



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE INGENIERIA QUÍMICA

**Evaluación de procesos de extracción de antioxidantes del
mortiño**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

INGENIERA QUÍMICA

Autora: López Correa, Marisabel

Director: Meneses Chamba, Miguel Ángel

LOJA

2024



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

2024

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 15 de marzo 2024

Magister

Natali Elizabeth Solano Cueva

Directora de la carrera de Ingeniería Química

Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Evaluación de procesos de extracción de antioxidantes del mortiño, realizado por Marisabel López Correa ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Ph.D. Miguel Ángel Meneses Chamba

C.I.: 1103885636

Correo electrónico: mameneses@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Marisabel López Correa, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: Evaluación de procesos de extracción de antioxidantes del mortiño, de la carrera de Ingeniería Química, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo I: Marco Teórico, Capítulo 2: Metodología, Capítulo 3: Resultados y discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Miguel Ángel Meneses Chamba, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Marisabel López Correa

C.I.: 1150195194

Correo electrónico: mlopez10@utpl.edu.ec

Dedicatoria

A Dios por mis padres, Roberth y María Elena, mis guías, este trabajo de titulación primero va dedicado a ellos, quienes con tanto sacrificio y entrega me brindaron el estudio, así sea a la distancia siempre estuvieron presentes para animarme y junto a ellos conseguir mi más grande meta. A mis queridos hermanos, Camilo y Adrián, con quienes compartí más cerca esta etapa universitaria y siempre estuvieron ayudándome a su manera, llena de cariño y perseverancia, a mi pequeño Sebitas quien con sus ocurrencias y amor siempre me saco una sonrisa y me animó a seguir adelante.

A mis queridos abuelitos, Gonzalo, Mariana, Marcial y Lidia, aunque los tres últimos ya no me acompañen terrenalmente, estoy segura de que siempre están conmigo, guiándome y protegiéndome.

En general a toda mi familia, quienes siempre buscaron la manera de ayudarme a seguir adelante y nunca nos dejaron solos a mí y a mis 2 hermanos.

Alex, quien vivió a mi lado cada proceso de este trabajo, el cual siempre busco la manera de animarme a no desistir y se convirtió en mi mejor compañía, su amor logro grandes cosas y una de las más importantes es poder culminar con este trabajo de titulación.

Agradecimiento

Mi agradecimiento primero a Dios y a mis 3 angelitos en el cielo, Mariana, Lidia y Marcial, tengo la certeza de que me brindaron su guía, amor y protección, para poder culminar con este trabajo, lo cual va de la mano con agradecer infinitamente a mis padres por su arduo sacrificio, entrega y presencia, quienes siempre mediante palabras o actos de amor supieron animarme y tomarme de la mano para juntos alcanzar esta meta. A mis hermanos, junto a ellos formamos un nuevo hogar y siempre fueron mi entrañable compañía y ayuda. A Rodri y Evelyn por recibirme como nueva integrante de su casa durante el primer ciclo de mi carrera, siempre me trataron con cariño y me ayudaron a adaptarme a mi nuevo estilo de vida.

A mi querida universidad, gracias a ella me forme de la mano de grandes profesionales y personas, como es el caso de mi director de tesis, Ph.D. Miguel Ángel Meneses, a quien le agradezco por su guía acertada a lo largo de esta investigación, siempre estuvo presto a resolver cualquier inquietud y también me formo como una profesional a lo largo de mi carrera.

A mi directora de carrera Mgtr. Natali Solano, por al estar al pendiente de nosotros y más que nada por su apoyo y motivación incondicional.

A los responsables del laboratorio de Bioensayos, Bioquímicos Luis Cartuche y Nayeli Chuchuca, quienes nos facilitaron dichas instalaciones para poder realizar los ensayos químicos y más allá de eso, siempre estuvieron pendientes brindándonos su guía acertada.

A mis queridas amigas que la carrera me regalo, Joseline, Jhulissa, Leydi y Slendy, quienes fueron mi soporte y guía durante estos cuatro años, juntas estamos logrando lo que algún día como desconocidas nos lo propusimos.

Índice de contenido

<i>Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular</i>	<i>II</i>
<i>Declaración de autoría y cesión de derechos</i>	<i>III</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>V</i>
<i>Agradecimiento</i>	<i>VI</i>
<i>Índice de contenido</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>VIII</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Abstract</i>	<i>2</i>
<i>Introducción</i>	<i>3</i>
<i>Capítulo uno</i>	<i>5</i>
<i>Marco Teórico</i>	<i>5</i>
1.1 Mortiño	<i>5</i>
1.2 Procesos de extracción de antioxidantes.....	<i>8</i>
1.3 Determinación de actividad antioxidante y contenido de fenoles totales ...	<i>9</i>
 <i>Capítulo dos</i>	 <i>12</i>
<i>Metodología</i>	<i>12</i>
2.1 Tratamiento de la materia prima.....	<i>12</i>
2.1.1 Determinación de la humedad y trituración	<i>12</i>
2.2 Procesos de extracción	<i>12</i>
2.2.1 Maceración con agitación continua.....	<i>12</i>
2.2.2 Maceración asistida con ultrasonido.....	<i>13</i>
2.2.3 Maceración asistida con microondas	<i>14</i>
2.2.4 Líquido presurizado	<i>15</i>
2.3 Cálculo del rendimiento	<i>16</i>
2.4 Determinación de Fenoles totales.....	<i>16</i>
2.5 Capacidad antioxidante.....	<i>17</i>
2.5.1 ABTS	<i>17</i>
2.5.2 FRAP	<i>18</i>
2.5.3 DPPH	<i>18</i>

2.6 Análisis estadístico	19
<i>Capítulo tres</i>	20
<i>Análisis de resultados</i>	20
3.1 Rendimiento de los extractos obtenidos	20
3.2 Fenoles totales	23
3.3 Capacidad antioxidante de los extractos.....	24
3.3.1 ABTS	25
3.3.2 FRAP	26
3.3.3 DPPH	27
<i>Conclusiones</i>	28
<i>Recomendaciones</i>	29
<i>Referencias</i>	30
<i>Apéndice</i>	35
<i>Apéndice A. Procesos de extracción de antioxidantes del mortiño</i>	35
<i>Apéndice B. Rendimiento de cada uno de los procesos de extracción</i>	39
<i>Apéndice C. Análisis de la varianza ANOVA para cada ensayo</i>	42
<i>Apéndice D. Curvas de calibración para cada determinar la capacidad antioxidante</i>	45

Índice de tablas

<i>Tabla 1</i>	6
<i>Clasificación taxonómica del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)</i>	6
<i>Tabla 2</i>	7
<i>Composición química del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)</i>	7
<i>Tabla 3</i>	21
<i>Rendimiento de extracción de los diferentes métodos de extracción de antioxidantes del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)</i>	21
<i>Tabla 4</i>	22
<i>Resultados del ANOVA para el rendimiento de las diferentes técnicas de extracción</i>	22
<i>Tabla 5</i>	24
<i>Resultados del contenido de fenoles totales para las diferentes técnicas de extracción</i>	24
<i>Tabla 6</i>	25

<i>Resultados de la capacidad antioxidante para las diferentes técnicas de extracción</i>	25
<i>Tabla B1</i>	40
<i>Resultados del rendimiento de maceración con agitación continua</i>	40
<i>Tabla B2</i>	40
<i>Resultados del rendimiento de maceración asistida con ultrasonido</i>	40
<i>Tabla B3</i>	40
<i>Resultados del rendimiento de maceración asistida con microondas</i>	40
<i>Tabla B4</i>	41
<i>Resultados del rendimiento de líquido presurizado</i>	41
<i>Tabla C1</i>	42
<i>Método de Tukey para el efecto del rendimiento sobre la extracción</i>	42
<i>Tabla C2</i>	42
<i>Método de Tukey para el efecto de fenoles totales sobre la extracción</i>	42
<i>Tabla C3</i>	43
<i>Método de Tukey para el efecto del reactivo ABTS sobre la extracción</i>	43
<i>Tabla C4</i>	43
<i>Método de Tukey para el efecto de FRAP sobre la extracción</i>	43
<i>Tabla C5</i>	44
<i>Método de Tukey para el efecto del reactivo DPPH sobre la extracción</i>	44

Índice de figuras

<i>Figura 1</i>	5
<i>Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)</i>	5
<i>Figura 2</i>	13
<i>Esquema del proceso de maceración con agitación continua</i>	13
<i>Figura 3</i>	14
<i>Esquema del proceso de maceración asistida con ultrasonido</i>	14
<i>Figura 4</i>	15
<i>Esquema del proceso de maceración asistida con microondas</i>	15
<i>Figura 5</i>	16
<i>Esquema de líquido presurizado</i>	16
<i>Figura A1</i>	35
<i>Diagrama del proceso de maceración con agitación continua</i>	35

Figura A2.....	36
Diagrama del proceso de maceración asistida con ultrasonido.....	36
Figura A3.....	37
Diagrama del proceso de maceración asistida con microondas.....	37
Figura A4.....	38
Diagrama del proceso de líquido presurizado.....	38
Figura D1	45
Curva de calibración para ABTS	45
Figura D2	45
Curva de calibración para DPPH.....	45
Figura D3	46
Curva de calibración para FRAP	46

Resumen

En el presente trabajo de investigación se plantea evaluar diferentes técnicas de extracción del mortiño (*Vaccinium floribundum*), en las que se encuentran maceración con agitación continua, maceración asistida con ultrasonido, maceración asistida con microondas y líquido presurizado, cada una de estas técnicas se realizó por triplicado obteniendo un total de 12 muestras, mediante la cuantificación de fenoles totales y la determinación de la capacidad antioxidante por ABTS ⁺, DPPH y FRAP, se determinó que tanto maceración con agitación continua, maceración asistida con ultrasonido y líquido presurizado mostraron resultados iguales para ABTS y DPPH. Por otro lado, maceración asistida con ultrasonido resulto ser la mejor técnica de extracción evaluada en actividad antioxidante para FRAP. Para la respuesta de fenoles totales no se observó efecto significativo debido a la técnica de extracción. En cuanto al rendimiento, la técnica que presentó la mejor respuesta fue maceración asistida con microondas.

Palabras clave: *Vaccinium floribundum*, extracto, antioxidante.

Abstract

In this research, different extraction techniques were evaluated on mortiño (*Vaccinium floribundum*), including maceration with continuous agitation, ultrasound-assisted maceration, microwave-assisted maceration and pressurized liquid, each of these techniques was carried out in triplicate, obtaining a total of 12 samples. It was determined that continuous stirring maceration, ultrasound-assisted maceration and pressurized liquid shown similar results for ABTS and DPPH assays. On the other hand, ultrasound-assisted maceration proved to be the best extraction technique evaluated on antioxidant activity for FRAP assay. Regarding total phenols content the extraction technique did not show significative effect. In terms of extraction yield, microwave-assisted maceration result in the best extraction technique.

Keywords: *Vaccinium floribundum*, extract, antioxidant.

Introducción

Los radicales libres pueden ser perjudiciales para los seres vivos porque pueden dañar moléculas importantes como proteínas, lípidos y ADN, este daño celular puede contribuir al envejecimiento, la enfermedad y la muerte celular, dicha acción oxidativa puede ser neutralizada mediante el uso de antioxidantes, muchos de ellos empleados en la industria farmacéutica y de alimentos son de carácter sintético, lo cual da paso a una serie de consecuencias negativas en lo que respecta a la salud de los consumidores. Es por ello que la presente investigación se propone la obtención de extractos antioxidantes de origen natural, específicamente del subproducto del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).

Para el desarrollo óptimo de la investigación se determinó el mejor proceso de extracción de antioxidantes para esta especie, con el fin de ofrecer una alternativa natural y sostenible. Se realizaron extracciones utilizando cuatro técnicas diferentes, como lo son maceración con agitación continua, maceración asistida con ultrasonido, maceración asistida con microondas y líquido presurizado. Para cada extracto obtenido se determinó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS, FRAP y DPPH, así como también se determinó el contenido de fenoles totales.

Durante el desarrollo de este trabajo se identificaron varias facilidades y oportunidades. Entre ellas, se destaca la disponibilidad de equipos de laboratorio los cuales se emplearon para la aplicación de las diferentes extracciones y los análisis realizados, así como también la asistencia de personal técnico. Por otro lado, se contó con literatura científica, como estudios previos relacionados con las propiedades antioxidantes del mortiño, aunque cabe destacar que es uno de los primeros trabajos en los que se evalúa varias técnicas para su determinación. Por otro lado, uno de los principales inconvenientes o limitantes fue la obtención del mortiño, ya que esta especie se encuentra mayormente disponible en el Ecuador durante el mes de noviembre, para superar esta limitación, se siguieron estrategias de recolección y conservación adecuadas, obteniendo las muestras necesarias para llevar a cabo las extracciones y análisis correspondientes.

Este documento está organizado en cuatro capítulos, en el primer capítulo se detalla un resumen de las investigaciones previas relacionadas con la especie del mortiño, abordando su composición química, propiedades antioxidantes y aplicaciones potenciales. El segundo capítulo se centró en la descripción de metodologías y procedimientos para las extracciones y análisis químicos, detallando los procedimientos utilizados para cada técnica ya antes mencionada. En el tercer capítulo, se presentan los resultados obtenidos y se lleva a cabo su discusión, comparando los diferentes métodos de extracción y analizando los valores de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para cada uno de ellos. Finalmente, en el cuarto capítulo se presentan las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos y se ofrecen recomendaciones para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

Esta investigación fomenta la valorización de los recursos naturales debido a que el mortiño es una especie autóctona de la región, y su aprovechamiento como fuente de antioxidantes puede impulsar la economía local y promover la conservación de la biodiversidad, asimismo, al emplear técnicas de extracción innovadoras y eficientes, se abre el camino para la optimización de procesos industriales y la generación de productos de alta calidad y valor agregado.

La evaluación de procesos de extracción de antioxidantes a partir del mortiño constituye una investigación relevante y pertinente en el contexto actual, su enfoque en la búsqueda de alternativas naturales a los antioxidantes sintéticos, el cumplimiento de los objetivos planteados y los resultados obtenidos, hacen que esta investigación sea un aporte significativo en el campo de la ciencia y la tecnología de los alimentos, así como también aporta al desarrollo industrial a través del aprovechamiento sustentable de la biodiversidad y de los subproductos industriales dentro del contexto de la economía circular.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 Mortiño

El mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), también conocido como "Andean Blueberry" o "*Vaccinium myrtillus*" en otros países, es una especie nativa de la región andina de América del Sur, incluido Ecuador, este es un arbusto que pertenece a la familia Ericaceae y se encuentra ampliamente distribuido en regiones montañosas de altitudes entre 2500 y 4200 metros sobre el nivel del mar. En lo que respecta a nuestro país, esta fruta es cosechada los meses de septiembre y noviembre, se presenta en forma de bayas esféricas, las cuales tienen un diámetro aproximado de 5 a 8 mm, el color característico de la piel que lo recubre es azul oscuro, mientras que la pulpa es de color verde o transparente, poseyendo numerosas semillas pequeñas, para una mejor ilustración de esta especie, se presenta la figura 1.

Figura 1

Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)



Nota. Adaptado de *Evaluación de la capacidad antioxidante de una crema de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) En la matriz pastelera* [Fotografía], por M. Suarez, 2018, Universidad de las Américas.

El mortiño es reconocido por su alto contenido de compuestos antioxidantes, lo que ha despertado un creciente interés en su potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Según como lo informan Loor & Zambrano (2016), estas sustancias antioxidantes se encargan de disminuir o retardar las reacciones de oxidación sobre

diferentes sustratos, de ahí radica su importancia y su uso en la vida cotidiana de las personas, destacando entre sus beneficios que ayuda a restablecer los niveles de azúcar en la sangre, prevención de diabetes, así como también la inflamación de las vías urinarias, combate los trastornos digestivos, entre otros.

Esta especie pertenece al género *Vaccinium*, el cual agrupa a numerosas especies de plantas que se distribuyen abundantemente en diversas regiones del mundo, Gonzáles (2002) y Alarcón (2018) en sus trabajos de investigación realizan el estudio de la taxonomía de la especie *Vaccinium floribundum Kunth*, la misma que se detalla en tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Especie	<i>Vaccinium Floribundum Kunth</i>

Nota. Adaptado de González (2002) & Alarcón (2018).

Por otro lado, se tiene que, el análisis de la composición química del mortiño se ha realizado por varios investigadores, en los que destacan Vasco et al. (2009) y Tupuna et al. (2016), dichos estudios han revelado la presencia de diversos compuestos bioactivos, entre los más importantes se encuentran compuestos antioxidantes correspondientes a antocianinas, flavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos y vitamina C. En el caso particular del mortiño según estudios realizados por Gallardo (2015), la presencia de antioxidantes radica en la existencia de flavonoides, β -carotenos, antocianinas y polifenoles.

Los flavonoides se encuentran presentes en los tejidos de la fruta, caracterizados por compuestos fenólicos con cadena carbonatada, su función es proteger a la célula y dar color rojo o azul al fruto. Su método de funcionamiento es inhibiendo las oxidasas y enzimas que participan en el proceso de oxidación del sistema celular. Por otro lado, las antocianinas, según Garzón (2008), son pigmentos hidrosolubles que se encargan de dar coloración al

fruto, los mismos que pueden ser rojos, azules o morados, para el mortiño los flavonoides se encuentran en mayor cantidad, alojándose en la cáscara del fruto y en las vacuolas.

Los polifenoles por su parte debido a su estructura química atrapan los radicales libres, debido a que este compuesto dona electrones, los estabiliza y ataca al que se separa de su estructura. Y por último se tiene a los β -carotenos los cuales son pigmentos liposolubles que aumentan en la madurez del fruto, estos antioxidantes pertenecen a la pro-vitamina A, entre sus funciones están proteger al ADN y reducir el deterioro de los tejidos (Olivares et al., 2010). La composición química del mortiño se encuentra más detallada en la tabla 2.

Tabla 2

Composición química del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)

Parámetro	Resultado
Humedad (g/100 g PF)	80.09 \pm 0.16
Proteínas (g/100 g PF)	0.76
Cenizas (g/100 g PF)	0.34 \pm 0.01
Contenido de azúcares	
Fructuosa (g/100 g PF)	4.4 \pm 0.4
Glucosa (g/100 g PF)	2.6 \pm 0.3
Sacarosa (g/100 g PF)	ND
Minerales	
Fe (mg/100 g PF)	0.77 \pm 0.00
K (mg/100 g PF)	142.04 \pm 1.88
Cu (mg/100 g PF)	0.11 \pm 0.00
Zn (mg/100 g PF)	0.21 \pm 0.00
Mg (mg/100 g PF)	21.22 \pm 1.90
Componentes antioxidantes	
Ácido ascórbico (mg/100 g PF)	9.0 \pm 2.0
β -caroteno (μ g/100 g PF)	36.0 \pm 6.0
Contenido fenólico soluble total (mg GA/100 g PF)	882 \pm 38
TEAC (mg Trolox/100 g PF)	1203 \pm 94

Nota. Adaptado de Vasco et al. (2009) & Tupuna et al. (2016); PF = peso

de fruta fresca; ND = Bajo límite de detección.

Según Vasco et al. (2009), la capacidad antioxidante del mortiño se reportó en un valor de 1203 mg Trolox/100 g, mientras que el estudio realizado por Tupuna et al. (2016) reportan un valor de 1192, 86 mg Trolox/100 g. Si se comparan estos valores con la capacidad

antioxidante de otras frutas ecuatorianas mencionadas por Vasco et al. (2009), como la mora (1302 mg Trolox/100 g) se puede observar que los valores del mortiño se sitúan dentro de ese rango. Por lo tanto, se puede concluir que el mortiño se encuentra entre las frutas de Ecuador que poseen una alta capacidad antioxidante.

1.2 Procesos de extracción de antioxidantes

Es importante destacar que existen varios métodos de extracción, como la extracción con solventes orgánicos, la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción con tecnologías emergentes como los extractores de alta presión; cada uno de estos métodos presenta ventajas y limitaciones en términos de eficiencia, selectividad y escalabilidad, en el contexto de esta investigación, se seleccionaron cuatro técnicas de extracción para evaluar la obtención de antioxidantes del mortiño la elección de estas técnicas se basó en consideraciones específicas que abordan diferentes aspectos de eficiencia y selectividad en la extracción de compuestos bioactivos del mortiño. La maceración con agitación continua es uno de los métodos de extracción de antioxidantes más empleados, este método implica poner en contacto la matriz sólida con el solvente durante un tiempo determinado. La eficiencia del método depende primordialmente de los parámetros de operación, la naturaleza de la matriz sólida, la química de los compuestos bioactivos de interés (Azmir et al., 2013).

Por otro lado, se tiene la maceración asistida con ultrasonido, la misma que emplea ondas sonoras de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao & Liu, 2005). Esta técnica es la más económica y tiene requerimientos instrumentales más bajos en comparación con otras técnicas de extracción.

La maceración asistida con microondas también resulta ser ampliamente utilizada, dicha técnica emplea radiación de microondas para calentar la muestra y extraer compuestos antioxidantes de ella. Este método de extracción se basa en el uso de un disolvente orgánico para extraer los compuestos antioxidantes de la muestra y se realiza en un sistema cerrado

que está expuesto a la radiación de microondas, la cual causa movimiento de moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal (Harborne, 2013).

Para finalizar, según como lo mencionan Montero et al. (2014), uno de los métodos escasamente utilizados para la extracción de antioxidantes, es mediante líquido presurizado, este es un método de extracción que utiliza la presión como medio para extraer compuestos antioxidantes de diversas muestras. El mismo se basa en el uso de disolventes orgánicos en combinación con una alta presión y temperatura para extraer compuestos antioxidantes de la muestra, además de ello no requiere el uso de productos químicos tóxicos y no genera residuos peligrosos. Además, según Buelvas (2019) esta técnica se ha propuesto como una alternativa sostenible y más eficiente para obtener los compuestos presentes en estos tipos de matrices vegetales, dado que emplean solventes verdes a altas presiones o temperaturas, que mejoran la solubilidad y desorción de compuestos y acorta los procesos de extracción.

Al contrastar estas últimas tres técnicas seleccionadas con métodos convencionales como la extracción por ebullición o Soxhlet y maceración, se observa una clara superioridad en términos de eficiencia y selectividad, las técnicas modernas presentan ventajas significativas, como tiempos de procesamiento menores y un consumo de energía más eficiente en comparación con los métodos convencionales, además, estas últimas suelen estar relacionadas con largos tiempos de extracción, bajos niveles de pureza en los productos obtenidos, altos costos de consumo energético debido a la evaporación de las grandes cantidades de disolvente, bajo rendimiento y selectividad de la extracción, así como la descomposición térmica de compuestos termolábiles (Bechtold et al, 2012).

1.3 Determinación de actividad antioxidante y contenido de fenoles totales

La familia *Vaccinium* a la cual pertenece el mortiño se caracteriza por contener cantidades altas de vitamina C, pectina, celulosa y antocianinas, las cuales tienen propiedades antioxidantes, antitumorales, antiulcerosos y antiinflamatorias; antocianinas que evidencian una capacidad antioxidante de 1200 mg Trolox/ 100 g, según investigaciones realizadas por Vasco et al. (2009). Actualmente, para medir dicha capacidad antioxidante, se

hace uso de pruebas antioxidantes *in vitro*, estas comprueban la capacidad de inhibir el daño generado por especies oxidantes y además de ello son fáciles de aplicarlas, entre estos métodos se encuentran ABTS⁺, DPPH y FRAP, además estas técnicas, existen otras, las cuales van a permitir la determinación de fenoles totales de cada uno de los extractos.

Según el estudio realizado por Ochoa et al. (2009), la evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS⁺, se basa en la capacidad de un antioxidante para reducirlo, esta acción se mide mediante la decoloración del radical, cuanto mayor sea la capacidad de un extracto para reducir el radical ABTS⁺, mayor será su actividad antioxidante. El resultado se expresa generalmente en términos de equivalente de Trolox, que es un antioxidante sintético análogo de la vitamina E usado como referencia para calibrar la curva de estándar.

Por otro lado, el método FRAP se basa en la capacidad de un antioxidante para reducir el ion férrico (Fe³⁺) a su forma ferrosa (Fe²⁺) (Hernández & Isern, 2019). En este ensayo, se utiliza un reactivo que contiene un compuesto férrico que cambia de color al reducirse, la medida de la reducción se realiza mediante la lectura de la absorbancia del complejo formado. Cuanto mayor sea la capacidad de reducción, mayor será la actividad antioxidante de la muestra.

El método DPPH se basa en la capacidad de un antioxidante para donar un electrón al radical DPPH⁺, lo que resulta en una reducción de su color característico púrpura a amarillo (Barrionuevo, 2023). La disminución de la absorbancia a una longitud de onda específica se utiliza para cuantificar la capacidad antioxidante de la muestra, entonces de esta manera se tiene que cuanto mayor sea la capacidad de un extracto para reducir el radical DPPH, mayor será su actividad antioxidante.

Así también, el contenido de fenoles totales se determina mediante la reacción de los compuestos fenólicos presentes en la muestra con un reactivo específico, como el reactivo de Folin-Ciocalteu (Echavarría et al., 2009), dicha reacción produce un cambio de color que se cuantifica mediante espectrofotometría. El resultado se expresa generalmente en términos de equivalentes de ácido gálico, que es un compuesto de referencia utilizado para calibrar la

curva estándar de trabajo, entendiéndose que un mayor contenido de fenoles totales indica una mayor concentración de compuestos antioxidantes en la muestra.

Capítulo dos

Metodología

2.1 Tratamiento de la materia prima

Previo a la obtención de extractos, se realizó el adecuamiento de la materia prima, para ello se recolectó el mortuño el cual se limpió adecuadamente, posteriormente con la ayuda de un proceso de prensado se retiró la parte del extracto líquido del fruto y el subproducto se dispondrá en bandejas para ser secadas a 40°C durante un lapso de 2 días.

2.1.1 *Determinación de la humedad y trituración*

Para la determinación de la humedad se tomaron muestras representativas de cada bandeja y se las colocó en el equipo analizador halógeno de humedad, el cual determina esta propiedad con el método de pérdida por secado y consta de una unidad de pesaje y una unidad de calefacción halógena. Una vez que el porcentaje de humedad se reportó en un rango no mayor al 10%, se procedió a triturar todo el subproducto secado en un molino ultracentrífugo ZM 200 - RETSCH, de donde se obtuvo un tamaño de partícula de 250 µm.

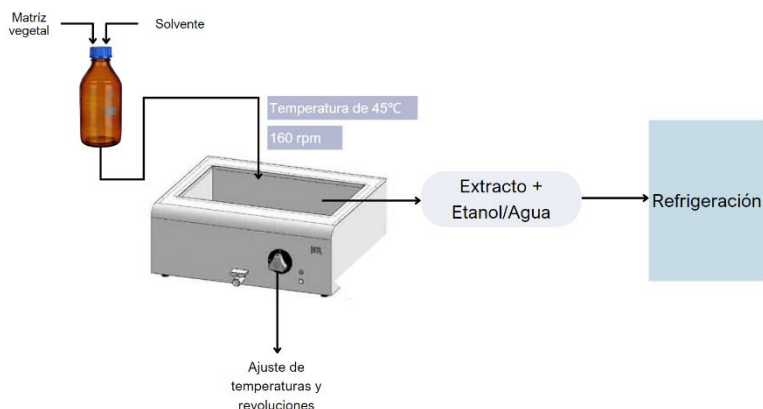
2.2 Procesos de extracción

2.2.1 *Maceración con agitación continua*

Para realizar este proceso de extracción se emplearon 20 g de muestra a la cual se le añadieron 200 mL de la mezcla agua y etanol, destacando que se empleó una relación 1:20 (muestra/solvente), dicha maceración dinámica se llevó a cabo en baño maría a una temperatura de 45°C con agitación magnética de 160 rpm durante un lapso de 6 horas. Transcurrido este tiempo se filtró la muestra al vacío, se almacenó el líquido y el sólido restante pasó por un nuevo proceso de maceración por un lapso de 3 horas, luego de ello se filtró y la solución líquida se evaporó en un rotavapor a 45 °C para obtener el extracto, el cual fue refrigerado para luego pasar por un proceso de liofilización (Ver apéndice A). Posterior a ello se almacenó el producto liofilizado en viales ámbar para evitar el daño causado por la luz, es importante mencionar que el proceso se realizó por triplicado. El proceso anterior se lo puede observar en la figura 2.

Figura 2

Esquema del proceso de maceración con agitación continua

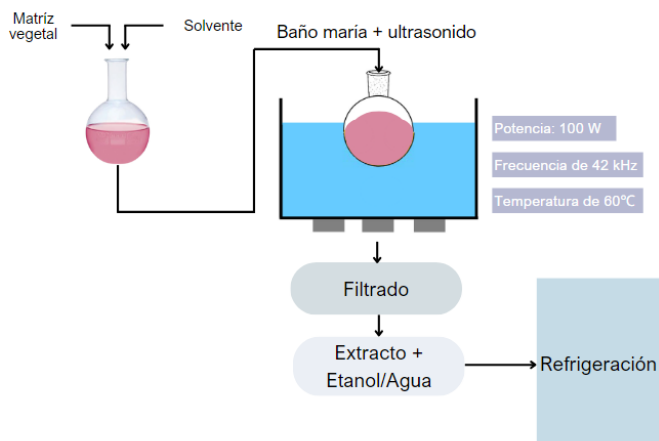


2.2.2 Maceración asistida con ultrasonido

Para la maceración asistida por ultrasonido, se emplearon 10 g de muestra, a la cual se le añadieron 200 mL de etanol/agua (50/50 v/v), para desarrollar este método se empleó el equipo Ultrasonic Cleaner (FS20 Fisher Scientific) el cual trabajó con una potencia de 100 W, frecuencia de 42 kHz, por un tiempo de 30 min y a una temperatura de 60°C. Al finalizar la extracción, la muestra se filtró al vacío, se almacenó la solución líquida y el extracto sólido paso nuevamente por el proceso descrito anteriormente. La solución líquida se rotaevaporó a 45 °C para obtener el extracto, luego se almacenó en refrigeración para pasar a un proceso de liofilización (Ver apéndice A). Posterior a ello se dispuso el extracto liofilizado en viales ámbar para evitar el daño causado por la luz, es importante mencionar que el proceso se realizó por triplicado. El proceso antes descrito, se esquematiza en la figura 3.

Figura 3

Esquema del proceso de maceración asistida con ultrasonido

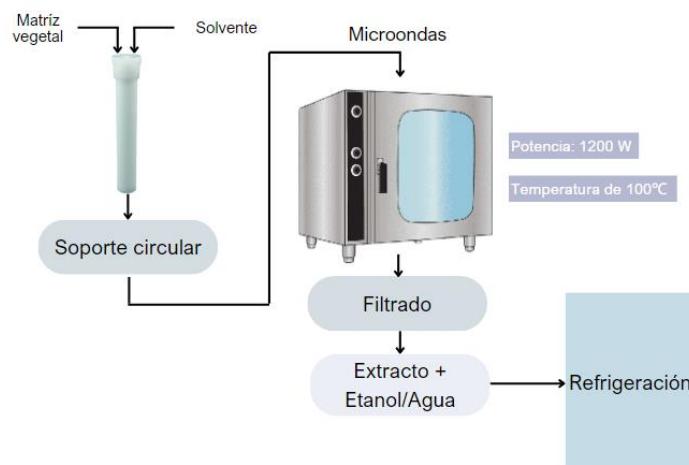


2.2.3 Maceración asistida con microondas

Para este método de extracción se hizo uso del equipo microondas (Mars 6 One touch, USA) el mismo contiene 24 tubos, en ellos se colocaron 3 g de muestra y 60 mL etanol/agua (50/50 v/v) respectivamente, las condiciones de operación a las que se trabajó fueron de 1200 W de potencia, 100 °C, durante un lapso de 60 min. Luego del proceso de extracción se filtró la muestra al vacío, obteniendo un extracto líquido el cual se rotaevaporó a 45°C, se almacenó en refrigeración y posteriormente se liofilizó por un lapso de 3 días (Ver apéndice A), por último, el extracto liofilizado se almacenó en un vial ámbar. Esta técnica de extracción también se realizó por triplicado. El proceso que se mencionó se evidencia en la figura 4.

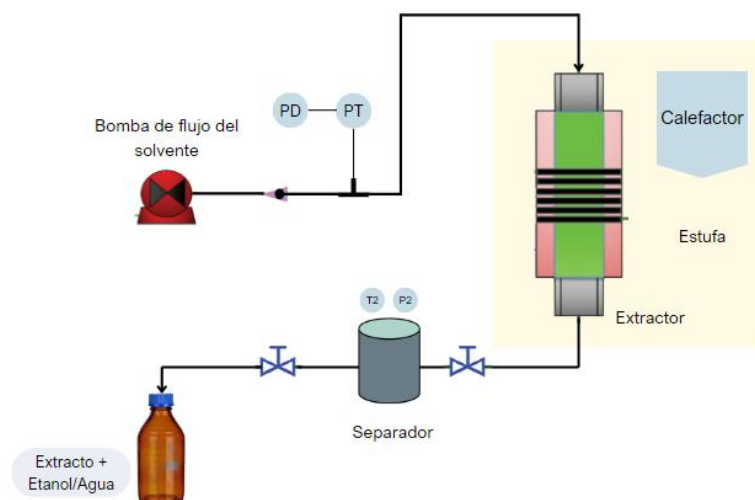
Figura 4

Esquema del proceso de maceración asistida con microondas



2.2.4 Líquido presurizado

Para este método de extracción se emplearon 20 g de muestra, la cual se colocó en un cartucho de papel filtro junto con 3 g perlas esmeriladas, este cartucho se ubicó en el extractor cilíndrico y se ajustó perfectamente al equipo, el mismo que se alimentó mediante un flujo constante de 5 mL/min con 600 mL de una solución 50:50 de etanol agua, durante ese lapso se verificó que no exista ninguna fuga en lo que resta del equipo. Una vez que la presión llegó a los 120 bar, se dejó presurizado por 12 horas a 60 °C, pasado ese tiempo se inició con la extracción por un lapso aproximado de 2 horas, pasado ese tiempo, el extracto líquido obtenido se rotaevaporó a 45 °C hasta quitar todo el etanol posible, posterior a ello se almacenó en refrigeración y se dio paso a un proceso de liofilización por 3 días (Ver apéndice A), por último, el extracto liofilizado se almacenó en un vial ámbar. Esta técnica de extracción de igual manera se realizó por triplicado. El proceso que se mencionó se evidencia en la figura 5.

Figura 5*Esquema de líquido presurizado*

2.3 Cálculo del rendimiento

Para el cálculo del rendimiento se pesó cada uno de los viales, primero vacíos y luego con el extracto correspondiente, luego de ello mediante diferencia del peso de este, se obtuvo la cantidad de extracto de cada triplicado por cada técnica de extracción, debido a que se almaceno el extracto en viales diferentes, se sumó para obtener la cantidad total, luego de ello con los valores correspondientes y aplicando la metodología de cálculo descrita en el (Apéndice B) se obtuvo el valor de rendimiento para cada triplicado.

2.4 Determinación de Fenoles totales

En un microtubo se pesaron 10 mg del extracto, al mismo se le adicionaron 250 μL de agua ultrapura y 250 μL de metanol, mientras que en 3 microtubos aparte se colocaron 250 μL de la solución 1:1 agua ultrapura-metanol, y 250 μL de la solución anterior a esta con el objetivo de realizar las disoluciones pertinentes.

Para este procedimiento se siguió lo descrito por Thaipong et al. (2006) con modificaciones, así como también se hizo uso del Lector de microplacas EPOCH2, en donde se seleccionó el tipo de placa a utilizar el cual fue Nunclon 96 flat bottom, se fijó la temperatura

a 20.6 °C con una agitación shake double orbital por 3:00 (HH:MM:SS) y una lectura de absorbancia de 593 nm.

Para la preparación de la microplaca, en primer lugar se realizó la lectura del blanco por triplicado, para ello se colocaron 255 µL de agua ultrapura y 15 µL de la solución de trabajo Folin, se introdujo al equipo y se realizó una primera lectura por 5 minutos, luego de ello se retiró la microplaca y al resto de pocillos se les adicionaron 240 µL de agua, 15 µL de la solución de trabajo Folin además de 15 µL de cada extracto de igual manera por triplicado, se introdujo la placa nuevamente y al cabo de 5 minutos de reacción se le adicionaron 30 µL de carbonato de sodio 1 N a todos los pocillos incluidos el blanco, se introdujo nuevamente la placa y se dejó reaccionar durante dos horas en oscuridad.

2.5 Capacidad antioxidante

2.5.1 ABTS

En primer lugar, se realizaron las disoluciones de las muestras, para la solución madre se pesaron 10 mg del extracto en un microtubo, al mismo se le adicionaron 250 µL de agua ultrapura y 250 µL de metanol, en 7 microtubos aparte se colocaron 250 µL de agua ultrapura, y 250 µL de la solución anterior a esta, esto con el objetivo de diluir las muestras.

Por otro lado, para lo que es el control de la solución de trabajo ABTS se siguió el procedimiento descrito por Thaipong et al. (2006) con respectivas modificaciones, además del protocolo lector de microplacas EPOCH2, en donde se seleccionó el tipo de placa a utilizar el cual fue Nunclon 96 flat bottom, se fijó la temperatura a 25 °C con una agitación shake double orbital por 3:00 (HH:MM:SS) y una lectura de absorbancia de 734 nm.

Para la preparación de la placa en primer lugar se añadió el blanco por triplicado, el cual consta de 270 µL de la solución madre ABTS más 30 µL de agua ultrapura, este se introdujo al equipo y se leyó por 5 min, se retiró la placa y se añadió al resto de pocillos 270 µL de solución madre ABTS más 30 µL de cada disolución antes preparada, esto también se añadió por triplicado. Se ingresó la placa en el equipo y se dejó reaccionar durante 1 hora en oscuridad.

2.5.2 FRAP

En un microtubo se pesaron 10 mg del extracto, al mismo se le adicionaron 250 μ L de agua ultrapura y 250 μ L de metanol, mientras que en 3 microtubos aparte se colocaron 250 μ L de la solución 1:1 agua ultrapura-metanol, y 250 μ L de la solución anterior a esta con el objetivo de realizar las disoluciones pertinentes.

Para la determinación del poder de reducción férrica (FRAP) se empleó el lector de microplacas EPOCH2 con la placa Nunclon 96 flat bottom, en el sistema, se fijó la temperatura a 37 °C con una agitación shake double orbital por 3:00 (HH:MM:SS) y una lectura de absorbancia de 593 nm.

Para la lectura de las absorbancias de las muestras se preparó la microplaca siguiendo el protocolo descrito por Thaipong et al. (2006) y Henderson et al. (2015). En primer lugar, se realizó la lectura de blanco por triplicado, para ello en cada pocillo se adiciono 270 μ L de solución de trabajo FRAP y 30 μ L de metanol, además de ello se realizó el control de la absorbancia del estándar Trolox utilizado en la curva de calibración (por triplicado), donde se colocó 270 μ L de solución de trabajo FRAP y 30 μ L del estándar Trolox que corresponda, se introdujo la microplaca al equipo y se dejó reaccionar por 5 minutos.

Pasado ese tiempo se realizó la lectura de cada extracto por triplicado, siendo entonces que en cada pocillo se colocaron 270 μ L de la solución de trabajo FRAP y 30 μ L de cada muestra a analizar, se dejó reaccionar durante 30 minutos en oscuridad, a 37°C y se realizó la lectura de absorbancia a 593 nm.

2.5.3 DPPH

En primer lugar, se realizaron las disoluciones pertinentes, para ello en un microtubo se pesaron 10 mg del extracto, al mismo se le adicionaron 250 μ L de agua ultrapura y 250 μ L de metanol, mientras que en 3 microtubos aparte se colocaron 250 μ L de la solución 1:1 agua ultrapura-metanol, y 250 μ L de la solución anterior, de tal manera que se llegó a una disolución 1:1000.

Para este procedimiento se siguió lo descrito por Thaipong et al. (2006) y Cheng et al. (2006) con modificaciones, así como también se hizo uso del lector de microplacas EPOCH2,

en donde se seleccionó el tipo de placa a utilizar el cual fue Nunclon 96 flat bottom, se fijó la temperatura a 20 °C con una agitación shake double orbital por 3:00 (HH:MM:SS) y una lectura de absorbancia de 515 nm.

Para la preparación de la placa en primer lugar se colocó el blanco por triplicado, adicionando 300 µL de metanol, así como también el control de la solución de trabajo DPPH de igual manera por triplicado, para ello se colocaron 30 µL de metanol y 270 µL de solución de trabajo, por último, se realizó un control de la absorbancia de un estándar de Trolox utilizado en la curva de calibración (por triplicado), en donde se colocaron 270 µL de solución de trabajo DPPH y 30 µL del estándar Trolox que corresponda. Una vez realizados los respectivos controles se dio paso a la lectura de los extractos, para ello en el resto de los pocillos se colocaron 270 µL de solución de trabajo DPPH y 30 µL de cada extracto a analizar, y se dejó reaccionar durante 1 hora en oscuridad, a 20°C.

2.6 Análisis estadístico

Como ya se mencionó anteriormente, cada uno de los ensayos se realizó por triplicado, por ello se obtuvieron un total de 12 muestras a analizar, así como también la determinación de fenoles totales como la capacidad antioxidante se realizó por triplicado. La comparación de datos obtenidos se realizó en el programa Minitab 16 en donde se aplicó el análisis de la varianza ANOVA de un solo factor, empleando el 95% de confianza, además de la prueba desarrollada a través Tukey para determinar la diferencia entre las medias obtenidas, si el valor p es menor que 0.05, entonces se concluirá que al menos una de las técnicas de extracción tiene efecto sobre las variables de respuesta.

Capítulo tres





Análisis de resultados

3.1 Rendimiento de los extractos obtenidos

La aplicación de la metodología descrita en el capítulo anterior llevó a obtener cada uno de los extractos correspondientes a los métodos de extracción, dando como resultado 12 extractos del subproducto de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) los cuales fueron analizados para determinar su capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales, dichos resultados se evidencian en la tabla 3. Además de ello en el apéndice B se denotan los valores mediante los cuales se obtuvo el rendimiento.

Tabla 3

Rendimiento de extracción de los diferentes métodos de extracción de antioxidantes del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)

Método de extracción	Solvente	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	N° de muestras	Rendimiento (%)	Resultados
Maceración con agitación continua	EtOH-H ₂ O	45	6	1	11.94	
				2	11.70	
				3	12.17	
Maceración asistida con ultrasonido		60	0.5	1	18.25	
				2	19.76	
				3	19.01	
Maceración asistida con microondas		100	1	1	28.69	
				2	27.42	
				3	27.63	
Líquido presurizado	60	14	1	14.59		
			2	10.80		
			3	12.69		

Bajo el diseño experimental empleando y ejecutado en el programa Minitab 16, se aplicó el ANOVA para los valores del rendimiento obtenido en cada método de extracción (Ver apéndice C), tras aplicarlo, se obtuvieron los resultados que se denotan en la tabla 4.

Tabla 4

Resultados del ANOVA para el rendimiento de las diferentes técnicas de extracción

Método de extracción	Rendimiento (%)
Maceración con agitación continua	11.94 ± 0.23 ^C
Maceración asistida con ultrasonido	19.01 ± 0.76 ^B
Maceración asistida con microondas	27.91 ± 0.68 ^A
Líquido Presurizado	12.70 ± 1.90 ^C

Nota. Cada valor representa a la media y desviación estándar respecto a las tres replicas realizadas. Las medias que no tengan una misma letra mayúscula son significativamente diferentes para Tukey.

Tras aplicar el análisis de varianza de un solo factor se dio a denotar que a las condiciones de experimentación (método de extracción), las respuestas mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), es decir que, respecto a los valores de las medias obtenidas, se tiene que maceración asistida con microondas presentó un mayor rendimiento con respecto a las otras tres técnicas de extracción (27.91 ± 0.68 %). Este método es una técnica eficaz y económica para extraer compuestos de interés a escala de laboratorio, resultando ser más eficaz que los métodos convencionales, tiene mayores rendimientos, requiere de menos tiempo y el consumo de solvente es menor (Martino et al. 2006). La maceración asistida con microondas puede presentar un mayor rendimiento en comparación con otras técnicas de extracción debido a sus propiedades específicas, una de ellas es la capacidad de las ondas para generar calor de manera selectiva en componentes polares puede mejorar la eficiencia en la ruptura celular, facilitando así la liberación de antioxidantes, además, la aplicación de esta técnica suele implicar tiempos de procesamiento más cortos, acelerando

la difusión de compuestos bioactivos y contribuyendo a un proceso más rápido sin comprometer la eficacia de la extracción.

Además de ello, según Soto & Rosales (2016), el rendimiento de una extracción depende en su mayoría de la polaridad del disolvente, de la composición química de los componentes a extraer, el tamaño molecular y de factores como la temperatura, tamaño de partícula, tiempo de contacto con el disolvente, relación solvente/masa y la concentración del disolvente. En el estudio realizado por D'Alessandro et al. (2014) demostraron que los rendimientos de extracción obtenidos utilizando etanol al 50% fueron aproximadamente 3 veces superiores a los obtenidos en extracciones acuosas, debido a ello, en la presente investigación se planteó el uso de la relación etanol/agua (50/50 v/v) para todas las extracciones.

Por otro lado al comparar los valores de rendimiento obtenidos se evidencia que se obtuvo un mayor valor respecto al reportado por Guamán (2022) en su estudio de la "Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la hoja y fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) frente a bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*)", en el mismo se presentó un valor de 11.19 ± 0.007 % mediante una extracción por macerado, mientras que, en la presente investigación, maceración asistida por microondas representa el doble de este valor 27.91 ± 0.68 % evidenciando mejoras en este parámetro.

3.2 Fenoles totales

De la misma manera se realizó el análisis estadístico ANOVA, en el programa Minitab 16 (Ver apéndice C), donde se obtuvieron los resultados que se exponen en la tabla 5.

Tabla 5

Resultados del contenido de fenoles totales para las diferentes técnicas de extracción

Método de extracción	Contenido de fenoles totales mgE (Ácido gálico) /g extracto
Maceración con agitación continua	3.37 ± 0.07 ^A
Maceración asistida con ultrasonido	3.63 ± 0.14 ^A
Maceración asistida con microondas	3.17 ± 0.36 ^A
Líquido Presurizado	3.03 ± 0.50 ^A

Nota. Cada valor representa a la media y desviación estándar respecto a las tres replicas realizadas. Las medias que tengan una misma letra mayúscula no son significativamente diferentes.

Respecto a las absorbancias obtenidas en los ensayos para fenoles totales, se realizaron los cálculos pertinentes, los mismos que arrojaron los resultados descritos en la tabla 5, donde se determinó que a las condiciones de experimentación no se evidenció una diferencia significativa ($p > 0.05$) debido al método de extracción respecto contenido de fenoles totales. Lo reportando en la anterior tabla, difiere con un estudio reportado por Pingret et al. (2012), en donde compararon la extracción convencional (maceración) y la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales de residuos de manzana, los resultados mostraron que la extracción asistida por ultrasonido fue más eficaz que la maceración convencional, con un aumento de más del 30% en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos.

3.3 Capacidad antioxidante de los extractos

Tras aplicar el análisis estadístico ANOVA, empleando las pruebas de Tukey, en el programa Minitab 16 (Ver apéndice C), se tienen los resultados expresados en la tabla 6.

Tabla 6

Resultados de la capacidad antioxidante para las diferentes técnicas de extracción

Método de extracción	ABTS	FRAP	DPPH
	mgE (Trolox)/ g extracto		
Maceración con agitación continua	10.04 ± 0.12 ^A	10.88 ± 0.18 ^B	8.33 ± 0.01 ^A
Maceración asistida con ultrasonido	10.81 ± 1.39 ^A	17.70 ± 0.75 ^A	8.21 ± 1.32 ^A
Maceración asistida con microondas	6.56 ± 1.25 ^B	9.17 ± 0.84 ^C	4.65 ± 0.51 ^B
Líquido Presurizado	11.46 ± 1.14 ^A	11.01 ± 0.18 ^B	9.72 ± 0.94 ^A

Nota. Cada valor representa a la media y desviación estándar respecto a las tres replicas realizadas. Las medias que no tengan una misma letra mayúscula son significativamente diferentes para Tukey.

Para cada una de las pruebas empleadas como ABTS, FRAP y DPPH, se determinó cual presentó mejor resultado con relación a las técnicas de extracción, se emplearon las curvas de calibración que se presentan en el Apéndice D, por otro lado, los resultados de estos se discuten en los apartados siguientes.

3.3.1 ABTS

Bajo el diseño experimental realizando el análisis ANOVA para el ensayo ABTS, se determinó que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los resultados. La extracción asistida con microondas mostró el menor resultado 6.56 ± 1.25 mgE (Trolox)/g extracto, mientras que el resultado fue similar para las otras tres técnicas de extracción entre 10.04 ± 0.12 mgE (Trolox)/g extracto y 11.46 ± 1.14 mgE (Trolox)/g extracto. Estos resultados resultan cercanos al reportado por Vasco et al. (2009), quienes reportaron un valor de 12 mgE (Trolox)/g de extracto.

El decrecimiento de la medida de actividad antioxidante por las técnicas de extracción se puede explicar debido a que la maceración asistida con microondas puede causar la degradación de los compuestos antioxidantes, debido a que utiliza ondas electromagnéticas de alta frecuencia para calentar el material vegetal, este calentamiento puede causar la degradación de los compuestos antioxidantes de varias maneras, como, por ejemplo: la

ruptura de las estructuras moleculares de los compuestos antioxidantes, la formación de radicales libres, que pueden reaccionar con los compuestos antioxidantes y destruirlos y por último la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos antioxidantes, lo que puede dificultar su extracción.

3.3.2 FRAP

De la misma manera, respecto al ensayo FRAP, se determinó que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) de dichos resultados, se asevera que “maceración asistida con ultrasonido”, presentó una respuesta más alta, presentado un valor de 17.71 ± 0.75 mgE(Trolox)/g extracto. La respuesta para maceración con agitación continua y líquido presurizado fue similar con un valor promedio de 10 mgE(Trolox)/g extracto, y el peor resultado fue obtenido con maceración asistida con microondas 9.17 ± 0.84 mgE(Trolox)/g extracto.

Este comportamiento fue similar e incluso mayor a lo reportado por Alarcón (2018), el cual empleo maceración usando como solvente de extracción metanol–agua proporción 80:20 v/v, para el extracto de mortiño, este último presentó un valor de 8.09 mgE (Trolox)/ g de extracto. Según como lo mencionan Reátegui et al. (2014) esto puede corresponder a que el ultrasonido genera reducción de partículas haciéndolas más pequeñas y liberando sus compuestos.

En los estudios realizados, por D’Alessandro et al. (2014), se sugiere que es importante conocer la cinética de extracción de las moléculas objetivo y el tiempo de extracción necesario para obtener un rendimiento determinado, para su trabajo estableció que a altas temperaturas se observó una disminución del rendimiento de antocianinas con el tiempo, lo que su degradación térmica en tales condiciones. Es por ello que, para mejorar esta técnica de extracción se plantea emplear una menor temperatura a la establecida (60°C), debido a que para el caso de la *Aronia Melanocarpa* a 70°C ya se presentó una degradación significativa de antocianinas, atribuida a esta degradación térmica.

3.3.3 DPPH

Por último, para el ensayo DPPH, se llegó a la respuesta de que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los datos empleados, tal como se muestra en la tabla 6, la extracción realizada mediante maceración asistida con microondas mostro el menor resultado 4.65 ± 0.51 mgE (Trolox)/g extracto, mientras que, por otro lado, los resultados de las otras técnicas fueron similares, colocándose en rangos de 8.21 ± 1.32 y 9.72 ± 0.94 mgE (Trolox)/g extracto.

Los frutos del género *Vaccinium* se caracterizan por poseer una gran cantidad de diferentes compuestos con actividad antioxidante (Netzel et al., 2006), los resultados tienen concordancia con lo mostrado por Alarcon (2018) en su estudio de la composición química y capacidad antioxidante de un extracto polifenólico del mortiño proveniente de diferentes regiones del Ecuador, en donde reportó un valor de 9 mgE (Trolox)/g de extracto. Además, para este punto es importante destacar que la variabilidad de la actividad antioxidante puede verse afectada por el nivel de madurez de los frutos y hojas y la temperatura al cual se almacena el extracto (Álvarez et al., 2016).

Conclusiones

Se demostró que la elección de la técnica de extracción influye significativamente en el rendimiento de los extractos obtenidos, así como en su capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales, es por ello que se logró realizar las cuatro técnicas de extracción planteadas como es el caso de maceración con agitación continua, maceración asistida con ultrasonido, maceración asistida con microondas y líquido presurizado

Tras realizar los ensayos se tiene que tanto maceración con agitación continua, con valores de 10.04 ± 0.12 y 8.33 ± 0.01 mgE (Trolox)/g extracto, maceración asistida con ultrasonido 10.81 ± 1.39 y 8.21 ± 1.32 mgE (Trolox)/g extracto, y líquido presurizado 11.46 ± 1.14 y 9.72 ± 0.94 mgE (Trolox)/g extracto, como mejores técnicas de extracción evaluadas en ABTS y DPPH respectivamente, mientras que la extracción por maceración asistida con microondas mostró el menor valor.

Para el análisis FRAP se determinó a la técnica de maceración asistida con ultrasonido como mejor técnica de extracción con un valor de 17.70 ± 0.75 mgE (Trolox)/g extracto.

Por último, para fenoles totales se estableció que estos no se vieron significativamente afectados por las técnicas de extracción.

Recomendaciones

Aunque se evaluaron cuatro técnicas de extracción en este estudio, existen otras técnicas que podrían ser evaluadas para la extracción de antioxidantes del mortiño, por ello se recomienda emplear la extracción con CO₂ supercrítico para determinar el efecto que estas generan.

Se recomienda estudiar la estabilidad de los antioxidantes extraídos del mortiño en diferentes condiciones de almacenamiento y procesamiento, para determinar su viabilidad como ingredientes en la industria alimentaria y farmacéutica.

Para finalizar es recomendable que los diferentes extractos se encuentren almacenados en continua refrigeración y envases ámbar, de tal manera que puedan ser útiles para futuras investigaciones.

Referencias

- Alarcón, K. (2018). Estudio de la composición química y la capacidad antioxidante de un extracto polifenólico del mortiño proveniente de diferentes regiones de Ecuador. Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2018.
- Álvarez, F., Korbee, N., & Figueroa, F. (2016). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4), 271–288.
- Álvarez, F., Korbee, N., & Figueroa, F. (2016). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4), 271–288.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. (2013). Técnicas para la extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales: una revisión. *Revista de ingeniería de alimentos*, 117 (4), 426-436
- Barrionuevo, A. (2023). Composición química y capacidad antioxidante del aceite esencial de *Baccharis tricuneata* (L. f.) Pers. Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco.
- Bechtold, T., & Mussak, R. (2012). "Conventional Separation Approaches," in *Biorefinery CoProducts: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*.
- Bechtold, T., & Mussak, R. (2012). "Conventional Separation Approaches," in *Biorefinery CoProducts: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*.
- Buelvas Puello, L. M. (2019). *Valorización y modelamiento de la extracción de aceites a partir de la semilla de mango (Mangifera indica L.) utilizando técnicas no convencionales* (Doctoral dissertation).
- Buelvas, L. (2019). Valorización y modelamiento de la extracción de aceites a partir de la semilla de mango (Mangifera indica L.) utilizando técnicas no convencionales (Doctoral dissertation).

- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436
- D'Alessandro, L. G., Dimitrov, K., Vauchel, P. & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.
- D'Alessandro, L., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.
- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, 16(1), 126-131.
- Gallardo, C. (2015). *Mortiño: la Perla de los Andes*. Quito. Universidad de las Américas
- Gao, M., & Liu, C. (2005). Comparación de técnicas para la extracción de flavonoides a partir de células cultivadas de *Saussurea medusa Maxim*. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*, 21, 1461-1463.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica colombiana*, 13(3), 27-36.
- Gaviria, C. A., Ochoa, C. I., Sánchez, N., Medina, C. I., Lobo, M., Galeano, P. L., ... & Gaviria, C. A. (2009). Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño*, 112.
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., ... & Gaviria, C. (2009). Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño*, 112.
- González, L. (2002). Propagación y productos del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*). Proyecto Paramo Andino ECOPAR, 100.
- Guamán, E. J. (2022). *Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la hoja y fruto del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) frente a bacterias patógenas (Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Listeria*

- monocytogenes*) (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Biotecnología).
- Harborne, N., Marete, E., & Christophe, J. (2013). 17 técnicas convencionales de extracción de fitoquímicos. Manual de fitoquímicos de alimentos vegetales, 399.
- Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. K. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food chemistry*, 174, 119-123.
- Hernández, S., & Isern, D. (2019). Estudio cuantitativo y comparativo de la actividad antioxidante total en soja por método FRAP. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano
- Loor, J., & Zambrano Navarro, A. (2016). Estudio del Mortiño, Beneficios, y Aplicación en la Repostería. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química
- Montero, L., López, I., Cediell, A. L., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2014). Extracción con líquidos presurizados para la obtención de fracciones antioxidantes y anti-inflamatorias a partir de la microalga *Isochrysis galbana*. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)
- Netzel, M., G. Netzel, Q. Tian, S. Schwartz e I. Konczak. (2006). Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26): 9820-9826.
- Netzel, M., Netzel, Q., Tian, S., Schwartz e I, K. (2006). Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26): 9820-9826.
- Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo Arias, M., Galeano, P., Mosquera, A., ... & Gaviria, C. (2009). Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz).
- Olivares, D., Cabrera, B., & Martínez, M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*, 18(50), 10-15.

- Pingret, D., Fabiano, A., Bourvellec, C., Renard, C., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of food engineering*, 111(1), 73-81.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Bourvellec, C.L., Renard, C.M. & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of food engineering*, 111(1), 73-81.
- Reátegui, J., da Fonseca Machado, A., Barbero, G., Rezende, C., & Martínez, J. (2014). Extracción de compuestos antioxidantes a partir de bagazo de mora (*Rubus* sp.) mediante CO₂ supercrítico asistido por ultrasonido. *La Revista de Fluidos Supercríticos*, 94, 223-233.
- Reátegui, JLP, da Fonseca Machado, AP, Barbero, GF, Rezende, CA, & Martínez, J. (2014). Extracción de compuestos antioxidantes a partir de bagazo de mora (*Rubus* sp.) mediante CO₂ supercrítico asistido por ultrasonido. *La Revista de Fluidos Supercríticos*, 94, 223-233.
- Soria, A., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology* 21(7): 323-331.
- Soria, A.C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology* 21(7): 323-331.
- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714.
- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714.
- Suárez, M. (2018). Evaluación de la capacidad antioxidante de una crema de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en la matriz pastelera. Universidad de las Américas.

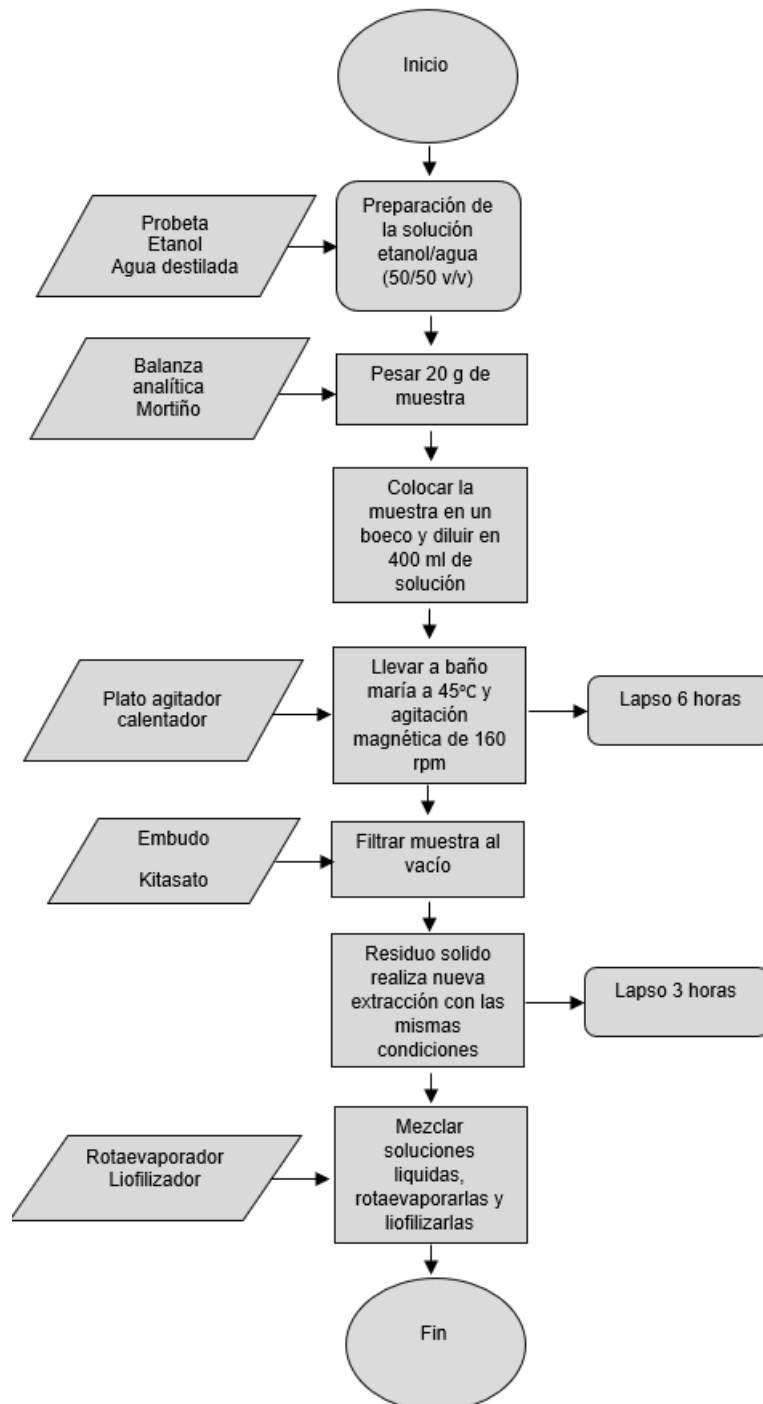
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Traspeña, J. L. H., Ramírez-Melo, L. M., del Socorro Cruz-Cansino, N., Delgado-Olivares, L., Ramírez-Moreno, E., Ariza-Ortega, J. A., & Alanís-García, E. (2019). Extracción de antioxidantes del residuo de betabel (*Beta vulgaris*) por ultrasonido: comparación con métodos convencionales. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 7(14), 70-73.
- Traspeña, J., Ramírez, L., del Socorro Cruz-Cansino, N., Delgado, L., Ramírez, E., Ariza, J. A., & Alanís, E. (2019). Extracción de antioxidantes del residuo de betabel (*Beta vulgaris*) por ultrasonido: comparación con métodos convencionales. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 7(14), 70-73.
- Tupuna, S., Vera, E., & Ruales, J. (2016). Obtención de Jugo Clarificado Concentrado de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) Mediante el Uso de Tecnología de Membranas. *Revista Politécnica*, 38(1), 18.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J. y Kamal-Eldin, A. (2009). Composición química y perfil de compuestos fenólicos del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Revista de química agrícola y alimentaria*, 57 (18), 8274-8281.

Apéndice

Apéndice A. Procesos de extracción de antioxidantes del mortiño

Figura A1

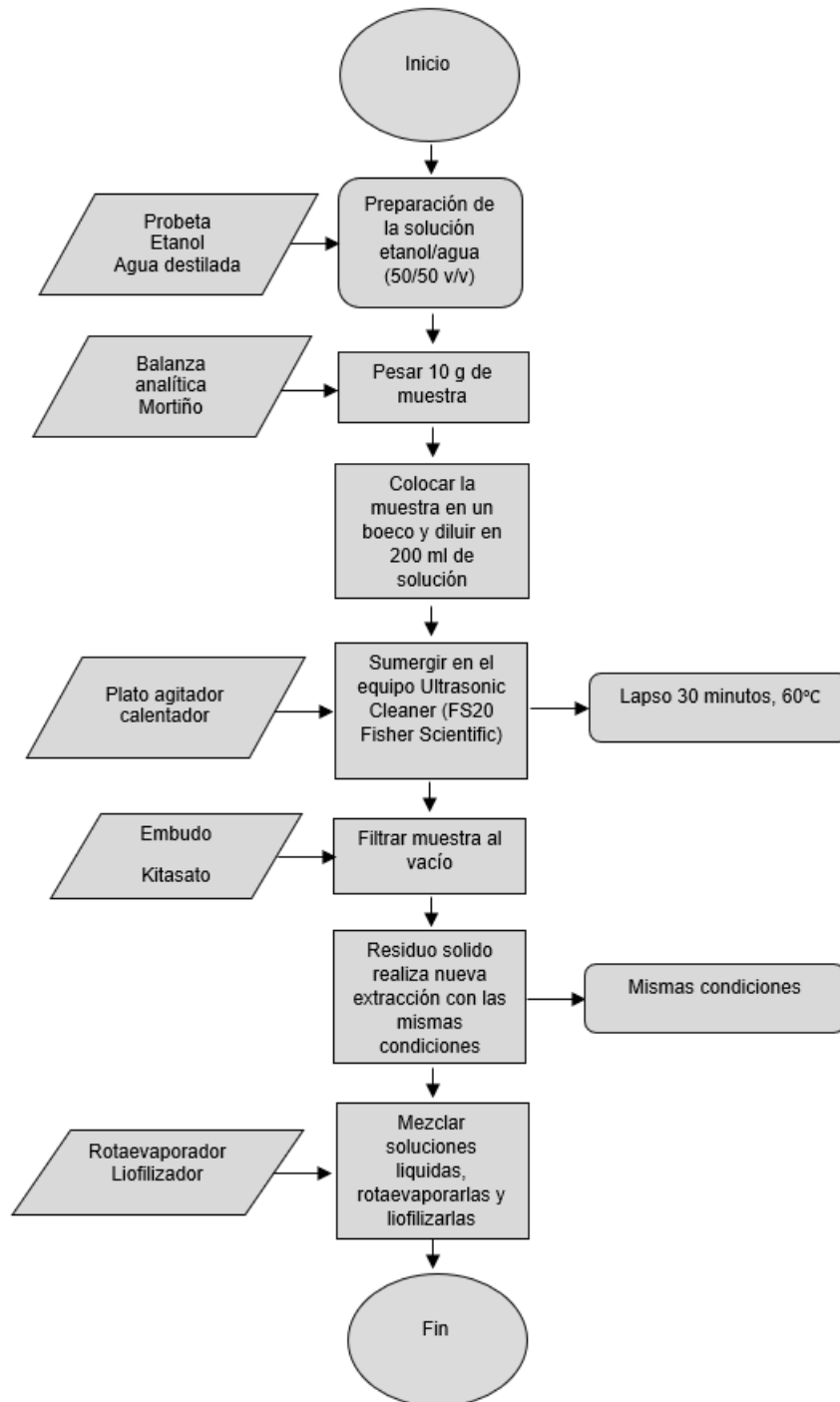
Diagrama del proceso de maceración con agitación continua



Nota. Elaboración propia

Figura A2

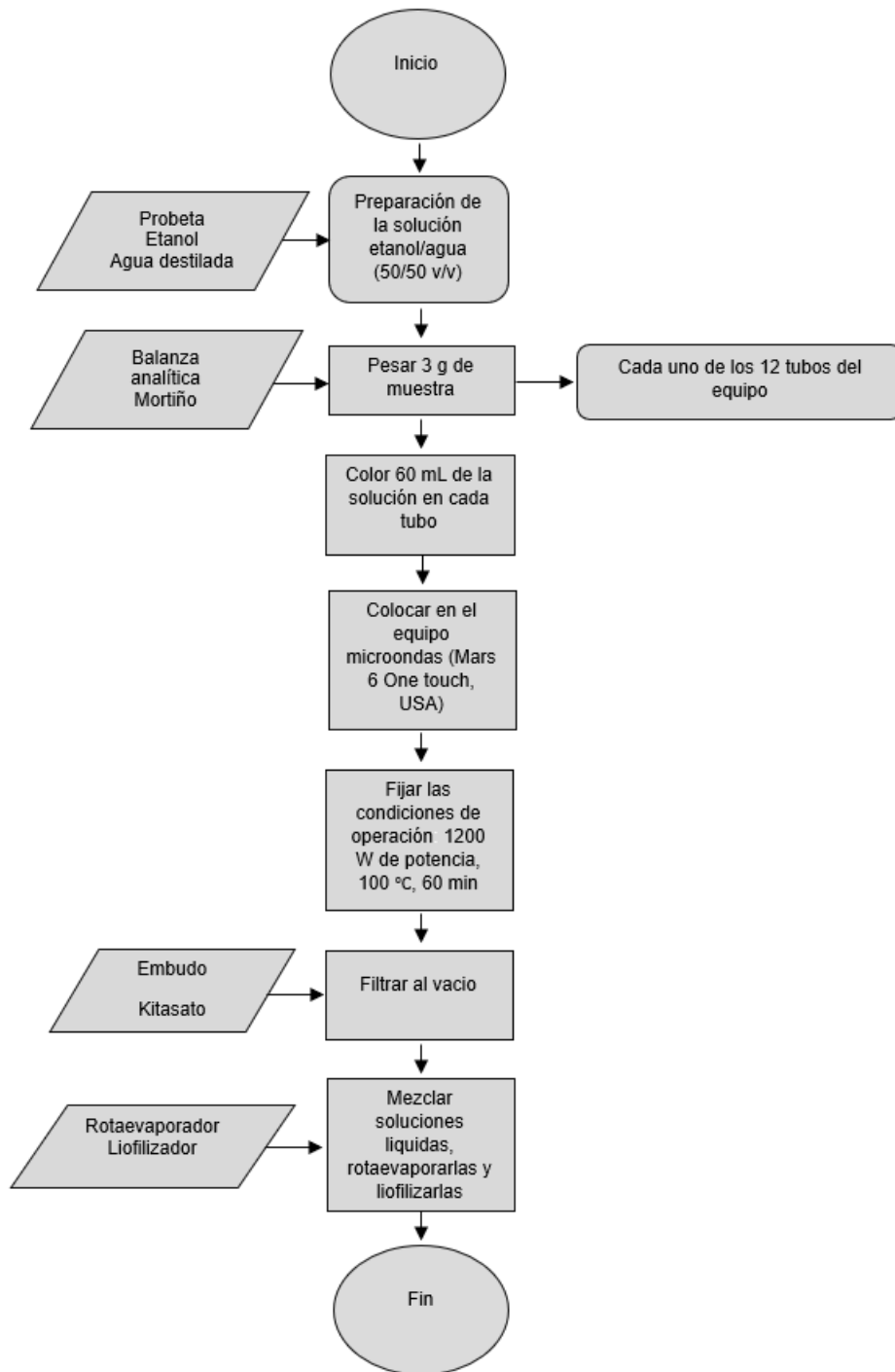
Diagrama del proceso de maceración asistida con ultrasonido



Nota. Elaboración propia

Figura A3

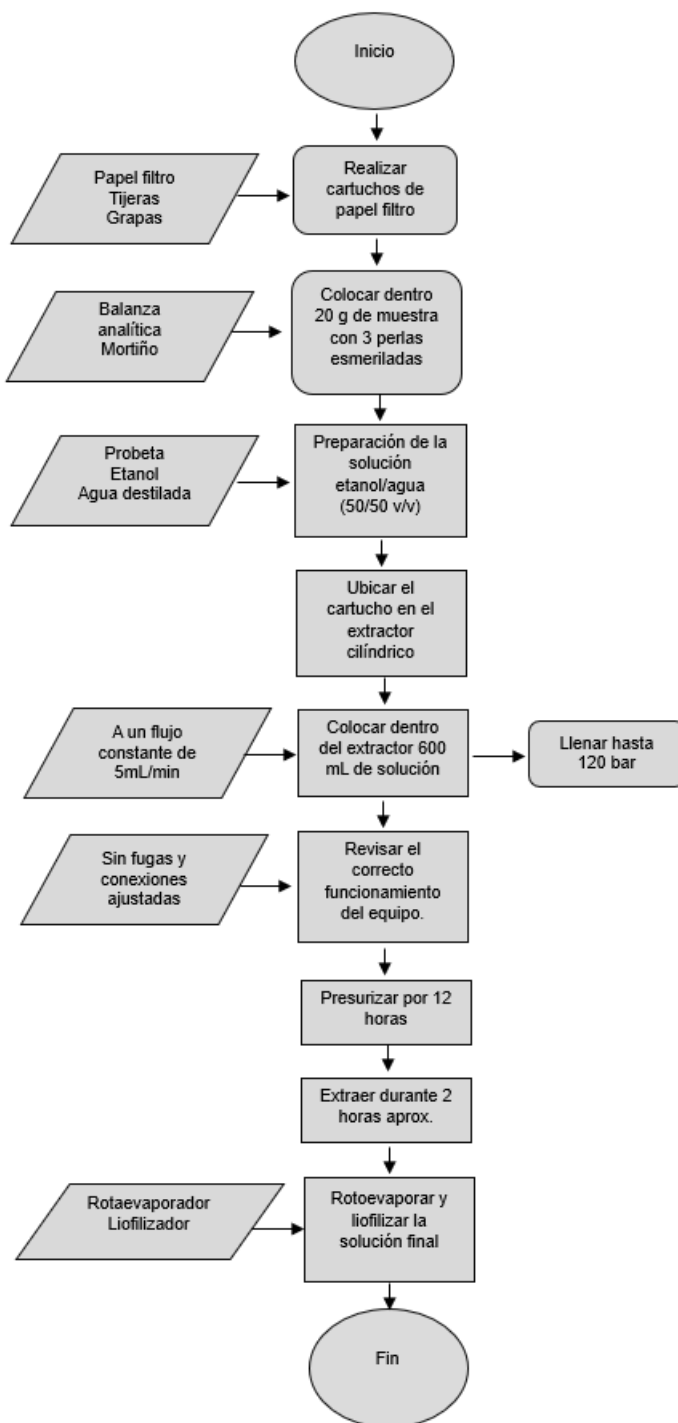
Diagrama del proceso de maceración asistida con microondas



Nota. Elaboración propia

Figura A4

Diagrama del proceso de líquido presurizado



Nota. Elaboración propia

Apéndice B. Rendimiento de cada uno de los procesos de extracción

Cálculo del rendimiento para maceración con agitación continua

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto (g)}}{\text{peso de la muestra inicial empleada (g)}} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{7.16}{20} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = 35.81$$

Cálculo del rendimiento para maceración asistida con ultrasonido

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto (g)}}{\text{peso de la muestra inicial empleada (g)}} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{5.7}{10} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = 57.03$$

Cálculo del rendimiento para maceración asistida con microondas

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto (g)}}{\text{peso de la muestra inicial empleada (g)}} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{30.14}{36} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = 83.74$$

Cálculo del rendimiento para líquido presurizado

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto (g)}}{\text{peso de la muestra inicial empleada (g)}} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{7.62}{20} \cdot 100$$

$$\% \text{Rendimiento} = 83.74$$

Tabla B1

Resultados del rendimiento de maceración con agitación continua

Ensayo	Maceración con agitación continua	
	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
1	2.39	11.94
2	2.34	11.70
3	2.43	12.17
Total	7.16	35.81

Nota. Los numerales del 1-3 representan cada uno de los triplicados realizados

Tabla B2

Resultados del rendimiento de maceración asistida con ultrasonido

Ensayo	Maceración con agitación continua	
	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
1	1.83	18.25
2	1.98	19.76
3	1.90	19.01
Total	5.70	57.03

Nota. Los numerales del 1-3 representan cada uno de los triplicados realizados

Tabla B3

Resultados del rendimiento de maceración asistida con microondas

Ensayo	Maceración con agitación continua	
	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
1	10.33	28.69
2	9.87	27.42
3	9.94	27.63
Total	30.14	83.74

Nota. Los numerales del 1-3 representan cada uno de los triplicados realizados

Tabla B4

Resultados del rendimiento de líquido presurizado

Ensayo	Maceración con agitación continua	
	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
1	2.92	14.49
2	2.16	10.80
3	2.54	12.69
Total	7.62	38.09

Nota. Los numerales del 1-3 representan cada uno de los triplicados realizados

Apéndice C. Análisis de la varianza ANOVA para cada ensayo

Tabla C1

Método de Tukey para el efecto del rendimiento sobre la extracción

EXT	N	Media	Grupo
3	3	27.91	A
2	3	19.01	B
4	3	12.70	C
1	3	11.94	C

Nota. El numero 1 representa a maceración con agitación continua, el número 2 corresponde a maceración asistida con ultrasonido, el número 3 representa a maceración asistida con microondas y el número 4 representa a líquido presurizado. Las letras diferentes presentan diferencias significativas entre sus medias

Tabla C2

Método de Tukey para el efecto de fenoles totales sobre la extracción

EXT	N	Media	Grupo
2	3	3.63	A
1	3	3.37	A
3	3	3.17	A
4	3	3.03	A

Nota. El numero 1 representa a maceración con agitación continua, el número 2 corresponde a maceración asistida con ultrasonido, el número 3 representa a maceración asistida con microondas y el número 4 representa a líquido presurizado. Las letras diferentes presentan diferencias significativas entre sus medias

Tabla C3

Método de Tukey para el efecto del reactivo ABTS sobre la extracción

EXT	N	Media	Grupo
4	3	11.46	A
2	3	10.80	A
1	3	10.04	A
3	3	6.56	B

Nota. El número 1 representa a maceración con agitación continua, el número 2 corresponde a maceración asistida con ultrasonido, el número 3 representa a maceración asistida con microondas y el número 4 representa a líquido presurizado. Las letras diferentes presentan diferencias significativas entre sus medias

Tabla C4

Método de Tukey para el efecto de FRAP sobre la extracción

EXT	N	Media	Grupo
2	3	17.71	A
4	3	11.01	B
1	3	10.89	B
3	3	9.17	C

Nota. El número 1 representa a maceración con agitación continua, el número 2 corresponde a maceración asistida con ultrasonido, el número 3 representa a maceración asistida con microondas y el número 4 representa a líquido presurizado. Las letras diferentes presentan diferencias significativas entre sus medias

Tabla C5

Método de Tukey para el efecto del reactivo DPPH sobre la extracción

EXT	N	Media	Grupo
4	3	9.72	A
1	3	8.32	A
2	3	8.21	A
3	3	4.65	B

Nota. El número 1 representa a maceración con agitación continua, el número 2 corresponde a maceración asistida con ultrasonido, el número 3 representa a maceración asistida con microondas y el número 4 representa a líquido presurizado. Las letras diferentes presentan diferencias significativas entre sus medias

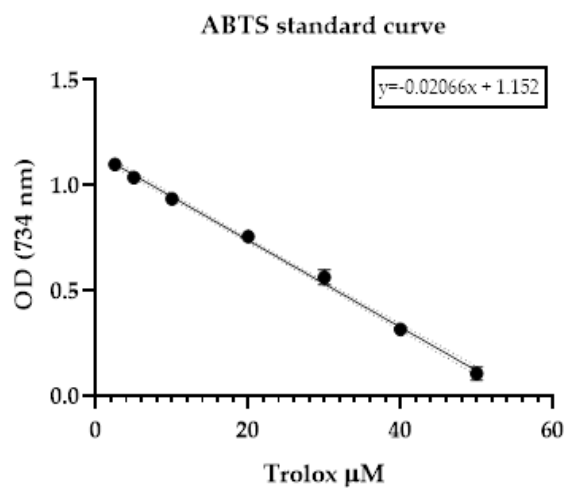
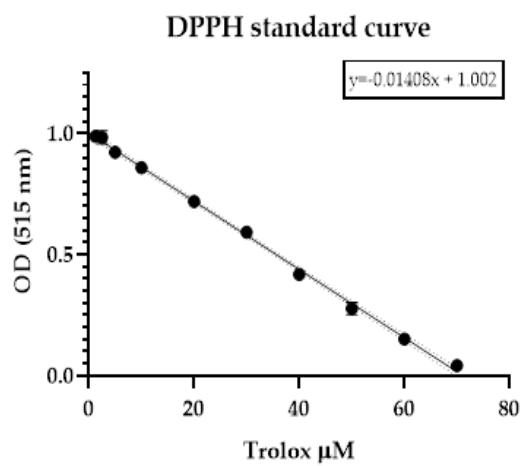
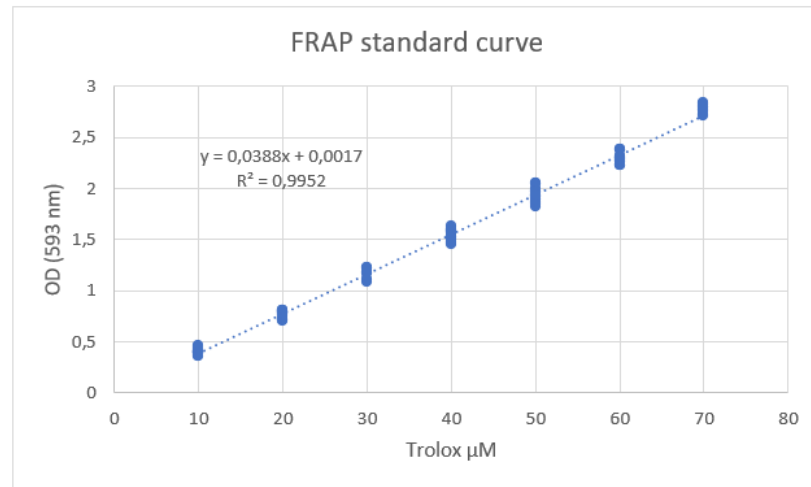
Apéndice D. Curvas de calibración para cada determinar la capacidad antioxidante**Figura D1***Curva de calibración para ABTS**Nota. Elaboración propia***Figura D2***Curva de calibración para DPPH**Nota. Elaboración propia*

Figura D3*Curva de calibración para FRAP**Nota. Elaboración propia*