficiencia de extracción de carotenoides.....	54
Figura 14. Gráfico de efectos principales que influyen en la eficiencia de extracción.....	55
Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta de la eficiencia de extracción. ....	55
Figura 16. Gráfico de deseabilidad para la extracción de carotenoides la flor de mastuerzo	57

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de Sólidos Totales.....	35
Ecuación 2. Determinación de la concentración de carotenoides .....	35
Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos .....	35

Ecuación 4. Masa de carotenoides en cien gramos de sólidos extraídos .....	36
Ecuación 5. Porcentaje de eficiencia de extracción .....	36
Ecuación 6. Determinación de la concentración de carotenoides .....	49

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 1. Resumen del ensayo experimental .....	70
Anexo 2. Datos experimentales obtenidos para el análisis de los extractos .....	70
Anexo 3. Cálculos y análisis de los extractos .....	72
Anexo 4. Desarrollo del análisis estadístico en Statgraphics Centurion XVI.II .....	73
Anexo 5. Tabla de escalas de deseabilidad .....	77

## RESUMEN

La presente investigación se fundamentó en la optimización de los parámetros operacionales que influyen en la extracción de carotenoides de la flor anaranjada del mastuerzo (*Tropaeolum majus* L) a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR). Considerando que estos metabolitos son pigmentos orgánicos liposolubles, se llevó a efecto una extracción sólido-líquido con etanol al 96%, mediante el estudio de dos factores: la relación materia vegetal: volumen de disolvente (1:20, 1:45, 1:70) y el tiempo de extracción (30, 60, 90 minutos). Posteriormente, se cuantificó el contenido de carotenoides por espectrofotometría UV-Visible, determinando que el mejor tratamiento corresponde a 70 partes de volumen de etanol en un tiempo de 90 minutos, registrando un valor de 929,44 mg por cada 100 g de base seca, mientras que el valor más bajo de 487,05 mg por cada 100 g se obtuvo con 20 partes de disolvente en un tiempo de 30 minutos. Subsecuentemente, se aplicó la MSR, mediante el cual se optimizaron los niveles de cada uno de los factores, determinado que el punto óptimo corresponde a 70 partes de volumen de etanol en un tiempo de 90 minutos, alcanzando una concentración máxima de 940,92 mg de carotenoides por cada 100 g, con una eficiencia de extracción de 0,18 por ciento y una deseabilidad de 0,97. Finalmente, se desarrolló una destilación al vacío, obteniendo el extracto concentrado de carotenoides con una humedad de 80,59 por ciento, mismo que fue almacenado a 4 grados Celsius para su conservación, ya que posee potencial antioxidante.

**Palabras clave:** Carotenoides, pigmentos liposolubles, compuestos bioactivos, mastuerzo.

## ABSTRACT

The present investigation was based on the optimization of the operational parameters that influence the extraction of carotenoids from the orange flower of the mastuerzo (*Tropaeolum majus L*) through the response surface methodology (MSR). Considering that these metabolites are fat-soluble organic pigments, a solid-liquid extraction with 96% ethanol was carried out, by studying two factors: the ratio of plant matter: volume of solvent (1:20, 1:45, 1: 70) and the extraction time (30, 60, 90 minutes). Subsequently, the carotenoid content was quantified by UV-Visible spectrophotometry, determining that the best treatment corresponds to 70 parts by volume of ethanol in a time of 90 minutes, registering a value of 929.44 mg per 100 g of dry base, while the lowest value of 487.05 mg per 100 g was obtained with 20 parts of solvent in a time of 30 minutes. Subsequently, the MSR was applied, through which the levels of each of the factors were optimized, determining that the optimum point corresponds to 70 parts of ethanol volume in a time of 90 minutes, reaching a maximum concentration of 940.92 mg of carotenoids per 100 g, with an extraction efficiency of 0.18 percent and a desirability of 0.97. Finally, a vacuum distillation was developed, obtaining the concentrated extract of carotenoids with a humidity of 80.59 percent, which was stored at 4 degrees Celsius for its conservation, since it has antioxidant potential.

**Keywords:** Carotenoids, fat-soluble pigments, bioactive compounds, mastuerzo.

## INTRODUCCIÓN

El mastuerzo (*Tropaeolum majus* L) es una especie originaria de Perú, y debido a su fácil adaptabilidad es común observarla en la región Andina de América del Sur en países como Bolivia, Colombia, Argentina y Ecuador (**Augusto & Barros, 2020**). Es una planta trepadora y anual, cuyas flores poseen tonalidades diferentes: amarillo, naranja y rojo. Debido a sus propiedades farmacológicas ha sido utilizada en la medicina popular, por consiguiente, se ha llevado a cabo el estudio de sus componentes activos, reportando efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antisépticos y antifúngicos (**Cruz, 2019**).

Una de las propiedades de *Tropaeolum majus* L. es el elevado contenido de carotenoides presentes en sus flores, los cuales son pigmentos de naturaleza lipofílica con acción antioxidante y, por lo tanto, poseen la capacidad para atrapar radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Aguilar et al., 2017**).

En varios estudios se ha determinado que los carotenoides intervienen en el equilibrio celular (redox), ayudando a mantener un metabolismo celular normal para generar energía (ATP), mediante la transferencia de electrones (**Brondani et al., 2016; Cheng et al., 2020**). Bajo este contexto, estos componentes activos impiden la generación de reacciones de oxidación, protegiendo la estructura de proteínas y lípidos con la finalidad de evitar daño celular (**Rajkumari, Dyavaiah, & Siddhardha, 2018**).

Considerando que los carotenoides son susceptibles a degradarse, el proceso de extracción involucra el control del tiempo de extracción, temperatura, cantidad de materia vegetal y el uso adecuado de disolventes orgánicos (**Cheng et al., 2020**). De modo que, se requiere estudiar las condiciones operacionales que permitan obtener el contenido máximo de componentes activos, aplicando herramientas experimentales (**Sanabria & Romo, 2019**).

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una estrategia o herramienta estadística que ha permitido optimizar los factores de un proceso. A través del mismo se maximizan los niveles de cada factor para obtener un rendimiento óptimo en el proceso, ahorrando gastos innecesarios en materia prima y energía. Además, se

protege a los carotenoides de reacciones de isomerización, las cuales perjudican su estabilidad, debido a condiciones operacionales mal desarrolladas (**Arias, 2014**).

Actualmente, la MSR ha sido utilizada para optimizar la extracción de flavonoides, sin embargo, existen pocas investigaciones con respecto a la extracción de carotenoides (**Jara, 2018**). A pesar de que se ha reportado el contenido de carotenoides en las flores de mastuerzo, estos varían acorde a las condiciones de operación (**Camavilva & Leyva, 2015; Juscamaita et al., 2017**). En consecuencia, fue fundamental la aplicación de una metodología experimental para aislar el contenido máximo de carotenos, de tal manera que el presente estudio a escala de laboratorio, pueda ser la base para el desarrollo de futuros ensayos a escala industrial, aprovechando las propiedades de estos metabolitos.



# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema de investigación

Optimización del proceso de extracción de carotenoides obtenidos a partir de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L).

### 1.2. Justificación

Las enfermedades crónico-degenerativas han incrementado la tasa de mortalidad en el mundo, alcanzando a un 68 y 71 % de la población mundial, según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el Ecuador aproximadamente el 31 % del total de muertes se encuentran asociadas a este tipo de enfermedades, incluyéndose entre ellas la diabetes mellitus, las alteraciones en el sistema nervioso central, la arteriosclerosis y el cáncer (**Díaz et al., 2017**).

Un factor importante que interviene en los procesos degenerativos y que desencadena en la aparición de este tipo de enfermedades, es el estrés oxidativo. Este se suscita cuando en el organismo existe un elevado contenido de radicales libres que no pueden ser neutralizados por los antioxidantes, ocasionado mutaciones en las células, dañando sus estructuras, y por ende, alterando su función, lo que consecuentemente lleva al desarrollo de patologías (**Gutiérrez et al., 2018**).

Es por todo aquello que la población ha buscado consumir alimentos y productos nutracéuticos que les proporcionen un mejor estado de salud, al reducir y prevenir diversas afecciones y padecimientos (**Santos, Silveira, & Salas, 2019**). Por lo tanto, varias especies vegetales han sido investigadas debido a sus componentes bioactivos al ser una fuente natural de antioxidantes, mismos que reemplazan a los aditivos sintéticos (**Spînu et al., 2016**).

Desde finales del siglo XX hasta la actualidad en Ecuador se han registrado aproximadamente 10 000 plantas con su respectiva información etnobotánica, de todas ellas se han identificado 3 118 ejemplares de uso medicinal (**Torre, et al., 2008**).

Varios reportes han establecido que la actividad antioxidante presente en varias especies vegetales está dada por su contenido de carotenoides, los cuales son pigmentos orgánicos liposolubles, que han demostrado ser efectivos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, han ayudado a prevenir la aterosclerosis, y en ciertas ocasiones han sido suministrados para contrarrestar el cáncer (**Cheng et al., 2020**). Al ser antioxidantes naturales tienen la capacidad de disminuir la presencia de radicales libres y por lo tanto, evitan que las células del organismo sufran daño oxidativo, es por ello, que dicha acción puede ser aplicada en la industria para obtener beneficios fisiológicos (**Challem & Block, 2008**).

El mastuerzo (*Tropaeolum majus* L), es una planta que posee un elevado contenido de carotenoides en sus flores, por lo cual la pigmentación de sus pétalos es variada: amarilla, naranja y roja respectivamente (**Bastidas & Llacua, 2018**). La concentración de carotenoides difiere en las tres variedades, ya que ésta es superior en dependencia de su estado de maduración (**Camavilva & Leyva, 2015**). Se ha registrado fundamentalmente la presencia de licopeno, luteína,  $\beta$ -caroteno,  $\varepsilon$ -caroteno e  $\gamma$ -caroteno, lo que la convierte en una flor atractiva desde el punto de vista nutritivo y farmacológico (**Juscamaita et al., 2017**).

En el Ecuador, la flor de mastuerzo ha sido estudiada por su efecto antiinflamatorio (**Montero & Mira, 2017**), nematocida (**Lara & Pomboza, 2019**), y su efecto cicatrizante (**Cabezas, 2014**), sin embargo, nada se reporta sobre el contenido de carotenoides. El mastuerzo es una planta ornamental que crece en estado silvestre y se produce de forma abundante durante todo el año, lo que facilita su recolección y posterior aprovechamiento, siendo común observarla en los sectores rurales de la provincia de Tungurahua, sobre todo en su pigmentación naranja (**Brondani et al., 2016**).

Por otra parte, la extracción sólido-líquido es una operación unitaria que con el paso de los años se ha convertido en una tecnología ampliamente utilizada en la industria alimentaria. En virtud de aquello, ha favorecido la obtención de componentes activos presentes en una matriz vegetal (soluto) al ser solubilizados en disolventes orgánicos (**Fon & Zumbado, 2020**). Sin embargo, se requiere cumplir con determinadas condiciones para aislar los metabolitos, evitando que se degraden y a la vez reduciendo gastos en materia prima, tiempo y energía. De modo que, se han aplicado

herramientas estadísticas, dentro de las que se incluye la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), la cual ha permitido optimizar procesos, controlando parámetros como: la cantidad de materia vegetal a utilizar, la naturaleza del disolvente, la temperatura y el tiempo de extracción (**Henry et al., 2016; Jara, 2018; Lobos, 2018; Miguel, 2017**).

Por tal motivo, se llevará a efecto el estudio de los parámetros operacionales a través de la Metodología de Superficie de Respuesta, con la finalidad de aislar el contenido máximo de carotenoides de *Tropaeolum majus* L. recolectada en los Andes ecuatorianos, de manera que se conviertan a futuro en una alternativa para la industria, al utilizar estos antioxidantes naturales en la creación de medicamentos, cosméticos y alimentos funcionales que reemplacen a los sintéticos, por consiguiente, generen múltiples beneficios para la salud.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

- Optimizar el proceso de extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L).

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar el contenido de carotenoides presentes en la flor de mastuerzo.
- Establecer los parámetros operacionales que influyen en el proceso de extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo a través de un diseño de superficie de respuesta.
- Evaluar el efecto de la relación materia vegetal/volumen de disolvente y del tiempo sobre la eficiencia de extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. Mastuerzo (*Tropaeolum majus* L)

###### 2.1.1.1. Hábitat y descripción geográfica

El mastuerzo pertenece a la familia Tropaeolaceae y es una especie originaria de Perú que además crece en la región andina de América del Sur desde México hasta Argentina, debido a su adaptabilidad en terrenos húmedos (**Brondani et al., 2016**).

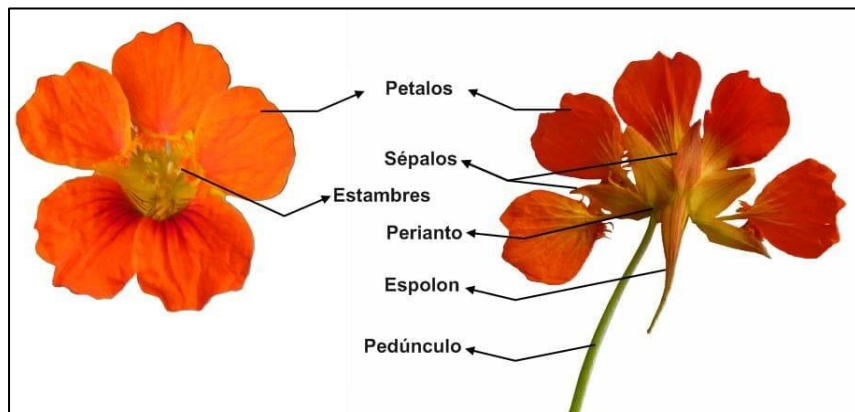
La historia redacta que los conquistadores españoles fueron los que introdujeron el mastuerzo en el viejo continente al asombrarse del color llamativo de sus pétalos y es por ello que en Europa es común observarla en jardines como una planta ornamental (**Nanzi, 1999**).

Sus nombres populares son varios: En Colombia se la conoce como cachaco de muladar, en Brasil su nombre es capuchina, en Cuba es reconocida como marañuela, mientras que en España adopta la denominación de llagas de Cristo o mastranto de indias (**Montero & Mira, 2017**). En Ecuador y Perú se la conoce como mastuerzo y por ende será citado en el texto de la presente investigación con dicho nombre.

###### 2.1.1.2. Descripción botánica

El mastuerzo es una planta herbácea y trepadora que se reproduce por semillas y gajos. Sus hojas son peltadas y orbiculares, llegando a alcanzar un diámetro de 4 a 12 cm. El pecíolo alcanza una longitud de 40 cm con enrollamiento en espiral. Los frutos son subcarnosos y con un diámetro pequeño de 1 cm (**Bastidas & Llacua, 2018**).

Las flores son hermafroditas y están formadas por 5 pétalos enteros, que llegan a tener un diámetro aproximado de 4 cm. El cáliz está formado por cinco sépalos, es más pequeño y presenta una tonalidad naranja amarillenta. La longitud del espolón es de 3 cm y existen alrededor de 8 estambres cuyo tamaño varía. Finalmente se puede recalcar que el pedúnculo es largo y delgado, de color verde brillante o verde rojizo (**Nanzi, 1999**). Dichas características se encuentran representadas en la Figura 1.



**Figura 1.** Partes de la flor anaranjada del mastuerzo (*Tropaeolum majus* L)  
**Fuente:** (Alfaro & Farje, 2016).

Las flores presentan tonalidades diferentes (amarillo, naranja y rojo). Esto se da porque en las células epidérmicas de los pétalos existen pigmentos hidrosolubles y liposolubles (**Bastidas & Llacua, 2018**). El cambio de color en las flores está determinado por el porcentaje de alcalinidad o acidez, sobre todo en aquellos que contienen antocianinas. Al ser ácido la tonalidad es roja, pero dicha característica también está dada por la presencia de los cromoplastos (orgánulos que acumulan carotenoides). Las tonalidades amarillas y naranjas determinan la presencia de flavonas y carotenoides. Es por ello que la misma flor contiene una variedad de colores, dependiendo del lugar en el que se haya desarrollado (**Arellano & Herrera, 2015**). En los Andes ecuatorianos es común observar en mayor cantidad la presencia de flores anaranjadas, seguidas de las amarillas y muy escasas de color rojo.



**Figura 2.** Pétalos de flores de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L) en sus tres variedades:  
 a) Flor anaranjada b) Flor amarilla c) Flor roja  
**Fuente:** (Arellano & Herrera, 2015).

### 2.1.1.3.Taxonomía

**Tabla 1.** Taxonomía del mastuerzo

Reino:	<b>Plantae</b>
División:	Magnoliophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Rosanae
Orden:	Brassicales
Familia:	Tropaeolaceae
Género:	<i>Tropaeolum</i> L
Epíteto específico:	<i>majus</i>
Nombre binomial:	<i>Tropaeolum majus</i> L

**Fuente:** www.tropicos.org ; (Gamara & Ramos, 2017).

### 2.1.1.4.Compuestos bioactivos de *Tropaeolum majus* L.

Las flores de mastuerzo poseen componentes biológicamente activos con la capacidad de cumplir determinadas funciones en la salud de ser humano al tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobinas (**Brondani et al., 2016**). Dentro de sus sustancias activas se encuentran los carotenoides, flavonoides, aceites esenciales, vitaminas (vitamina C, riboflavina), ácidos fenólicos, glucosilones y aminoácidos (**Bastidas & Llacua, 2018**).

La concentración de vitamina C es cercana a 60 mg/100 g, los flavonoides totales oscilan entre 124 y 251 mg/100 g, mientras que las antocianinas totales se encuentran en un intervalo de 69 y 281 mg/100 g (**Arellano & Herrera, 2015**).

La concentración de carotenoides totales es diferente en las flores de mastuerzo (amarilla, naranja y roja). De acuerdo a los ensayos efectuados por **Choque & Corilla (2015)**, se determinó que la flor amarilla posee aproximadamente 343 µg, la flor naranja registró 292 µg y la flor roja 304 µg de carotenoides totales por cada 100 g en base seca. En las tres variedades se encuentran diversas concentraciones de  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\alpha$ -caroteno y de  $\varepsilon$ -caroteno. Cabe recalcar que en la flor anaranjada se presenta una cantidad elevada de  $\gamma$ -caroteno (**Camavilva & Leyva, 2015**).

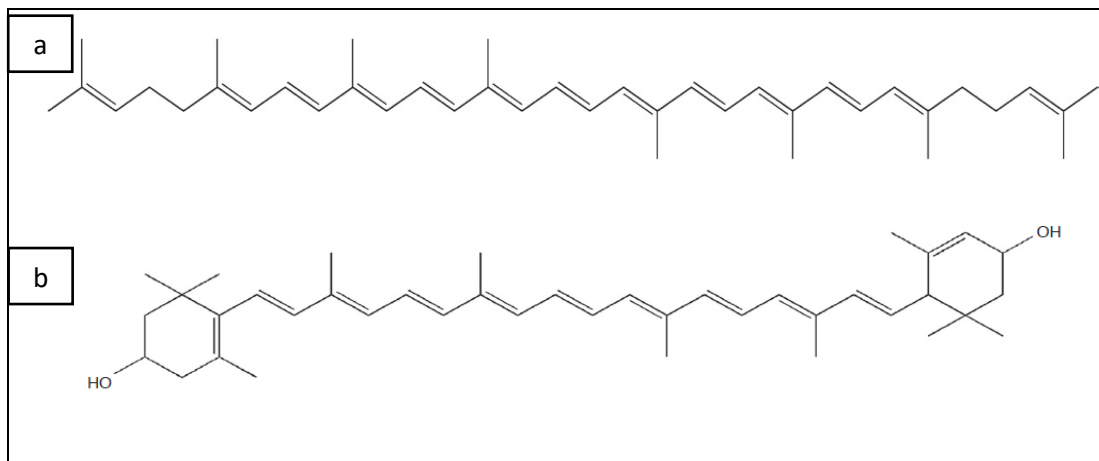
Dichos análisis determinan la presencia de carotenoides en la flor de mastuerzo, por ende, son aplicables al tratamiento de diversas enfermedades.

### 2.1.2. Carotenoides: Estructura y características

Los carotenoides son pigmentos orgánicos y liposolubles, que por lo general poseen una estructura que contiene cuarenta átomos de carbono (tetraterpenos). En las plantas su función es la de captar energía lumínica y la de evitar la muerte por radiación UV, además previenen el daño fotooxidativo (**Martínez, Vicario, & Heredia, 2015**).

En las flores, estos pigmentos forman parte de los cromoplastos y por ende los colores intensos que generan son producto de sus dobles enlaces conjugados, por lo cual su pigmentación es amarilla ( $\beta$ -caroteno), roja (licopeno) y anaranjada (**Amparo et al., 2009**).

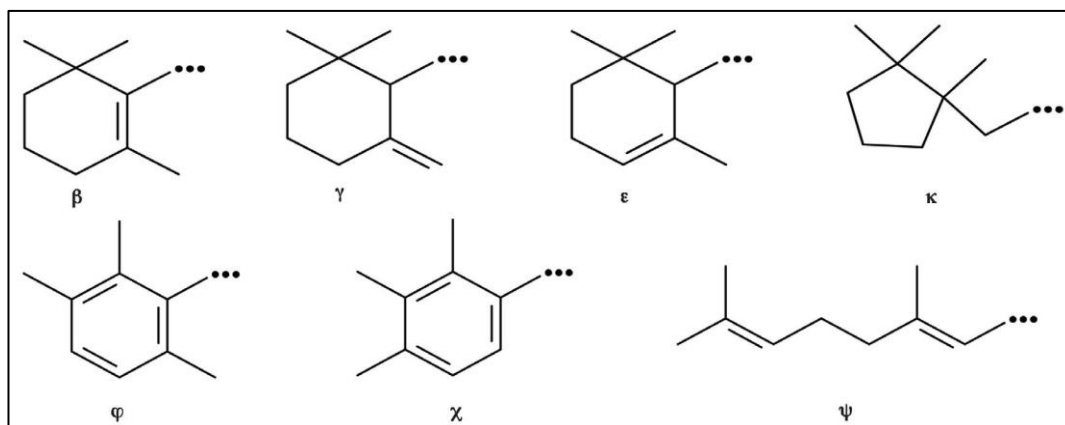
Existen dos clases de carotenoides: Los carotenos, los cuales poseen estructura hidrocarbonada, como por ejemplo el licopeno y  $\beta$ -caroteno; y las xantofilas cuya estructura hidrocarbonada contiene átomos de oxígeno, tal es el caso de la luteína y zeaxantina (**Sánchez et al., 1999**).



**Figura 3.** Estructura de carotenos: a) licopeno y xantofilas: b) luteína

**Fuente:** (Amparo et al., 2009).

Se pueden encontrar diferentes grupos terminales (anillos) en la estructura de los carotenoides, mismos que se presentan en la Figura 4.



**Figura 4.** Grupos terminales (anillos cíclicos y acíclicos) de los carotenoides

**Fuente:** (Meléndez, 2017).

Existen diversos isómeros espaciales (*cis* y *trans*) que les proporcionan estabilidad a los carotenoides. Por lo regular se encuentran carotenos con isómeros *trans*, aunque también se ha reportado la presencia de isómeros *cis*, sobre todo en el licopeno (Meléndez, 2017). A pesar de ello, este tipo de isómeros son menos usuales que los *trans*, ya que son termodinámicamente menos estables a causa del impedimento estérico que se presenta entre los hidrógenos contiguos y los grupos metilo (Jomova & Valko, 2013).

En el proceso de extracción de carotenoides la etapa más importante es el secado, ya que con ello se posibilita su conservación, al evitar la proliferación de microorganismos y diversas reacciones de oxidación que degradan el material vegetal. Sin embargo, al involucrar calor se pueden perder sustancias volátiles y termolábiles como es el caso de los aceites esenciales (Bastidas & Llacua, 2018).

Los carotenoides al ser pigmentos lipofílicos, son insolubles en agua y por lo tanto se extraen en disolventes orgánicos. Entre los disolventes están: el hexano, acetona, éter de petróleo y etanol (Meléndez, 2017).

#### 2.1.2.1. Factores que influyen en la estabilidad de los carotenoides

Los carotenoides están conformados por una cadena de polieno conjugada, por lo cual son susceptibles a sufrir degradación y perder su bioactividad debido a varios agentes oxidantes (Kumar & Keum, 2018). Los factores más influyentes son:



## **Temperatura**

En el proceso de secado de la materia vegetal o en la extracción, el contenido de carotenoides puede perder su funcionalidad, ya que, al ser expuestos a tratamientos térmicos el componente activo se ve afectado en su conformación al formarse isómeros *cis* (conformación menos estable), y por lo tanto son más propensos a la degradación (**Boon et al., 2010**).

## **Tiempo de extracción**

En extracciones convencionales se requiere aplicar temperatura para solubilizar el soluto en el disolvente orgánico. Por ello, en base a la matriz vegetal con la que trabaje, se recomienda llevar a efecto la extracción en el menor tiempo posible para evitar la isomerización de los carotenoides (**Cheng et al., 2020**).

## **Luz**

Los carotenoides se degradan en presencia de luz debido a la fotooxidación. Esto se debe a que las moléculas que conforman los carotenoides son excitadas por la luz, y al encontrarse en un solvente (extractos líquidos) reaccionan para formar especies denominadas radical caroteno ya que pierden sus hidrógenos (**Amaro et al., 2018**). Pero considerando que estos pigmentos orgánicos son agentes reductores, terminan por autooxidarse, aún más, si se conservan en presencia de oxígeno los carotenos se consumen en su totalidad en un período no mayor a 30 horas (**Boon et al., 2010**).

### **2.1.3. Función de los antioxidantes frente al estrés oxidativo**

#### **2.1.3.1. Estrés oxidativo**

En el ser humano existe un balance entre los radicales libres y antioxidantes (balance óxido-reducción). Los prooxidantes presentes en el organismo son resultado del metabolismo celular, mismos que son contrarrestados por los antioxidantes, los cuales presentan mecanismos de defensa (**Hemmati et al., 2019**).

El estrés oxidativo es producto de un desbalance óxido-reducción, por lo tanto se genera un incremento de radicales libres, llegando a ser especies reactivas que producen reacciones en cadena y por ende, originan la muerte celular (**Hayes et al., 2020**).

Se denominan radicales libres a las moléculas cuyos átomos poseen un electrón desapareado en su orbital externo, por consiguiente, producen oxidación. Debido a su inestabilidad el electrón desapareado busca acoger electrones de otras moléculas, como los carbohidratos, proteínas, lípidos y sobre todo nucleótidos, ocasionando daños en el DNA (**Kirtonia, 2020**).

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es considerado como birradical, ya que presenta dos electrones desapareados, pero al encontrarse en un orbital antienlazante (spin paralelo) no reacciona con otras moléculas y por ende su reactividad es baja (**Parwez, 2017**). Sin embargo, existen casos en donde el  $O_2$  al excitarse invierte el spin de uno de los electrones, y por ende, un electrón desapareado puede trasladarse a otro orbital que posee mayor energía, generando de tal modo especies reactivas de oxígeno, denotado por sus siglas en inglés como ROS (Reactive Oxygen Species) (**Sies & Jones, 2020**).

Las ROS que han sido identificadas son: El anión súper oxido ( $O_2^-$ ), en el cual una molécula de oxígeno es reducida por un solo electrón; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), mismo que se forma al incorporarse dos electrones en la molécula de oxígeno; el radical hidroxilo (HO) que se origina por la reducción de tres electrones (**Mayor, 2010**).

Existen otras especies reactivas que incluyen a las de nitrógeno (RNS: Reactive Nitrogen Species), hierro (RIS: Reactive Iron Species) y cobre (RCS: Reactive Copper Species). Todas ellas son moléculas oxidantes con la capacidad de transformarse en radicales libres (**Sies, Berndt, & Jones, 2017**).

La oxidación produce modificaciones en la estructura de proteínas y lípidos, lo que consecuentemente genera daño celular. En el caso de las proteínas, los radicales libres al reaccionar con estas macromoléculas, rompen los enlaces peptídicos, originan la presencia de grupos carbonilo, por ende, su actividad hormonal y enzimática se ve afectada (**Casas et al., 2020**). En lo que respecta a los lípidos, se produce la peroxidación, ya que los ácidos grasos poliinsaturados (componente de los fosfolípidos) al ceder sus electrones a los radicales libres, alteran la función de la bicapa lipídica, provocando pérdida de estabilidad en la membrana celular (**Olivares et al., 2010**).

El daño oxidativo que se da en el DNA se origina principalmente por efectos adversos ocasionados en sus bases nitrogenadas o en el azúcar, provocando inestabilidad genética y por consiguiente mutaciones que derivan en la carcinogénesis (**Gholamian et al., 2017**).

#### **2.1.3.2. Mecanismo de acción de los antioxidantes**

Los antioxidantes son moléculas que donan electrones a los radicales libres con la finalidad de reducirlos, por tal razón se estabilizan y se elimina la reacción en cadena (**Diaz et al., 2020**).

Los antioxidantes pueden ser sintetizados por el organismo, pero además provienen de fuentes exógenas, principalmente de los alimentos, entre los que se destacan los carotenoides, flavonoides, las vitaminas (A, C, E), los ácidos lipoicos y diversos cofactores (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) (**Olivares et al., 2010**).

Los mecanismos de defensa se presentan de diversas maneras: La acción principal es la de disminuir la concentración de oxidantes, por otra parte, se unen a iones metálicos con la finalidad de prevenir o reducir la transformación de especies reactivas. Finalmente, los antioxidantes interrumpen la reacción en cadena evitando que se eleven los niveles de radicales libres (**Diaz et al., 2020**).

#### **2.1.4. Extracción de componentes bioactivos**

En diversos alimentos de origen vegetal se encuentran presentes varios metabolitos que requieren ser extraídos debido a sus propiedades nutraceuticas. Es por ello que se han desarrollado métodos de extracción convencionales (Sólido-líquido, Soxhlet) y otras técnicas no convencionales (Microondas, fluidos supercríticos, ultrasonido) (**Pérez, Hernández, & Barragán, 2017**).

La extracción sólido-líquido es la operación unitaria más utilizada para extraer componentes bioactivos en el campo alimentario, debido a su facilidad y el corto tiempo que requiere el ensayo en base a determinados parámetros. El proceso se lleva a efecto al colocar el soluto desestructurado (materia vegetal seca o fresca) en un disolvente orgánico. Con esto se facilita la transferencia de masa desde la fase sólida a la fase líquida, obteniendo de tal manera los extractos (disolvente +

componente activo) y se procede a eliminar la matriz vegetal inerte (materia vegetal insoluble) (Gómez et al., 2020).

La presente técnica ha favorecido la extracción de carotenoides totales de diversas matrices vegetales tales como: tomate de árbol (Pérez, 2019), zanahoria (Fiallos, 2019) y zapote mamey (Guevara, 2020).

Un factor esencial a considerar en el proceso de extracción es el tipo de disolvente, ya que los carotenoides presentan naturaleza hidrofóbica y por ende se extraen en disolventes orgánicos. Por lo tanto, se utilizan solventes no polares (éter de petróleo, hexano), los cuales facilitan la solubilización de  $\beta$ -caroteno (Cheng et al., 2020). Sin embargo, los disolventes semipolares (etanol, acetona) ofrecen mayor seguridad y reducen el riesgo ambiental, favoreciendo principalmente la extracción de luteína. Finalmente, es importante recalcar que si se desea obtener una alta concentración de licopeno es conveniente llevar a efecto una combinación de hexano, acetona y etanol (Kumar, Hyun, & Keum, 2018).

#### **2.1.5. Espectrofotometría UV-Visible: Ley de Lambert-Beer**

La espectroscopía ultravioleta-visible es un método analítico que posibilita la cuantificación de un determinado compuesto bioactivo presente en una solución. Lo expuesto ocurre debido a la capacidad que poseen las biomoléculas para absorber las radiaciones electromagnéticas correspondientes a una longitud de onda dentro de la región UV-visible. Con ello se deduce que la cantidad de luz que absorbe la muestra es dependiente de su estructura atómica y de su concentración (Abril et al., 2010).

La Ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia de la solución está relacionada cuantitativamente con la concentración del componente activo y se encuentra expresada de la siguiente manera:  $A = \epsilon * b * c$ , donde  $c$  representa la concentración del componente bioactivo en  $\text{g.L}^{-1}$ ,  $b$  hace referencia a la longitud de la celda que contiene la disolución en  $\text{cm}$  y finalmente,  $\epsilon$  hace alusión a la absorptividad propia de la sustancia de interés y se expresa en  $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Serrano, 2017).

La ley se cumple para soluciones diluidas, ya que, en caso de existir una concentración elevada del analito se obtendrá un valor erróneo. En las soluciones

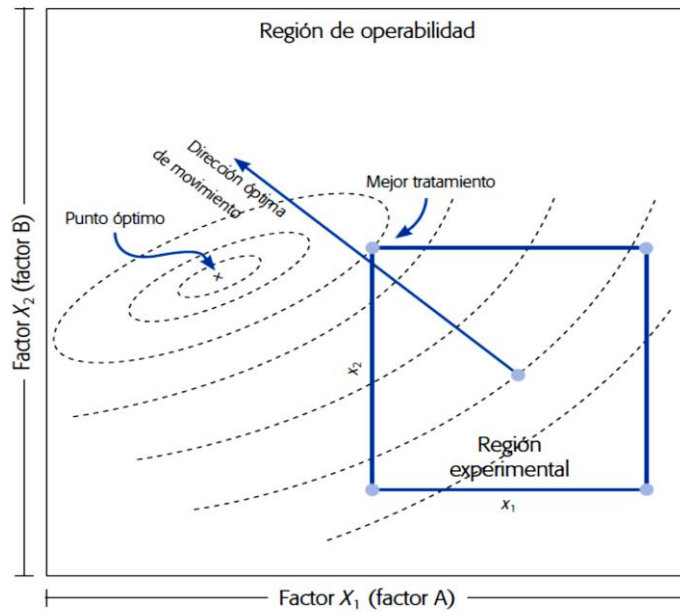
concentradas la distancia existente entre las partículas del compuesto es pequeña, por ende, se genera variación en las cargas de las partículas que lo conforman, lo cual dificulta que sea absorbida a una determinada longitud de onda (**López, 2019**).

#### **2.1.6. Diseño de experimentos: Metodología de superficie de respuesta (MSR)**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta experimental aplicada en la industria para el control de los procesos, ya que, permite determinar los factores o parámetros óptimos con los que se logran las salidas deseadas (variables de respuesta) (**Yaguas, 2017**).

Bajo este contexto, es necesario considerar tres fases que facilitarán el desarrollo el método: La primera fase se refiere a la exploración experimental, en donde se toman en consideración los factores más importantes que van a ser incluidos en el modelo estadístico; la segunda fase hace referencia al modelado empírico en el cual se determinan los factores que influyen significativamente sobre la variable de respuesta; finalmente, la tercera fase corresponde al modelado mecanicista, en el que se lleva a efecto el análisis de los valores óptimos registrados con la finalidad de perfeccionarlos, es decir se estudia la región de operabilidad (región con las mejores condiciones para realizar el experimento) (**De Zan, 2006**).

Es importante enfatizar que, el mejor tratamiento y el punto óptimo son dos conceptos totalmente diferentes. Por consiguiente, en la Figura 5 se expone que, el mejor tratamiento se refiere al mejor parámetro operacional que se encuentra dentro de la región experimental, mientras que, el punto óptimo corresponde al mejor parámetro presente en la región de operabilidad, mismo que a su vez se puede encontrar o no, dentro de la región experimental (**Jara, 2018**).



**Figura 5.** Mejor tratamiento y punto óptimo de operación

**Fuente:** (Jara, 2018).

### 2.1.6.1. Diseño 3<sup>n</sup> para ajustar la superficie de respuesta

Para realizar un ajuste adecuado de la superficie de respuesta, se requiere llevar a cabo un análisis apropiado de los datos a través de un diseño experimental. De ahí que, cuando se pretenden ajustar modelos de primer orden se utilizan diseños 2<sup>n</sup> (2 niveles con  $n$  factores), en donde los valores son codificados con  $+1$  (valor alto) y  $-1$  (valor bajo) (Nóchez & Ventura, 2009).

Del mismo modo, para ajustar un modelo de segundo orden es necesario utilizar un diseño central compuesto (DCC) dentro del que se incluye el diseño factorial 3<sup>n</sup> (3 niveles por cada factor  $n$ ) (Yaguas, 2017). El presente diseño experimental consta de tres codificaciones en sus variables, en base a los cuales se efectúa la interacción de sus tratamientos y se denotan por:  $-1$  (valor bajo),  $0$  (valor medio),  $+1$  (valor alto) (Del Ángel et al., 2015).

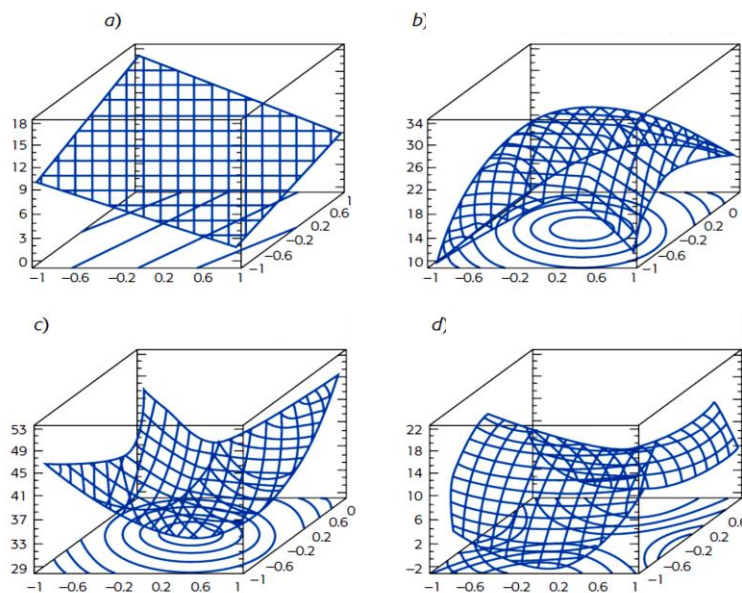
A través del análisis de varianza (ANOVA), se determinan los factores significativos que influyen en el ensayo con un  $p < 0,05$  y a través de la MSR se ajusta el modelo, con ello se establece el mejor tratamiento, es decir los valores óptimos que deben aplicarse en los factores para obtener la variable de respuesta deseada (Jiménez, 2015).

Por último, es importante resaltar que el modelo estadístico se representa de la siguiente manera :  $Y_{ijk} = \mu + \delta_i + \gamma_j + (\delta\gamma)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$  con los niveles  $i= 1,2,3$  ;  $j= 1,2,3$  y la corrida experimental  $k= 1,2,3,\dots,n$ .

Donde  $Y$  hace referencia a la variable de respuesta,  $\mu$  corresponde a la media general,  $\delta_i$  representa al factor A en el nivel  $i$ ,  $\gamma_j$  concierne al factor B en el nivel  $j$ ,  $\delta\gamma$  es la interacción de los factores (A y B) en los niveles  $ij$ , y finalmente,  $\varepsilon$  es el error en base a los niveles  $ij$  de acuerdo al número réplicas experimentales  $k$  (Del Ángel et al., 2015).

### 2.1.6.2. Gráficas de superficie de respuesta

Los niveles optimizados para cada factor son representados en una gráfica de superficie de respuesta, la cual posee una estructura tridimensional. De modo que, se grafican dos factores (variables dependientes) con una variable de respuesta (variable independiente). En base al modelo estadístico, en una ecuación de primer orden la gráfica es plana (Figura 6a), mientras que, para una ecuación de segundo orden, se distingue una curvatura, misma que puede ser en forma de montaña (Figura 6b), valle (Figura 6c) y silla (Figura 6d) (Jara, 2018).



**Figura 6.** Gráficas de superficie de respuesta: a) plana b) montaña c) valle d) silla.

**Fuente:** (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Hipótesis nula**

No se determinarán los parámetros operacionales óptimos que permitan extraer el contenido máximo de carotenoides de la flor del mastuerzo (*Tropaeolum majus* L).

### **2.2.2. Hipótesis alternativa**

Se determinarán los parámetros operacionales óptimos que permitan extraer el contenido máximo de carotenoides la flor del mastuerzo (*Tropaeolum majus* L).

## **2.3. Variables de la hipótesis**

### **2.3.1. Variables dependientes**

Eficiencia de extracción, masa de carotenoides en cien gramos de sólidos extraídos.

### **2.3.2. Variables independientes**

Relación de materia vegetal-volumen de disolvente (1:20; 1:45; 1:70), tiempo de extracción (30, 60, 90 minutos).



## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Recursos Materiales

##### 3.1.1. Materiales de laboratorio

Para llevar a efecto los ensayos se requirió de los siguientes materiales: Flores de anaranjadas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*), matraces Erlenmeyer de 250 mL y 800 mL, probeta graduada de 100 mL, balones de aforo de 100 mL, pipetas graduadas de 5 mL y 10 mL, micropipetas de 20-200  $\mu$ L, peras de succión, agitadores magnéticos, cubetas para espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuScan GO), frascos de vidrio color ámbar de 90 mL y 1000 mL, tubos Falcon de 50 mL, termómetro, papel aluminio y fundas plásticas con cierre hermético.

##### 3.1.2. Equipos

Para realizar el proceso de extracción de carotenoides se utilizaron los siguientes equipos: Horno de bandejas (Gander MTN), molino (Oster), plancha de calentamiento (Corning PC-620), centrífuga (Rotina 380), balanza analítica (Ohaus PA-214), balanza de humedad (KERN MLS 50-3), rotoevaporador (IKA-RV8) y espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuScan GO).

El análisis estadístico se efectuó en un computador HP con sistema operativo Windows 10 con ayuda del programa estadístico Minitab 19, Statgraphics Centrión XVI.I y Excel 2016.

##### 3.1.3. Reactivos

Para el lavado de las flores se utilizó agua destilada y para obtener los extractos de carotenoides se requirió de etanol al 96 %.

## **3.2.Métodos**

### **3.2.1. Recolección del material vegetal**

Las flores de mastuerzo fueron recolectadas en el caserío Puerto Arturo (1°10'54.6"S 78°35'17.7"W) perteneciente a la parroquia Unamuncho, en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua. Se escogieron específicamente las flores de mastuerzo que poseían los pétalos de color anaranjado, luego fueron almacenados en bolsas de papel y se las transportó a los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) para su tratamiento.

### **3.2.2. Tratamiento del material vegetal**

En el laboratorio se efectuó el lavado de las flores con agua destilada para eliminar el polvo o insectos presentes en los pétalos. Después, se seleccionaron los mejores ejemplares, y se los secaron en bandejas a una temperatura de 60 °C por 24 horas en un horno con circulación forzada de aire Gander MTN. Posteriormente, se efectuó el pulverizado del material vegetal utilizando un molino Oster. Finalmente, se tamizó la muestra y se lo guardó protegido de la luz y humedad en fundas de polietileno con cierre hermético.

### **3.2.3. Obtención de los extractos de carotenoides**

Se efectuó una extracción sólido-líquido usando etanol al 96 % como disolvente orgánico. Se trabajó en tres relaciones: 1:20, 1:45 y 1:70 de material vegetal seco con respecto al disolvente.

En la primera relación 1:20 se utilizó 2,500 g de material vegetal seco, el cual se lo pesó en la balanza analítica (Ohaus PA-214) y se le agregó 50 mL de etanol al 96 %. Para la siguiente relación 1:45, se pesó 1,111 g de material vegetal en la balanza analítica (Ohaus PA-214) y se le añadió 50 mL de etanol al 96 %. Finalmente, en la tercera relación 1:70 se pesó 0,714 g de material vegetal seco y se le agregó 50 mL de etanol al 96 %.

Cada una de las muestras fueron colocadas en matraces de 250 mL y se las taparon para evitar que el disolvente se evapore. De acuerdo al protocolo establecido por **Amaro et al., (2018)**, se las llevó a una plancha de calentamiento (Corning PC-

620D) a una temperatura de 60 °C con agitación magnética a 380 min<sup>-1</sup>, y considerando intervalos de tiempo diferentes: 30, 60 y 90 minutos respectivamente.

Una vez obtenidos los extractos líquidos, se los colocó en tubos Falcon de 50 mL y se los llevó a una centrífuga (Rotina 380) a 4500 min<sup>-1</sup> por un tiempo de 10 minutos.

El volumen (mL) y masa del sobrenadante (g) obtenidos fueron registrados, se los almacenó en frascos ámbar y fueron puestos en refrigeración protegidos de la luz.

#### 3.2.4. Análisis de los extractos

Para determinar los sólidos totales (SST), se utilizó la Ecuación 1, para lo cual se efectuaron mediciones por triplicado en la balanza de humedad (KERN MLS 50-3).

$$\% SST = 100 - \% Humedad$$

Ecuación 1. Determinación de Sólidos Totales

En base al método descrito por **Strati & Oreopoulou (2011)**, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuScan GO), a una longitud de onda de 472 nm, utilizando el etanol como blanco reactivo.

La concentración de carotenoides totales (C) estuvieron expresados como licopeno en mg/L, y el cálculo se lo realizó a través de la Ecuación 2, utilizando la absorptividad específica del licopeno en etanol de 3950 (E).

$$C = \frac{A * 10^4}{E}$$

Ecuación 2. Determinación de la concentración de carotenoides

Para obtener la masa de sólidos extraídos (MSE), se utilizó la Ecuación 3, en donde *M* representa la masa del extracto en gramos (g).

$$MSE = M * \frac{\% SST}{100}$$

Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos

Además, se determinó la masa de carotenoides en 100 g de sólidos extraídos por medio de la siguiente expresión.

$$m_c \text{ en } 100g = \frac{(C * V_f)}{MSE} * 100$$

Ecuación 4. Masa de carotenoides en cien gramos de sólidos extraídos

Donde:

$C$  = Concentración de carotenoides en mg/L

$V_f$  = Volumen final del extracto en L.

Finalmente, se calculó el porcentaje de eficiencia de extracción (% E.Ex) a través de la siguiente ecuación.

$$\% E. Ex = \frac{(C * V_f)}{MV} * 100\%$$

Ecuación 5. Porcentaje de eficiencia de extracción

Donde:

$MV$  = Materia vegetal utilizada en la extracción, expresado en gramos (g).

### **3.2.5. Análisis del contenido de carotenoides totales**

Se determinó el contenido de carotenoides presentes en la forma de mastuerzo por espectrofotometría UV-Vis y por medio del programa estadístico Minitab 19 se efectuó la prueba de Tukey, mediante el cual se mostró las medias de los valores correspondientes al contenido de carotenoides (mg/ 100g de base seca), los mismos fueron expresados como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar, como se los expone en la Tabla 2. Conforme a los valores establecidos, se desarrolló un gráfico de barras de error para identificar de forma eficiente el mejor tratamiento alusivo a la región experimental.

**Tabla 2.** Contenido de carotenos totales presentes en la flor de mastuerzo

<b>Relación materia vegetal/volumen de disolvente</b>	<b>Tiempo de extracción (minutos)</b>	<b>Carotenos totales (mg/ 100g)</b>
1:20	30	valor promedio 1 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	60	valor promedio 2 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	90	valor promedio 3 ± desviación estándar <sup>L</sup>
1:45	30	valor promedio 4 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	60	valor promedio 5 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	90	valor promedio 6 ± desviación estándar <sup>L</sup>
1:70	30	valor promedio 7 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	60	valor promedio 8 ± desviación estándar <sup>L</sup>
	90	valor promedio 9 ± desviación estándar <sup>L</sup>

Leyenda: **L** hace referencia a las letras del alfabeto que corresponden a cada valor promedio, mediante el cual se identificó la presencia de diferencias significativas en base a la prueba de Tukey.

Subsecuentemente, se mostró un gráfico de Intervalos de confianza de 95% de Tukey para comparaciones múltiples, con la finalidad de evaluar de forma específica todas las parejas de medias aritméticas que guardan relación y aquellas que presentan significancia.

En comparaciones múltiples, la prueba de Tukey permite especificar los tratamientos que poseen un efecto superior e identificar los tratamientos divergentes (**Hernández et al., 2020**). Por lo tanto, con ello se puntualizó si todas las medias fueron iguales o no, lo que permitió precisar la incidencia del Factor A y el Factor B en la extracción de carotenoides, previo a la optimización de cada uno de sus niveles.

### **3.2.6. Análisis estadístico para optimizar el contenido de carotenoides**

Para definir las mejores condiciones de extracción de los carotenoides o punto óptimo (región de operabilidad), los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI.I. Cada tratamiento constó de tres réplicas y se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño experimental de 3<sup>2</sup>, el cual posee dos factores (A×B) y tres niveles [alto (1), medio (0), bajo (-1)]. El factor A correspondió a la relación de material vegetal/ volumen de

disolvente con sus niveles: 1/20 (bajo); 1/45 (medio); 1/70 (alto), y el factor B hizo referencia al tiempo de extracción con sus niveles: 30 (bajo), 60 (medio), 90 (alto) minutos.

En la Tabla 3. se exhibe la interacción de los tratamientos que se realizan en un diseño experimental  $3^2$ .

**Tabla 3.** Diseño experimental  $3^2$

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	<b>Interacción de los tratamientos</b>
<b>A:</b> Relación material vegetal: volumen de disolvente	<b>a<sub>0</sub>:</b> Relación 1:20 <b>a<sub>1</sub>:</b> Relación 1:45 <b>a<sub>2</sub>:</b> Relación 1:70	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> a <sub>0</sub> b <sub>2</sub>
<b>B:</b> Tiempo de extracción (minutos)	<b>b<sub>0</sub>:</b> 30 <b>b<sub>1</sub>:</b> 60 <b>b<sub>2</sub>:</b> 90	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>

El presente análisis estadístico incorporó un análisis de varianza (ANOVA), para detectar la significancia de cada factor con un  $p < 0,05$  en base a un nivel de confianza del 95 %. Para corroborar el ANOVA, se incluyó un diagrama de Pareto Estandarizado para evaluar el efecto de cada factor de acuerdo a su impacto significativo. Además, en el mismo gráfico se ejecutó el modelado mecanicista que consistió en eliminar los factores o sus interacciones cuadráticas que no afectaron significativamente la extracción.

Por lo tanto, a través del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado) obtenidos, se estableció la correlación entre los datos encontrados experimentalmente y los datos que predijo el modelo estadístico.

De tal manera, por medio del diseño de superficie de respuesta se determinó la relación existente entre las variables independientes (Factor A y Factor B) y la variable dependiente o de respuesta (Concentración de carotenoides). Se desarrolló un gráfico de superficie de respuesta, en donde se observó la relación del material vegetal:volumen de disolvente, el tiempo de extracción y la concentración de carotenoides (mg/100 g de sólidos extraídos). Con ello se identificaron los puntos óptimos que se encuentran en la región de operabilidad, es decir los valores óptimos

que deben aplicarse en las variables independientes para obtener la variable de respuesta deseada (Sanabria & Romo, 2019).

En la Tabla 4 se representan los niveles codificados que fueron establecidos en el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI.I para cada tratamiento en base a tres corridas experimentales de un diseño  $3^2$  (27 tratamientos), mediante el cual se optimizaron los niveles correspondientes a cada factor o parámetro.

**Tabla 4.** Niveles codificados para un diseño de superficie de respuesta  $3^2$

N° Tratamiento	Nivel actual		Nivel codificado		Niveles correspondientes a cada codificación	
	Factor A	Factor B	x1	x2	x1	x2
1	Alto	Alto	1	1	70	90
2	Medio	Alto	0	1	45	90
3	Bajo	Alto	-1	1	20	90
4	Alto	Bajo	1	-1	70	30
5	Alto	Medio	1	0	70	60
6	Medio	Medio	0	0	45	60
7	Bajo	Bajo	-1	-1	20	30
8	Medio	Bajo	0	-1	45	30
9	Bajo	Medio	-1	0	20	60
10	Alto	Alto	1	1	70	90
11	Medio	Alto	0	1	45	90
12	Bajo	Alto	-1	1	20	90
13	Alto	Bajo	1	-1	70	30
14	Alto	Medio	1	0	70	60
15	Medio	Medio	0	0	45	60
16	Bajo	Bajo	-1	-1	20	30
17	Medio	Bajo	0	-1	45	30
18	Bajo	Medio	-1	0	20	60
19	Alto	Alto	1	1	70	90
20	Medio	Alto	0	1	45	90
21	Bajo	Alto	-1	1	20	90
22	Alto	Bajo	1	-1	70	30
23	Alto	Medio	1	0	70	60
24	Medio	Medio	0	0	45	60
25	Bajo	Bajo	-1	-1	20	30
26	Medio	Bajo	0	-1	45	30
27	Bajo	Medio	-1	0	20	60

Leyenda: Los niveles del Factor A corresponden a las relaciones 1:20 (-1), 1:45 (0) y 1:70 (+1), mientras que los niveles del Factor B se refieren al tiempo de 30 (-1), 60 (0) y 90 (+1) minutos.

Por último, se obtuvo la ecuación del modelo estadístico correspondiente al Contenido óptimo de carotenoides totales de la flor de mastuerzo con relación a los Factores A y B.

### **3.2.7. Análisis estadístico para evaluar la eficiencia de extracción**

Acorde a la metodología expuesta por **Henry et al. (2016)**, se llevó a efecto el desarrollo de un gráfico de pruebas múltiples de Tukey para precisar la presencia de diferencias significativas en las medias aritméticas de los valores calculados experimentalmente a través de la Ecuación 5. Con ello, se visualizó y analizó la influencia de cada uno de los niveles correspondientes a cada Factor A y B, sobre la eficiencia de extracción.

Se analizó la significancia de los factores A y B a través de un ANOVA, efectuando a la vez un diagrama de Pareto estandarizado y un gráfico de Efectos principales para constatar de forma eficiente la influencia de cada uno de los parámetros sobre el rendimiento de extracción.

Posteriormente, se realizó la optimización de los niveles de cada factor para evaluar la región de operabilidad sobre el que se debe realizar el experimento, mediante un diseño experimental de superficie de respuesta  $3^2$ , idéntico al explicado en el apartado anterior, a diferencia de que, en el presente análisis la variable de respuesta correspondió al porcentaje de eficiencia de extracción.

De igual manera, a través del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado), se estableció la correlación entre los datos encontrados experimentalmente y los datos que predijo el modelo estadístico.

Bajo este contexto, se identificaron las mejores condiciones en las que se deben extraer los carotenoides de acuerdo al porcentaje de eficiencia de extracción, identificando los parámetros operacionales por medio de un gráfico de superficie de respuesta, en donde se observó la relación del material vegetal:volumen de disolvente, el tiempo de extracción y el porcentaje de eficiencia de extracción.

### **3.2.8. Análisis múltiple de respuestas**

En base al método descrito por **Jofre et al. (2020)**, a través de la función de deseabilidad en Statgraphics se evaluó la combinación de las respuestas



(Concentración de carotenoides y % Eficiencia de extracción) obtenidos para los factores A y B, con la finalidad de analizar el rendimiento global del proceso.

### **3.2.9. Obtención del extracto concentrado de carotenoides**

Una vez determinado los parámetros operacionales óptimos, se procedió a obtener un volumen elevado de extracto líquido de carotenoides. Para ello se efectuaron extracciones sucesivas en matraces PYREX de 800 mL, manteniendo una temperatura constante de 60°C y agitación magnética de 400 min<sup>-1</sup>. El extracto líquido de carotenoides fue concentrado a 68 °C a 200 min<sup>-1</sup> y con presión reducida para eliminar el etanol de la muestra, en un Rotoevaporador (IKA 8). Finalmente, de acuerdo al protocolo establecido por **Tahir et al. (2018)**, se cuantificó el porcentaje de humedad y se almacenó el extracto concentrado en la oscuridad y en refrigeración a 4°C, para evitar que la estabilidad de los pigmentos se vea afectada.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1. Obtención de los extractos de carotenoides

El proceso de extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo, se efectuó mediante el estudio de dos factores: la relación de material vegetal - volumen de disolvente (Factor A) y el tiempo de extracción de carotenoides (Factor B).

El disolvente utilizado fue etanol al 96 %, ya que los carotenoides son pigmentos orgánicos liposolubles y por consiguiente son compuestos inmiscibles en agua. El etanol es un solvente polar y un azeótropo en la concentración mencionada (**Mejía, Espinal, & Mondragón, 2006**). Por ende, este solvente facilitó la extracción máxima de carotenoides, ya que al estar formado de una mezcla azeotrópica (96 % de etanol – 4 % de agua) se comporta como un único compuesto (etanol) que no se ve afectado por la ínfima cantidad de agua que contiene al momento extraer los metabolitos.

Los extractos fueron cuantificados por espectrofotoscopia UV-Visible (Anexo 2), ya que en base a esta técnica analítica fue posible determinar la concentración de los compuestos orgánicos presentes en la disolución. **Girón & Ordóñez (2016)**, reportaron que este método espectrofotométrico se basa en la estructura molecular de los carotenoides, pues sus dobles enlaces conjugados forman un cromóforo del cual depende su color y por tal razón absorbe a una determinada longitud de onda de luz visible (472 nm).

Con el programa estadístico Matlab 19 se llevó a efecto la comparación de medias del contenido de carotenos totales (mg / 100 g) a través de la prueba de Tukey con lo cual se evaluó la presencia de diferencias significativas.

En la Tabla 5. se presenta el contenido de carotenoides presentes en cada uno de los tratamientos.

**Tabla 5.** Contenido de carotenos totales de la flor anaranjada de mastuerzo presentes en los extractos líquidos

Relación materia vegetal/volumen de disolvente	Tiempo de extracción (minutos)	Carotenos totales (mg/ 100 g)
1:20	30	487,050 ± 11,183 <sup>f</sup>
	60	499,880 ± 8,268 <sup>f</sup>
	90	532,035 ± 9,213 <sup>ef</sup>
1:45	30	638,325 ± 20,151 <sup>de</sup>
	60	570,974 ± 39,439 <sup>ef</sup>
	90	867,788 ± 27,600 <sup>ab</sup>
1:70	30	745,280 ± 17,139 <sup>cd</sup>
	60	787,424 ± 67,100 <sup>bc</sup>
	90	929,447 ± 19,246 <sup>a</sup>

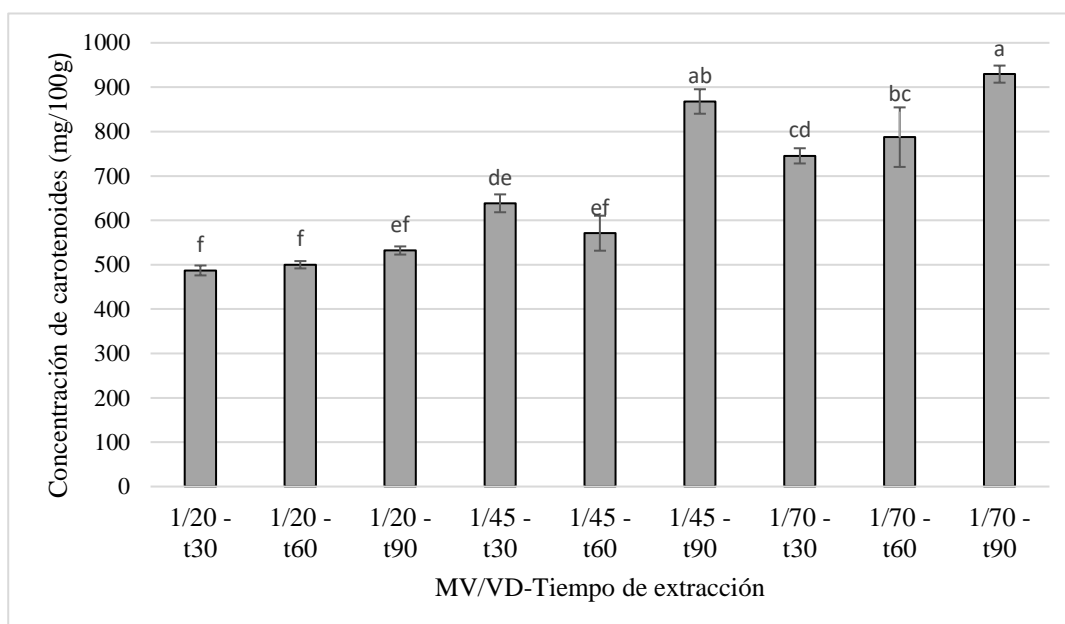
Leyenda: Los valores están codificados con letras (a y f) los cuales muestran diferencia significativa dentro de la prueba de Tukey. Se presenta el valor promedio de 3 réplicas experimentales ± desviación estándar.

A través de la prueba de Tukey se verificó la presencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre todas las medias aritméticas correspondientes al contenido de carotenoides. Las letras (a y g) fueron un indicativo para examinar si las medias guardaban relación. Con ello se determinó que el mejor tratamiento experimental, corresponde a la relación de 1:70 con un tiempo de 90 minutos equivalente a un promedio de  $929,447 \pm 19,246$  mg carotenos totales/ 100 g de base seca (a), cuyo valor fue significativo con referencia a los demás datos, mientras que el promedio más bajo de  $487,050 \pm 11,183$  mg carotenos totales/ 100 g de base seca (b) pertenece a la relación 1:20 con un tiempo de 30 minutos. Acorde a estos resultados experimentales se puntualizó la presencia de una relación directamente proporcional, ya que, a medida que se incrementó la relación materia vegetal/ volumen de disolvente y el tiempo de extracción, el contenido de carotenoides fue superior. Lo descrito se produjo por las características naturales propias de la materia vegetal y su elevado contenido de carotenoides, según lo expuesto por **Borguini et al. (2018)**. Esto conllevó a que se requiera un volumen superior de disolvente para incrementar

la solubilización de los metabolitos, controlando los niveles de los parámetros para evitar que se obtenga un extracto líquido muy diluido.

Por otra parte, considerando que los carotenoides se encuentran asociadas a otro tipo de macromoléculas tales como ácidos grasos y proteínas, requieren de pretratamientos que faciliten su extracción. En el presente ensayo dicho obstáculo fue superado con el secado y pulverización de las flores. Ya que, según **Kumar & Keum (2018)**, la disrupción celular por métodos de deshidratación y molienda incrementan el rendimiento de extracción de carotenos, al permitir que el disolvente orgánico penetre con mayor facilidad la matriz vegetal y, por ende, se dé la transferencia de masa.

A continuación, en la Figura 7 se expone el diagrama de barras con el error estándar, de acuerdo a los valores calculados en la Tabla 5. Con ello se visualizó el mejor tratamiento experimental, 1:70 con un tiempo de 90 minutos, y la letra **a** designada en función de prueba de Tukey determina que es el parámetro sobre el cual se extrajo el mayor contenido de carotenoides. A su vez, dicho valor es análogo a la relación 1:45 con un tiempo de 90 minutos, cuya codificación es **ab**, esto debido a que es el segundo parámetro con el que se obtuvo la mayor concentración de carotenoides.

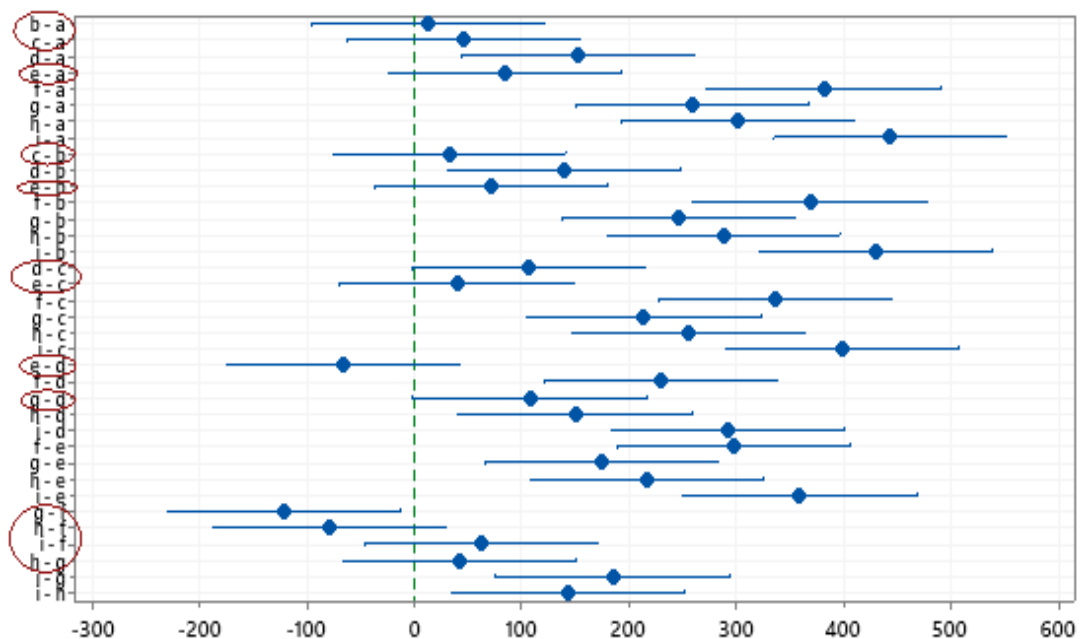


**Figura 7.** Diagrama de barras con error estándar correspondiente a la concentración de carotenoides. *Leyenda: MV/VD: Relación materia vegetal/ volumen de disolvente (1/20, 1/45, 1/70); t30- t60- t90: Tiempo de extracción en minutos (30,60, 90 min.)*

Por el contrario, los parámetros a través de los cuales se obtuvo la menor concentración de carotenos, corresponde a la relación 1:20 con un tiempo de 30 y 60 minutos respectivamente, ya que, con referencia a su codificación, la letra **f**, determina que no existe diferencia significativa entre las dos medias aritméticas.

Bajo este contexto, se representó en la Figura 8 las diferencias significativas presentes entre todas las parejas de medias aritméticas, efectuando comparaciones múltiples con un intervalo de confianza del 95% de Tukey. En el gráfico se observa una línea de referencia en el valor cero (0) para evaluar los intervalos de confianza. De tal manera, aquellos intervalos que se ubican en cero, corresponden a las parejas de medias que no presentan significancia, mientras que las restantes son aquellos promedios estadísticamente significativos.

Por consiguiente, se visualizó en la Figura 8 por ejemplo que, al comparar una pareja de medias aritméticas: 1:20 en un tiempo de 60 minutos, con respecto a 1:20 en un tiempo de 30 minutos (b-a), no existió diferencia significativa, debido a que su intervalo de confianza se ubica en 0, confirmando con ello lo expuesto en la Figura 5 en donde ambos valores fueron codificados con la letra **f**.



**Figura 8.** Intervalos de confianza de 95% de Tukey para comparaciones múltiples. *Leyenda:* **a:** 1/20-30 min; **b:** 1/20-60 min; **c:** 1/20-90 min; **d:** 1/45-30 min; **e:** 1/45-60 min; **f:** 1/45-90 min; **g:** 1/70-30 min; **h:** 1/70-60 min; **i:** 1/70-90 min. *Códigos encerrados:* Medias aritméticas no significativas.

Por lo tanto, al analizar todas las medias obtenidas de acuerdo a la interacción de los niveles de cada factor (A y B) (Figura 8), se precisó que no todas las medias aritméticas son iguales y con ello se acepta la Hipótesis alternativa establecida acorde a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, la cual menciona que al menos un valor promedio debe ser distinto al resto de valores calculados.

De tal manera, una vez desarrollada la exploración experimental se dedujo que los factores A y B incidieron en el proceso de extracción, ya que sus valores promedio presentaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides, por ello fueron incluidas en el modelo de superficie de respuesta para evaluar su significancia en la variable de respuesta, con el objetivo de obtener los valores óptimos.

#### 4.1.2. Análisis estadístico aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta

Una vez cuantificados los extractos líquidos se establecieron las condiciones óptimas que influyen en la extracción, para lo cual se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta  $3^2$  en el programa Statgraphics Centurión XVI.I (Anexo 4), que según **Arias (2014)**, permite obtener la variable de respuesta deseada (contenido máximo de carotenoides).

En la Tabla 6 se presenta el ANOVA correspondiente al diseño experimental propuesto.

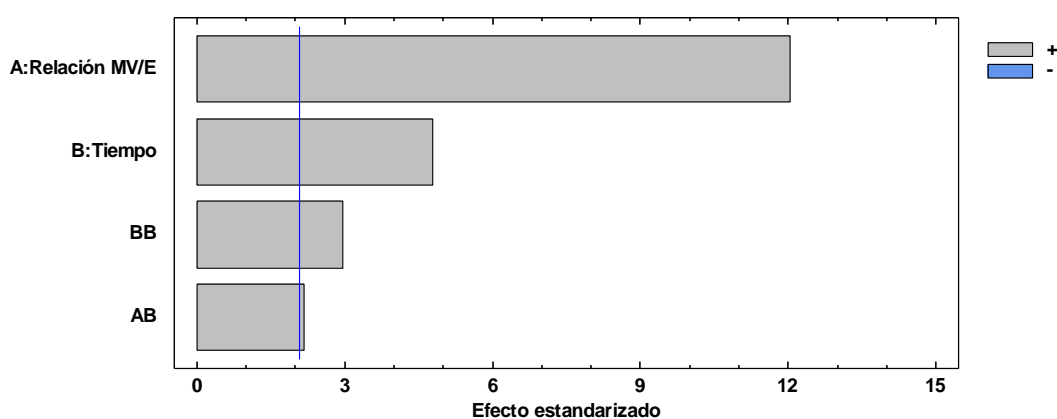
**Tabla 6.** Análisis de varianza para la extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:Relación MV/E</b>	444799,0	1	444799,0	144,65	0,0000
<b>B:Tiempo</b>	70738,1	1	70738,1	23,00	0,0001
<b>AB</b>	14528,7	1	14528,7	4,72	0,0419
<b>BB</b>	26785,1	1	26785,1	8,71	0,0079
<b>bloques</b>	8933,21	2	4466,6	1,45	0,2576
<b>Error total</b>	61500,4	20	3075,02		
<b>Total (corr.)</b>	627285,0	26			

Leyenda. Relación MV/E: Relación de material vegetal/ volumen de disolvente

Con el análisis de varianza, se determinó que el factor A y el factor B influyeron significativamente en la variable de respuesta con un valor de  $p < 0,05$  a un 95 % de confianza. De igual manera, la interacción cuadrática del tiempo influyó significativamente, ya que a medida que se incrementó el tiempo de extracción se obtuvo un mayor contenido de carotenoides. Finalmente, en lo que referente a la interacción del factor A y B, se dedujo que incidió en la respuesta experimental en menor proporción, ya que su valor  $p$  (0,04), se encontró cercano a 0,05.

Para constatar el ANOVA, en la Figura 9 se muestra el Diagrama de Pareto estandarizado en el cual se representa los efectos significativos de forma decreciente. Se visualizó y comprobó que el efecto del factor A es el que incide en mayor proporción de forma positiva en la extracción de carotenoides, seguido por el factor B y su interacción cuadrática. La interacción de los factores A y B afectan en menor relevancia al proceso de extracción, ya que la barra sobrepasa de forma mínima el efecto estandarizado (línea vertical) correspondiente al nivel de significancia (0,05). Con ello se infiere que, al disminuir las partes de materia vegetal con respecto al volumen de disolvente, se va a llegar a un punto en donde la solución se encontrará muy diluida y, por ende, a pesar de ampliar el tiempo de extracción, el contenido de carotenoides no será el máximo.



**Figura 9.** Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que influyen en la extracción de carotenoides.

A través del ANOVA se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,901 y un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado) de 0,872, sobre el que se determina la existencia de un elevado grado de correlación entre los valores que

predice el modelo y los valores observados. Además de ello, los valores obtenidos son superiores en comparación con los reportados por **Henry et al. (2016)**, donde obtuvo un  $R^2$  de 0,850 y un  $R^2$  ajustado de 0,760 en su estudio referente a la optimización de la extracción de flavonoides. Por lo tanto, se cumple lo establecido por **Gutiérrez & De La Vara (2012)**, ya que en su libro “*Análisis y diseños de experimentos*”, menciona que se requiere de un  $R^2$  ajustado de al menos el 0.70 para que la optimización y la predicción de la respuesta sea aceptada.

En la Tabla 7 se muestran los valores de los dos factores (A y B), con los cuáles se obtuvo la respuesta óptima.

**Tabla 7.** Valores de respuesta óptima

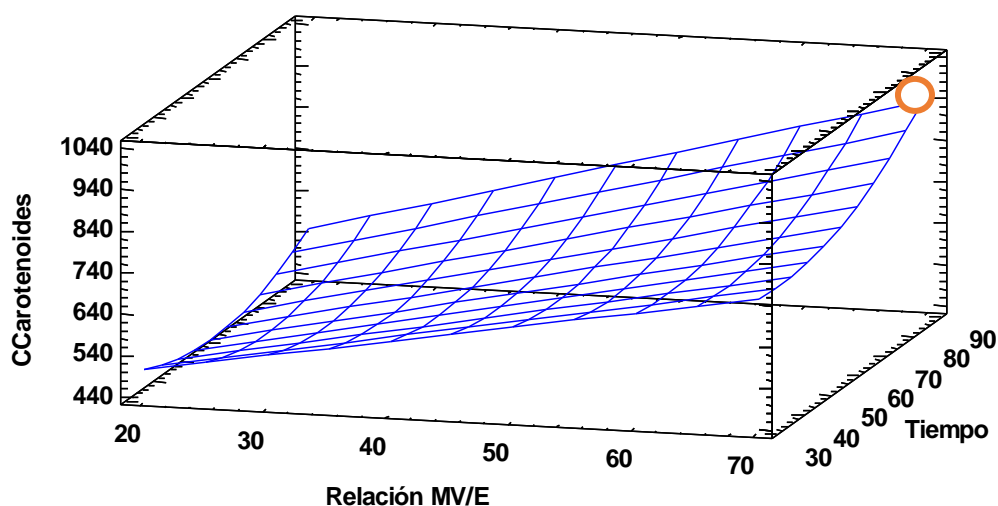
<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
<b>A:Relación MV/E</b>	20,0	70,0	70,0
<b>B:Tiempo</b>	30,0	90,0	90,0

La relación 1:70 correspondiente a relación de masa-volumen de disolvente, con un tiempo de 90 minutos, son los parámetros óptimos que influyeron en la extracción de carotenoides de la flor anaranjada del mastuerzo.

Además, la temperatura de 60 °C (parámetro fijo) favoreció la extracción de carotenoides, ya que según **Amaro et al. (2018)**, en su estudio sobre el desarrollo de un método mejorado para la extracción de carotenoides, reportó que al trabajar con esta temperatura se incrementa la velocidad de difusión permitiendo extraer los metabolitos, al posibilitar que las interacciones cohesivas (lípidolípido) y las interacciones adhesivas (lípidomatriz celular), sean superadas. En otro ensayo efectuado por **Fiallos (2019)**, se reportó que a un temperatura de 60 °C se obtiene el contenido máximo de carotenoides de la zanahoria, pues facilita que el disolvente penetre en los poros del material vegetal, favoreciendo la tasa de transferencia de masa.

A través del diseño experimental de superficie de respuesta, se logró analizar los parámetros operacionales que afectaron de forma positiva a la variable de respuesta, como se muestra en la Figura 10.





**Figura 10.** Gráfica de superficie de respuesta estimada de los factores que influyen en la extracción del contenido de carotenoides. *Leyenda. CCarotenoides: Concentración de carotenoides; Relación MV/E: Materia vegetal/ Volumen de disolvente*

Se observó en la gráfica de superficie de respuesta que con una relación de materia vegetal-volumen de disolvente 1:70, y un tiempo de 90 minutos, se extrajo el contenido máximo de carotenoides, obteniendo un valor óptimo de  $940,923 \pm 37,026$  mg de carotenoides/100g de sólidos extraídos. Esta concentración pertenece a la región de operabilidad, es decir, es el punto óptimo que se obtendrá si se efectúa el experimento sobre los parámetros establecidos a través del diseño, considerando que experimentalmente se obtuvo un valor cercano al mismo, se determina que en el ensayo deben controlarse estrictamente cada uno de los parámetros.

A su vez, la ecuación del modelo ajustado estuvo determinada por la siguiente expresión, y mediante ésta, se predecirá la concentración de carotenoides que se obtendrá en base a la relación MV/E y tiempo de extracción.

$$\begin{aligned}
 & \text{Concentración de carotenoides} \\
 & = 603,615 + 3,50426 * \frac{\text{Relación materia vegetal}}{\text{Volumen disolvente}} - 8,90671 \\
 & * \text{Tiempo de extracción} + 0,046394 * \frac{\text{Relación materia vegetal}}{\text{Volumen disolvente}} \\
 & * \text{Tiempo de extracción} + 0,0742384 * \text{Tiempo de extracción}^2
 \end{aligned}$$

**Ecuación 6.** Determinación de la concentración de carotenoides

Por otra parte, el contenido de carotenoides fue superior al reportado por **Juscamaita et al. (2017)**, ya que en su estudio referente al contenido de carotenoides de la flor amarilla del mastuerzo en estado fresco, obtuvo aproximadamente 358 mg de

carotenoides/100g de sólidos extraídos, y en los pétalos deshidratados el dato reportado fue de 254 mg de carotenoides/100g de sólidos extraídos.

De esta manera, se deduce que los pétalos anaranjados de la flor de mastuerzo presentan un mayor contenido de carotenoides, debido a la influencia de varios factores, como son la madurez, la variedad de la flor, el clima y el sitio de recolección (**Cheng et al., 2020**). Por consiguiente, es importante resaltar que el estrés por calor, contaminación o sequía son perniciosos en la estabilidad y contenido de carotenoides.

Ya en el proceso poscosecha referente al proceso de extracción, la relación 1:70 facilitó la obtención de carotenoides, ya que, al disminuir la cantidad de materia vegetal, el solvente no se sobresaturó, posibilitando que los carotenoides se solubilizan en mayor cantidad en el etanol y, por ende, se obtuvo un mayor rendimiento. Por esta razón, la concentración fue superior al reportado por **Camavilva & Leyva (2015)**, en donde se determinó en la flor anaranjada de mastuerzo un contenido de 982,130  $\mu\text{g}$  de carotenos/ 100 g de base seca al realizar el ensayo en base a una relación 1:20.

Fundamentalmente, es importante recalcar que la eficiencia de extracción es dependiente de las propiedades naturales de matriz vegetal con la que se trabaje, pues, si está presenta un bajo contenido de carotenoides, el añadirle más disolvente no va a favorecer su extracción, debido a que la solución se va a diluir rápidamente.

Los carotenoides están expuestos a la oxidación enzimática y no enzimática, debido a los prolongados tiempos de extracción, las elevadas temperaturas y la exposición a la luz. Por ello, es fundamental considerar estos parámetros en futuros estudios, ya que, en caso de trabajar a una temperatura superior o alargar el tiempo de extracción, se puede originar la degradación e isomerización de los carotenoides de los pétalos de la flor anaranjada de mastuerzo, provocando que pierdan su actividad antioxidante. Por lo tanto, es recomendable llevar a efecto los ensayos en un intervalo de temperatura que oscile entre 40 °C y 65°C (**Cardona, Ríos, & Restrepo, 2006; Rodríguez, 2001**).

### 4.1.3. Análisis de la eficiencia de extracción

La eficiencia de extracción depende de las propiedades naturales propias de la materia vegetal (soluto), lo cual determina que sus metabolitos puedan ser disueltos en el disolvente orgánico. Por ello se trabajó con etanol al 96%, ya que es un alcohol que está conformado por un grupo lipofílico (tipo alcano R-H) y un grupo hidroxilo (OH) (Elvir, 2016). En consecuencia, el grupo lipófilo es el que favorece que los carotenoides sean solubilizados, ya que interactúa directamente con estos pigmentos orgánicos.

Norshzila et al. (2017), reporta que el etanol es un excelente disolvente para extraer carotenoides de matrices vegetales. En consecuencia, en la extracción convencional fue fundamental estudiar la influencia de los parámetros que posibiliten la extracción.

En primer lugar, se realizó el análisis de cada Factor (A y B) a través de la prueba de Tukey. Con ello se verificó la presencia de diferencias significativas entre las medias experimentales, conforme a los valores calculados a través de la Ecuación 5 (Anexo3).

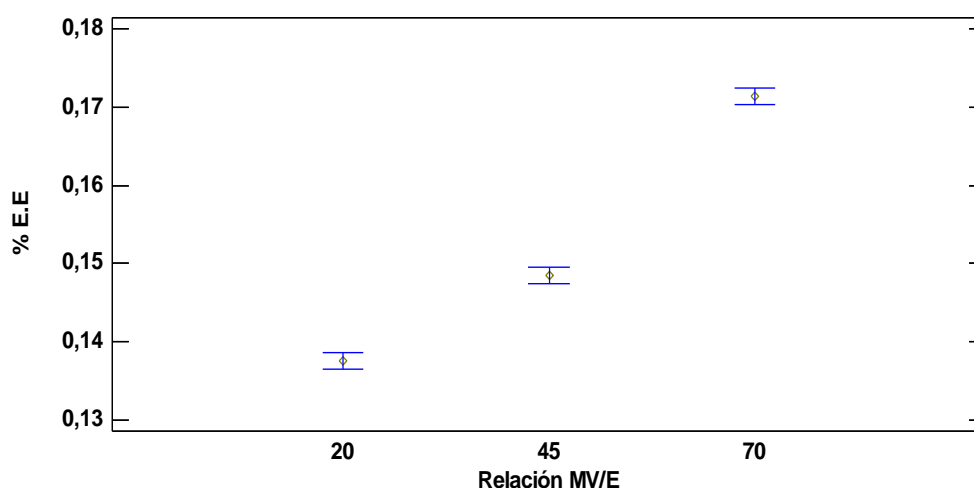
En la Tabla 8 se presentan las medias aritméticas de la Eficiencia de extracción para el Factor A.

**Tabla 8.** Eficiencia de extracción para el Factor A

<b>Relación MV/E</b>	<b>Media (% E.E)</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Agrupación</b>
20	0,138	0,0019	c
45	0,148	0,0019	b
70	0,171	0,0019	a

Leyenda. %E.E : % Eficiencia de extracción

La información fue agrupada utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%, determinado que las medias que no comparten la misma letra son estadísticamente significativas.



**Figura 11.** Gráfico de prueba de múltiples rangos de Tukey para el Factor A. *Leyenda.* % E.E: % Eficiencia de extracción; Relación MV/E: Materia vegetal / Volumen de disolvente

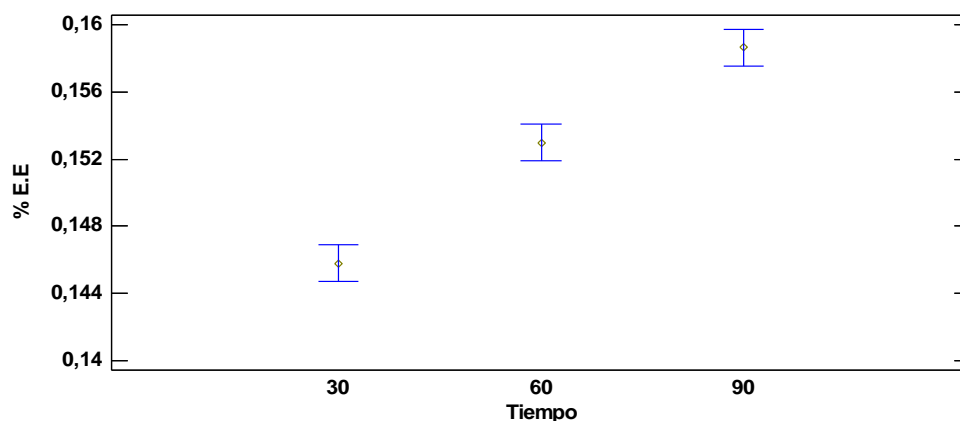
En la Figura 11 se observó que, en el intervalo de 20 a 70 partes de volumen de disolvente, se presentaron diferencias significativas en sus medias (valores promedio de 3 réplicas), determinando una relación directamente proporcional, ya que, al incrementar las partes de volumen de disolvente la eficiencia fue superior, obteniendo en 1:70 el valor más alto de  $0,171 \pm 0,0019\%$ . Fundamentalmente, se deduce que, al incrementar el volumen de etanol, se evitó que la muestra se sobresature, es decir, que tenga un contenido mayor de materia vegetal superior a la que puede disolver.

En la Tabla 9 se presentan las medias aritméticas de la Eficiencia de extracción para el Factor B.

**Tabla 9.** Eficiencia de extracción para el Factor B

Tiempo (minutos)	Media	Error estándar	Agrupación
30	0,146	0,006	c
60	0,153	0,006	b
90	0,159	0,006	a

Las medias determinadas a través de comparaciones múltiples de Tukey estableció que existe diferencia significativa entre ellas ya no comparten la misma letra.



**Figura 12.** Gráfico de prueba de múltiples rangos de Tukey para el Factor B. *Leyenda. % E.E: % Eficiencia de extracción; Tiempo expresado en minutos (30,60, 90)*

De igual manera en la Figura 12, se encontró significancia en los valores promedio, deduciendo de tal modo que es recomendable trabajar en un tiempo de 90 minutos, ya que no se vio afectada la extracción. El valor menor corresponde al tiempo de 30 minutos con un rendimiento de  $0,146 \pm 0,06$  %, mientras que el valor más alto es de  $0,159 \pm 0,06\%$  alusivo al tiempo de 90 minutos. Este último dato mencionado, es menor comparándolo con la eficiencia obtenida para la relación MV/E. Por consiguiente, el Factor A es el que influye en gran parte en la eficiencia de extracción.

Una vez desarrollado el análisis experimental, en la Tabla 10 se presenta el ANOVA que permite determinar la significancia de los Factores A y B en la variable de respuesta (eficiencia de extracción).

**Tabla 10.** Análisis de varianza para la eficiencia de extracción de carotenoides

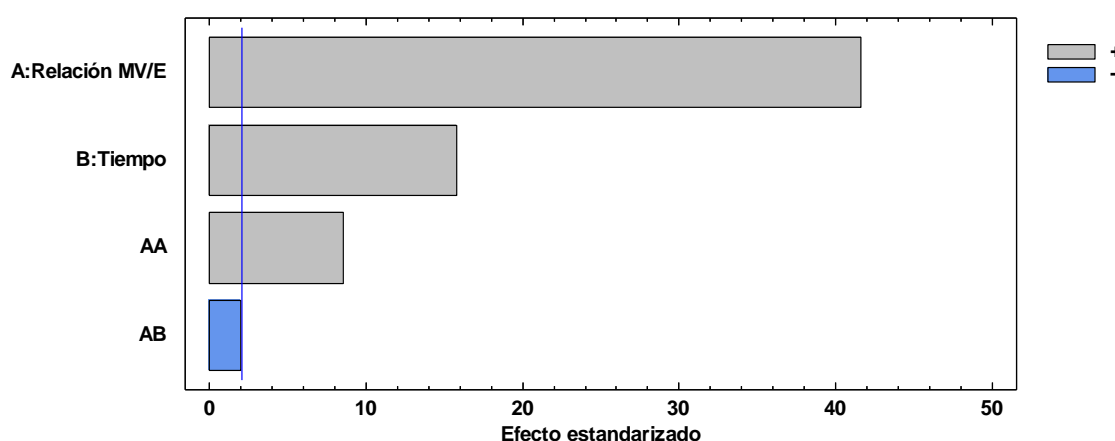
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A:Relación MV/E</b>	0,00516806	1	0,00516806	1731,23	0,0000
<b>B:Tiempo</b>	0,000747556	1	0,000747556	250,42	0,0000
<b>AA</b>	0,000220019	1	0,000220019	73,70	0,0000
<b>AB</b>	0,000012	1	0,000012	4,02	0,0587
<b>bloques</b>	0,00000540741	2	0,0000027037	0,91	0,4202
<b>Error total</b>	0,0000597037	20	0,00000298519		
<b>Total (corr.)</b>	0,00621274	26			

Nota. Relación MV/E: Relación de material vegetal con volumen de disolvente

El factor A y el factor B influyeron directamente en la eficiencia de extracción de carotenoides con un  $p < 0,05$  a un nivel de confianza del 95%. La interacción cuadrática del factor A también incidió positivamente en la respuesta experimental, ya que al incrementar la relación de materia vegetal/ volumen de disolvente, la eficiencia de extracción se vio favorecida.

Los valores que predice el modelo se ajustaron a un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,987, a través del mismo se precisa que existe un elevado grado de correlación con los datos observados experimentalmente. Igualmente, este es un indicativo de que los niveles de los parámetros estudiados fueron lo suficientemente amplios para medir las variaciones sobre la variable de respuesta, de modo que, se puede evaluar su efecto al cambiar de un nivel a otro (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

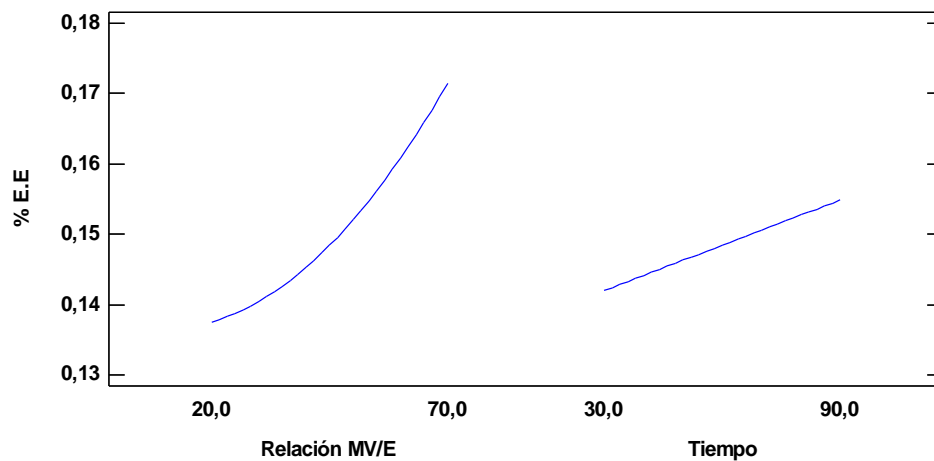
La interacción de los factores A y B influyeron negativamente en la respuesta, registrándose un valor de  $p > 0,05$ , con ello se precisa que si se superan las 70 partes de volumen de disolvente se puede obtener una solución muy diluida, e incrementando el tiempo de extracción de 90 minutos, se puede conllevar a la degradación de los carotenoides por las reacciones de isomerización generadas por efecto de la temperatura. Lo descrito se visualiza en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 13), en donde la interacción AB sobrepasa el efecto estandarizado.



**Figura 13.** Diagrama de Pareto estandarizado de los factores que influyen en la eficiencia de extracción de carotenoides.

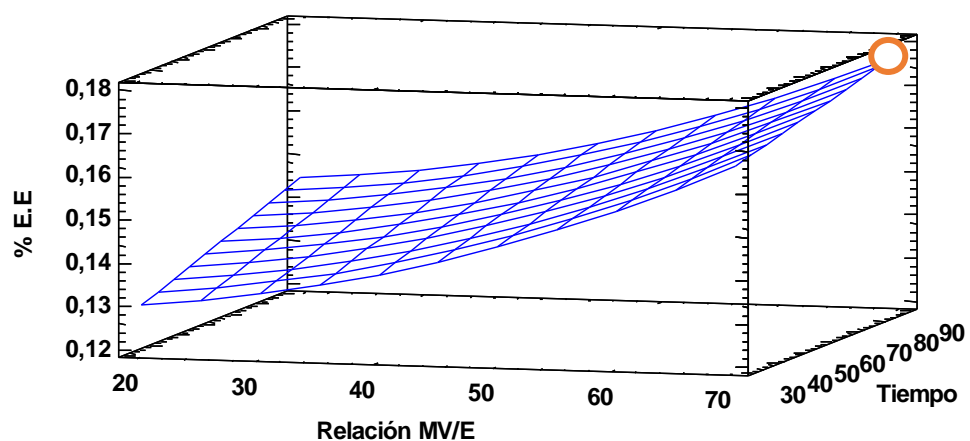
En la figura 14 se observa que el efecto del factor A es el que incide en mayor proporción en comparación con el tiempo de extracción, verificando con ello lo

determinado en el análisis experimental por medio de la prueba de Tukey. Es decir, el incrementar las partes de volumen de disolvente influyó en gran medida para que los metabolitos sean solubilizados al facilitar la transferencia de masa, hasta llegar a su punto máximo 1:70. **Henry et al. (2016)**, menciona que bajas cantidades de disolvente inciden para que se alcance de manera instantánea la fase de equilibrio entre el disolvente y el soluto, por lo tanto la transferencia de masa se detiene.



**Figura 14.** Gráfico de efectos principales que influyen en la eficiencia de extracción

A través de un gráfico de superficie de respuesta (Figura 15) se visualizó el porcentaje de eficiencia de extracción, el cual se ve influenciado por los dos factores: A y B.



**Figura 15.** Gráfico de superficie de respuesta de la eficiencia de extracción. *Leyenda.* % E.E.: % Eficiencia de extracción; Relación MV/E: Materia vegetal/ volumen de disolvente; Tiempo de extracción en minutos

El porcentaje de eficiencia de extracción optimizado fue de 0,177% , correspondiente a 70 partes de volumen de disolvente con un tiempo de 90 minutos. Con ello se verifica que dichos parámetros son los que influyeron en las variables de respuesta, es decir, a medida que se vio favorecida la eficiencia de extracción, el contenido de carotenoides fue superior. Otro de los aspectos a resaltar es que, el rendimiento es superior al reportado por **Pérez (2019)** y **Pazmiño (2019)**, en donde se obtuvo una eficiencia de 0,008 y 0,007% respectivamente en la extracción de licopeno del tomate del árbol utilizando como disolvente etanol.

Por otra parte, la eficiencia de extracción es menor a la registrada por **Calderón & Vera (2018)**, cuyo rendimiento de extracción de carotenos de mango alcanzó un valor de 27,24 %. Esto se debe a que utilizó una extracción asistida por ultrasonido a temperatura ambiente, la cual facilita la ruptura de las membranas celulares, liberando los carotenoides, sin embargo, se requiere de mayor consumo de energía.

El método de extracción utilizado (sólido-líquido), no requirió del uso de equipos sofisticados, permitiendo determinar el contenido de carotenos de forma rápida y sin gastar muchos recursos. Al utilizar etanol, se evitó la exposición a vapores orgánicos peligrosos, ya que según **Cheng et al. (2020)**, es un solvente amigable con el medio ambiente y seguro en la industria alimentaria.

Por consiguiente, se puede deducir que el porcentaje de eficiencia de extracción obtenido en la presente investigación es consecuente con el método convencional utilizado, considerando que para incrementar el rendimiento se requerirá efectuar una mezcla de disolventes y utilizar otros métodos de extracción no convencionales.

#### **4.1.4. Análisis de múltiple respuesta**

En el aparatado anterior las respuestas (Concentración de carotenoides y % Eficiencia de extracción) fueron analizadas y optimizadas por separado, sin embargo, puede darse el caso que, al optimizar una variable la otra se vea afectada y, por lo tanto, el rendimiento global del proceso tenga un resultado desfavorable.

Por consiguiente, se aplicó la función de deseabilidad, misma que permitió combinar las dos respuestas de forma simultánea, transformando los valores óptimos en valores adimensionales entre 0 y 1 (Tabla 11). De ahí que, un valor de 0 determina una



respuesta inaceptable (no se extraen los carotenoides) y un valor de 1 representa un respuesta excelente y deseable (se máxima la extracción de carotenoides al 100%) (Anexo 5), según lo expuesto por **Ivanovna & López (2018)**.

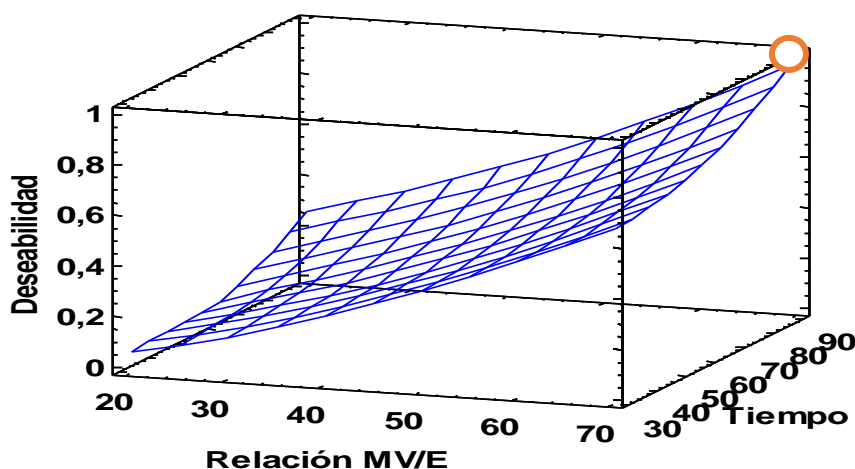
**Tabla 11.** Deseabilidad individual y global de las respuestas óptimas

Respuesta	Optimizado	Predicción	Deseabilidad	Deseabilidad global
CCarotenoides	si	940,923	0,954	0,970
% E.E	si	0,177	0,987	

Leyenda: CCarotenoides: Concentración de carotenoides; % E.E: % Eficiencia de extracción

En la concentración de carotenoides se obtuvo una deseabilidad individual aceptable y deseable de 0,954, al igual que en la eficiencia de extracción con un valor de 0,987. Mientras que la deseabilidad global para las dos respuestas fue de 0,970, por ende, se determinó que el proceso alcanzó el desempeño máximo con los factores A y B en sus niveles: relación MV/E 1:70 y tiempo de 90 minutos. Es decir, se comprueba que este el punto óptimo con el que se alcanzó las respuestas deseadas, por lo tanto, con estos parámetros operacionales se aisló el contenido máximo de carotenoides a medida que se optimizó la eficiencia de extracción.

El valor de deseabilidad global obtenido es análogo al registrado por **Jofre et al. (2020)**, el cual obtuvo un valor de 0,928 al optimizar la masa de material vegetal, solvente, y tiempo de extracción de carotenoides provenientes de residuos agroindustriales del orujo.



**Figura 16.** Gráfico de deseabilidad para la extracción de carotenoides la flor de mastuerzo

En la Figura 16 se expone que, con 70 partes de volumen de etanol y con un tiempo de 90 minutos, se optimizaron de manera simultánea las dos respuestas, alcanzando una deseabilidad de 0,970. De ahí que, el Factor A no influirá negativamente en el Factor B y viceversa, por ende, es factible llevar a efecto el ensayo en los niveles establecidos para cada variable.

#### **4.1.4. Obtención del extracto concentrado de carotenoides**

A partir de la relación materia vegetal/ volumen de disolvente 1:70 con un tiempo de 90 minutos se obtuvo el extracto concentrado de carotenoides, para lo cual se utilizó un rotaevaporador (IKA 8). Se desarrolló una destilación al vacío que favoreció la reducción de la presión, forzando con ello la evaporación del etanol, pues éste alcanzó un punto de ebullición más bajo (**Buchi Labortechnik, 2016**).

Se trabajó con una velocidad de rotación de  $200 \text{ min}^{-1}$ , lo cual garantizó una mayor velocidad de evaporación y con ello se evitó que se sobrecaliente la muestra, además la temperatura del baño calefactor de  $68^{\circ}\text{C}$  facilitó el proceso de destilación. Con lo expuesto se protege a los carotenoides de la degradación, llevándose a efecto la destilación en un tiempo menor.

El porcentaje de humedad fue determinado a través de un método termogravimétrico con ayuda de una balanza de humedad (KERN MLS 50-3). La transmisión de calor en la balanza se dio a través de ondas infrarrojas que atravesaron la muestra, secándola homogéneamente y que permitieron cuantificar la humedad (**Ibérica, 2016**). Con ello se cuantificó una humedad de  $80,593 \pm 0,875 \%$ , lo que hace alusión al contenido de disolvente orgánico y de agua presentes aún en la masa de la muestra. Dicho valor puede ser utilizado en análisis posteriores para darle estabilidad al componente activo, como por ejemplo a través de la microencapsulación, ya que, en esta tecnología se requiere preparar una emulsión, y a través del porcentaje de humedad del componente activo se analiza la cantidad de agua y polímeros a utilizar para preparar la misma.

El valor de humedad correspondiente al concentrado, fue menor al cuantificado en el extracto líquido, mismo que alcanzó un valor promedio de  $99,641 \pm 0,007 \%$  (Anexo 3). Por lo tanto, se precisa que, al pasar el extracto líquido por el proceso de

destilación al vacío se logró concentrar los metabolitos, debido a su reducción en el porcentaje de humedad.

Es importante resaltar que, para disminuir aún más el contenido de humedad en la muestra y eliminar el etanol, se debe llevar a cabo un secado por aspersión, en el cual se obtiene un polvo vitamínico con un porcentaje de humedad entre 3 y 8 %, proporcionándole estabilidad al componente activo. Es así que, tanto en la industria alimentaria y farmacéutica, es fundamental controlar el contenido de agua presente en la masa de la muestra mediante la determinación de la humedad, de manera que no afecte la estabilidad y almacenaje del producto final (Tews, 2017).

Finalmente, el extracto concentrado fue almacenado en refrigeración a 4°C, en base al protocolo descrito por Tahir et al. (2018), el cual menciona que a esta temperatura la estabilidad de los carotenoides se ve afectada únicamente en aproximadamente 19% después de 50 días. A diferencia de temperaturas elevadas de almacenamiento (45°C), donde considerando el mismo tiempo, se genera una pérdida de los pigmentos en un 62 %.

#### **4.2. Verificación de hipótesis**

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos:

- Se rechaza la hipótesis nula
- Se acepta la hipótesis alternativa, ya que se determinaron los parámetros operacionales óptimos que permitieron extraer el contenido máximo de carotenoides de *Tropaeolum majus* L.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se optimizó el proceso de extracción de carotenoides de la flor de mastuerzo aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR), por medio del cual se logró aislar el contenido máximo de metabolitos al controlar las condiciones operacionales de extracción: relación materia vegetal/volumen de disolvente y tiempo de extracción.
- Se determinó el contenido de carotenoides presentes en la flor anaranjada de mastuerzo, llevando a efecto los ensayos experimentales a una temperatura de 60 °C y utilizando etanol al 96 %, se obtuvo con 70 partes de volumen de disolvente y un tiempo de 90 minutos la concentración máxima de  $929,447 \pm 19,246$  mg carotenoides/ 100g de sólidos extraídos, mientras que la concentración más baja se dio con 20 partes de etanol y un tiempo de 30 minutos, registrando un valor de  $487,050 \pm 11,183$  mg carotenoides/ 100g de sólidos extraídos.
- A través de la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño experimental  $3^2$  se estableció los parámetros operacionales óptimos que influyen en el proceso de extracción de carotenoides de la flor anaranjada de mastuerzo, siendo estos 70 partes de volumen de etanol con un tiempo de 90 minutos, y a través del modelo estadístico se optimizó el contenido máximo de metabolitos a  $940,923 \pm 37,026$  mg de carotenoides/100 g de sólidos extraídos, lo que hace mención a su elevado contenido de carotenos con respecto a otras especies del mismo género.
- Se evaluó el efecto de la Relación materia vegetal/ volumen de disolvente y del tiempo sobre la eficiencia de extracción, determinado que con 70 partes de volumen de etanol se extraen los metabolitos en un 0,171 %, mientras que con un tiempo de 90 minutos la eficiencia alcanzó un valor de 0,146 %. Ambos factores influyeron de forma positiva en la extracción y por lo tanto fueron optimizados a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR), obteniendo una eficiencia final de 0,177 %. Finalmente, la deseabilidad global del proceso adquirió un valor de 0,970 para las respuestas óptimas.

## 5.2. Recomendaciones

- Extraer los carotenoides de la flor anaranjada de mastuerzo utilizando otros disolventes orgánicos tales como: éter de petróleo, cloroformo y hexano.
- Estudiar el efecto de la aplicación de métodos no convencionales para la extracción de carotenoides: Microondas, fluidos supercríticos y ultrasonido.
- Incrementar la relación de materia vegetal-volumen de disolvente (1:70) y el tiempo de extracción (90 min.) para evaluar la estabilidad de los carotenoides.
- Microencapsular los carotenoides de la flor anaranjada de mastuerzo para su conservación.
- Desarrollar ensayos sobre el efecto de los carotenoides de la flor de mastuerzo en el tratamiento terapéutico de la enfermedad COVID-19 ocasionada por la infección del virus SARS COV-2.

## Bibliografía

- Abril, N., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., ... Túnez, I. (2010). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas* (pp. 1–8). Córdoba.
- Aguilar, D. A., Avalos, S. P., Marquillo, I., Rojas, P., & Marquillo, I. (2017). Efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “ mastuerzo ” sobre la micosis inducida por *Trichophyton mentagrophytes* en *Rattus norvegicus* Effect of the ethanol extract of *Tropaeolum majus* mycosis in *Rattus norvegicus*. *Acta Médica Peruana*, 34(3), 196–202. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v34n3/a06v34n3.pdf>
- Alfaro, J., & Farje, R. (2016). *Temperatura de secado y concentración de carragenina en las características físicas y antocianinas del extracto atomizado del mastuerzo ( Tropaeolum majus )* (pp. 39–41). Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., Preto, M. A. C., & Malcata, F. X. (2018). Gloeotheca sp . as a Nutraceutical Source — An improved method of extraction of carotenoids and fatty acids. *Marine Drugs*, 16(327), 1–17. <https://doi.org/10.3390/md16090327>
- Amparo, L., Marchena, U., Alejandra, G., Parra, M., Adelaida, M., Quiroz, C., ... Gómez, B. D. (2009). *Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud*. 11(1), 27–38.
- Arellano, K., & Herrera, J. (2015). *Evaluación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del extracto de tres variedades de flor de mastuerzo (Tropaeolum majus)* (pp. 50–54). Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Arias, A. (2014). *Optimización de la producción de carotenoides por haloferax sp . utilizando el método de superficie de respuesta* (Universidad Mayor de San Marcos; pp. 15–16). Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/723a/867aeff03db95d4507e719e8257c31f17efe.pdf>
- Augusto, F., & Barros, R. De. (2020). Capacidade antioxidante de flores de capuchinha ( *Tropaeolum majus* L .). *Revista Ponto de Vista*, 9(1), 73–84. Retrieved from <https://periodicos.ufv.br/RPV/article/view/9632/5790>
- Bastidas, C., & Llacua, L. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (Tropaeolum majus L.) frente al crecimiento del microorganismo Penicillium sp.* (p. 5). Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Boon, C., McClements, D., Weiss, J., & Decker, E. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Food Science and Nutrition*, 50(6), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408390802565889>

- Borguini, R., Botrel, N., Pacheco, S., Nascimento, L., Santiago, M., & Godoy, R. (2018). Flores de capuchinha: uma hortaliça não-convencional rica em carotenoides. *Agroecología e Agriculturas*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/2236-7934>
- Brondani, C., Cuelho, F., Helena, C., Marangoni, D., Guex, G., Bonilha, D. F., & Manfron, P. (2016). Traditional usages , botany , phytochemistry , biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L . - A review. *Boletín Lationamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(4), 264–273.
- Buchi Labortechnik, A. (2016). *Rotavapor ® R-300 Manual de instrucciones* (pp. 1–72). pp. 1–72. Retrieved from [https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593667\\_R-100\\_BA\\_es\\_C\\_0.pdf?a1ada21f67298c86cd2efb200abacabe890e3a87](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593667_R-100_BA_es_C_0.pdf?a1ada21f67298c86cd2efb200abacabe890e3a87)
- Cabezas, G. (2014). *Evaluación del efecto cicatrizante de extractos a base de mastuerzo (Tropaeolum majus) en ratones (Mus musculus)* (pp. 18–49). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Calderón, S., & Vera, E. (2018). Extracción de Carotenos de Cáscara de Mango (*Mangifera indica*) con mezclas de Solventes y Extracción Asistida. *Bionatura*, 1(1), 1–21. Retrieved from <https://www.revistabionatura.com/files/CS-2018.01.01.6---Revista-bionatura.pdf>
- Camavilva, M., & Leyva, M. (2015). *Identificación de antocianinas y carotenoides en flores de mastuerzo (Tropaeolum majus) por cromatografía de capa fina* (p. 97). Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Cardona, E., Ríos, L., & Restrepo, G. (2006). EXTRACCIÓN DEL CAROTENOIDE LICOPENO DEL TOMATE CHONTO ( *Lycopersicon esculentum* ). *Facultad de Química Farmacéutica*, 13(2), 44–53.
- Casas, A. I., Nogales, C., Mucke, H. A. M., Petraina, A., Cuadrado, A., Rojo, A. I., ... Schmidt, H. H. H. W. (2020). On the Clinical Pharmacology of Reactive Oxygen Species. *Pharmacol*, pp. 802–822. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019422>
- Challem, J., & Block, M. (2008). Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. *Guías Prácticas de Salud, Nutrifarmacia y Medicina Natural*. Retrieved from <http://www.aglutinaeditores.com/media/resources/public/ff/ff3d/ff3d75f6181a4b01ba98e11ca4b7b312.pdf>
- Cheng, S., Khoo, H. E., Kong, K. W., Prasad, K. N., & Galanakis, C. M. (2020). Extraction of carotenoids and applications. In *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 259–288). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817067-0.00008-7>

- Choque, S., & Corilla, G. (2015). *Influencia de la temperatura del aire de entrada y la concentración de maltodextrinas en la humedad final y contenido de antocianinas en el secado por atomización de las flores del matuerzo (Tropaeolum majus L.)* (pp. 18–34–67–85). Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Cruz, F. (2019). *Capacidad antioxidante del yogurt funcional con adición de antocianinas de mastuerzo (Tropaeolum majus L.)* (Universidad Nacional del Centro del Perú; pp. 12–19). Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/5938/T010\\_47535515\\_T\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/5938/T010_47535515_T_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- De Zan, A. (2006). *Principios de metodología de superficie de respuesta para modelos logísticos* (Universidad Politécnica de Catalunya; pp. 10–17). Retrieved from <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/6518/01Atz01de15.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Del Ángel, M., García, P., Lagunes, L., García, R., & Cabrera, E. (2015). Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con TiO<sub>2</sub> sol-gel sulfatado. *Int. Contam. Ambie.*, 31(1), 99–106. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v31n1/v31n1a8.pdf>
- Díaz, A. A., Veliz, P. M., Rivas-mariño, G., Mafla, C. V., María, L., Altamirano, M., & Jones, V. (2017). Etiquetado de alimentos en Ecuador: implementación, resultados y acciones pendientes. *Revista Panamericana de Salud*, 41(2), 1–8. Retrieved from <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2017.v41/e54/es>
- Diaz, C., Grande, C., Escobar, V., Vallejo, W., & Muñoz, A. (2020). Valorization of agraz (*vaccinium meridionale*) waste as antioxidant against singlet oxygen and free radicals. *Prospectiva*, 18(2), 3–15.
- Elvir, J. R. (2016). Efecto del Etanol sobre las Membranas Biológicas. *Médica Hondurena*, 61(1), 20–24. Retrieved from <http://cidbimena.desastres.hn/RMH/pdf/1993/pdf/Vol61-1-1993-4.pdf>
- Fiallos, H. (2019). *Extracción y microencapsulación de carotenoides con actividad antioxidante a partir de Daucus carota* (Universidad Técnica de Ambato). Retrieved from <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/29998>
- Fon, F., & Zumbado, H. (2020). *Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales* (pp. 1–106). Retrieved from <http://colloquium-biblioteca.com/index.php/web/article/view/43/39>
- Gamara, F., & Ramos, M. (2017). *Extracción por diclorometano y CO<sub>2</sub> supercrítico de isocinato de bencilo a partir de hojas de mastuerzo (Tropaeolum majus L.)* (pp. 17–35–49). Universidad Nacional del Centro de Perú.



- Gholamian-dehkordi, N., Luther, T., Asadi-samani, M., & Mahmoudian-sani, M. R. (2017). An overview on natural antioxidants for oxidative stress reduction in cancers ; a systematic review. *Immunopathol*, 3(2), 1–7. <https://doi.org/10.15171/ipp.2017.04>
- Girón, J., & Ordóñez, L. (2016). Determinación de la concentración de pigmentos carotenoides en harina de residuos de chontaduro ( *Bactris gasipaes* ). *Producción + Limpia*, 11(1), 85–93.
- Gómez, C., Suñer, F., Gil, S., & Valls, B. (2020). *Fundamentos de la Extracción Sólido-Líquido* (pp. 1–8). Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/147097>
- Guevara, J. (2020). *Extracción y microencapsulado de carotenoides con actividad antioxidante a partir de Pouteria sapota* (pp. 1–49). Universidad Técnica de Ambato.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos* (pp. 385–398). Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/44401609\\_Analisis\\_y\\_Disenio\\_de\\_Experimentos](https://www.researchgate.net/publication/44401609_Analisis_y_Disenio_de_Experimentos)
- Gutiérrez, R., Reyes, C., Martínez, J., López, J., & Lazalde, B. (2018). Estrés oxidativo : promotor de enfermedades. *Electrónica Semestral En Ciencias de La Salud*, 1(9), 1–9. Retrieved from <http://148.217.50.37/index.php/ibnsina/article/view/91>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 2, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
- Hemmati, M., Valilo, M., & Kalantary-charvadeh, A. (2019). Neuroscience Letters Oxidative stress and Parkinson ’ s disease : con fl ict of oxidant-antioxidant systems. *Neuroscience Letters*, 709(February). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134296>
- Henry, Y., Salomón, S., Acosta, J., Romero, A., López, M., & Mercado, J. (2016). Optimization of variables for extraction of flavonoids from *Annona muricata* L . leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 298–308. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n3/pla05316.pdf>
- Hernández, E., Nava, A., Monteon, A., & García, P. (2020). Perfiles bioquímicos foliares de cultivares de mando amarillo de reciente introducción en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(59), 11. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Abraham\\_Monteon/publication/342107316\\_PERFILES\\_BIOQUIMICOS\\_FOLIARES\\_DE\\_CULTIVARES\\_DE\\_MANGO\\_AMARILLO\\_DE\\_RECIENTE\\_INTRODUCCION\\_EN\\_MEXICO/links/5ee859c7458515814a628ea9/PERFILES-BIOQUIMICOS-FOLIARES-DE-CULTIVARES-DE-MANGO-AMARILLO-DE-RECIENTE-INTRODUCCION-EN-MEXICO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Abraham_Monteon/publication/342107316_PERFILES_BIOQUIMICOS_FOLIARES_DE_CULTIVARES_DE_MANGO_AMARILLO_DE_RECIENTE_INTRODUCCION_EN_MEXICO/links/5ee859c7458515814a628ea9/PERFILES-BIOQUIMICOS-FOLIARES-DE-CULTIVARES-DE-MANGO-AMARILLO-DE-RECIENTE-INTRODUCCION-EN-MEXICO.pdf)

- Ibérica, P. (2016). *Instrucciones de uso de la balanza para medición de humedad* (pp. 4–32). Retrieved from <https://www.pce-iberica.es/manuales/manual-balanza-humedad-pce-mb.pdf>
- Ivanovna, S., & López, V. (2018). Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajos restricciones. *Revista EIA*, 15(30), 13–24. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/v15n30/2463-0950-eia-15-30-13.pdf>
- Jara, A. (2018). *Optimización de los parámetros de extracción de flavonoides de la Chijchipa (Tagetes mandonii), utilizando el método de superficie de respuesta* (Universidad San Ignacio de Loyola; p. 74). Retrieved from [http://repositorio.usil.edu.pe/bitstream/USIL/8543/1/2018\\_Jara-Angeles.pdf](http://repositorio.usil.edu.pe/bitstream/USIL/8543/1/2018_Jara-Angeles.pdf)
- Jiménez, M. (2015). Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Varianza*, 11, 31–36.
- Jofre, V., Assof, M., Vargas, E., & Fanzone, M. (2020). Determinación simultánea de carotenoides y fenoles en subproductos agroalimentarios: Microextracción Líquido-Sólido Asistida por Ultrasonido optimizada por metodologías de diseño experimental. *Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de La Tierra*, 4(5), 20–28.
- Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>
- Juscamaita, L., Salvatierra, T. P., Silva, C. E., Quispe, M., Juscamaita, L., Pérez, T., & Espinoza, C. (2017). Evaluación de la estabilidad de carotenoides y actividad antioxidante de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) en la microencapsulación por spray-drying. *Revista de La Sociedad Química de Perú*, 83(3), 282–293.
- Kirtonia, A., Sethi, G., Garg, M., & Artesunate, A. R. T. (2020). The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2(1), 3–25. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03536-5>
- Kumar, R., Hyun, S., & Keum, Y. (2018). An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids. *Food Research International*, 108, 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.003>
- Kumar, R., & Keum, Y. (2018). Carotenoid extraction methods : A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240(2), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Lara, L., & Pomboza, P. (2019). *Evaluación del contenido de isotiocianatos de los extractos vegetales de mashua (Tropaeolum tuberosum), Mostaza (Raphanus raphanistrum L.) y mastuerzo (Tropaeolum majus) y su actividad nematocida in*

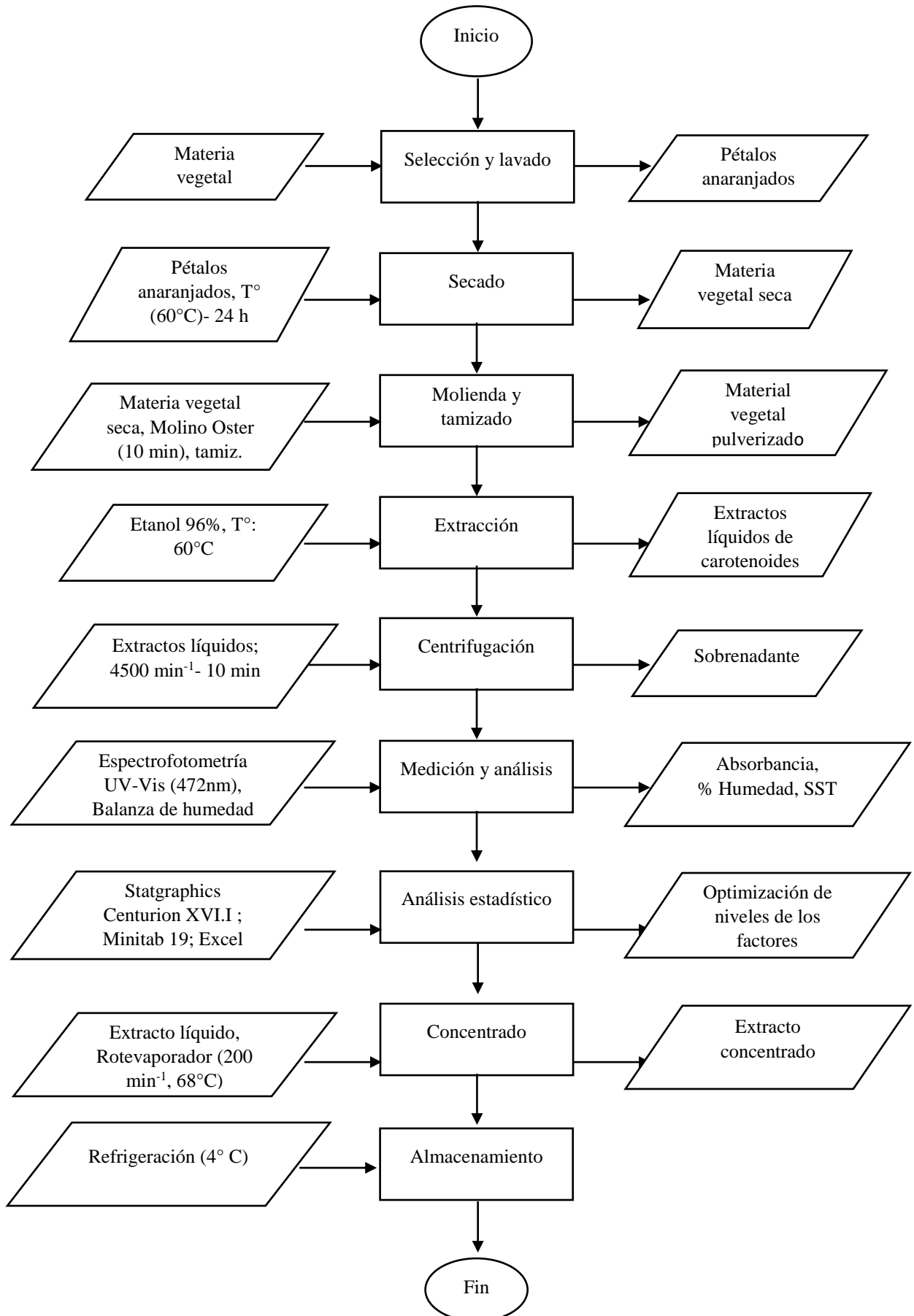
- vitro para el control de Meloidogyne* (pp. 34–46). Universidad Técnica de Ambato.
- Lobos, R. (2018). *Optimización de los parámetros de extracción discontinua sólido-líquido de los antioxidantes de las hojas de Anona ( Annona x atemoya Mabb .) Optimización de los parámetros de extracción discontinua sólido-líquido de los antioxidantes de las hojas de Anon* (pp. 6–125). Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios.
- López, J. (2019). *Estudio comparativo para la selección del detector d eun prototipo de espectrofotómetro de luz visible* (Universidad Central del Ecuador; pp. 1–96). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18787/1/T-UCE-0017-IQU-041.pdf>
- Martínez, A. J. M., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2015). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 54(2).
- Mayor, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa. *Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23–29.
- Mejía, S., Espinal, J., & Mondragón, F. (2006). Estudio del azeótropo etanol-agua, caracterización molecular de dímeros de etanol, heterodímeros y heterotrímeros de etanol-agua. *Energética*, 1(36), 5–18.
- Meléndez, A. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud* (Primera ed, pp. 15–447). México.
- Miguel, S. (2017). *Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad Quebranta (ICA, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido* (Pontificia Universidad Católica del Perú; pp. 5–123). Retrieved from [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/9717/DUE% c3%91AS\\_ZURITA\\_JULIA\\_COMPUESTOS\\_FENOLICOS\\_UVA\\_QUEBRANTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/9717/DUE%20c3%91AS_ZURITA_JULIA_COMPUESTOS_FENOLICOS_UVA_QUEBRANTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Montero, M., & Mira, J. (2017). *Eficacia antimicrobiana in vitro del extracto de mastuerzo (Tropaeolum majus) y tomillo (Thymus vulgaris) sobre cepa certificada de Staphylococcus aureus* (p. 11). Universidad Técnica de Ambato.
- Nanzi, A. F. (1999). *Tropaeolum majus L .* (pp. 1–6). Retrieved from [https://kupdf.net/download/capuchina-tropaeolum-majus-l\\_59b17edadc0d606d58568edc\\_pdf?fbclid=IwAR3vQNDchkat530zMUEG-byuVvt5\\_kBLsmiopglqYJgr3JgtKwSLmJyGdA4](https://kupdf.net/download/capuchina-tropaeolum-majus-l_59b17edadc0d606d58568edc_pdf?fbclid=IwAR3vQNDchkat530zMUEG-byuVvt5_kBLsmiopglqYJgr3JgtKwSLmJyGdA4)
- Nayhua, C. (2017). *OBTENCIÓN DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE LA CÁSCARA DE TUNA PÚRPURA (Opuntia ficus-indica) POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS, FRUTO PROVENIENTE DEL DISTRITO DE SAN CRISTÓBAL-MOQUEGUA*. (Universidad Nacional del Altiplano; pp. 1–

- 91). Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6391/Nayhua\\_Yana\\_Candelaria\\_Milagros.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6391/Nayhua_Yana_Candelaria_Milagros.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Nóchez, J., & Ventura, A. (2009). *Metodología de Superficie de Respuesta ( MSR ), conceptos y aplicación para obtener el valor óptimo en un experimento* (Universidad de El Salvador; pp. 20–29). Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/12512/1/19200894.pdf>
- Norshzila, S., Koy, C., Ho, L., Azrina, I., Nurul, Z., & Zarinah, Z. (2017). The Effect of Time , Temperature and Solid to Solvent Ratio on Pumpkin Carotenoids Extracted Using Food Grade Solvents. *Sains Malaysiana*, 46(2), 231–237.
- Olivares, D., Cabrera, B., Martínez, S., Teresa, M., Olivares, L. D., & Cabrera, G. B. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 18(50), 10–15. Retrieved from [https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icsa/LI\\_NutriMole/Gabriel\\_Bet/importancia.pdf](https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icsa/LI_NutriMole/Gabriel_Bet/importancia.pdf)
- Parwez, A. (2017). Oxidative Stress : An Overview. *Med. Phoenix*, 2(1), 1–2.
- Pazmiño, D. (2019). *Evaluación de diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopeno de tomate de árbol (solanum betaceum)* (pp. 9–19). Universidad Técnica de Ambato.
- Pérez, C. (2019). *Extracción y microencapsulación de licopenos provenientes de residuos agroindustriales del tomate de árbol (Solanum betaceum)* (pp. 1–40). Universidad Técnica de Ambato.
- Pérez, M., Hernández, L., & Barragán, B. (2017). Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Agrociencia*, 51, 135–151.
- Rajkumari, J., Dyavaiah, M., & Siddhardha, S. J. S. (2018). Evaluation of in vivo antioxidant potential of *Syzygium jambos* ( L .) Alston and *Terminalia citrina* Roxb . towards oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3355-z>
- Rodriguez, D. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods* (pp. 15–53). Washington, D.C.
- Sanabria, J., & Romo, A. (2019). Análisis de la superficie de respuesta para el diseño de actividades de modelización. *REDIEM*, 1(1), 56–59. Retrieved from <http://revistas.uaz.edu.mx/index.php/REDIEM/article/view/571/518>
- Sánchez, A., Flores, L., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G., & Spanchez, S. (1999). Carotenoides: Estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 175–191. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-1999/mi993j.pdf>

- Santos, S., Silveira, M., & Salas, M. (2019). Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods : Polyphenols , Carotenoids , Peptides From Animal and Plant Sources New. In *Bioactive Compounds* (pp. 127–142). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4>
- Serrano, J. (2017). *EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO . ABSORCIÓN VISIBLE-ULTRAVIOLETA* (pp. 8–10). Retrieved from [https://www.upct.es/~minaees/espectro\\_electromagnetico.pdf](https://www.upct.es/~minaees/espectro_electromagnetico.pdf)
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. (2017). Oxidative Stress. *Biochemistry*, *86*, 715–748.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Spînu, M., Niculae, M., Pastiu, A., Sandru, C., Pall, E., & Vasiu, A. (2016). Vegetal extracts influence in vitro on the cell-mediated immunity in carnivores depending on health status, target species and plant taxonomy. *Industrial Crops & Products*, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.060>
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, *129*(3), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015>
- Tahir, M., Saima, H., Afzaal, M., Yasmeen, A., Ahmad, A., Zia, M., & Aamir, M. (2018). Cellulolytic Treatment : A Competent Approach to Improve Extraction and Storage Stability of Carotenoids from Kinnow ( Citrus reticulate ) Peel. *Asian Journal of Chemistry*, *30*(3), 603–606. <https://doi.org/https://doi.org/10.14233/ajchem.2018.21034>
- Tews, M. (2017). *Medición de la humedad para procesos y laboratorio*. Retrieved from [https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos\\_y\\_documentos/14541/Medicion\\_humedad.pdf](https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/14541/Medicion_humedad.pdf)
- Torre, L., Alarcón, D., Peter, L., & Salazar, J. (2008). *Usos medicinales de las plantas*. (1995), 105–114.
- Yaguas, O. (2017). RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR THE OPTIMIZATION OF AN AGRICULTURAL PRODUCTION. *Ingeniería Industrial*, *1*(16), 205–222.

## ANEXOS

### Anexo 1. Resumen del ensayo experimental



**Anexo 2.** Datos experimentales obtenidos para el análisis de los extractos

<b>Tratamientos</b>	<b>Materia vegetal (g)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración carotenoides (mg/L)</b>	<b>Factor de dilución (F.D.)</b>	<b>Concentración * F.D. (mg/L)</b>	<b>Volumen final extraído (mL)</b>
a: 1/20	2,500	0,7445	1,886	40	75,443	43,200
t: 30 min.	2,500	0,7479	1,894	40	75,447	43,200
	2,500	0,7401	1,873	40	74,937	43,200
a: 1/20	2,500	0,7692	1,947	40	77,873	44,600
t: 60 min.	2,500	0,7664	1,939	40	77,570	44,600
	2,500	0,7604	1,924	40	76,962	44,600
a: 1/20	2,500	0,8054	2,038	40	81,519	44,300
t: 90 min.	2,500	0,8081	2,046	40	81,823	44,300
	2,500	0,8069	2,043	40	81,722	44,300
a: 1/45	1,111	0,3345	0,848	40	33,924	46,200
t: 30 min.	1,111	0,3327	0,843	40	33,722	46,200
	1,111	0,3395	0,861	40	34,430	46,200
a: 1/45	1,111	0,3568	0,904	40	36,152	46,000
t: 60 min.	1,111	0,3550	0,899	40	35,949	46,000
	1,111	0,3549	0,899	40	35,949	46,000
a: 1/45	1,111	0,3689	0,934	40	37,367	46,000
t: 90 min.	1,111	0,3693	0,932	40	37,266	46,000
	1,111	0,3689	0,934	40	37,367	46,000
a: 1/70	0,714	0,2460	0,623	40	24,911	48,300
t: 30 min.	0,714	0,2440	0,618	40	24,709	48,300
	0,714	0,2331	0,590	40	23,595	48,300
a: 1/70	0,714	0,2558	0,648	40	25,924	47,500
t: 60 min.	0,714	0,2549	0,633	40	25,316	47,500
	0,714	0,2551	0,646	40	25,823	47,500
a: 1/70	0,714	0,2601	0,658	40	26,329	47,600
t: 90 min.	0,714	0,2595	0,656	40	26,228	47,600
	0,714	0,2604	0,658	40	26,329	47,600

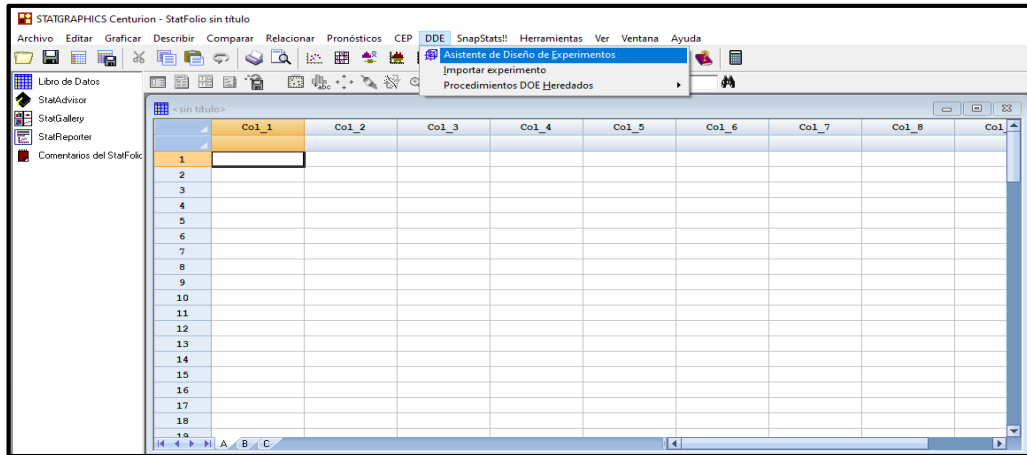
**Anexo 3. Cálculos y análisis de los extractos**

<b>Tratamientos</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>SST (%)</b>	<b>MSE (g)</b>	<b>Masa del extracto (g)</b>	<b>Concentración (mg carotenoides/100 g sólidos)</b>	<b>Eficiencia de extracción (%)</b>
a: 1/20	98,019	1,981	0,675	34,085	482,678	0,130
t: 30 min.	98,079	1,921	0,655	34,085	499,758	0,131
	98,016	1,984	0,676	34,085	478,714	0,129
a: 1/20	97,991	2,009	0,707	35,189	491,284	0,139
t: 60 min.	98,036	1,964	0,691	35,189	500,580	0,138
	98,079	1,921	0,676	35,189	507,776	0,137
a: 1/20	98,031	1,969	0,688	34,953	524,730	0,144
t: 90 min.	98,088	1,912	0,668	34,953	542,387	0,145
	98,042	1,958	0,684	34,953	528,989	0,145
a: 1/45	99,301	0,699	0,255	36,452	615,111	0,141
t: 30 min.	99,341	0,659	0,240	36,452	648,552	0,140
	99,330	0,670	0,244	36,452	651,313	0,143
a: 1/45	99,181	0,819	0,297	36,294	559,462	0,150
t: 60 min.	99,154	0,846	0,307	36,294	538,572	0,149
	99,259	0,741	0,269	36,294	614,888	0,149
a: 1/45	99,440	0,560	0,560	36,294	845,715	0,155
t: 90 min.	99,126	0,874	0,874	36,294	540,409	0,154
	99,273	0,727	0,727	36,294	651,445	0,155
a: 1/70	99,565	0,435	0,166	38,109	725,825	0,169
t: 30 min.	99,620	0,380	0,145	38,109	824,123	0,168
	99,564	0,436	0,166	38,109	685,891	0,161
a: 1/70	99,560	0,440	0,165	37,478	746,746	0,173
t: 60 min.	99,629	0,371	0,139	37,478	864,872	0,169
	99,564	0,436	0,163	37,478	750,654	0,173
a: 1/70	99,649	0,351	0,132	37,556	950,719	0,177
t: 90 min.	99,636	0,364	0,137	37,556	913,239	0,176
	99,639	0,361	0,136	37,556	924,383	0,177

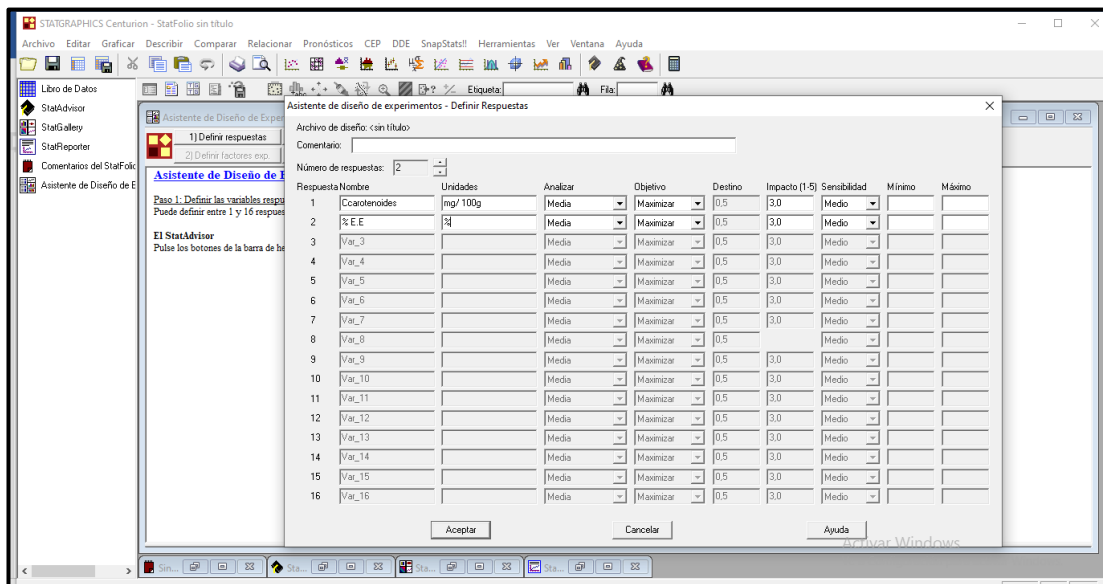


## Anexo 4. Desarrollo del análisis estadístico en Statgraphics Centurion XVI.II

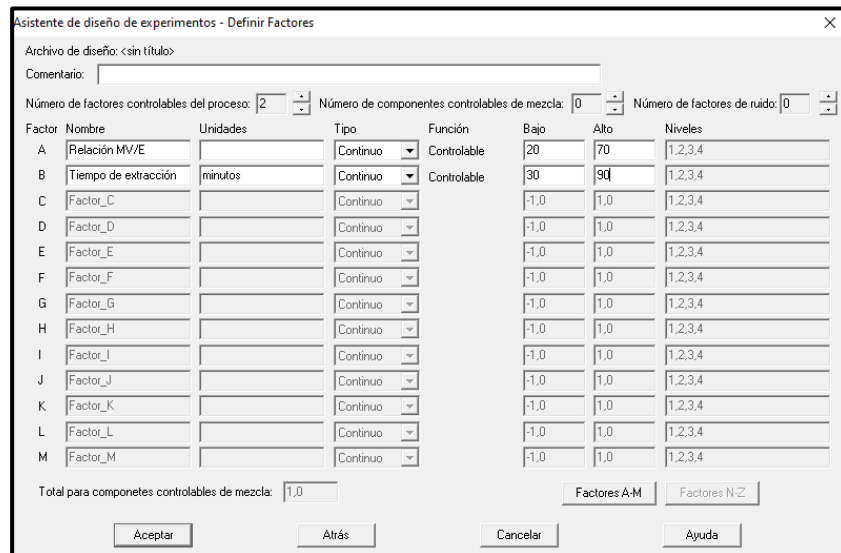
1. Abrir el programa estadístico y dirigirse a Diseño de experimentos (DDE), y seleccionar la opción Asistente de Diseño de Experimentos.



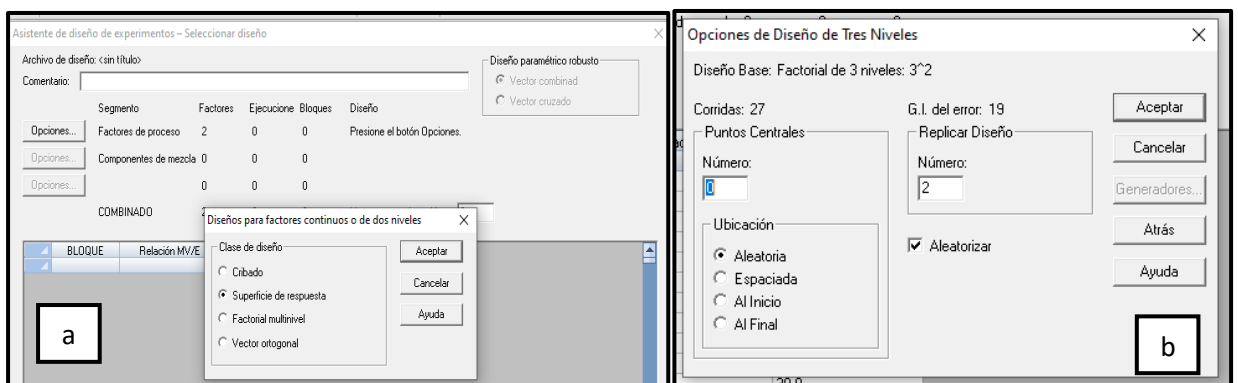
2. Una vez generado el Asistente de Diseño de Experimentos, dar clic en Definir Respuestas. Dentro de esta ventana se establecerán las dos respuestas o variables independientes (C Carotenoides y % E.E), con sus respectivas unidades.



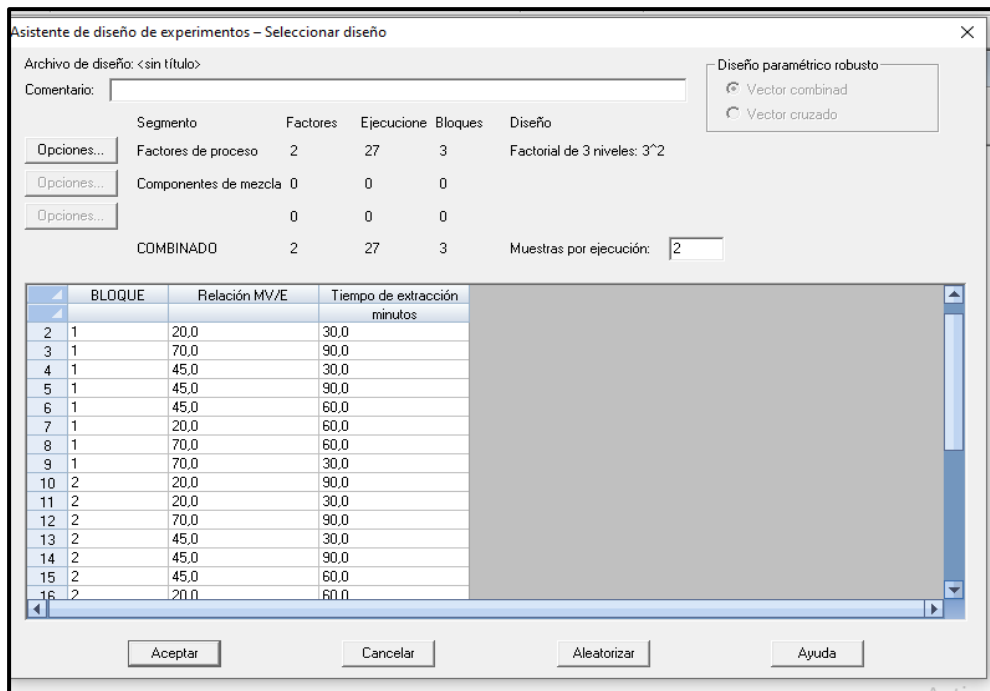
- Determinar los factores en la siguiente opción del Asistente de Experimentos. Los factores son la Relación MV/E, con la función Bajo de 20 y Alto de 70. El tiempo de extracción está expresado en minutos con un nivel Bajo de 30 y Alto de 90, y dar clic en Aceptar. El programa por defecto arrojará el Valor Medio de los dos factores.



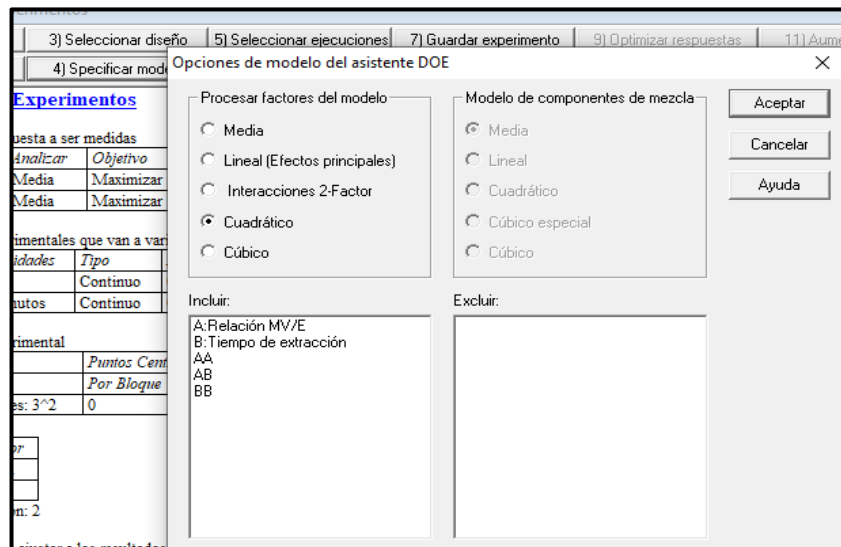
- Posteriormente, elegir la opción seleccionar diseño. En la barra de opciones se desplegará una ventana en la cual se escogerá el tipo de análisis. Dar clic en Superficie de Respuesta (a). A su vez, se mostrará otra ventana en la cual se establecerá el número de corridas experimentales (b) y dar clic en Aceptar.



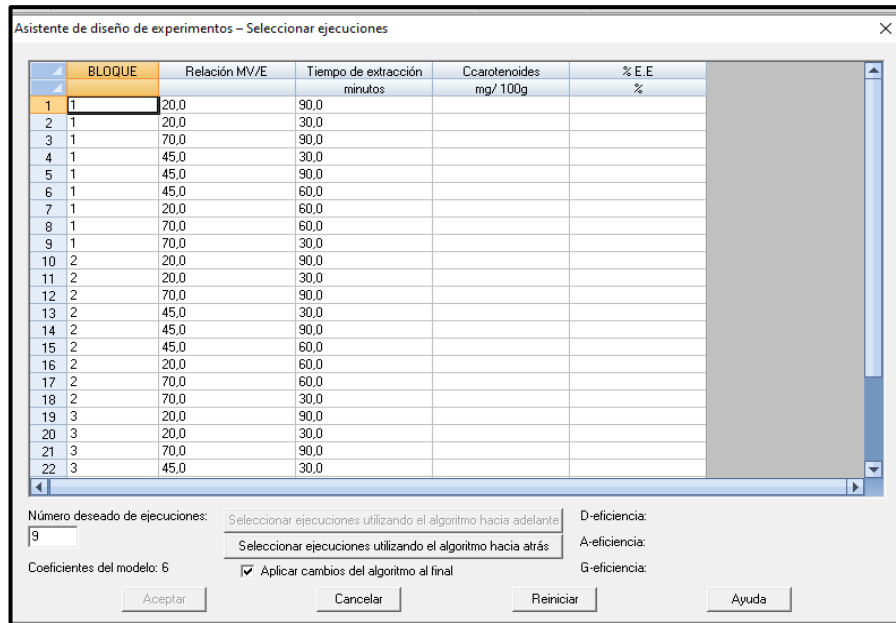
- Aparecerá una ventana que permitirá identificar la interacción de los factores en cada uno de sus niveles.



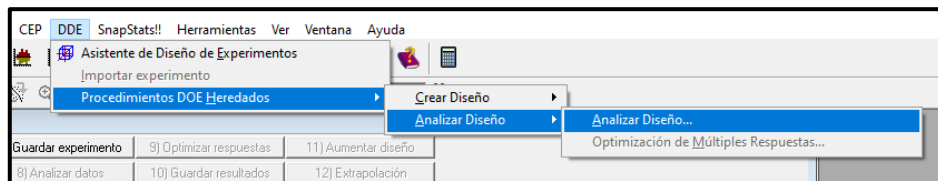
- El siguiente paso del DDE consiste en Especificar el Modelo, mismo que será determinado como cuadrático.



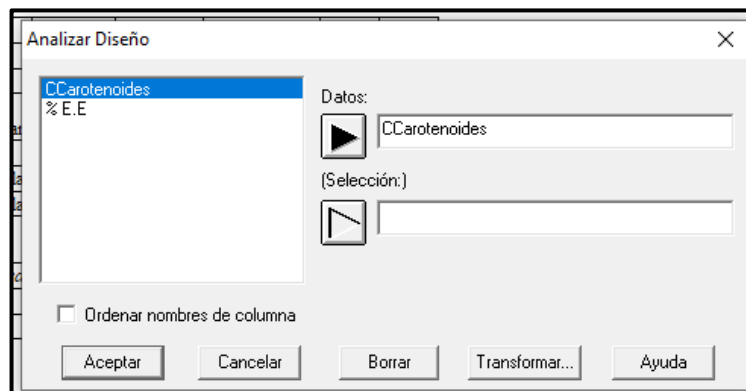
7. Después de Seleccionar las Ejecuciones y se mostrará una ventana en la cual se deben ingresar los datos correspondientes a las variables de respuesta, según corresponda.



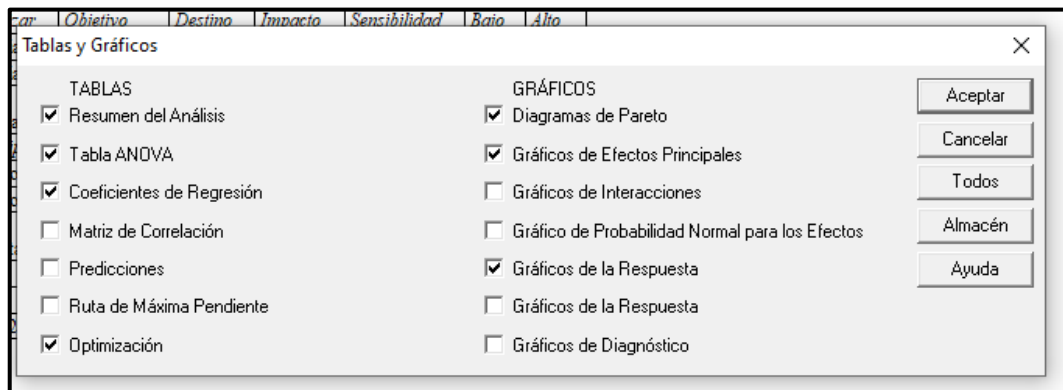
8. Una vez establecidos los valores se debe Evaluar el Diseño. Para ello, dar clic en DDE y seleccionar Procedimientos DOE Heredados -> Analizar Diseño -> Analizar Diseño.



9. Seleccionar la variable de respuesta a medir



10. Determinar los análisis a desarrollarse, y obtener la Optimización y el Gráfico de Respuesta.



De esta manera se obtendrá los valores óptimos sobre los cuáles debe efectuarse el experimento.

**Anexo 5.** Tabla de escalas de deseabilidad

<b>Valores</b>	<b>Equivalente</b>
0,00	Completamente inaceptable
0,00 - 3,00	Inaceptable
3,00 - 4,00	Límite de aceptación
4,00 - 0,63	Aceptable pero mediocre
0,63 - 0,80	Aceptable y bueno
0,80 - 1,00	Aceptable y excelente
1,00	Mejor adicional no tiene valor apreciable

**Fuente:** (Ivanovna & López, 2018)