



UNIVERSIDAD
**SAN IGNACIO
DE LOYOLA**

FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias

**OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE
EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DE LA CHIJCHIPA
(*Tagetes mandonii*), UTILIZANDO EL MÉTODO DE
SUPERFICIE RESPUESTA**

**Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero en Industrias
Alimentarias**

BRUNO ALEJANDRO JARA ANGELES

Asesor:

Carlos César Augusto Elías Peñafiel

Lima – Perú

2018

Dedicatoria

A Dios, por acompañarme a lo largo de esta etapa. A mis padres, por la educación que me dieron desde pequeño y por el apoyo brindado. A mi novia Brenda, por ser mi motivación, comprenderme, apoyarme y alentarme siempre. A mis amigos, por animarme y recordarme la importancia del esfuerzo.

Agradecimientos

Al ingeniero Carlos César Augusto Elías Peñafiel, por la guía y ayuda brindadas a lo largo de este trabajo.

A la ingeniera Sandra Casimiro, por sus consejos y apoyo en la elaboración de las pruebas experimentales.

A la ingeniera Keidy Cancino, por su apoyo durante la elaboración del plan de tesis.

Al ingeniero Eduardo Reynaldo Morales Soriano, por las observaciones y consejos brindados.

A las chicas del laboratorio de la USIL, por su disposición en brindarme lo necesario para realizar mis pruebas.

Resumen

Se realizó diferentes extracciones de la chijchipa, *Tagetes mandonii*, para determinar la combinación de niveles de los parámetros con la que se logra una extracción óptima de flavonoides. Se utilizó el método de extracción por reflujo y los flavonoides se cuantificaron mediante el método espectrofotométrico de formación de un complejo con el cloruro de aluminio, los resultados fueron expresados en mg de equivalente de quercetina (EQ)/g materia vegetal seca (MS). Para el diseño del experimento y el análisis de los resultados se utilizó el método de superficie respuesta con un diseño compuesto central con 3 variables, con dos niveles, las cuales fueron las siguientes: concentración de metanol, de 20 a 80%; temperatura de extracción, de 60 a 80°C; y relación solvente/MS, de 20 ml/g a 40 ml/g. No se alcanzó un punto óptimo de contenido de flavonoides, pero se logró un contenido máximo cuando la concentración de metanol, temperatura de extracción y relación solvente/MS fueron de 99%, 87°C y 46.79 ml/gr respectivamente. Se realizó una comparación entre el resultado dado por el programa (62.838 mg EQ/g MS) y el obtenido experimentalmente del punto máximo (56.203 mg EQ/g MS), siendo estos bastantes cercanos. Se concluye que, si bien no se pudo encontrar una combinación de los niveles de los parámetros con la que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides, se logró una mejor extracción y se maximizó el contenido de flavonoides obtenido de la chijchipa.

Palabras clave: Chijchipa, *Tagetes mandonii*, Flavonoides, Reflujo, Optimización, Superficie respuesta, Diseño compuesto central.

Abstract

Different extractions of the chijchipa, *Tagetes mandonii*, were carried out to determine the combination of levels of the parameters that achieves an optimum extraction of flavonoids. The extraction method was reflux and the flavonoids were quantified by the spectrophotometric method of the aluminum chloride complex formation, the results were expressed in mg of quercetin equivalent (QE) / g dry plant material (DM). For the design of the experiment and the analysis of the results, the response surface method was used with a central composite design with 3 variables, with two levels, which were the following: concentration of methanol, from 20 to 80%; extraction temperature, from 60 to 80 ° C; and solvent /DM ratio, from 20 ml / g to 40 ml / g. An optimum content of flavonoids was not reached, but a maximum content was achieved when the concentration of methanol, extraction temperature and solvent / MS ratio were 99%, 87 °C and 46.79 ml / gr respectively. A comparison was made between the result given by the program (62,838 mg EQ / g DM) and the one obtained experimentally from the maximum point (56,203 mg EQ / g DM), these being quite close. It is concluded that, although it was not possible to find a combination of the levels of the parameters that achieves an optimum value in the flavonoid content, a better extraction was achieved and the flavonoid content obtained from the chijchipa was maximized.

Key words: Chijchipa, *Tagetes mandonii*, Flavonoids, Reflux, Optimization, Response surface, Central composite design.

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
PROBLEMA GENERAL	3
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
JUSTIFICACIÓN	5
HIPÓTESIS	5
HIPÓTESIS GENERAL	5
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	5
ANTECEDENTES	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
LA CHIJCHIPA	8
NOMBRE COMÚN Y CIENTÍFICO	8
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN	8
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
DESCRIPCIÓN	9
HÁBITAT	10
USOS	10
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	10
ANTIOXIDANTES	11
DEFINICIÓN	11
INTERACCIÓN CON RADICALES LIBRES	12
FUNCIONES Y PROPIEDADES	13
APLICACIONES	13
FLAVONOIDES	14
DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	14

ESTRUCTURA QUÍMICA	15
FUNCIONES Y PROPIEDADES	16
APLICACIONES DE LOS FLAVONOIDES	16
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	17
INTRODUCCIÓN	17
MACERACIÓN	18
PERCOLACIÓN	18
MÉTODO SOXHLET	19
REFLUJO	20
MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	20
INTRODUCCIÓN	20
MÉTODO DE FORMACIÓN DE UN COMPLEJO CON EL CLORURO DE ALUMINIO	21
MÉTODO DE SUPERFICIE RESPUESTA	22
INTRODUCCIÓN	22
ELEMENTOS	23
DISEÑO	23
DISEÑOS DE PRIMER ORDEN	24
DISEÑOS DE SEGUNDO ORDEN	24
MODELO	25
TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN	27
ESCALAMIENTO ASCENDENTE	27
ANÁLISIS CANÓNICO	27
ETAPAS	28
CRIBADO	28
BÚSQUEDA DE PRIMER ORDEN	29
BÚSQUEDA DE SEGUNDO ORDEN	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
LUGAR DE EJECUCIÓN	30
MATERIA PRIMA	30
EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	30
EQUIPOS	30
MATERIALES	30
REACTIVO	31
FLUJO Y DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	31

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	31
EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DE LA CHIJCHIPA	33
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
VARIABLES INDEPENDIENTES	35
VARIABLES DEPENDIENTES	36
MATRIZ DE DISEÑO	36
MÉTODOS DE EVALUACIÓN O ANÁLISIS	37
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	37
ANÁLISIS EXPERIMENTAL	39
RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	40
ANÁLISIS EXPERIMENTAL	42
COMPROBACIÓN DEL PUNTO MÁXIMO	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición Nutricional de 100 gr de Chijchipa (<i>Tagetes Mandonii</i>)	10
Tabla 2.	Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides y sus fuentes	15
Tabla 3.	Matriz de diseño	36
Tabla 4.	Solubilidad de la quercetina	38
Tabla 5.	Absorbancias de los tratamientos	40
Tabla 6.	Concentraciones de flavonoides en cada solución	41
Tabla 7.	Contenido de flavonoides obtenido en cada tratamiento	42
Tabla 8.	Coeficientes de la ecuación de la gráfica de superficie respuesta	43
Tabla 9.	Tabla ANOVA de la variable contenido de flavonoides	44
Tabla 10.	Punto máximo para la extracción de flavonoides	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Chijchipa (<i>Tagetes mandonii</i>)	9
Figura 2.	Interacción entre antioxidantes y radicales libres	12
Figura 3.	Estructura química básica de los flavonoides	15
Figura 4.	Percolador	19
Figura 5.	Sistema de extracción soxhlet	19
Figura 6.	Sistema de extracción por reflujo	20
Figura 7.	Diferencia entre mejor tratamiento y punto óptimo	22
Figura 8.	Modelos de primer y segundo orden	25
Figura 9.	Gráficas de superficie respuesta para modelos de primer y segundo orden	26
Figura 10.	Representación gráfica de la metodología de superficie respuesta	29
Figura 11.	Flujo de operaciones para la preparación de la muestra	32
Figura 12.	Chijchipa previo al secado en estufa	32
Figura 13.	Triturado en mortero de la chijchipa seca	33
Figura 14.	Flujo de operaciones para la extracción de flavonoides de la Chijchipa	33
Figura 15.	Sistema de reflujo para la obtención del extracto	34
Figura 16.	Filtrado del extracto obtenido	35
Figura 17.	Coloración luego de agregar agua y NaNO ₂ 5%	37
Figura 18.	Coloración luego de agregar AlCl ₃ 10%	37
Figura 19.	Coloración luego de agregar NaOH 1M	38
Figura 20.	Curva de calibración (concentración de quercetina (ug/ml) vs absorbancia)	40
Figura 21.	Gráfico de superficie respuesta del contenido de flavonoides	43
Figura 22.	Gráfico de contornos del contenido de flavonoides	44
Figura 23.	Gráfico de efectos principales del contenido de flavonoides	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Fotografías del estándar quercetina, los reactivos utilizados y algunas pruebas preliminares a la elaboración de la curva de calibración	56
Anexo 2.	Fotografías de la elaboración de la curva de calibración	57
Anexo 3.	Fotografías de algunos extractos de chijchipa obtenidos	58
Anexo 4.	Tabla con contenido de flavonoides de <i>Tagetes erecta</i> y <i>Tagetes patula</i> , expresado en mg equivalentes de catequina (EC)/g materia vegetal seca (MS)	59
Anexo 5.	Tabla con contenido de flavonoides de <i>Tagetes erecta</i> , expresado en mg equivalentes de rutina (ER) /g MS	60
Anexo 6.	Diagrama de Pareto de los efectos para el contenido de flavonoides	61
Anexo 7.	Cálculos para la obtención del contenido de flavonoides por g de materia vegetal seca	62

Introducción

En ciertas comunidades andinas se consumen las plantas que crecen a los alrededores de la zona para satisfacer sus necesidades nutricionales, reemplazando en parte a las verduras y hortalizas, las cuales son fuentes importantes de vitaminas, minerales y otros compuestos (Pauro et al., 2011).

Una de estas plantas es denominada chijchipa, cuyo nombre científico es *Tagetes mandonii*, con el sinónimo *Tagetes maxima* (*The Plant List*, 2013). Las hojas y brotes de las hierbas del género *Tagetes* son utilizadas en los andes como condimentos en sopas, guisos, chupes y asados debido a las cualidades aromáticas que poseen (Ulloa, 2006). Además, se realizaron estudios donde se ha encontrado que una gran cantidad de especies del género *Tagetes* contienen flavonoides en una buena concentración, específicamente flavonoles, como derivados de la quercetina. Shahzadi y Mohammad (2015) afirmaron como los componentes mayoritarios en la *Tagetes minuta* son los aceites esenciales y los flavonoles. También se reporto en la *Tagetes mandonii* estos componentes (Shcmeda-Hirschmann et al., 2004).

Los flavonoides son compuestos fenólicos, los cuales contienen en su estructura química varios grupos hidroxilo, además de tener excelentes propiedades de quelación de hierro y otros metales. Esto les brinda cualidades antioxidantes y los hace excelentes para tratar diversas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, vasculares y gástricas. Además de esto, los flavonoides tienen otros efectos beneficiosos como regulación del crecimiento celular e inducción de enzimas de detoxificación. Estos compuestos no son producidos por nuestro cuerpo, por lo que se deben obtener a través de nuestra dieta (Martínez-Flóres, Gónzales-Gallego, Culebras y Tuñón, 2002). Es evidente la importancia de una fuente de flavonoides en nuestra alimentación, en este rol podría estar presente la chijchipa.

El objetivo de esta investigación es determinar la combinación de niveles de las variables con la que se logra una extracción óptima de la *Tagetes mandonii*. Es decir que se busca obtener un valor óptimo para el contenido de flavonoides extraído de la materia vegetal.

Problema de investigación

Planteamiento del problema

La chijchipa es utilizada como una planta alimenticia y medicinal en ciertas comunidades andinas (Pauro et al., 2011). Además, las especies de este género contienen flavonoides, los cuales son compuestos secundarios de las plantas con propiedades antioxidantes y por lo tanto con una gran variedad de beneficios para la salud. Estas características, le darían a la chijchipa la denominación de alimento funcional, lo cual la haría cumplir un rol muy importante en la dieta de las personas.

El mercado de los alimentos funcionales se está expandiendo y creciendo en demanda. En diferentes países es cada vez mayor el consumo de suplementos dietéticos y alimentos que no solo nutran, sino que aporten un beneficio a la salud. Existen diferentes formas en las que se consumen los alimentos funcionales y suplementos dietéticos, algunas son las siguientes: bebidas energéticas, enriquecidas con vitaminas y antioxidantes; te listos para beber; yogurt probióticos; preparaciones en polvo de fruta, vegetales, vitaminas o algas, listas para ser consumidas; capsulas que contienen una mezcla de raíces, frutas y vegetales; barras de cereal y snacks, con un alto contenido de fibra; alimentos enriquecidos con ácidos grasos esenciales como omega 3, por ejemplo huevos; y extractos con beneficios para el cabello y piel. Cada uno de los diferentes productos está dirigido a un público específico y de esta manera se pretende brindar productos saludables a personas de todas las edades. En los últimos años se incrementó el número de personas con enfermedades como obesidad, diabetes e hipertensión en países como Estados Unidos, Canadá, Francia y México. Esto ocasiona un creciente número de personas que opten por consumir productos relacionados con la salud (Leal, 2016). Es en este contexto que la chijchipa podría ser utilizada y formar parte de un suplemento o producto, debido a los componentes que posee, con lo cual contribuiría a la salud, estado de ánimo y bienestar de los consumidores.

Sin embargo, la *Tagetes mandonii*, así como muchas plantas andinas, es muy poco conocida y utilizada fuera de su zona de origen (Ulloa, 2006). Su uso de forma comercial no es conocido y se considera que merece mayor atención. Por lo cual, un estudio de esta planta sería un paso importante para su difusión, para aprovechar las propiedades que posee y como punto de partida para proyectos que quieran usarla como tema de estudio.

Problema general

¿Cuál es la combinación de niveles de los parámetros con la que se logra una extracción óptima de la *Tagetes mandonii*?

Problemas específicos

Problema específico 1:

¿Cuál es el nivel de la relación solvente/materia vegetal seca (MS) con él que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides?

Problema específico 2:

¿Cuál es el nivel de la concentración de metanol con él que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides?

Problema específico 3:

¿Cuál es el nivel de la temperatura de extracción con él que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides?

Problema específico 4:

¿Cuál es la diferencia entre el contenido de flavonoides de la *Tagetes mandonii* y otras especies de este género?

Objetivos

Objetivo general

Realizar diferentes extracciones de la *Tagetes mandonii* y determinar la combinación de niveles de los parámetros con la que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1:

Determinar el nivel de la relación solvente/MS con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Objetivo específico 2:

Determinar el nivel de la concentración de metanol con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Objetivo específico 3:

Determinar el nivel de la temperatura de extracción con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Objetivo específico 4:

Analizar la diferencia entre el contenido de flavonoides de la *Tagetes mandonii* y otras especies de ese género.

Justificación

La presencia de flavonoides en la chijchipa, así como el importante aporte para la salud de estos, hace que esta planta pueda tener usos en las siguientes industrias: industria farmacéutica, como fuente de compuestos bioactivos para cápsulas, medicamentos, productos de cuidado personal y suplementos nutricionales; industria alimentaria, como una hierba o condimento que puede formar parte de la dieta de las personas y como parte de la formulación de diversos productos como aderezos, bebidas y mezclas para comida.

Además, la investigación serviría como un medio de difusión de la chijchipa, que es solo utilizada y conocida en zonas andinas. Finalmente, las investigaciones que se realizaron previamente con la *Tagetes mandonii* solo extrajeron compuestos fenólicos de esta o analizaron los compuestos que posee, no se encontró ninguna que optimice la extracción de flavonoides obtenida.

Hipótesis

Hipótesis general

Hi: Es posible determinar la combinación de niveles de los parámetros de extracción con la que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides extraído de la *Tagetes mandonii*.

Ho: No es posible determinar la combinación de niveles de los parámetros de extracción con la que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides extraído de la *Tagetes mandonii*.

Hipótesis específicas

Hipótesis específica 1:

Hi: Es posible determinar el nivel de la relación solvente/MS con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Ho: No es posible determinar el nivel de la relación solvente/MS con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Hipótesis específica 2:

Hi: Es posible determinar el nivel de la concentración de metanol con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Ho: No es posible determinar el nivel de la concentración de metanol con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Hipótesis específica 3:

Hi: Es posible determinar el nivel de la temperatura de extracción con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Ho: No es posible determinar el nivel de la temperatura de extracción con el que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides.

Hipótesis específica 4:

Hi: Existe una similitud entre el contenido de flavonoides de la *Tagetes mandonii* y otras especies de ese género.

Ho: No existe una similitud entre el contenido de flavonoides de la *Tagetes mandonii* y otras especies de ese género.

Antecedentes

En el trabajo de Parejo, Bastida, Viladomat y Codina (2005), se extrajeron derivados de la quercetagina, la cual es un flavonoide, y se determinó la cantidad total de compuestos fenolicos de diferentes extractos obtenidos a partir de la *Tagetes maxima*, se utilizó diferentes solventes con diversas polaridades como metanol, hexano y etil acetato. Se usaron diferentes radicales para medir la actividad antioxidante de cada extracto como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), hidroxilo (OH) y superoxido (O_2^-). El objetivo fue extraer compuestos de alta actividad antioxidante de la *Tagetes maxima*. El trabajo también menciona como los tallos y hojas de esta planta son usados por las personas indigenas de la región de Cochabamba (Bolivia) como sazoador, medicina para problemas estomacales y para la preparacion de bebidas.

Lorenzo, Loayza y Dellacassa (2002) estudiaron la composición del aceite esencial de la *Tagetes maxima*. Se menciona las características de la chijchipa, así como el hecho que es utilizada como hierba alimenticia y medicinal. El trabajo logró obtener los componentes del aceite esencial de la planta y así la caracterizó y diferenció. Es importante mencionar como toda la literatura apunta a que la chijchipa es oriunda de zonas altoandinas, dado que los trabajos y fuentes la ubican en cuzco, puno y bolivia.

Respecto al método de superficie respuesta, se tiene el trabajo de Ghasemzadeh y Jaafar (2014), en el cual se optimizaron las condiciones de extracción para obtener una mayor cantidad de flavonoides, compuestos fenolicos y actividad antioxidante para las hojas de Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). Se estudió los factores de relación entre la cantidad de disolvente y materia vegetal, concentración de metanol y temperatura de extracción; los cuales se tomaran como guía en el trabajo a realizar, pero utilizando la chijchipa, la cual es mucho menos conocida y difundida pero se sabe contiene componentes bioactivos valiosos. El trabajo mencionado utilizó conceptos y herramientas estadísticas y de diseño de experimentos que también serán utilizadas en la presente investigación para lograr la optimización; estas son las siguientes: diseño de arreglo factorial, modelo de regresión, diseño central compuesto y grafica de la superficie respuesta.

Revisión bibliográfica

La chijchipa

Nombre común y científico.

La *Tagetes Mandonii* Sch. Bip. tiene como nombre común el de chijchipa (L.Herrera, 1939; Pauro et al., 2011; Roersch y Van Der Hoogte, 1988 citado en Senatore, D'Agostino y Dini, 1999; Ugás, 2014). Los nombres científicos de *Tagetes Mandonii* Sch. Bip. Ex Klatt y *Tagetes Maxima* Kuntze son sinonimos (Bolivia Catalogue, 2009; The Plant List, 2013). Además, esta última denominación, *Tagetes maxima*, también es conocida con el nombre común de "Suico Alto" (Lorenzo et al., 2002; Parejo et al., 2003). Sin embargo, se encontraron fuentes donde se le da el nombre común de Chijchipa a otras especies como *Tagetes Minuta*(Huacatay) o *Tagetes Elliptica*(Chincho), otras donde se las trato como especies diferentes, cada una con su respectivo nombre común y científico; y otras donde se le otorgo nombres comunes de otras especies a la *Tagetes Mandonii*, como los ya mencionados. Esto probablemente es debido a las similitudes que hay entre ellos al ser del mismo genero. Es por este motivo que solo se trabajó con fuentes donde se haga mención de los nombres científicos *Tagetes Mandonii* Sch. Bip., *Tagetes Mandonii* Sch. Bip. Ex Klatt y *Tagetes Maxima* Kuntze, al referirse estos a la misma planta. Se hace esto con el objetivo de aportar información verídica y no contribuir a la confusión entre denominaciones.

Clasificación taxonómica y descripción.

Clasificación taxonómica.

- División: Antophyta
- Clase: Dicotyledonae
- Super – Orden: Asteranae
- Orden: Asterales
- Familia: Asteraceae
- Sub – Familia: Asteroideae
- Tribu: Helenieae
- Género: Tagetes
- Especie: Mandonii Sch. Bip. Ex Klatt

Descripción.

Según Kuntze (1898), la *Tagetes maxima* es un arbusto o Sub-arbusto ramificado sin pelo de aproximadamente 2 metros de altura. Posee hojas compuestas pinnadas, lanceoladas con unión sésil; las más bajas son pequeñas, con aproximadamente 1 – 1 ½ cm de largo; las superiores poseen el doble al triple del tamaño (1:6). Son groseramente serradas con muchas puntas hasta el raquis. La inflorescencia tiene forma de corimbo con un largo de 1 1/3 cm y las flores no son sésiles. El involucro tiene aproximadamente 1 cm de largo y 4-5 mm de ancho, es ranurado, punteado, corto con 5 dientes agudos. Flores amarillas de 8 mm de largo descubiertas, lígula de 4 mm de largo y papus de 2 – 2 ½ mm de largo, puntiagudo y pálido.



Figura 1. Chijchipa (*Tagetes mandoni*)

Hábitat.

La chijchipa es una planta nativa de zonas andinas. Asociada a Perú en la provincia de Cuzco (L.Herrera, 1939; Senatore et al., 1999); pero también en la provincia de Puno, donde es utilizada como especie alimenticia y medicinal (Pauro et al., 2011). Las alturas donde se realizaron las investigaciones citadas están en el rango entre los 3500 – 4800 msnm.

Esta planta también es vinculada con Bolivia (Lorenzo et al., 2002; Parejo et al., 2003). Haciendo énfasis en la provincia de Cochabamba que se encuentra en un rango de 2000-3500 msnm.

Usos.

Se reportó que la chijchipa es usada como especie condimentaria y aromática para sazonar sopas, comidas y como bebida por las personas de la región (Lorenzo et al., 2002; Pauro et al., 2011).

También se encontró que es usada en las zonas andinas como especie medicinal para tratar malestares estomacales, malestares respiratorios, como antiespasmódico, para malestares gastrointestinales y por sus propiedades antidiarreicas (Lorenzo et al., 2002; Pauro et al., 2011; Roersch y Van Der Hoogte, 1988 citado en Senatore et al., 1999).

Composición nutricional.

Tabla 1
Composición Nutricional de 100 gr de Chijchipa (Tagetes Mandonii)

Nutrientes	Cantidad
Energía (kcal)	45
Agua (g)	85.3
Proteína (g)	3.3
Grasa Total (g)	0.4
Carbohidratos Totales (g)	9.3
Carbohidratos disponibles (g)	9.3
Fibra cruda (g)	1.8
Cenizas (g)	1.7
Calcio (mg)	335
Fósforo (mg)	57
Zinc (mg)	-
Hierro (mg)	8.3
B Caroteno (ug)	-
Retinol(ug)	189
Vitamina A (ug)	-

Tiamina (mg)	0.06
Riboflavina (mg)	0.43
Niacina (mg)	1.02
Vitamina C (mg)	70

Fuente: (Tablas Peruanas de Composición de Alimentos, 2008)

Antioxidantes

Definición.

Para entender la definición de antioxidantes, es importante entender el concepto de radical libre. Un radical libre es una especie química, que tiene una vida de unos microsegundos, la cual tiene uno o más de sus electrones no apareados y necesita quitarles electrones a otras moléculas para poder estabilizarse (Nuñez, 2011 citado en Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez y Radilla, 2015; Gutiérrez, Ledesma, García y Grajales, 2007; Hansberg, 2002 citado en Quintanar y Calderón, 2009; Cheesman, 1998 citado en Venereo, 2002). Esto lo hace bastante inestable y reactivo, por lo cual puede reaccionar con todo lo que lo rodea y así causar daño a macromoléculas y membranas a través de efectos como peroxidación lipídica, entrecruzamiento de cadenas de proteínas y daño al ADN mediante mutaciones y carcinogénesis (Llancari, 2011 citado en Coronado et al., 2015; Cervantes, 2005 citado en Quintanar y Calderón, 2009; Jerlick, 2000 citado en Venereo, 2002). Un radical libre reacciona en forma de cadena, porque al estabilizarse oxidando otra molécula, se crea un nuevo radical libre, que a su vez también oxida a otras moléculas y el efecto se multiplica (Hansberg, 2002 citado en Quintanar y Calderón, 2009). Forman parte de las especies reactivas del oxígeno (ERO) que son especies que causan la elevación de agentes prooxidantes (Nuñez, 2011 citado en Coronado et al., 2015; Naqui, 1996 citado en Venereo, 2002). Los radicales libres son producidos como parte del metabolismo animal y vegetal en la cadena respiratoria mitocondrial, cadena de transporte de electrones y en los cloroplastos; pero también son producidos por factores externos, como por ejemplo contaminantes ambientales, radiación ionizante, consumo de alcohol, tabaco, drogas, alimentación no adecuada, procesos inflamatorios, traumatismos y ejercicio extenuante (Llancari, 2011 citado en Coronado et al., 2015; Venereo, 2002). Sin embargo, estos compuestos también participan en procesos necesarios para nuestro metabolismo como la proliferación y diferenciación celular, fagocitosis, síntesis de colágeno y activan enzimas de la membrana celular (Konigsberg, 2008 citado en Quintanar y Calderón, 2009; Venereo, 2002).

Un antioxidante es una sustancia susceptible a reaccionar con los radicales libres, les dona sus electrones sacrificando su integridad molecular y se oxida, de esta manera

evitando que se cause algún efecto adverso en las macromoléculas importante como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN, las cuales son más vitales para el cuerpo (Patthamakanokporn, 2008 citado en Coronado et al., 2015; Gutiérrez et al., 2007; Forman, 2009 citado en Quintanar y Calderón, 2009; Reitter, 1995 citado en Venereo, 2002). La actividad antioxidante consiste en la acción de combatir los radicales libres; y la capacidad antioxidante es la cantidad de radicales libres que la sustancia antioxidante puede combatir, su potencia. Esta capacidad se mide en base a sustancias ya estandarizadas, de las cuales ya se conoce su poder de acción. Sin embargo, la actividad y capacidad antioxidante de una sustancia, no solo dependen de características estructurales como reactividad hacia peróxidos y otras especies reactivas, si no también de factores como la concentración que haya de antioxidante, presión de oxígeno, mayor área de exposición, la temperatura, la luz, la composición del sustrato a proteger de la oxidación y la presencia de otros componentes que pueden actuar de prooxidantes o sinérgicos. Por ejemplo, en un aceite con un alto grado de insaturación la capacidad de un mismo antioxidante, en una misma concentración, será menor que en otro aceite con menor grado de insaturación (Pokorny, Vanishlieva y Gordon, 2001).

Interacción con radicales libres.

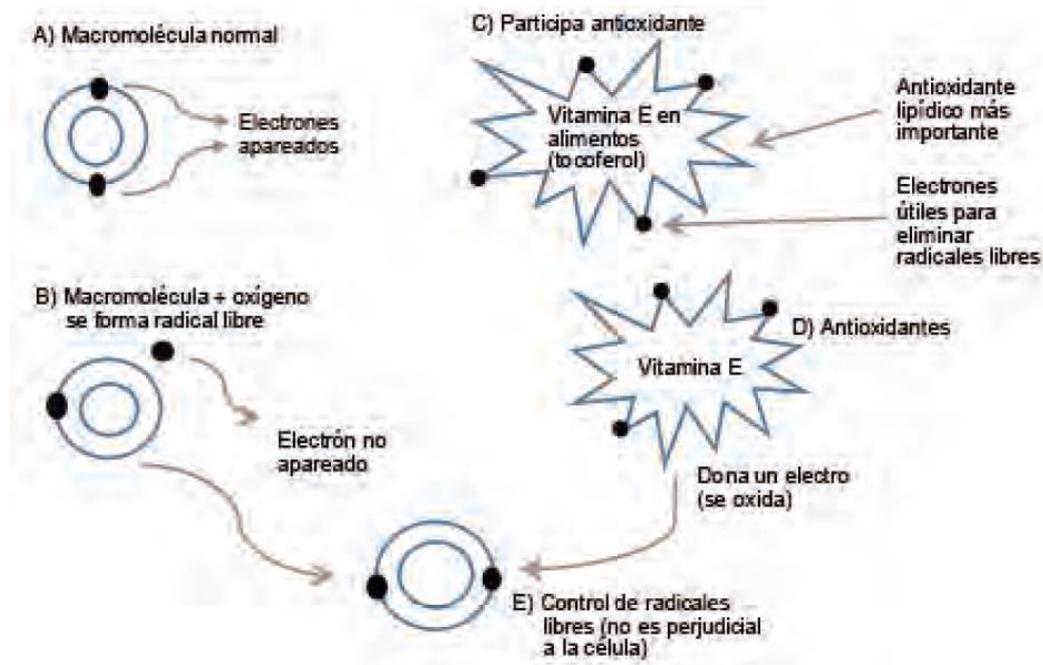


Figura 2. Interacción entre antioxidantes y radicales libres (Coronado et al., 2015)

Funciones y propiedades.

Debido a su acción de combatir los radicales libres y proteger a macromoléculas importantes, los antioxidantes presentan una enorme cantidad de propiedades y efectos beneficiosos. Ayudan a combatir las siguientes enfermedades: enfermedades cardiovasculares, existen antioxidantes con demostrada actividad vasodilatadora, vasoprotectora, antitrombótica y antiesclerótica, además de reducir la oxidación de las LDL, lo cual juega un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis; diabetes, estimulan la secreción de insulina en el páncreas, activan los receptores de esta, además de activar la recaptura de glucosa en tejidos blancos y la digestión de carbohidratos en el intestino; cáncer, un exceso en el nivel de radicales libres es una de las causas principales de aparición de células cancerosas, además que estas también generan un elevado estrés oxidativo en el enfermo, se realizaron estudios donde el consumo de antioxidantes ayuda a aliviar y prevenir la incidencia de esta enfermedad; enfermedades neurodegenerativas, el deterioro de algunas proteínas específicas y disminución de algunos metales de transición son factores que inician y agravan estas enfermedades, estos son causados por un elevado nivel de radicales libres y una disminución en el nivel de antioxidantes debido al envejecimiento; daño hepático y gástrico por consumo de alcohol; obesidad y estrés. También se realizaron estudios donde se concluyó que un consumo adecuado de antioxidantes está relacionado con una mayor longevidad debido a que se reduce la degradación del metabolismo, muerte celular, mitocondrias y el consumo de oxígeno (Llancari, 2011 citado en Coronado et al., 2015; Gutiérrez et al., 2007; Giugliano, 2000 citado en Venereo, 2002). Cabe mencionar que una dosis en exceso de antioxidantes puede tener efectos prooxidantes o impedir el adecuado metabolismo de algunos minerales de la dieta, sin embargo, las personas tienden a consumir por debajo del nivel requerido y muy por debajo del nivel donde se presenta toxicidad o efectos adversos, por lo que esta situación es poco probable.

Aplicaciones.

Los antioxidantes tienen aplicaciones en un amplio número de áreas. En alimentos, los antioxidantes y especies que los contienen, se han utilizado en productos cárnicos, aceites y grasas para retrasar la oxidación de los lípidos y por tanto los atributos negativos en sabor y aroma que vienen por la rancidez. Los antioxidantes también son incluidos en diferentes productos alimenticios debido a los beneficios que aportan a la salud, ofreciendo así un alimento funcional, además, varios flavonoides como antocianinas, flavonas, flavanonas y flavonoles, son usados como colorantes,

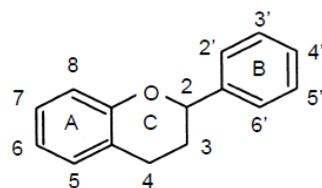
saborizantes y edulcorantes en una variedad de productos alimenticios. Por ejemplo, las flavanonas naringina y neohesperidina han adquirido importancia debido a que algunos de sus derivados tienen un dulzor de aproximadamente 2000 veces el de la sacarosa (Barrera, 1998; Dewi et al., 2010 citado en Bojalil y Pozos, 2013; Friedli, 2003 citado en Ochoa y Ayala, 2004). Son también utilizados en productos de cosmética, higiene y cuidado personal para no solo prevenir la oxidación de la parte lipídica de la formulación; por ejemplo, han sido usados en la elaboración de productos cosméticos debido a su capacidad de proteger la piel de los radicales libres que se generan debido a la radiación solar y contaminantes ambientales, también se sabe que los ésteres de flavonoides son buenos agentes humectantes, dado que las esterases presentes en la epidermis rompen los esterres y regeneran los flavonoides iniciales, lo cual permite que tengan su capacidad antioxidante inicial, además, diversos flavonoides han sido usados en pastas dentales y enjuagues bucales como endulzantes y saborizantes (Avello et al., 2009; Gajardo et al., 2011; Kashket, 1990 citado en Ochoa y Ayala, 2004). En el sector farmacéutico, existen actualmente un gran número de suplementos y medicamentos que se elaboran a base de especies naturales que contienen poderosos antioxidantes, estos sirven para ayudar, prevenir y tratar las diferentes enfermedades que ya se han mencionado (Messina, 2003 citado en Ochoa y Ayala, 2004).

Flavonoides

Definición y clasificación.

Para discutir el concepto de flavonoide, se debe conocer el grupo de compuestos que los abarcan. Un compuesto fenólico es una sustancia que posee uno o más fenoles, los cuales son bencenos unidos a un grupo hidroxilo. Estos compuestos están presentes en las plantas en forma de metabolitos secundarios y cumplen una variedad de funciones como pigmentación de frutos, flores y hojas, intervienen en la polinización atrayendo insectos y ayudan a plantas heridas a protegerse de ataques fúngicos y bacterianos (Gimeno, 2004; López, 2002; Martínez-Flóres et al., 2002). Los flavonoides son un grupo incluido dentro de los compuestos fenólicos, que se caracterizan por tener una estructura química del tipo C₆-C₃-C₆, es decir, 2 anillos compuestos de 6 carbonos unidos a través de una cadena de 3 carbonos ciclada con un oxígeno (Gimeno, 2004; López, 2002; Kühnau, 1976 citado en Martínez-Flóres et al., 2002). Dentro de los flavonoides se tienen varios tipos como flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanolas, isoflavonas y antocianinas; los cuales se diferencian por variaciones en su estructura química.

Estructura química.



Flavonoide

Figura 3. Estructura química básica de los flavonoides (Martínez-Flóres et al., 2002)

Tabla 2

Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides y sus fuentes

Subclase	Estructura	Compuestos	Fuente
Flavona		Sinensetina, apigenina Diosmina y luteolina	Hierbas, apio, pimentón, uva naranja y limón
Flavonol		Querquetina, myricetina y kaempferol	Cebolla, vino, tomate, naranja, manzana, té, frutas rojas
Flavanona		Naringenina, hesperidina y isoxanthohumol	Miel, cítricos, tomate, lúpulo y cerveza
Flavanol ó catequina		Catequina, epicatequina y galocatequina	Vino, chocolate, cocoa, té, uva, manzana y pera
Isoflavona		Genisteina, daidzeina y gliciteina	Soya y leguminosas
Antocianina		Cianidina, pelargonidina, delphinidina y peonidina	Frutas rojas manzana, pera, uva y naranja

Fuente: (Ochoa y Ayala, 2004)

Funciones y propiedades.

Los flavonoides tienen las siguientes propiedades: son solubles en agua y termoestables; poseen una gran capacidad antioxidante debido a la presencia de los grupos hidroxilos y a su facilidad de formar complejos con metales; combaten la oxidación del colesterol y las lipoproteínas de baja densidad (LDL); inhiben algunos sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular, lo cual hace que tengan efectos muy positivos como aumentar la fuerza y frecuencia del flujo sanguíneo, llevando más oxígeno al cuerpo, prevenir la agregación plaquetaria y por tanto la formación de coágulos, protegen la pared vascular y disminuyen la inflamación en la placa de ateroma, lo cual es debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares; regulan el crecimiento celular, inducen la eliminación de células tumorales; inducen enzimas de detoxificación; y también tienen efectos diuréticos, antiespasmódicos, antiinflamatorios y combaten las úlceras gástricas (Brandan, 2010; Birt et al., 2001 citado en Gimeno, 2004; López, 2002; Pace-Asciak CR, 1995 citado en Martínez-Flóres et al., 2002; Crozier et al., 1997 citado en *Plants: Diet and Health*, 2003). De los grupos de flavonoides, los flavonoles son los que presentan la mayor actividad antioxidante debido a la estructura que poseen (Gimeno, 2004; Letan, 1966 citado en Martínez-Flóres et al., 2002). Sin embargo, cabe destacar que los flavonoides pueden presentar efectos prooxidantes o interferir con la absorción de hierro del organismo y causar anemia, pero solo si son consumidos en dosis elevadas; lo cual es muy improbable en condiciones normales, ya que se consume entre 25 mg - 1 gr al día en promedio y para llegar a ser tóxicos deberían estar entre el 1-5% de nuestra dieta (Gimeno, 2004; Martínez-Flóres et al., 2002).

Es importante mencionar que los flavonoides se pueden unir a azúcares, como glucosa o rutinosa, para formar glicosidos, pero si se encuentran solos, se les llama agliconas. Los glicosidos de flavonoides tienen mayor solubilidad en agua, diferente absorción y biodisponibilidad que la aglicona correspondiente (Kelly, 2011).

Aplicaciones de los flavonoides.

Los flavonoides tienen aplicaciones en una diversidad de sectores. En el de alimentos, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, tienen presencia en el mercado de los alimentos funcionales a través de productos como frutas, panadería, confitería y cereales, que incluso utilizan subproductos de otras industrias, como por ejemplo la del vino (Mazza, 2000 citado en Ochoa y Ayala, 2004). Algunos, como los flavonoles y las

catequinas, son usados en bajas concentraciones como aditivos endulzantes que ayudan a mantener por más tiempo el sabor de gomas de mascar, dulces, mieles y productos como las pastas de dientes, enjuagues bucales y medicinas; sin embargo, su efecto parece consistir en hacer los receptores de la boca más sensibles a los endulzantes, lo cual permite bajar el nivel de saborizante y endulzantes empleados (Kashket, 1990 citado en Ochoa y Ayala, 2004). En la industria del vino, se ha utilizado al flavonol rutina para incrementar la intensidad del color en vinos y para la conservación de la cantidad y prevención de la oxidación de las antocianinas mediante la formación de complejos más estables entre estas y la rutina, este fenómeno se llama copigmentación (Boulton, 2001 citado en Gónzales, De la Rosa, Gónzales y Martín, 2010). Además, la adición de flavonoides es un metodo para incrementar la vida util de productos que contienen una parte grasa, debido a que ayudan a prevenir la peroxidación lipídica; un ejemplo son las antocianinas, las cuales tienen un porcentaje de inhibición incluso mayor al de algunos antioxidantes sintéticos como el BHA, BHT y TBC (Muraleedharan, 2002 citado en Ochoa y Ayala, 2004). En el sector farmacológico, se han desarrollado a partir de extractos que contienen flavonoides, una variedad de suplementos alimenticios y medicamentos con diversos efectos como antiinflamatorios, diuréticos, protectores del hígado, para el colesterol y antiespasmódicos (Messina, 2003 citado en Ochoa y Ayala, 2004). Por último, en el sector cosmético, los flavonoides son apropiados como agentes antisolares, debido a que tienen una alta absorbancia UV y no son tóxicos; por ejemplo las flavonas y flavanonas. Además, los ésteres de flavonoides son especialmente útiles en humectantes y cosméticos, debido a que las esterases presentes en los tejidos celulares, como la epidermis, rompen los ésteres y regeneran los flavonoides iniciales, dándoles su capacidad antioxidante inicial (Plaschke, 2002 citado en Ochoa y Ayala, 2004).

Métodos de extracción.

Introducción.

La extracción es la separación de las porciones activas de tejidos vegetales, o animales, usando solventes selectivos a través de procedimientos estándar. Esta técnica separa los metabolitos solubles de la planta y deja atrás a la masa celular insoluble. Los productos obtenidos son mezclas complejas de metabolitos, en estado líquido, semisólido, o, luego de remover el solvente, en forma de polvo seco. Se incluyen las preparaciones como decocciones, infusiones, extractos fluidos, tintes y extractos en polvo. El propósito de los procesos de extracción estandarizados para

drogas crudas es obtener la porción deseada y eliminar el material indeseado mediante tratamiento con un solvente selectivo. Los extractos obtenidos, luego de estandarizarse, pueden utilizarse como agentes medicinales en su forma actual; o recibir un tratamiento mayor para ser incorporados en cualquier dosis en tabletas o capsulas. Estos contienen compuestos como alcaloides, glicósidos, terpenos, flavonoides y lignanos. Se tienen varias técnicas de extracción como maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, extracción caliente continua (Soxhlet), extracción alcohólica con fermentación, extracción mediante ultrasonido y mediante fluidos supercríticos. (Longo, 2008 citado en *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 2008). Es importante mencionar que antes de realizar la extracción, el material vegetal debe prepararse, lo cual se puede hacer de distintas maneras como secado y molido, congelado y molido, cortado en trozos pequeños y liofilización; esto se hace con el propósito de obtener partículas más pequeñas, y por tanto una mayor superficie de contacto, que brinden mayor facilidad al momento de extraer el metabolito deseado. La forma de preparar la muestra y el tamaño de partícula dependerá del método de extracción que se realizará. A continuación, se explicarán los detalles de algunos métodos de extracción.

Maceración.

En este proceso, la planta entera o groseramente molida es colocada en un contenedor tapado con el solvente y se le deja reposar a temperatura ambiente por un periodo de al menos 3 días, con agitación frecuente hasta que la materia soluble se haya disuelto. Luego la mezcla se separa y la materia vegetal húmeda se exprime para obtener la mayor cantidad de extracto posible. Los líquidos se combinan y luego se clarifican mediante filtrado o decantación (Handa, 2008 citado en *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 2008).

Percolación.

La planta trozada es humedecida con una apropiada cantidad del solvente especificado y se la deja reposar por aproximadamente 4 horas en un contenedor cerrado. Luego esta mezcla se coloca en el percolador y se cierra la parte superior de este. Se agrega más solvente para formar una capa poco profunda encima del material vegetal y se deja la mezcla macerar en el percolador cerrado por 24 horas. Luego se abre la parte de abajo del percolador y se deja que el líquido goteé lentamente. Se va agregando solvente según lo requerido, hasta que el percolado sea las tres cuarta partes del volumen final requerido. Finalmente se exprime el

material vegetal y el líquido obtenido es agregado al percolado, el cual se clarifica mediante filtración o decantación (Handa, 2008 citado en *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 2008).

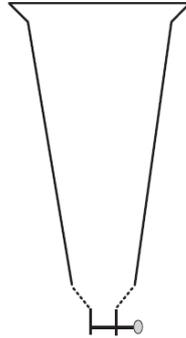


Figura 4. Percolador (*Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 2008)

Método Soxhlet.

La extracción Soxhlet consiste en las siguientes etapas: colocación del solvente en un balón; ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador; caída del condensado sobre un cartucho poroso con la muestra vegetal molida en su interior; ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujó que vuelve el solvente con el material extraído al balón. Este proceso se produce las veces necesarias, hasta que la muestra quede agotada; lo extraído se va concentrando en el balón de solvente (Núñez, 2008).

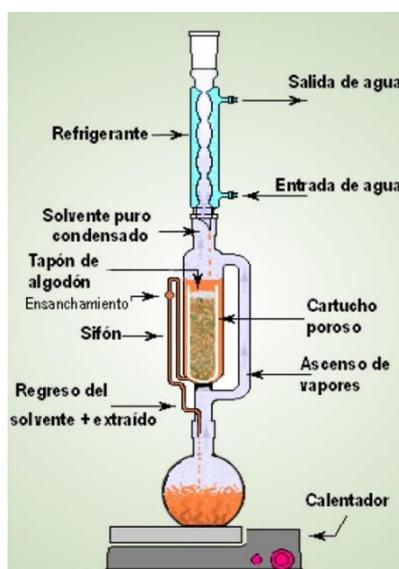


Figura 5. Sistema de extracción soxhlet (Núñez, 2008)

Reflujo.

En extracción bajo reflujo, el material vegetal está sumergido en el solvente dentro de un matraz o balón, el cual está conectado a un condensador. El solvente es calentado hasta que alcance la temperatura deseada, usualmente la de ebullición. Los vapores que se generan van siendo condensados y el solvente se recicla al recipiente (Seidel, 2006 citado en *Natural Products Isolation*, 2006).

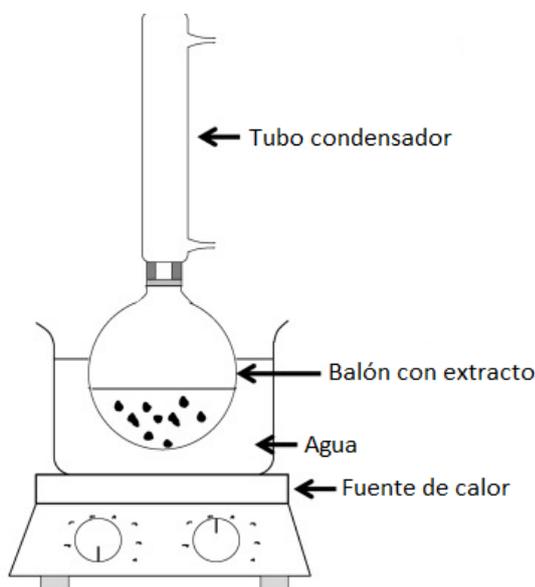


Figura 6. Sistema de extracción por reflujo (Alonso-Carrillo et al., 2017)

Métodos de cuantificación.

Introducción.

La cuantificación se realiza con el propósito de conocer las cantidades de un tipo de metabolito que se encuentra en la planta. Hay diferentes métodos para realizar este proceso, los cuales son las siguientes: espectrometría de masas, HPLC, cromatografía de gases y métodos espectrofotométricos (Peñarrieta, Alvarado, Bergenståhl y Åkesson, 2007). Los ensayos espectrofotométricos, para cuantificar contenido fenólico y flavonoides totales, son más baratos, rápidos y por tanto más accesibles que las técnicas de análisis cromatográfico; aunque solo se identifica categorías de compuestos en lugar de compuestos individuales (Csepregi, Kocsis y Hideg, 2013). El principio detrás de estas técnicas consiste en qué al agregar una serie de reactivos al extracto obtenido, se forman complejos con los metabolitos presentes, los cuales absorben la radiación a diferentes longitudes de onda

dependiendo del compuesto. Esto permite cuantificarlos comparándolos con una curva realizada con un estándar (Chang, Yang, Wen y Chern, 2002). Uno de los métodos más utilizados para cuantificar flavonoides, es el de formación de un complejo con el cloruro de aluminio ($AlCl_3$), el cual ha sido empleado en varios trabajos de investigación para reportar la cantidad de flavonoides de diferentes plantas (Ayub, 2017; Bonilla Ríos, 2014; Chang et al., 2002; Nassr Allah, 2009; Siriamornpun, 2012; Zhishen, Mengcheng y Jianming, 1999). A continuación, se describirá la manera de cómo realizar este método y los reactivos necesarios.

Método de formación de un complejo con el cloruro de aluminio.

El principio de este método es que el cloruro de aluminio puede formar complejos con el grupo carbonilo ($=O$) y los grupos hidroxilos (OH) que pueden estar presentes en los carbonos 3 y 5 de los flavonoides, así como formando un grupo catecol (orto-dihidroxibenceno) en los anillos A y B de estos (Bhaigyabati, 2014). Se tienen variantes de cómo realizar este ensayo, siendo las más comunes las dos formas siguientes. En la primera, se mezcla 0.5 ml del extracto obtenido con 1.5 ml de 95% etanol, 0.1 ml de una solución de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) 10%, 0.1 ml de una solución de acetato de potasio (CH_3COOK) 1M y 2.8 ml de agua destilada. Se deja reaccionar la solución por 30-40 minutos a temperatura ambiente. Luego se mide la absorbancia a 415 nm con un espectrofotómetro. Los resultados se comparan con la curva estándar del equivalente escogido para expresar la cantidad final de flavonoides en función de este (Chang et al., 2002; Nassr Allah, 2009). El equivalente escogido es, de preferencia, un flavonoide que se sepa está en altas cantidades en la muestra; o en caso contrario, algunos de los más comunes como quercetina.

En la segunda, la cual será utilizada en esta investigación, se disuelve 1 ml del extracto obtenido con 4 ml de agua destilada, obteniendo 5 ml. Se le agrega 0.3 ml de $NaNO_2$ 5% para generar una reacción de nitración, se espera 5 minutos y se le agrega 0.3 ml de $AlCl_3$ 10% para la formación del complejo, se espera 6 minutos más y se le agrega 2 ml de $NaOH$ 1M para neutralizar, luego se completa hasta 10 ml con agua destilada. Se mezcla bien la solución y se deja reaccionar por 30 minutos. Luego se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm. Los resultados se comparan con la curva estándar del equivalente escogido y se expresan en función de este (Pekal, 2014; Silva Espinoza, 2013; Zhishen et al., 1999).

Método de superficie respuesta

Introducción.

La metodología de superficie respuesta es una estrategia experimental y de análisis que permite encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso; las cuales darán por resultado valores óptimos en una o varias características de calidad del producto final. Como en todo experimento, se busca conocer la relación entre los factores estudiados y la variable, o variables, respuesta. Los factores estudiados y todas las combinaciones entre sus diferentes valores posibles, o niveles, forman la región experimental; mientras que las condiciones donde se puede operar el experimento conforman la región de operabilidad, esta región siempre es igual o mayor que la región experimental. El principio del método de superficie respuesta es encontrar el punto óptimo dentro de la región de operabilidad, lo cual puede implicar mover la región experimental inicial hasta que el punto óptimo este dentro de esta, para luego analizar bien la región y obtener el punto buscado.

Es clave entender la diferencia entre mejor tratamiento y punto óptimo. El mejor tratamiento es la mejor combinación posible en la región experimental en la que se trabaja; mientras que el punto óptimo es la mejor combinación en la región de operabilidad, lo cual puede significar que este punto este dentro o fuera de la región experimental actual (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

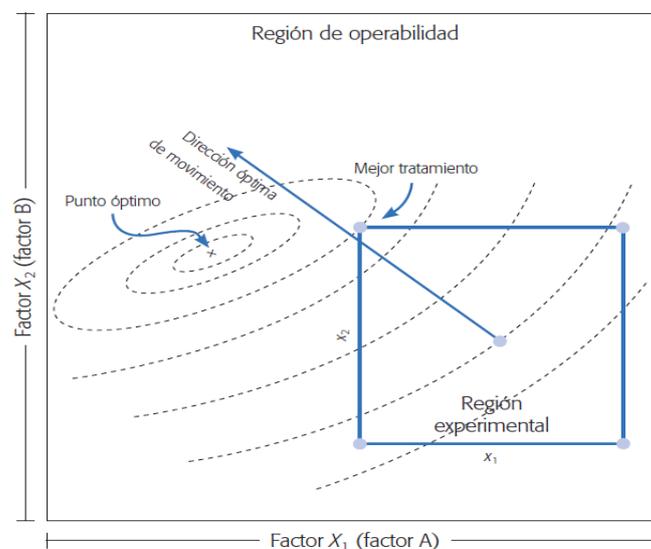


Figura 7. Diferencia entre mejor tratamiento y punto óptimo (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008)

Para poder ejecutar la metodología, se deben tener en cuenta unos elementos, los cuales se explicarán a continuación.

Elementos.

Diseño.

Este elemento implica que para optimizar el proceso se debe utilizar un diseño experimental adecuado, que proporcione los tratamientos a correr, para generar la información que permita ajustar el modelo de regresión que describa la variable respuesta en la región experimental. Tienen especial importancia los diseños que permitan ajustar un modelo de regresión lineal múltiple, dado que nuestra variable respuesta será afectada por varios factores, los cuales modelaran la ecuación y la gráfica de superficie respuesta final. Los modelos pueden ser de primer o segundo orden, por lo tanto, también habrá diseños y técnicas de optimización de primer y segundo orden. Algunas propiedades deseables en estos diseños son las siguientes: que genere una distribución satisfactoria de los puntos sobre la región experimental, los diseños más utilizados son puntos distribuidos de manera uniforme sobre la región experimental, o que al menos exista una simetría con respecto al centro; el diseño debe requerir un número mínimo de corridas experimentales, para minimizar el gasto de recursos; el diseño debe permitir que otros diseños de orden mayor se construyan a partir de él, esto permite agregar puntos adicionales para explicar la respuesta, en caso sea más complicada de lo esperado; el experimento debe permitir la detección de la falta de ajuste, para lo cual se necesita repeticiones al menos en el punto central; el diseño debe proporcionar con un estimador puro de la varianza del error, para lo cual se requieren repeticiones al menos en el punto central. Otras propiedades deseables son la ortogonalidad y la rotabilidad, estas propiedades facilitan la interpretación de los parámetros estimados en el modelo y de la superficie respuesta. Un diseño es considerado ortogonal cuando los coeficientes estimados en el modelo ajustado no están correlacionados entre sí, lo cual hace que el efecto de cada término sea estimado de manera más precisa. Un experimento es ortogonal si en la matriz de diseño todos los vectores columna son independientes entre sí. Por otro lado, un diseño será rotable si la varianza de $Y(x)$ sólo depende de la distancia del punto x al centro del diseño y no de la dirección en la que se encuentra; esta propiedad asegura que la calidad de la predicción, medida por la varianza de $Y(x)$, sea invariante a cualquier rotación del diseño alrededor del centro del mismo, es decir que independientemente de la dirección, a partir del centro del diseño, en la cual se

busque el óptimo, la calidad de predicción será igual (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Existe una relación directa entre el modelo que se ajustara y el diseño que se aplicara. No se puede obtener de un diseño experimental más información de la que pueda dar. Un diseño factorial completo nos permitirá estimar los efectos principales y las interacciones dobles, pero no los términos cuadráticos. Si a este diseño se le agrega el punto central, se podrá estimar uno de los términos cuadráticos y la curvatura. Si además se agregasen los puntos estrella o axiales, se podrá estimar los efectos cuadráticos puros e incluirlos a todos en el modelo ajustado (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Diseños de primer orden.

Al proponer un diseño de primer orden se supone que sólo son importantes los efectos principales. Un criterio de selección del diseño de primer orden es que la varianza de la respuesta predicha en el punto $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)$ sea mínima, lo cual hace que esta respuesta sea más precisa; y por tanto que la dirección óptima de movimiento, determinada a partir de los predichos del modelo, sea más certera. Es decir, se quiere un diseño que permita ajustar un modelo con poca variabilidad. Los diseños que satisfacen este criterio son los que tienen la propiedad de ortogonalidad. Entre los más utilizados están los siguientes: diseños factoriales 2^k , diseños factoriales fraccionados 2^{k-p} , diseño de plackett-burman y diseño simplex (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Diseños de segundo orden.

Los diseños de segundo orden son aquellos que permiten ajustar un modelo de segundo orden para así estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos y de curvatura. Es decir, estos diseños se emplean cuando se quiere explorar una región que se espera más compleja o cuando se cree que el punto óptimo ya está incluido dentro de la región experimental. Es deseable que estos diseños sean ortogonales; sin embargo, esto no siempre es fácil de cumplirse. Los más utilizados tienen la propiedad de ser rotables. Se deben considerar los siguientes criterios para seleccionar un diseño de segundo orden: que tenga un número mínimo de tratamientos y que permita estimar todos los parámetros del modelo de segundo orden; que sea flexible, es decir que pueda ser construido a partir de diseños de primer orden; que tenga buenas propiedades

como ortogonalidad, rotabilidad y/o precisión uniforme, las cuales están relacionadas con la calidad de estimación del modelo.

En este trabajo se utilizará el diseño de composición central. Este es el más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden, debido a su gran flexibilidad. Puede construirse a partir de un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} agregando puntos sobre los ejes y al centro, además de darle otras propiedades deseables. Este diseño se compone de tres tipos de puntos, los cuales son los siguientes: la porción factorial, la cual es una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado; n_0 repeticiones al centro del diseño, con $n_0 \geq 1$; y la porción axial, la cual son dos puntos sobre cada eje, cada eje representa a un factor, a una distancia α del origen. Con k factores el número total de corridas experimentales es $N = 2^k + 2k + n_0$. El número de corridas al centro, n_0 , y la distancia de los puntos axiales (α) deben escogerse de manera adecuada, dependiendo de las propiedades que se quiere que tenga el diseño (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Modelo.

El modelo hace referencia a la ecuación matemática que relaciona la variable respuesta con los factores estudiados en el diseño. Es importante recordar los diversos conceptos de análisis de regresión lineal múltiple como parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos y coeficiente de determinación. Se tienen modelos de primer y segundo orden; los cuales se usan en etapas diferentes de la metodología de superficie respuesta.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Figura 8. Modelos de primer y segundo orden (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008)

Cabe mencionar que para más de 2 factores las gráficas de superficie respuesta no pueden ser graficadas completas, dado que se encuentran en 4 dimensiones o más. Por lo cual, se grafica 2 factores a la vez junto con la variable respuesta para observar cómo se relacionan. La grafica para un modelo de primer orden representa un plano, mientras que para uno de segundo orden hay presencia de curvatura y el grafico puede tener la forma de montaña (máximo), valle (mínimo) y punto silla. La forma específica que toma la superficie depende de los signos y magnitudes de los coeficientes del modelo (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

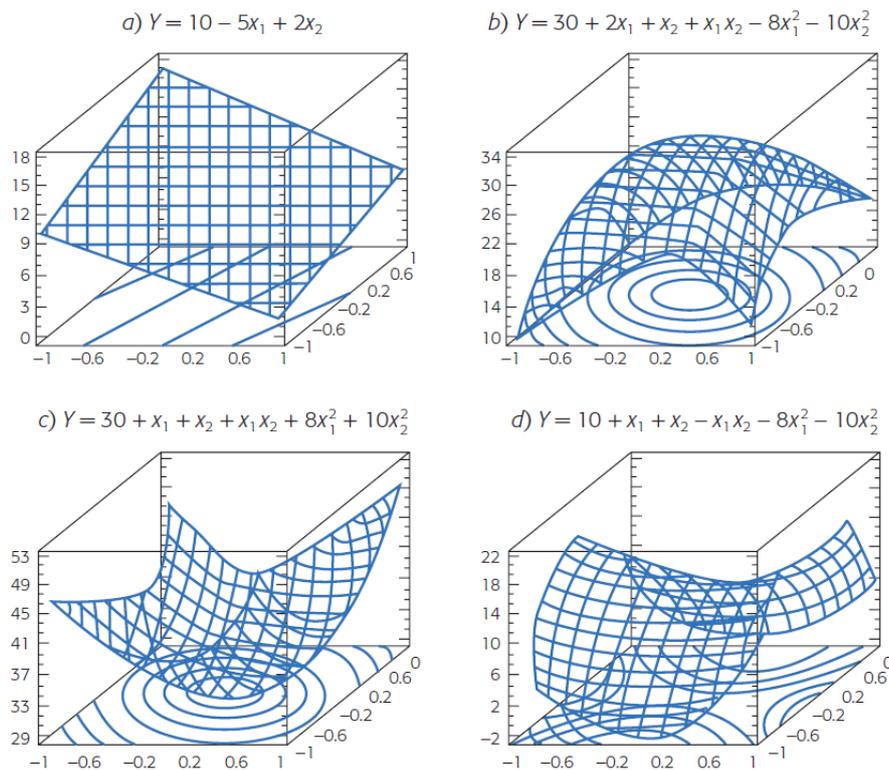


Figura 9. Gráficas de superficie respuesta para modelos de primer y segundo orden (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008)

Es importante el concepto de modelo jerárquico. Cuando todos los términos simples, que componen los términos de mayor orden, están presentes en el modelo, se dice que este es jerárquico. Esta característica es importante en superficie respuesta, ya que este tipo de modelo tiene un comportamiento más suave y estable que facilita la

exploración de las superficies representadas (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Técnicas de optimización.

Aquí se agrupan diferentes técnicas matemáticas que sirven para explorar el modelo, una vez este ya ha sido ajustado, y encontrar información sobre el punto óptimo. Se busca obtener la combinación de niveles en los factores que dan por resultado el valor óptimo de la respuesta o la dirección óptima de movimiento en la cual se debe experimentar, la cual nos permitiría desplazar nuestra región experimental. Las técnicas de optimización a utilizar dependen si el modelo ajustado es de primer o segundo orden. A continuación se describirán algunas de estas (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Escalamiento Ascendente.

Esta técnica se utiliza para modelos de primer orden. Si la superficie es descrita adecuadamente por un modelo de primer orden, significa que todavía no se ha conseguido atrapar el punto óptimo en la región experimental actual, por lo que se debe explorar la región y determinar una dirección en la cual experimentar fuera de la región actual. Se le llama técnica de escalamiento ya que, dependiendo del tipo de variable respuesta que se tenga, se buscara una dirección ascendente o descendente para encontrar el punto óptimo. Si un modelo de primer orden describe bien la superficie, es decir, la variabilidad de la variable respuesta es bien explicada por el modelo, entonces significa que no hay presencia de curvatura; y por tanto no hay ni un máximo o mínimo en la región experimental actual, lo cual implica que se la debe trasladar. La dirección óptima de movimiento se seguirá hasta que haya un cambio de tendencia, es decir, se vea que la variable respuesta deja de optimizarse en esa dirección, por lo cual se debe explorar esa nueva región y ver si hay presencia de curvatura. Cuando se detecte presencia de curvatura, se deja de hacer escalamiento.(Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Análisis Canónico.

Esta técnica se aplica para modelos de segundo orden, cuando se quiere explorar con más amplitud una región experimental o cuando se espera que el punto óptimo ya está cerca. Los pasos para realizar este análisis son los siguientes: Determinar la región experimental a partir de los niveles de los factores; correr un diseño de

segundo orden para explorar la región, el más usado es el diseño compuesto central que puede construirse a partir de un diseño de primer orden agregando puntos; ajustar un modelo de segundo orden, si este explica bien la variabilidad observada se está cerca del óptimo; encontrar las coordenadas del punto estacionario, el punto estacionario es el punto donde la pendiente del plano tangente a la superficie es cero, lo cual lo hace un candidato a óptimo, siempre y cuando la superficie sea del tipo que se desea; expresar el modelo ajustado en su forma canónica, el análisis canónico consiste en reescribir el modelo ajustado de segundo orden en su forma canónica, expresándolo en términos de nuevas variables llamadas variables canónicas, que son transformaciones de las variables codificadas, la ventaja de la ecuación canónica es que proporciona información a simple vista sobre el tipo de superficie que se está observando y sobre su forma; finalmente se evidencia la relación entre las variables canónicas y las codificadas. Si se cuenta con un programa, no es necesario seguir los últimos 3 pasos del análisis canónico. Lo adecuado es encontrar los coeficientes de la ecuación canónica que indican el tipo de superficie observada y sólo si esta es del tipo que interesa, como montaña (máximo), se buscan las coordenadas del punto estacionario. Para calcular las coordenadas del punto estacionario se requiere conocimiento de matrices, vectores y derivadas; sin embargo, los programas de trabajo calculan el punto óptimo si tienen los datos experimentales, pero de todas maneras es importante conocer la teoría para tener criterio al momento de realizar el análisis (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Etapas.

Cribado.

La optimización de un proceso se inicia con esta etapa cuando se tiene muchos factores (más de 6 u 8) que afectan la variable de interés. No se tiene una idea clara de cómo influyen cada uno de los factores y se debe correr un experimento para determinar los que tienen mayor influencia. El modelo matemático se debe realizar solo con los factores significativos (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Búsqueda de primer orden.

Esta etapa se aplica cuando se tienen pocos factores ($k \leq 5$) y se sabe que estos influyen en la variable respuesta. Se corre un diseño de primer orden para caracterizar de forma preliminar el tipo de superficie de respuesta y detectar la presencia de curvatura. Se suele utilizar un diseño factorial, completo o fraccionado, con repeticiones al centro. Se prueba la falta de ajuste para ver si el modelo describe bien la superficie, si la describe bien, significa que se tiene un hiperplano y que no hay presencia de curvatura. En este caso se utiliza la técnica de escalamiento ascendente para experimentar en la dirección óptima dada por el modelo hasta detectar un cambio de tendencia. Se vuelve a aplicar la búsqueda de primer orden usando como centro del nuevo modelo el punto de cambio de tendencia, se realiza este proceso hasta detectar la presencia de curvatura (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Búsqueda de segundo orden.

En el momento en que se detecta la presencia de curvatura o que la superficie es más complicada que un hiperplano, se completa un diseño de segundo orden para caracterizar mejor la superficie y poder modelar la curvatura. Con el modelo ajustado se determinan las condiciones óptimas de operación del proceso (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

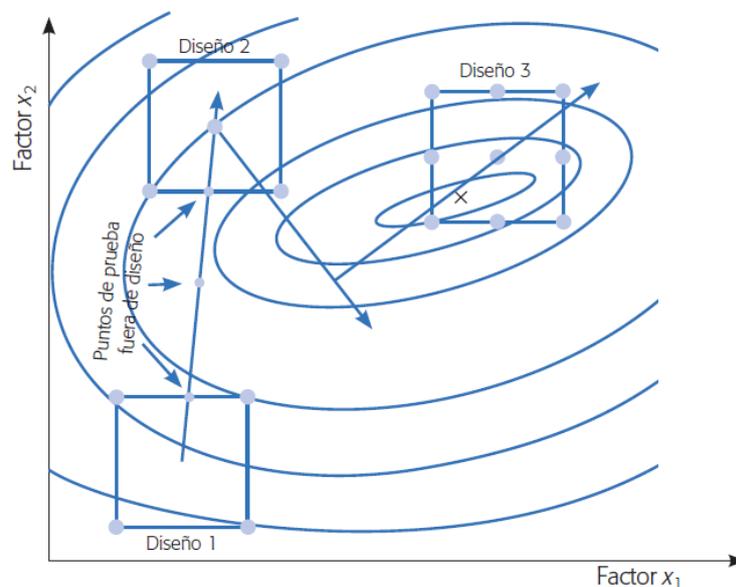


Figura 10. Representación gráfica de la metodología de superficie respuesta (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008)

Materiales y métodos

Lugar de ejecución

Laboratorios de Investigación de la Universidad San Ignacio de Loyola

Materia prima

Se trabajó con el tallo y las hojas de la chijchipa (*Tagetes mandonii*), la cual se recolectó de los siguientes lugares:

- Fecha: 03/03/18
Lugar: Distrito Chinchero, Provincia Urubamba, Departamento de Cuzco
- Fecha: 04/03/18
Lugar: Fundo Molleray, Distrito San Sebastián, Provincia de Cuzco, Departamento de Cuzco

La planta fue identificada por personas nativas de la zona.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos.

- Estufa Memmert UN160
- Procesador de alimentos Oster
- Balanza analítica And GH-200
- Cocinilla/Agitador magnético SBS ACS-160
- Soporte universal
- Espectrofotómetro Jenway 6305
- Agitador vibrador/Vortex SBS MVOR-03

Materiales.

- Bandejas de metal
- Mortero
- Bolsas trilaminadas

- Fiolas de diferentes tamaños (25 ml, 100 ml)
- Tubos de ensayo
- Gradillas de tubos de ensayo
- Pipetas de diferentes tamaños (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)
- Vasos de precipitación de diferentes tamaños (50 ml, 1000 ml)
- Embudos de diferentes tamaños
- Tubo condensador con sus mangueras
- Lubricante
- Balón (250 ml)
- Termómetro de vidrio y digital
- Lunas de reloj
- Cucharillas de metal
- Cubetas para el espectrofotómetro
- Soporte de Tecnopor para cubetas
- Papel filtro Whatman N°1
- Agitador magnético
- Bombilla
- Guantes
- Mascarilla

Reactivos.

- Metanol (CH₃OH)
- Nitrito de sodio (NaNO₂)
- Cloruro de Aluminio (AlCl₃)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Agua destilada
- Quercetina

Flujo y descripción del proceso

Preparación de la muestra.

A continuación, se muestra el flujo de operaciones que se aplicó a la chijchipa para la preparación de la muestra para la extracción

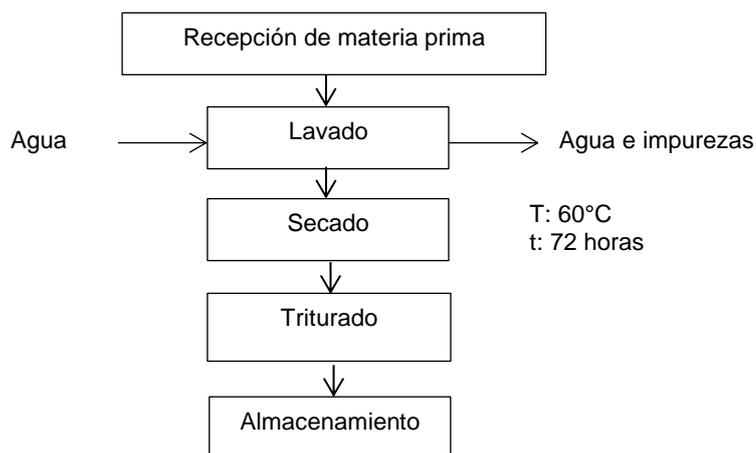


Figura 11. Flujo de operaciones para la preparación de la muestra

Lavado:

Se lavó la planta con agua potable para eliminar restos de tierra e impurezas, sin frotación para no afectar su estructura. Luego se sacudió la planta y se usó papel toalla para eliminar el exceso de agua de la superficie.

Secado:

La planta se colocó en bandejas de metal y se cubrió con papel aluminio. Se secó en estufa a 60°C por 72 horas, hasta que esta alcanzó un peso constante.



Figura 12. Chijchipa previo al secado en estufa

Triturado:

Se realizó una trituration previa de la planta seca con mortero, luego se obtuvo un polvo homogéneo con ayuda de un procesador de alimentos. Se realizó esto con el objetivo de reducir el tamaño de la partícula y facilitar la extracción.



Figura 13. Triturado en mortero de la chijchipa seca

Almacenamiento:

Se almacenó el polvo en bolsas trilaminadas, las cuales se colocaron en un desecador hasta su utilización.

Extracción de flavonoides de la chijchipa.

A continuación, se muestra el flujo de operaciones que se aplicó para la extracción de flavonoides.

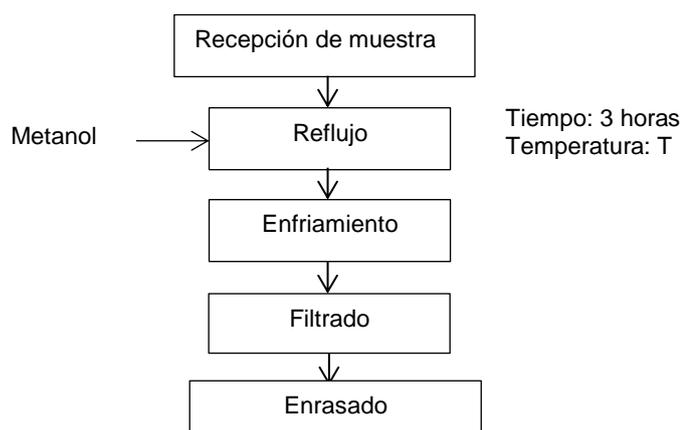


Figura 14. Flujo de operaciones para la extracción de flavonoides de la Chijchipa

Reflujo:

El método de extracción fue reflujo, se colocó 25 ml del solvente junto con una cantidad de muestra de chijchipa triturada en un balón, la razón por la que se utilizó 25 ml fue debido al tamaño de la fiola donde se colocó el extracto final. Se conectó el balón a un tubo condensador; y se colocó el sistema dentro de un vaso de precipitación de 1000

ml, con aproximadamente 600 ml de agua que se calentó a diferentes temperaturas, las cuales dependieron del tratamiento a probar. El condensador causó que los vapores de solvente que se volatilizaron regresen al balón, lo cual mantuvo la cantidad de solvente casi constante. Se realizó el reflujo por 3 horas por corrida experimental.



Figura 15. Sistema de reflujo para la obtención del extracto

Enfriamiento:

Se colocó el balón con extracto, bajo un chorro de agua fría. Cuando el extracto estuvo frío, se retiró del agua y se secó el balón con papel para que no ingresase agua durante el filtrado.

Filtrado:

Se filtró el extracto obtenido a una fiola de 25 ml con ayuda de un embudo y papel filtro Whatman N°1, se realizó esto para eliminar los restos de materia vegetal que se encontraban en el extracto.



Figura 16. Filtrado del extracto obtenido

Enrasado:

Luego del filtrado, se observó que el volumen de extracto obtenido era menor al volumen de solvente que se utilizó, por lo cual se enrasó en la fiola a 25 ml con el solvente usado en la extracción, para tener un volumen constante.

Diseño Experimental

Variables independientes.

Los factores, o variables independientes, que se estudiaron en el presente trabajo y sus niveles fueron los siguientes:

Concentración de metanol (CM):

- 20%
- 80%

Temperatura de extracción (TE):

- 60°C
- 80°C

Relación cantidad de solvente/materia vegetal seca (RLS):

- 20 ml/g
- 40 ml/g

Las variables, con sus niveles, fueron seleccionadas en base a pruebas preliminares e investigaciones previas (Cartaya, 2001; Ghasemzadeh y Jaafar, 2014; Liu, 2014; Souza, 2007; Torti, 1995).

VARIABLES DEPENDIENTES.

La variable respuesta o dependiente, fue el contenido de flavonoides, expresado en mg equivalentes de quercetina (EQ)/g MS.

MATRIZ DE DISEÑO.

La matriz de diseño fue obtenida con ayuda del programa Statgraphics versión 18.1.06. Se colocaron las variables, sus niveles, unidades y se seleccionó un diseño compuesto central que tenga las propiedades de ser rotable y ortogonal. Se obtuvo 23 tratamientos, donde 8 (2^3) puntos corresponden a la parte factorial del modelo, 6 (2×3) puntos corresponden a los puntos axiales y 9 puntos son las repeticiones al centro necesarias para otorgar las propiedades de rotabilidad y ortogonalidad.

Tabla 3
Matriz de diseño

Tratamiento	CM (%)	TE (°C)	RLS (ml/g)
(Punto Axial)1	-0.454	70.000	30.000
(Punto Axial)2	50.000	70.000	13.182
(Punto Factorial)3	80.000	80.000	20.000
(Punto Factorial)4	20.000	80.000	40.000
(Punto Central)5	50.000	70.000	30.000
(Punto Axial)6	50.000	70.000	46.818
(Punto Central)7	50.000	70.000	30.000
(Punto Central)8	50.000	70.000	30.000
(Punto Central)9	50.000	70.000	30.000
(Punto Factorial)10	20.000	60.000	20.000
(Punto Axial)11	50.000	53.182	30.000
(Punto Central)12	50.000	70.000	30.000
(Punto Central)13	50.000	70.000	30.000
(Punto Factorial)14	20.000	80.000	20.000
(Punto Central)15	50.000	70.000	30.000
(Punto Factorial)16	80.000	80.000	40.000
(Punto Factorial)17	20.000	60.000	40.000
(Punto Central)18	50.000	70.000	30.000
(Punto Central)19	50.000	70.000	30.000
(Punto Axial)20	100.454	70.000	30.000
(Punto Factorial)21	80.000	60.000	20.000
(Punto Axial)22	50.000	86.818	30.000
(Punto Factorial)23	80.000	60.000	40.000

MÉTODOS DE EVALUACIÓN O ANÁLISIS

Cuantificación de flavonoides.

El método de cuantificación utilizado fue una adaptación del método espectrofotométrico basado en la formación de un complejo con cloruro de aluminio (AlCl_3) (Zhishen et al., 1999). Se disolvió 1 ml del extracto filtrado obtenido anteriormente con 4 ml de agua destilada, obteniendo 5 ml. Al extracto disuelto se le agregó 0.3 ml de NaNO_2 5%.

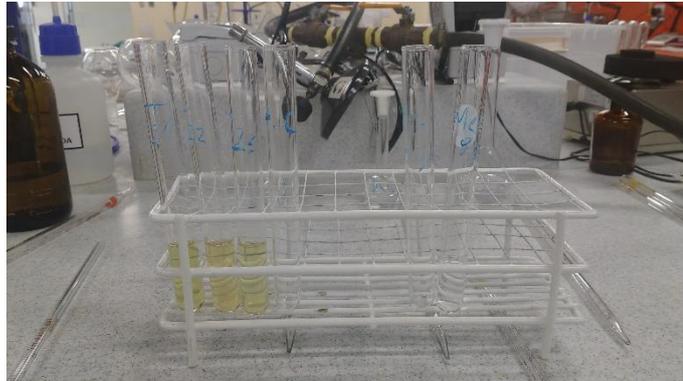


Figura 17. Coloración luego de agregar agua y NaNO_2 5%

Se esperó 5 minutos y se agregó 0.3 ml de AlCl_3 10%.

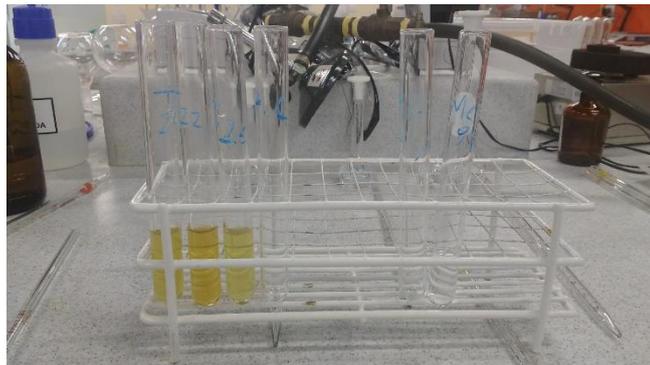


Figura 18. Coloración luego de agregar AlCl_3 10%

Se esperó 6 minutos y se le agregó 2 ml de NaOH 1M; luego se completó con agua destilada hasta 10 ml.

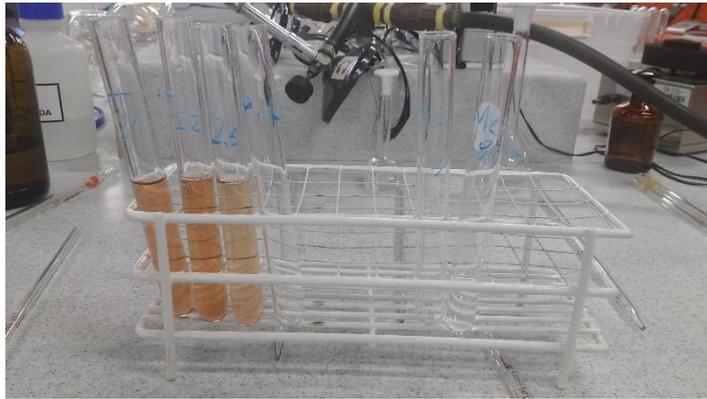


Figura 19. Coloración luego de agregar NaOH 1M

La solución anterior se mezcló bien, mediante una agitación del tubo de ensayo que la contenía con un agitador vortex. Se dejó reaccionar por 30 minutos y luego, con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm, se midió la absorbancia. La concentración de flavonoides de la solución se determinó con una curva de calibración de quercetina, los resultados fueron expresados en ug EQ/ml solución. Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó el método de cuantificación explicado previamente, se trabajó con soluciones con concentraciones de 90.0, 79.2, 58.5 y 49.1 ug quercetina/ml y así se obtuvieron los datos para graficar la curva. Cada prueba se realizó por triplicado. La quercetina es un flavonoide insoluble en agua fría, poco soluble en agua caliente, pero muy soluble en alcohol y lípidos. A continuación, se presenta la solubilidad de la quercetina en diferentes solventes orgánicos.

Tabla 4
Solubilidad de la quercetina

SOLUBILITY OF QUERCETIN IN ORGANIC SOLVENTS			
Solvent	mmol/L	mole fraction	Temperature (K)
acetonitrile	5.40	0.00028	323
	6.80	0.00036	333
	7.05	0.00037	343
acetone	80.08	0.00588	323
tert-amyl alcohol	67.01	0.00734	323
water		0.000055	298.6
water		0.00000013 ^a	298.8
methanol		0.00092	298.6
ethanol		0.00153	298.6

^a anhydrous quercetin

Fuente: (Aguda, 2016)

Se calculó el contenido de flavonoides en mg EQ/g MS para cada tratamiento realizado con la concentración de la solución, los volúmenes trabajados y la cantidad de materia vegetal utilizada.

Análisis experimental.

Se utilizó el programa Statgraphics versión 18.1.06 para generar la matriz de diseño, recibir los resultados obtenidos de las pruebas experimentales y así generar los diferentes análisis y gráficos como la superficie respuesta con su respectiva ecuación, gráfico de contornos, gráfico de interacciones y la obtención del punto óptimo.

Resultados y discusiones

Cuantificación de flavonoides

La curva de calibración resultante fue la siguiente

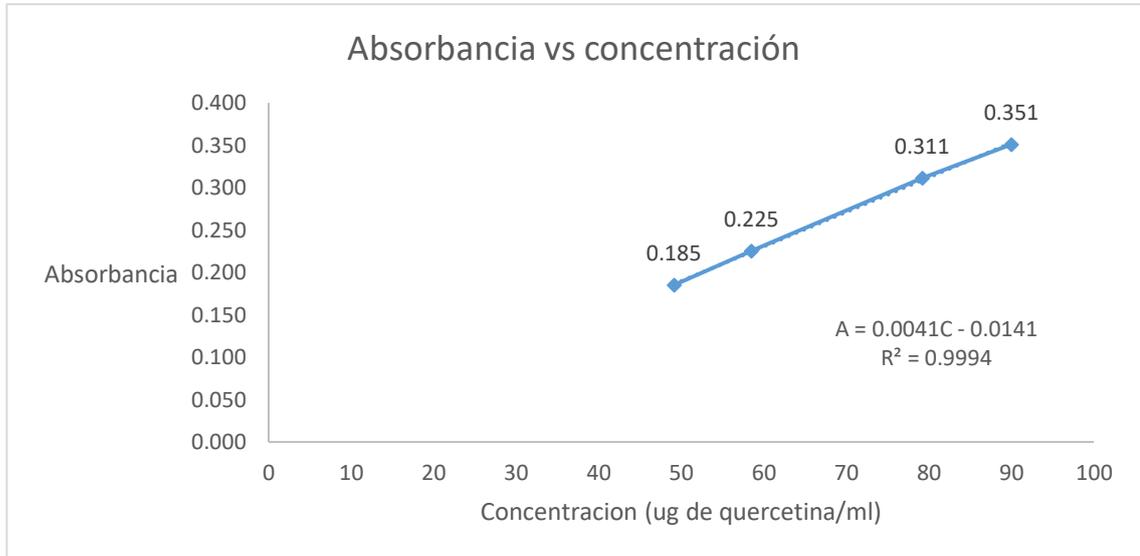


Figura 20. Curva de calibración (absorbancia vs concentración (ug de quercetina /ml))

El rango de absorbancias para la curva de calibración fue de 0.185 a 0.351. Como se aprecia, la ecuación hallada fue

$$A = 0.0041C - 0.0141$$

Se realizaron las 23 pruebas de la matriz de diseño, en el orden aleatorio dado por el programa y mostrado en la tabla 3. Cuando se usó 1 ml del extracto obtenido mediante algunos tratamientos, para la cuantificación, se obtuvo absorbancias que estuvieron por encima de la absorbancia límite de la curva de calibración elaborada, que fue 0.351. Sin embargo, a estos extractos se les diluyó para que pudieran entrar en el rango, en un factor de dilución del 50%.

Tabla 5
Absorbancias de los tratamientos

Tratamiento	CM (%)	TE (°C)	RLS (ml/g)	Absorbancia
(Punto Axial)1	-0.453785	70	30	0.278
(Punto Axial)2	50	70	13.1821	0.305

(Punto Factorial)3	80	80	20	0.321
(Punto Factorial)4	20	80	40	0.209
(Punto Central)5	50	70	30	0.332
(Punto Axial)6	50	70	46.8179	0.219
(Punto Central)7	50	70	30	0.265
(Punto Central)8	50	70	30	0.294
(Punto Central)9	50	70	30	0.319
(Punto Factorial)10	20	60	20	0.260
(Punto Axial)11	50	53.1821	30	0.334
(Punto Central)12	50	70	30	0.300
(Punto Central)13	50	70	30	0.328
(Punto Factorial)14	20	80	20	0.312
(Punto Central)15	50	70	30	0.282
(Punto Factorial)16	80	80	40	0.193
(Punto Factorial)17	20	60	40	0.276
(Punto Central)18	50	70	30	0.280
(Punto Central)19	50	70	30	0.289
(Punto Axial)20	100.454	70	30	0.299
(Punto Factorial)21	80	60	20	0.215
(Punto Axial)22	50	86.8179	30	0.194
(Punto Factorial)23	80	60	40	0.336

A partir de las absorbancias, se calculó las concentraciones de cada extracto con la ecuación de la curva de calibración. A los extractos que fueron disueltos para entrar en el rango de la curva, se les multiplicó su concentración por dos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 6
Concentraciones de flavonoides en cada solución

Tratamiento	Concentración de flavonoides (ug EQ/ml solución)
(Punto Axial)1	142.244
(Punto Axial)2	155.415
(Punto Factorial)3	163.220
(Punto Factorial)4	108.829
(Punto Central)5	84.415
(Punto Axial)6	56.854
(Punto Central)7	68.073
(Punto Central)8	75.146
(Punto Central)9	81.244
(Punto Factorial)10	133.707
(Punto Axial)11	84.902
(Punto Central)12	76.610
(Punto Central)13	83.439
(Punto Factorial)14	159.073
(Punto Central)15	72.220
(Punto Factorial)16	100.780
(Punto Factorial)17	70.756
(Punto Central)18	71.732
(Punto Central)19	73.927
(Punto Axial)20	152.732
(Punto Factorial)21	111.756
(Punto Axial)22	101.268
(Punto Factorial)23	85.390

A partir de las concentraciones de las soluciones, los volúmenes utilizados y las cantidades de materia vegetal usada, se calculó la cantidad de flavonoides obtenidos por gramo de materia vegetal seca. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 7
Contenido de flavonoides obtenido en cada tratamiento

Tratamiento	Contenido de flavonoides (mg EQ/g MS)
(Punto Axial)1	42.690
(Punto Axial)2	20.557
(Punto Factorial)3	32.644
(Punto Factorial)4	43.532
(Punto Central)5	25.335
(Punto Axial)6	26.617
(Punto Central)7	20.430
(Punto Central)8	22.553
(Punto Central)9	24.383
(Punto Factorial)10	26.741
(Punto Axial)11	25.481
(Punto Central)12	22.992
(Punto Central)13	25.042
(Punto Factorial)14	31.815
(Punto Central)15	21.675
(Punto Factorial)16	40.312
(Punto Factorial)17	28.302
(Punto Central)18	21.528
(Punto Central)19	22.187
(Punto Axial)20	45.838
(Punto Factorial)21	22.351
(Punto Axial)22	30.393
(Punto Factorial)23	34.156

Análisis experimental

Los contenidos de flavonoides obtenidos fueron colocados en el programa Statgraphics, se analizó el diseño experimental y se obtuvo la siguiente grafica de superficie respuesta:

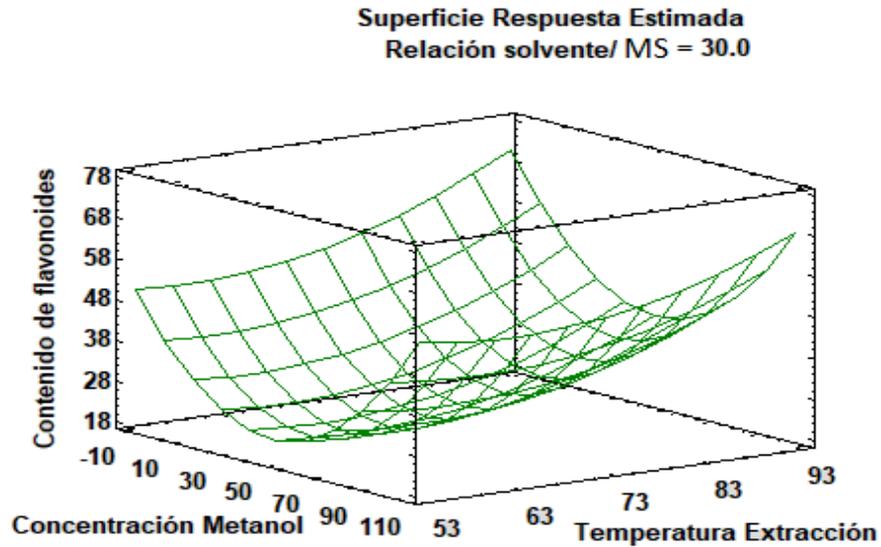


Figura 21. Gráfico de superficie respuesta del contenido de flavonoides

La ecuación de la gráfica mostrada con sus coeficientes fue la siguiente:

Tabla 8
Coeficientes de la ecuación de la gráfica de superficie respuesta

Coeficiente	Estimado
constante	114.343
A: Concentración Metanol	-0.793596
B: Temperatura Extracción	-2.309
C: Relación solvente/m.vegetal seca	-0.487023
AA	0.00839254
AB	-0.00160625
AC	0.00258125
BB	0.0178086
BC	0.00752375
CC	0.00242898

La ecuación del modelo ajustado fue

$$\begin{aligned}
 \text{Contenido de flavonoides} &= 114.343 - 0.793596 * C. \text{Metanol} - 2.309 * T. \text{Extracción} - 0.487023 \\
 & * \frac{\text{solvente}}{MS} + 0.00839254 * C. \text{Metanol}^2 - 0.00160625 * C. \text{Metanol} \\
 & * T. \text{Extracción} + 0.00258125 * C. \text{Metanol} * \frac{\text{solvente}}{MS} + 0.0178086 \\
 & * T. \text{Extracción}^2 + 0.00752375 * T. \text{Extracción} * \frac{\text{solvente}}{MS} + 0.00242898 \\
 & * \left(\frac{\text{solvente}}{MS}\right)^2
 \end{aligned}$$

El gráfico de contornos correspondiente fue el siguiente:

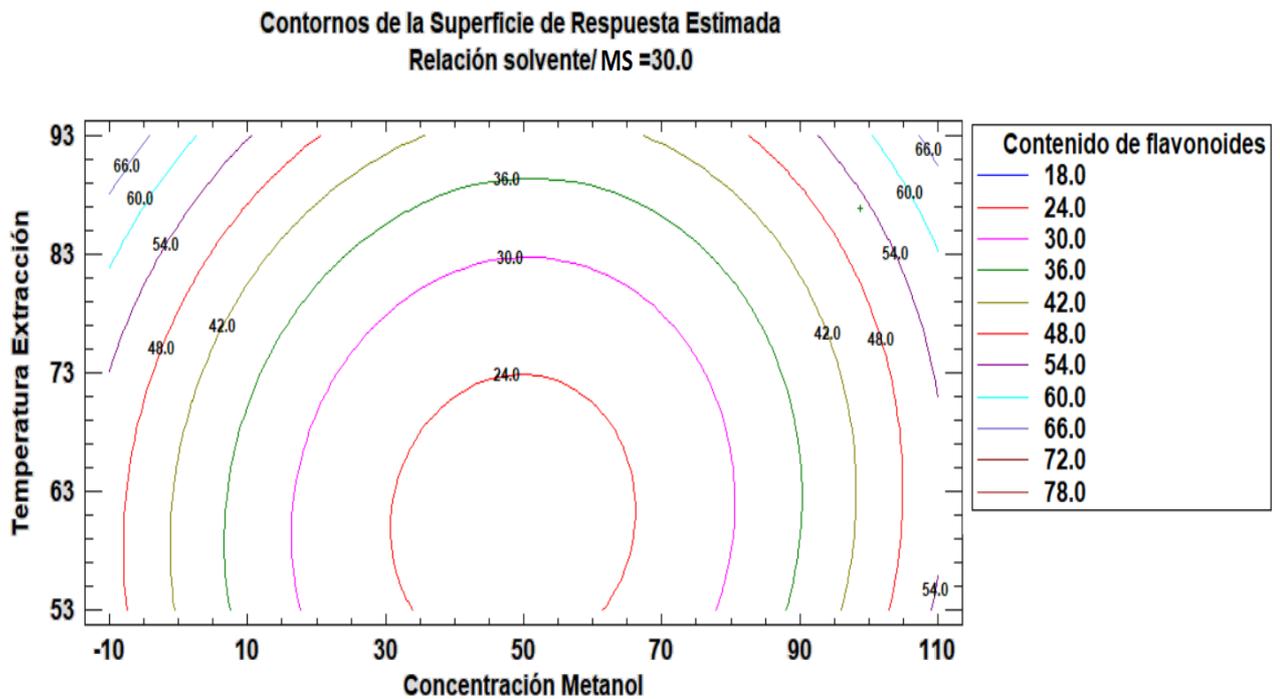


Figura 22. Gráfico de contornos del contenido de flavonoides

Para el modelo presentado se tuvo la siguiente tabla ANOVA

Tabla 9
Tabla ANOVA de la variable contenido de flavonoides

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración Metanol	1.39641	1	1.39641	0.18	0.6800
B:Temperatura Extracción	148.369	1	148.369	18.91	0.0008
C:Relación solvente/M.vegetal	135.029	1	135.029	17.21	0.0011
AA	906.53	1	906.53	115.55	0.0000
AB	1.85763	1	1.85763	0.24	0.6346
AC	4.79725	1	4.79725	0.61	0.4482
BB	50.3923	1	50.3923	6.42	0.0249
BC	4.52855	1	4.52855	0.58	0.4610
CC	0.937459	1	0.937459	0.12	0.7351
Error total	101.993	13	7.84561		
Total (corr.)	1352.49	22			

R-cuadrada = 92.4589 porciento

R-cuadrada (ajustada por grados de libertad) = 87.2381 porciento

Error estándar del estimado = 2.801

Error absoluto medio = 1.71474

Estadístico Durbin-Watson = 1.42166 (P=0.0646)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.278936

La tabla ANOVA particiona la variabilidad del contenido de flavonoides en partes separadas, para cada uno de los efectos, luego prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 4 efectos tuvieron un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explicó 92.4589% de la variabilidad en el contenido de flavonoides. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue 87.2381%. El error estándar del estimado indicó que la desviación estándar de los residuos fue 2.801. El error medio absoluto (MAE) de 1.71474 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa. Debido a que el valor-P fue mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

Además, se obtuvo el grafico de efectos principales siguiente:

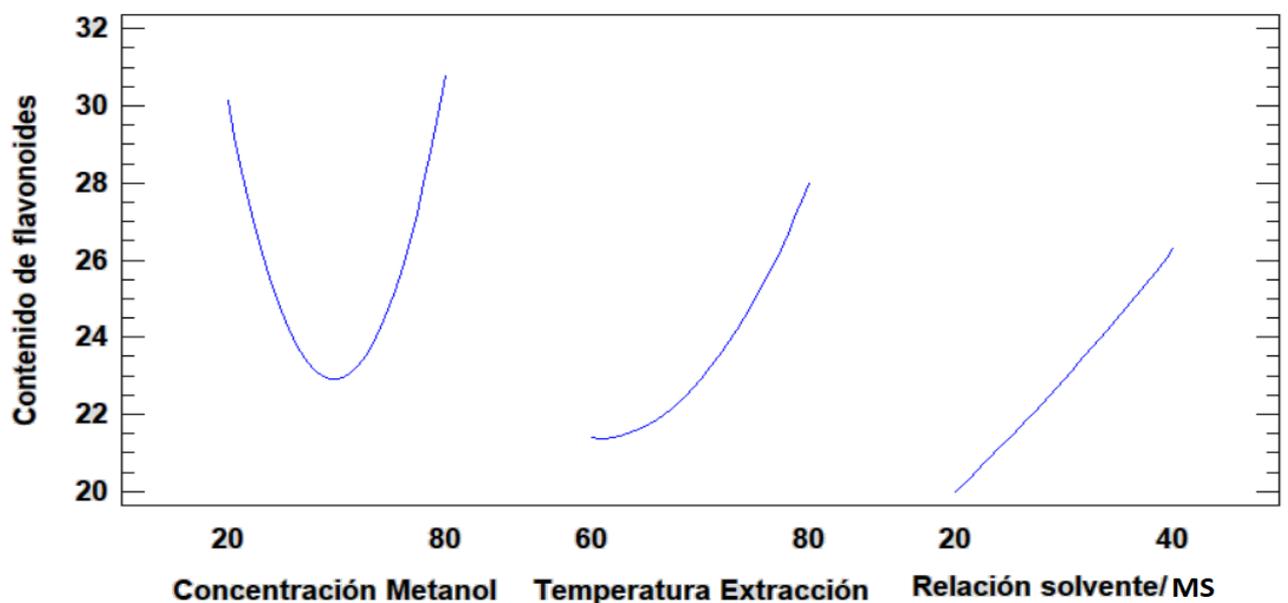


Figura 23. Gráfico de efectos principales del contenido de flavonoides

En los gráficos mostrados, se puede observar el efecto de las variables escogidas y sus niveles en el contenido de flavonoides obtenido de la chijchipa (*Tagetes mandonii*). Se encontró un punto donde la pendiente del plano tangente es igual a cero, pero al observar la forma de la superficie y la gráfica de contornos, nos damos cuenta que se trata de un punto mínimo. Para obtener un punto óptimo, la forma de la superficie de respuesta debe ser la de una montaña, como se aprecia en la figura 9 b. Sin embargo, la región experimental escogida fue adecuada, dado que las variables independientes trabajadas, y sus niveles respectivos, estuvieron basadas en pruebas preliminares y en bibliografía. El nivel alto de la temperatura se fijó en 80°C, porque los flavonoides podrían empezar a degradarse a temperaturas mayores; mientras que el nivel bajo se fijó en 60°C al ser esta una temperatura cercana a la temperatura de ebullición del metanol, además se sabe que a menores temperaturas el contenido extraído es menor, como también se pudo comprobar experimentalmente y se observa en la figura 23. La concentración de metanol estuvo en el rango del 20% al 80%, pero también se probó los valores extremos de 0% y 100% al momento de experimentar los puntos axiales, por lo que se cubre todos los valores posibles. Finalmente, se fijó los niveles de la relación solvente/MS de tal manera que la absorbancia final estuviese en el rango establecido por la ley de Lambert y Beer, que es de 0.2 a 0.8. Eso quiere que decir que la investigación realizada permitió lograr una mejor extracción y maximizó el contenido de flavonoides obtenido de la chijchipa, pero no se pudo alcanzar un punto óptimo con los datos obtenidos.

Al observar la figura 23, se aprecia que al trabajarse con una mayor relación solvente/MS se obtuvo un mayor contenido de flavonoides. Es probable que con bajas relaciones el extracto se empezó a saturar, mientras que, con una mayor relación, hubo más solvente disponible para lograr extraer un mayor contenido. Respecto a la concentración de metanol, se observa cómo se obtuvo un mayor contenido de flavonoides con concentraciones extremas, bajas o altas, mientras que, con concentraciones intermedias, el contenido se vio reducido. Esto probablemente ocurrió debido a que durante la extracción por reflujo, el metanol se empezó a evaporar primero que el agua al tener un menor punto de ebullición, lo cual afectó la polaridad del solvente en el balón. Cuando el solvente estuvo compuesto de principalmente agua o metanol, su polaridad se mantuvo más estable durante la extracción, pero cuando estuvieron mezclados, la polaridad variaba y por tanto variaba la forma en cómo eran extraídos los flavonoides.

Comprobación del punto máximo

Como se mencionó en la parte de discusiones, la investigación realizada no permite encontrar un punto óptimo, pero si permite mejorar la extracción mediante la determinación de un tratamiento con el que se obtiene un contenido de flavonoides más alto que los otros probados en la matriz de diseño de la tabla 3, a este tratamiento encontrado se le llamara punto máximo.

El punto máximo obtenido en el programa fue el siguiente:

Tabla 10
Punto máximo para la extracción de flavonoides

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración Metanol	-0.453785	100.454	98.7587
Temperatura Extracción	53.1821	86.8179	86.8179
Relación solvente/M.vegetal	13.1821	46.8179	46.7872

En este punto, el contenido de flavonoides obtenido fue el siguiente:

Contenido máximo de flavonoides dado por el programa = 62.838 mg EQ/g MS

Se probó experimentalmente el punto máximo obtenido mediante el programa Statgraphics. Los niveles ajustados fueron los siguientes: concentración de metanol, 99%; temperatura de extracción, 87°C; y relación solvente/m.vegetal, 46.79 ml/gr. La absorbancia obtenida, de aplicar el método de cuantificación al extracto obtenido al realizar este tratamiento, estuvo por encima del límite de nuestra curva de calibración, por lo que se diluyó el extracto para que pudiese entrar en el rango, usando un factor de dilución del 50%. La absorbancia obtenida fue la siguiente

Absorbancia obtenida de realizar experimentalmente el punto máximo = 0.232

Aplicando la ecuación de nuestra curva de calibración a la absorbancia obtenida, se obtiene la concentración de flavonoides de la solución. La concentración de flavonoides obtenida fue multiplicada por dos. Se obtuvo el siguiente resultado:

Concentración de flavonoides obtenida experimentalmente = 120.048 ug EQ/ml solución

Para poder obtener el contenido de flavonoides por gramo de chijchipa seca, se realizó cálculos en base a la concentración de la solución obtenida, los volúmenes con los que se trabajó y la cantidad de materia vegetal que se utilizó (ver Anexo 7). El valor obtenido fue el siguiente

Contenido máximo de flavonoides obtenido experimentalmente = 56.203 mg EQ/g MS

Se puede observar que, si bien se obtuvo experimentalmente un valor de contenido de flavonoides menor al dado por el programa, este fue cercano y mayor al de cualquier tratamiento realizado inicialmente. Además, se considera adecuado debido al R^2 ajustado que tiene la ecuación de nuestra superficie respuesta.

Este valor es muy superior a los obtenidos en la investigación realizada por Ayub (2017), donde se cuantificó flavonoides de extractos de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*. En este trabajo, se realizó una extracción, utilizando un agitador orbital, de los pétalos de las flores de las plantas ya mencionadas, los cuales fueron secados y molidos a un polvo fino. Se usaron como solventes hexano y metanol, además, el método de cuantificación de flavonoides utilizado fue el método espectrofotométrico de formación de un complejo con el cloruro de aluminio. El extracto de metanol de *Tagetes Patula* fue el más rico en flavonoides con 16.9 mg EC (equivalentes de catequina) /g MS (Ver anexo 4).

Sin embargo, el contenido logrado es menor a los obtenidos por Siriamornpun (2012), el cual cuantificó flavonoides de un extracto de pétalos de *Tagetes erecta*, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos previos como liofilización, secado con aire caliente y una combinación de aire caliente y radiación infrarroja. El método de extracción utilizado fue una maceración por 12 horas con una mezcla de metanol, ácido clorhídrico (HCl) (100:1) y 2% terbutil hidroquinona (TBHQ). Para cuantificar los flavonoides en este trabajo, también se utilizó el método de formación de un complejo con el cloruro de aluminio, los resultados fueron expresados en mg ER (equivalentes de rutina) /g MS (Ver anexo 5). El menor resultado obtenido fue de 68.9 mg ER/ g MS, el cual es superior al valor obtenido en este trabajo.

Las investigaciones mencionadas, utilizaron los pétalos de las flores de la *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*, mientras que en la presente investigación se utilizó las hojas y tallos de la *Tagetes mandonii*, debido a que estas partes de la planta suelen utilizarse con propósitos alimenticios y medicinales (Lorenzo et al., 2002). Además, Parejo et al. (2005) en su

investigación extrae derivados de la quercetagina, un flavonol, de las hojas y tallos de la *Tagetes maxima*. Otra razón por la cual se utilizó las hojas y tallos, es debido a que estas son las partes de las hierbas que son comúnmente utilizadas en la preparación de comidas y aderezos.

La diferencia entre los resultados obtenidos por Ayub (2017) y Siriamornpun (2012) con los de esta investigación es debido a diversos factores como el método de extracción empleado, partes de la planta utilizadas, especie de la planta utilizada, solventes y reactivos utilizados, temperatura y estación de crecimiento de la planta, condiciones ambientales durante la parte experimental y preparación previa a la muestra.

Conclusiones

- No se pudo encontrar una combinación de los niveles de los parámetros con la que se logra un valor óptimo en el contenido de flavonoides; sin embargo, se logro una mejor extracción y se maximizó el contenido de flavonoides obtenido de la chijchipa.
- La combinación de niveles de los factores de extracción que da un valor máximo de contenido de flavonoides es de 99% de concentración de metanol, 87°C de temperatura de extracción y 46.79 ml/gr de relación solvente/MS.
- El contenido máximo de flavonoides obtenido fue de 56.203 mg EQ/g MS
- El resultado de contenido de flavonoides de la *Tagetes mandonii* guarda relación con los contenidos de flavonoides de otras especies de ese género, dado que el resultado de esta investigación está comprendido entre los valores hallados por otras investigaciones.

Recomendaciones

- Como se puede observar en la figura 23, se obtuvo un contenido similar de flavonoides utilizando una concentración de metanol muy alta (100%) o muy baja (0%). Si bien el contenido extraído es mayor con altas concentraciones de metanol, para aplicaciones en la industria alimentaria, se recomienda el uso de agua destilada, es decir una concentración del 0% de metanol. Esto es debido a que se incurriría en menores gastos, el contenido de flavonoides obtenido también sería elevado y un extracto acuoso sería más sencillo y seguro de manipular comparado con uno de metanol, el cual es tóxico.
- Se recomienda encontrar, de ser posible, una mezcla azeotrópica entre el agua y metanol para ver el contenido de flavonoides que son extraídos con este solvente.
- Se recomienda elaborar algún alimento que contenga chijchipa, como por ejemplo un aderezo o mezcla, para fomentar su uso y hacerla más conocida. En los productos realizados se debe de hacer énfasis en las propiedades beneficiosas de esta planta, ya que esto permitirá que se difunda más rápido.
- Esta planta es oriunda de zonas andinas, pero se debería intentar sembrar en otros climas y alturas para ver su desarrollo y viabilidad.
- Se recomienda realizar otros métodos de extracción y cuantificación a la chijchipa, con el objetivo de ver con cual se obtiene un mayor contenido de flavonoides.

Bibliografía

- Aguda, R. C. C., Chau. (2016). Solubility of Nutraceutical Compounds in Generally Recognized as Safe Solvents at 298 K. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7(5), 289-294. doi: 10.18178/ijcea.2016.7.5.591
- Alonso-Carrillo, N., de los Ángeles Aguilar-Santamaría, M., Vernon-Carter, E. J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., & Román-Guerrero, A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 103, 213-221.
- Avello, M., Valdivia, R., Sanzana, R., Mondaca, M., Mennickent, S., Aeschlimann, V., . . . Becerra, J. (2009). Extractos Antioxidantes y Antimicrobianos de *Aristolelia chilensis* y *Ugni molinae* y sus Aplicaciones como Preservantes en Productos Cosméticos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 479-486.
- Ayub, M. H., Abdullah; Hanif, Muhammad; Shahid, Shahzad; Kamal, Ghulam; Shahid, Muhammad; Janneh, Omar. (2017). Variation in phenolic profile, B-carotene and flavonoids contents, biological activities of two *Tagetes* species from Pakistani flora. doi: doi: 10.1002/cbdv.201600463
- Barrera, D. (1998). Estabilidad y Utilización de Nitrógeno en Aceite y Grasas. *Grasas y Aceites*, 49(1), 55-63.
- Bhaigyabati, T. G. D., P; Bag, GC. (2014). Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Aqueous Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 970-976.
- Bojalil, B., & Pozos, B. (2013). El Ajo y sus Aplicaciones en la Conservación de Alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 25-36.
- Bolivia Catalogue. (2009, Enero 15). *Tropicos*. Retrieved from <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2708465&projectid=13&langid=66>
- Bonilla Ríos, N. C. V., Flor Angela; Garzón , Leidy Paola. (2014). Extracción de Pigmentos Colorantes Tipo Flavonoides, Flor del Plomo (*Syzygium jambos*). *Revista Amazonia Investiga*, 3(5), 34-42.
- Brandan, N. (2010). Hormonas Catecolamínicas Adrenales. Corriente, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- Cartaya, O. R., Inés. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14.
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva Actual para la Salud Humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212.

- Csepregi, K., Kocsis, M., & Hideg, É. (2013). on the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4), 500-509.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 178-182.
- Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (2008). Trieste, Italy: International Centre for Science and High Technology.
- Gajardo, S., Benites, J., López, J., Burgos, N., Caro, C., & Rojas, M. (2011). Astaxantina: Antioxidante de Origen Natural con Variadas Aplicaciones en Cosmética. *Biofarbo*, 19(2), 6-12.
- Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. (2014). Optimization of Reflux Conditions for Total Flavonoid and Total Phenolic Extraction and Enhanced Antioxidant Capacity in Pandam (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Using Response Surface Methodology. *The Scientific World Journal*.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos Fenólicos Un Análisis de sus Beneficios para la Salud. *Offarm*, 23(6), 80-84.
- Gonzales, R., De la Rosa, M. T., González, M. R., & Martín, P. (2010). Pre-harvest spraying with rutin improves colour of "Tempranillo" grapes and wines. *Vitis*, 49(3), 147-148.
- Gutiérrez, Á., Ledesma, L., García, I., & Grajales, O. (2007). Capacidad Antioxidante Total en Alimentos Convencionales y Regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana Salud Pública*, 33(1).
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos* (2 ed.). Mexico: McGraw-Hill.
- Kelly, G. S. (2011). Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 16(2), 172-194.
- Kuntze, O. (1898). *Revisio Generum Plantarum* (Vol. 3).
- L.Herrera, F. (1939). *Catálogo Alfabético de los Nombres Vulgares y Científicos de Plantas que Existen en el Perú*. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Marcos.
- Leal, M. G., Miguel; Sanchez, Adriana. (2016). *Estudio Panorámico de Vigilancia Tecnológica e Inteligencia Competitiva: Alimentos Funcionales* Estudios panorámicos de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva, (pp. 323).
- Liu, X. L., L.; Wang, Y.; Leng, F.; Wang, S.; Li, Y. (2014). Optimization of Total Flavonoids Extraction from *Coreopsis tinctoria* Nutt. by Response Surface Methodology. *Kemija u industriji*, 63(11), 391-396. doi: 10.15255/KUI.2013.027
- López, T. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4), 108-113.
- Lorenzo, D., Loayza, I., & Dellacassa, E. (2002). Composition of the Essential Oil of *Tagetes Maxima* Kuntze from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 115-118.
- Martínez-Flóres, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 271-278.

- Nassr Allah, A. A. A. E., Ahmed M.; Aboul Enein, Khalid M.; Lightfoot, David A.; Cocchetto, Alan; El Shemy, Hany A. (2009). Anti-cancer and Anti-oxidant Activity of some Egyptian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(10), 799-808.
- Natural Products Isolation*. (2006). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Núñez, C. E. (2008). *Extracciones con Equipo Soxhlet*.
- Ochoa, C., & Ayala, A. (2004). Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 6(2), 93-104.
- Parejo, I., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2005). Acylated Quercetagenin Glycosides with Antioxidant Activity from *Tagetes Maxima*. *Phytochemistry*, 66, 2356-2362.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., . . . Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian Plant Extracts for their Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity. *Life Sciences*, 73, 1667-1681.
- Pauro, J., Gonzáles, F., Gamarra, B., Pauro, J., Mamani, F., & Huerta, R. (2011). Plantas Alimenticias, Medicinales y Biocidas de las Comunidades de Muñani y Suatia, Provincia de Lampa (Puno-Perú). *Ecología Aplicada*, 10, 41-49.
- Pekal, A. P., Krystyna. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782.
- Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Bergenståhl, B., & Åkesson, B. (2007). SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR THE MEASUREMENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND TOTAL FLAVONOIDS IN FOODS. *Revista Boliviana de Química*, 24(1), 5-9.
- The Plant List. (2013). *The Plant List*. Retrieved from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-136086>
- Plants: Diet and Health*. (2003). Great Britain, United Kingdom: Blackwell Science.
- Pokorny, J., Vanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidantes de los Alimentos: Aplicaciones Practicas*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA S.A.
- Quintanar, M., & Calderón, J. (2009). La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Senatore, F., D'Agostino, M., & Dini, I. (1999). Two New Quercetagenin O-glucosides from *Tagetes Mandonii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 309-311.
- Shahzadi, I., & Mohammad, M. S. (2015). Acylated Flavonol Glycosides from *Tagetes Minuta* with Antibacterial Activity. *Frontiers in Pharmacology*, 6.
- Shcmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Theoduloz, C., Rodríguez, J., López, S., & Egly Feresin, G. (2004). Free Radical Scavengers and Antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Z.Naturforsch*, 59c, 345-353.
- Silva Espinoza, B. A. O. R., Luis A.; Gonzales Aguilar, Gustavo A.; Olivas, Isela; Ayala Zavala, Jesús F. (2013). Protección Antifúngica y Enriquecimiento Antioxidante de Fresa con Aceite Esencial de Hoja de Canela. *Revista Fitotecnia*, 36(3), 217-224.

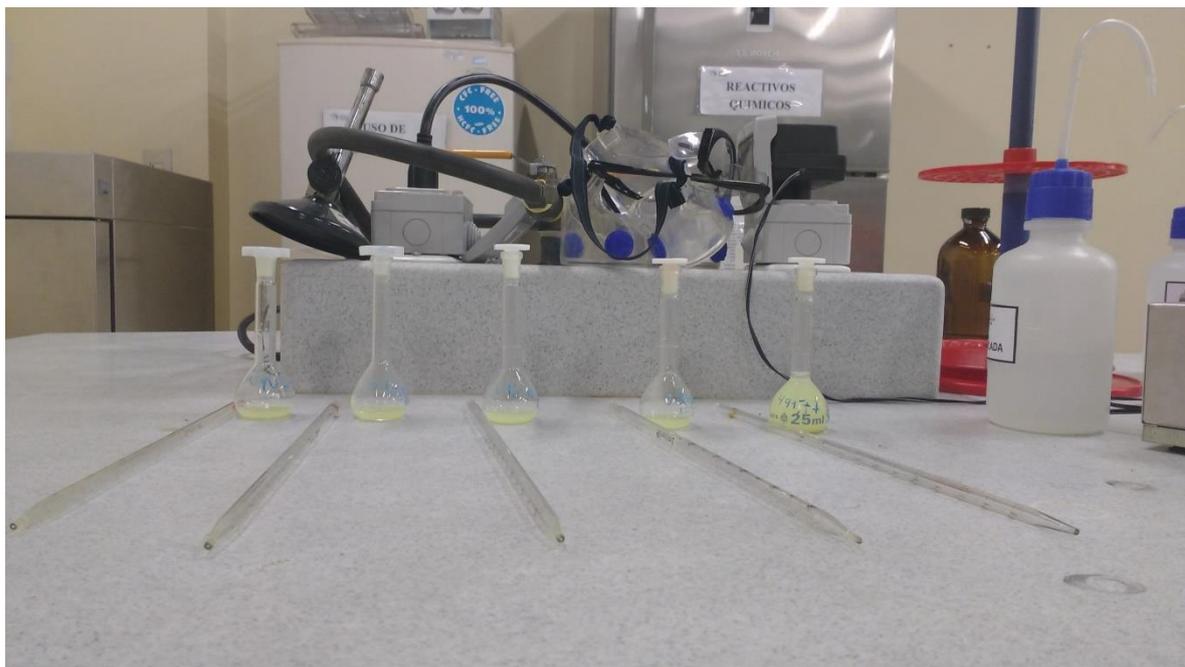
- Siriamornpun, S. K., Onanong; Meeso, Naret. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, B-carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of functional foods*, 4, 757-766. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.002>
- Souza, C. B., Rubiana; Oliveira, Wanderley. (2007). Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using Experimental Design and Multi-response Analysis. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(5), 682-690.
- . Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. (2008). Peru: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.
- Torti, S. D., M.; Kursar, Thomas. (1995). Extraction of Phenolic Compounds from Fresh Leaves: A Comparison of Methods. *Journal of Chemical Ecology*, 21(2).
- Ugás, R. (2014). *40 Viejas y Nuevas Verduras Para Diversificar tu Alimentación y Nutrirte Mejor*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 313-328.
- Venereo, J. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Anexos

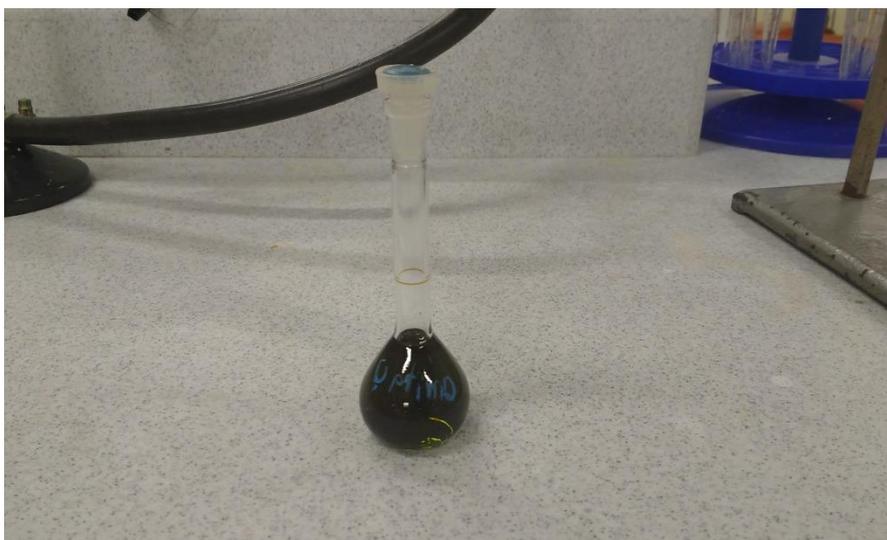
Anexo 1. Fotografías del estándar quercetina, los reactivos utilizados y algunas pruebas preliminares a la elaboración de la curva de calibración



Anexo 2. Fotografías de la elaboración de la curva de calibración



Anexo 3. Fotografías de algunos extractos de chijchipa obtenidos



Anexo 4. Tabla con contenido de flavonoides de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*, expresado en mg equivalentes de catequina (EC) /g materia vegetal seca (MS)

Extracts	Extract Yield (g/100g of dry petals)	Total Phenolics (mg TP/g of dry petals)	Total Flavonoids (mg TF/g of dry petals)	Total Carotenoids (mg TC/g of dry petals)	DPPH radical scavenging (IC ₅₀ µg/mL)
<i>Tagetes patula</i> hexane	6.23 ± 0.3 ^a	3.60 ± 0.30 ^b	1.70 ± 0.10 ^a	6.32 ± 0.1 ^a	30.0 ± 2.1 ^c
<i>Tagetes patula</i> methanol	21.3 ± 1.2 ^b	35.8 ± 1.7 ^c	16.9 ± 0.61 ^d	---	5.95 ± 0.51 ^b
<i>Tagetes erecta</i> hexane	6.80 ± 0.3 ^a	3.00 ± 0.21 ^a	2.01 ± 0.11 ^b	6.45 ± 0.2 ^b	27.1 ± 1.8 ^c
<i>Tagetes erecta</i> methanol	23.1 ± 1.9 ^b	35.6 ± 1.4 ^c	15.0 ± 0.46 ^c	---	5.73 ± 0.46 ^b
BHT	---	---	---	---	3.92 ± 0.36 ^a
BHA	---	---	---	---	4.15 ± 0.29 ^a

Fuente: (Ayub, 2017)

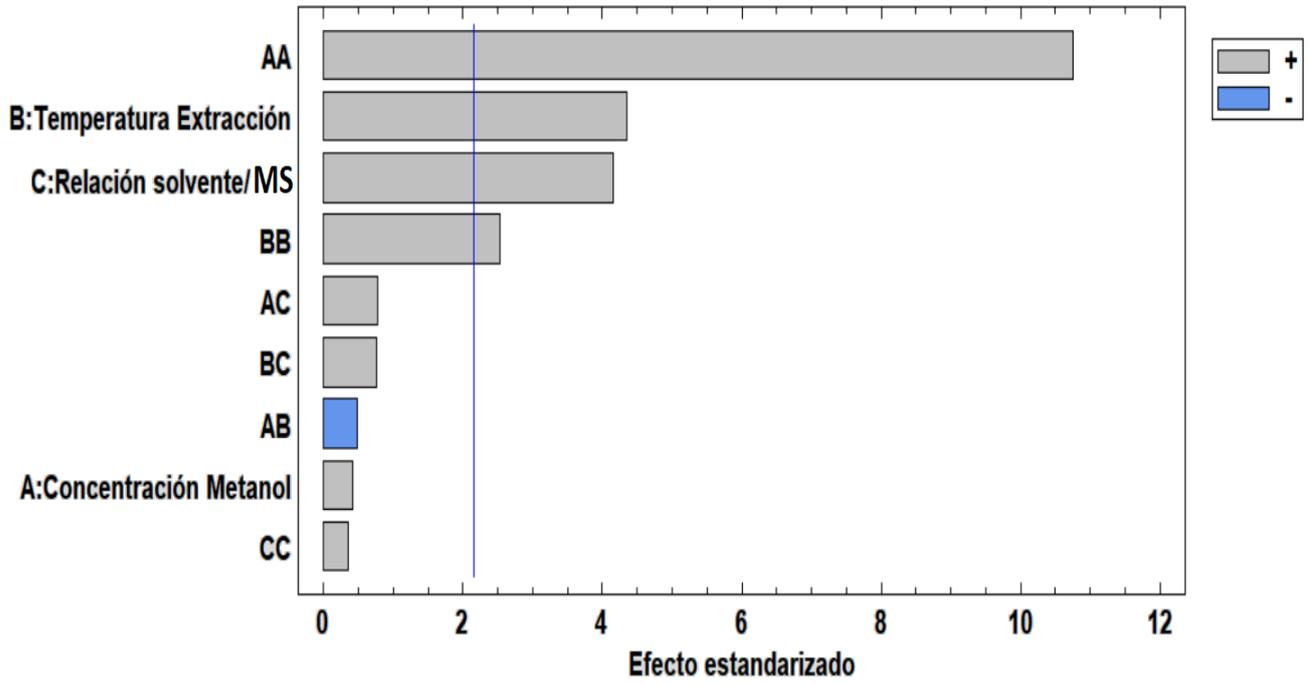
Anexo 5. Tabla con contenido de flavonoides de *Tagetes erecta*, expresado en mg equivalentes de rutina (ER) /g MS

Total phenolic content, total flavonoid content and FRAP value of fresh and dried marigold flower by different drying methods.			
Drying method	TFC (mg RTE/g DW)	TPC (mg GAE/g DW)	FRAP ($\mu\text{molFeSO}_4/\text{g DW}$)
Fresh	107.8 \pm 3.1 ^b	55.8 \pm 0.4 ^b	821.0 \pm 26.4 ^b
Freeze dry	105.5 \pm 1.9 ^b	53.6 \pm 2.5 ^b	811.0 \pm 23.7 ^b
Hot air	68.9 \pm 1.8 ^c	43.6 \pm 2.2 ^c	730.7 \pm 18.4 ^c
FIR-hot air	133.1 \pm 7.2 ^a	60.0 \pm 1.3 ^a	972.7 \pm 14.4 ^a

Fuente: (Siriamornpun, 2012)

Anexo 6. Diagrama de Pareto de los efectos para el contenido de flavonoides

Diagrama de pareto estandarizado para contenido de flavonoides



Anexo 7. Cálculos para la obtención del contenido de flavonoides por g de materia vegetal seca

Después de probar experimentalmente el punto máximo y realizar el método de cuantificación, se obtuvo la siguiente absorbancia:

Absorbancia obtenida de realizar experimentalmente el punto máximo = 0.232

Aplicando la ecuación de la curva de calibración se obtiene la siguiente concentración en la solución:

Concentración de flavonoides obtenida experimentalmente = 120.048 ug EQ/ml solución

Sin embargo, el tubo de ensayo contenía 10 ml de solución, por lo que en total se tuvo

$$120.048 \frac{ug EQ}{ml muestra} * 10 ml = 1200.48 ug EQ$$

Esa concentración de flavonoides estaba en el mililitro de extracto que se utilizó para el método de cuantificación. Nuestra fiola contenía 25 ml del extracto, por lo que se tuvo en total

$$1200.48 \frac{ug EQ}{ml extracto} * 25 ml = 30012 ug EQ$$

La relación solvente/materia vegetal seca utilizada fue de

$$46.79 \frac{ml solvente}{g MS} = \frac{25 ml solvente}{0.534 g MS}$$

La cantidad de materia vegetal seca usada para los 25 ml de extracto, fue de 0.534 g, por lo que se tiene lo siguiente

$$\frac{30012 \text{ } \mu\text{g EQ}}{0.534 \text{ g MS}}$$

Convirtiendo los microgramos (μg) a miligramos (mg) se tiene

$$\frac{30.012 \text{ mg EQ}}{0.534 \text{ g MS}}$$

Finalmente calculamos para un gramo de materia vegetal seca

$$56.203 \frac{\text{mg EQ}}{\text{g MS}}$$