

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación

Evaluación de la extracción y obtención de un extracto de flavonoides a partir de cáscaras de plátano verde (*Musa* sp. AAB) provenientes de residuos agroindustriales.

Jesús Alberto Brenes Granados

B41112

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2021

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos.

Elaborado por:

Jesús Brenes Granados

Aprobado por:

ANA LUCIA MAYORGA GROSS (FIRMA) Firmado digitalmente por ANA LUCIA MAYORGA GROSS (FIRMA)
Fecha: 2021.08.11 17:12:54 -06'00'

M. Sc. Ana Lucía Mayorga Gross
Presidente del Tribunal

EDUARDO ENRIQUE THOMPSON VICENTE (FIRMA) Firmado digitalmente por EDUARDO ENRIQUE THOMPSON VICENTE (FIRMA)
Fecha: 2021.08.12 14:46:40 -06'00'

Ing. Eduardo Thompson Vicente

Director del Proyecto

CAROLINA CORTES HERRERA (FIRMA) Firmado digitalmente por CAROLINA CORTES HERRERA (FIRMA)
Fecha: 2021.08.16 15:13:26 -06'00'

M. Sc. Carolina Cortes Herrera

Asesora del Proyecto

Wilfredo Flores del Valle Firmado digitalmente por Wilfredo Flores del Valle
Fecha: 2021.08.16 16:05:57 -06'00'

Lic. Wilfredo Flores del Valle

Asesor del Proyecto

ANA MARIA QUIROS BLANCO (FIRMA) Firmado digitalmente por ANA MARIA QUIROS BLANCO (FIRMA)
Fecha: 2021.08.16 23:02:33 -06'00'

Lic. Ana María Quirós Blanco

Profesor designado

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

La información generada en esta investigación se considera de uso público.

DEDICATORIA

A Dios, por acompañarme día a día.

A mi familia, mi pasado y el lugar de donde vengo.

A mí, aquel niño que amaba aprender, que anhelaba ser un científico y cambiar un poquito el mundo, aquel que siempre vio en las limitaciones una oportunidad y a pesar de las circunstancias no se rindió.

¡Mira lo lejos que has llegado!

¡Lo has logrado!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a toda mi familia: mis padres Jesús y Ana a quienes a pesar de las limitaciones han sido el pilar fundamental de quien soy hoy en día, no hay palabras para agradecer por tanto. A mis hermanos: Johan, Cristina, Monserrath y Eunice, porque siempre hemos estado ahí los unos para los otros. Todos sabemos cuánto esfuerzo ponemos día a día para salir adelante.

Al comité asesor de este proyecto: al profesor Eduardo Thompson por la guía y ayuda brindada a lo largo de este tiempo. A la profesora Carolina Cortés por todo el apoyo en la parte de análisis químico. Al profesor Wilfredo Flores por todos los consejos y por toda la colaboración brindada, así como por el contacto con la empresa Alimentos Zúñiga S.A., a la cual le agradezco también por brindar la materia prima para este estudio.

Un agradecimiento a los profesores y personal tanto de la Escuela de Tecnología de Alimentos como quienes laboran para el CITA, quienes siempre fueron muy serviciales conmigo durante todos estos años.

A todos mis compañeros de Tecnología de Alimentos durante todos estos años (2014-2021)

A todas las personas que han estado ahí a lo largo de mi vida, ayudándome y motivándome a seguir adelante y creer en mí mismo.

Un agradecimiento muy especial a la Familia Figueroa Martínez por la ayuda desinteresada durante toda mi etapa universitaria.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xvi
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1. Valorización de subproductos en la industria alimentaria.	6
3.2. Generalidades del plátano.....	7
3.2.1 Producción en Costa Rica	8
3.2.2 Subproductos del procesamiento de plátano.....	11
3.2.3 Cáscara de plátano.....	11
3.2.3.1 Composición	11
3.2.3.2 Enzimas en la cáscara de plátano	13
3.3 Compuestos fenólicos.....	15
3.3.1 Polifenoles	15
3.3.2 Flavonoides	16
3.3.3 Polifenoles, flavonoides y compuestos específicos en la cáscara de plátano	17
3.3.4 Efecto de flavonoides en la salud.....	18
3.3.5 Capacidad antioxidante.....	19

3.3.6 Métodos de análisis de flavonoides.....	21
3.4. Extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales	22
3.4.1 Efecto de las variables de extracción.....	23
3.4.2.1 Tipo de solvente.....	24
3.4.2.2 Relación solvente sustrato (R_{ss})	24
3.4.2.3 Temperatura.....	24
3.4.2.4 Concentración de ácido	25
3.5. Diseño de experimentos	25
3.5.1 Diseño experimental de mezclas	26
3.5.2 Diseño central compuesto (DCC)	27
3.5.3 Metodología de superficie de respuesta (MSR).....	29
3.6. Caracterización de extractos vegetales	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Localización	31
4.2 Características de materia prima	31
4.3 Metodología	32
4.3.1. Determinación analítica del contenido flavonoides	32
4.3.2 Validación del método de cuantificación de flavonoides	34
4.3.3 Determinación de las condiciones de acidificación para reducir la degradación enzimática de los flavonoides.	37
4.3.3.1 Procedimiento.....	37
4.3.3.2 Diseño experimental	38
4.3.3.3. Análisis estadístico	38
4.3.4. Preparación del sustrato para la extracción.....	38
4.3.5 Determinación de la mezcla de solventes de extracción para obtener un mayor rendimiento de flavonoides	40
4.3.5.1 Procedimiento.....	40
4.3.5.2 Diseño experimental	42
4.3.5.3 Análisis estadístico	43
4.3.5.4 Verificación del modelo	44

4.3.6 Evaluación del efecto de acidez, temperatura, relación solvente sustrato sobre la extracción de flavonoides y rutina mediante un diseño central compuesto	44
4.3.6.1 Procedimiento.....	44
4.3.6.2 Diseño experimental	45
4.3.6.3 Análisis estadístico	47
4.3.6.4 Función de deseabilidad	48
4.3.6.5 Verificación del modelo obtenido.	48
4.3.7 Caracterización del extracto obtenido	48
4.3.7.1 Polifenoles totales.....	48
4.3.7.2 Flavonoides totales.....	49
4.3.7.3 Azúcares simples por HPLC.....	49
4.3.7.4 Cenizas	50
4.3.7.5 Acidez titulable.....	50
4.3.7.6 Determinación de actividad antioxidante (ORAC).....	51
4.3.7.7 Humedad.....	51
4.3.7.8 Contenido de rutina	52
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1. Validación del método de cuantificación de flavonoides	53
5.2 Determinación de las condiciones del tratamiento de acidificación de las cáscaras de plátano verde para reducir la degradación enzimática de los flavonoides.....	54
5.3 Evaluación de la combinación de solventes para obtener un extracto con la mayor concentración de flavonoides, mediante un diseño de mezclas.....	57
5.3.1 Selección del modelo de regresión	58
5.3.2 Ecuación del modelo de regresión y la superficie de respuesta obtenidos.....	58
5.3.3 Optimización de la mezcla de solventes para la extracción de flavonoides	62
5.3.4 Validación del modelo	64
5.4 Evaluación de las condiciones de extracción de los flavonoides de la cáscara de plátano mediante un diseño central compuesto	65
5.4.1 Modelo de regresión y superficie de respuesta obtenidos del diseño central compuesto	67

5.4.2 Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides y rutina	76
5.4.3 Validación del modelo del DCC.....	78
5.5 Caracterización fisicoquímica del extracto.	80
6. CONCLUSIONES	87
.7. RECOMENDACIONES	88
8. BIBLIOGRAFÍA	89
9. ANEXOS.....	104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Composición química de la cáscara de plátano madurez 1 deshidratada. ..	12
Cuadro II. Datos de compuestos fenólicos en la cáscara del plátano verde	18
Cuadro III. Ensayos para evaluar actividad antioxidante en alimentos	20
Cuadro IV. Tratamientos de inmersión de plátano verde en soluciones de ácido cítrico a diferentes concentraciones para la inhibición de enzimas de deterioro.	37
Cuadro V. Combinación de solventes de los tratamientos del diseño de mezclas reticular simple ampliado grado dos utilizado.....	43
Cuadro VI. Valores codificados y decodificados para las variables del diseño central compuesto utilizado para la optimización de las condiciones de extracción.	45
Cuadro VII. Diseño central propuesto para la evaluación de las variables de extracción de flavonoides y rutina en cáscara de plátano verde.	47
Cuadro VIII. Parámetros de regresión lineal para la cuantificación de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina por espectrofotometría a 510 nm, límites y parámetros de precisión del método.	53
Cuadro IX. Concentración promedio de flavonoides en extractos obtenidos de cáscara de plátano bajo diferentes condiciones de extracción del diseño de mezclas empleado.	57
Cuadro X. Parámetros de evaluación para la selección del modelo de mejor ajuste. ...	58
Cuadro XI. Propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados para extracción de flavonoides de cáscara de plátano verde.....	61
Cuadro XII. Solventes utilizados en investigaciones de extracción de polifenoles en cáscaras de musáceas.....	63
Cuadro XIII. Comparación de la concentración de flavonoides predicha con un nivel de confianza del 95% por el modelo de mezcla óptima de solventes (55:45 aceto-a - agua) y la lograda en corridas de verificación.	64

Cuadro XIV. Concentración de flavonoides y rutina obtenida en extractos a partir de la cáscara de plátano para las corridas del DCC.....	66
Cuadro XV Parámetros estadísticos del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides y rutina a partir del cascara de plátano verde.....	67
Cuadro XVI. Condiciones óptimas de extracción de flavonoides y rutina de forma individual y combinada predichas por la superficie de respuesta del modelo cuadrático	76
Cuadro XVII. Comparación entre la concentración de flavonoides y rutina predichas por los modelos con las obtenidas en las corridas de verificación, con las condiciones Rss de 8, temperatura de 50 °C y 0,75 % de ácido acético.....	78
Cuadro XVIII. Condiciones óptimas de extracción polifenoles y flavonoides de diferentes estudios en musáceas.....	79
Cuadro XIX. Composición del extracto de la cáscara de plátano obtenido con las condiciones de operación óptimas: (solvente acetona-agua 55:45, Rss 8:1 g solvente/g sus, T = 50 °C y concentración de ácido acético 0,75 % m/m).....	81
Cuadro XX. Recopilación de investigación de contenido de polifenoles totales en extractos de cáscara de musáceas.....	82
Cuadro XXI. Recopilación de investigaciones de flavonoides en extractos cáscara de plátano.....	83
Cuadro XXII. Recopilación de investigaciones de concentración rutina en extractos de cáscara de musáceas	84
Cuadro XXIII. Recopilación de investigaciones de ORAC en musáceas	85
Cuadro XXIV. Datos obtenidos para la inhibición de la PFO mediante la adición de diferentes cantidades de ácido cítrico.	104
Cuadro XXV. Análisis fisicoquímico realizado al extracto final.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto físico según cruces de genes para las principales musáceas comerciales.	7
Figura 2. Patio de descarga de plátano verde en una industria procesadora para fritura.	9
Figura 3. Total, de fincas con los principales cultivos permanentes por extensión en hectáreas y cantidad de plantas	9
Figura 4. Distribución porcentual de la producción de plátano según su destino	10
Figura 5. Estructura del plátano..	11
Figura 6. Sitio activo de la enzima polifenoloxidasas.....	13
Figura 7. Reacción de pardeamiento enzimático.	14
Figura 8. Clasificación de los polifenoles	15
Figura 9. Estructura base de los flavonoides.....	17
Figura 10. Mecanismo de estabilización de radicales libres por resonancia en los polifenoles	19
Figura 11. Formación del complejo cromogénico por interacción del ion aluminio con el flavonoide catequina	21
Figura 12. Región experimental de un diseño simplex centroide, utilizado para la optimización de los solventes de una extracción	26
Figura 13. Esquema del diseño central compuesto para tres factores.	28
Figura 14. Ejemplo de una superficie de respuesta.	30
Figura 15. Cáscaras de plátano verde recolectadas en la industria después del pelado.	31
Figura 16. Color del complejo de aluminio (III) para la determinación de flavonoides por espectrofotometría.	35
Figura 17. Método de extracción de flavonoides a partir de cáscara de plátano.....	33

Figura 18. Diagrama de preparación del sustrato de extracción	39
Figura 19. Obtención del sustrato de extracción a partir de cáscaras de plátano verde: a) inmersión en ácido cítrico, b) secado, c) cáscara plátano seca y molida (CS).....	39
Figura 20. Método de extracción de flavonoides.....	41
Figura 21. Equipo de extracción utilizado.....	42
Figura 22. Extractos obtenidos con los diferentes solventes.	43
Figura 23. Procedimiento de extracción de flavonoides utilizado en las corridas del DCC para la evaluación del efecto de la temperatura, R_{ss} y concentración de ácido acético.	46
Figura 24. Efecto de los tratamientos de lavado con diferentes concentraciones de ácido cítrico sobre el contenido de flavonoides extraíbles en las cáscaras de plátano.....	55
Figura 25. Explicación de forma quelante de la molécula de ácido cítrico.	56
Figura 26. Diagrama de Pareto para los factores del modelo cuadrático obtenido de los resultados del diseño de mezclas utilizado.....	59
Figura 27. Superficie de respuesta del modelo obtenido en la evaluación de la mezcla de solventes para la extracción de flavonoides de la cáscara de plátano. a) Vista 2D b) Vista 3D.....	60
Figura 28. Extracto de flavonoides obtenido mediante la combinación óptima de solventes (acetona agua 55:45) en cáscara de plátano verde.	65
Figura 29. Diagrama de Pareto de los principales factores del modelo cuadrático de superficie de respuesta para la extracción de flavonoides en cáscara de plátano verde.	68
Figura 30. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de flavonoides en función de las variables temperatura y R_{ss}.....	69
Figura 31. Superficie de respuesta del DCC de rendimiento de flavonoides en función de las variables R_{ss} y concentración de ácido acético.	69

Figura 32. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de flavonoides en función de las variables temperatura y concentración de ácido acético.	70
Figura 33. Diagrama de Pareto del efecto de las variables de extracción en el rendimiento de rutina.	72
Figura 34. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables temperatura y Rss.	73
Figura 35. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables temperatura y concentración de ácido acético.	74
Figura 36. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables concentración de ácido acético y Rss.	74
Figura 37. Gráficas de la función de deseabilidad y comportamiento de las diferentes variables bajo el modelo de optimización.	77
Figura 38. Extractos de flavonoides y rutina obtenidos de la cáscara de plátano verde	78
Figura 39. Análisis de Tukey para la comprobación de los efectos de la inhibición de PFO con ácido cítrico.	104
Figura 40. Curvas de calibración de la determinación espectrofotométrica realizada con epicatequina para la determinación de flavonoides.	105
Figura 41. ANDEVA para los distintos modelos de regresión aplicados a los resultados del diseño de mezclas.	105
Figura 42. Coeficientes de regresión del modelo cuadrático obtenido de los resultados del diseño de mezclas	106
Figura 43. Coeficientes de regresión y predicción del modelo cuadrático obtenido para la variable rendimiento de flavonoides del diseño central compuesto	106
Figura 44. Coeficientes de regresión y predicción del modelo cuadrático obtenido para la variable rendimiento de rutina del diseño central compuesto	107

ABREVIATURAS

<p>ABTS: 2, 2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico</p> <p>ANDEVA: Análisis de varianza</p> <p>a_w: Actividad del agua</p> <p>bh: Base húmeda</p> <p>bs: Base seca</p> <p>CAA: Concentración de ácido acético</p> <p>CS: Cáscara seca (de plátano)</p> <p>DCC: Diseño central compuesto</p> <p>DOE: Design of experiments (Diseño de experimentos)</p> <p>DPPH: 2, 2-Difenil-1-picrilhidrazilo</p> <p>EAG: Equivalentes de ácido gálico</p> <p>EE: Equivalentes de (-)-epicatequina</p> <p>Ext: Extracto</p> <p>FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro</p> <p>HAC: Ácido acético glacial</p> <p>HPLC: High Performance liquid chromatography</p> <p>LC: Límite de cuantificación</p> <p>LD: Límite de detección</p> <p>LDL: Colesterol de baja densidad</p> <p>MSR: Metodología de superficie de respuesta</p>	<p>ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno</p> <p>p: Probabilidad</p> <p>p_{fa}: Probabilidad falta de ajuste</p> <p>PFO: Polifenoloxidasa</p> <p>PFT: Polifenoles totales extraíbles</p> <p>pH: Potencial de hidrógeno</p> <p>POD: Peroxidasa</p> <p>R^2: Coeficiente de determinación</p> <p>R^2_{ajd}: Coeficiente de determinación ajustado</p> <p>RSD: Desviación estándar</p> <p>R_{ss}: Relación solvente sustrato</p> <p>T: Temperatura</p> <p>TRAP: Capacidad antioxidante total</p> <p>UV: Ultravioleta</p>
---	--

RESUMEN

Brenes Granados, Jesús

Evaluación de la extracción y obtención de un extracto de flavonoides a partir de cáscaras de plátano verde (*Musa sp. AAB*) provenientes de residuos agroindustriales.

Tesis Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

Brenes Granados, J. 2021.

123 h.: 44 il.- 125 refs.

En la actualidad se estudia el aprovechamiento de residuos, principalmente en la industria alimentaria. Se destaca la investigación de los compuestos bioactivos que se pueden obtener de estos residuos y su potencial impacto positivo en la salud. Del procesamiento industrial del plátano, la cáscara que se descarta representa un 30-40 %, que se puede valorizar por su contenido de compuestos antioxidantes.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar la metodología de análisis, procesamiento y optimización de las condiciones de extracción de la cáscara de plátano seca (*Musa sp. AAB*) con madurez 1 para la obtención de un extracto de flavonoides con potencial bioactivo.

Para esto, se utilizó un método de medición de los flavonoides mediante espectrofotometría con nitrato de aluminio. Se evaluaron las condiciones de inmersión de las cáscaras en diferentes disoluciones de ácido cítrico por 5 min para la inactivación de las enzimas de deterioro polifenol oxidasas, y se escogió la mínima concentración que conserva los flavonoides. Posteriormente, a partir de un subproducto industrial de cáscaras de plátano verde se obtuvo el sustrato seco para la extracción a nivel de planta piloto (inhibición de las enzimas de degradación, secado y molienda). Se optimizó la composición de la mezcla de solventes de extracción (agua, etanol, acetona) y las condiciones de extracción (relación solvente-sustrato, temperatura y concentración de ácido acético) que permiten obtener el mayor rendimiento de flavonoides y rutina en el producto. Finalmente, el extracto obtenido se caracterizó fisicoquímicamente (acidez titulable, contenido de azúcares simples, cenizas, sólidos totales, contenidos de polifenoles totales, flavonoides y rutina y capacidad antioxidante H-ORAC).

Como resultados se obtuvo que la medición del complejo de Al^{3+} por espectrofotometría permite cuantificar de forma adecuada los flavonoides. Por otra parte, la inmersión de las cáscaras en una solución al 1% de ácido cítrico por 5 min, es la mínima cantidad que permite una adecuada estabilización de los flavonoides del deterioro por oxidación enzimática. La aplicación de un secado con aire caliente hasta una humedad menor al 12 % y una molienda mediante molino de martillos brinda un sustrato en polvo estable al deterioro microbiológico. Se obtuvo que el empleo de una mezcla acetona-agua 55:45 con las condiciones de extracción temperatura 50°C, relación solvente sustrato 8:1 y concentración de ácido acético 0,75 % producen el mayor rendimiento de extracción de flavonoides totales y rutina.

El extracto obtenido presenta un contenido de azúcares de $(0,22 \pm 0,01)$ g/100 g, $(0,23 \pm 0,01)$ g/100 g de cenizas y $(1,0 \pm 0,1)$ g/100 g sólidos totales. El contenido de polifenoles totales fue de (270 ± 114) mg EAG/100 g ext., de flavonoides totales fue de (69 ± 4) mg EE/100 g ext, y de rutina fue de (246 ± 41) μ g /100 g ext, con una capacidad antioxidante H-ORAC de (272 ± 131) μ mol TE/100 g ext (todos los valores en base húmeda).

Se concluye que con las condiciones de proceso desarrolladas se logra obtener un sustrato estable al deterioro enzimático y microbiológico y se optimiza la extracción de flavonoides, así como la obtención de un extracto con potencial antioxidante y baja cantidad de sólidos.

Se recomienda escalar el proceso desarrollado a escala industrial, así como evaluar otras variables del proceso (tiempos, temperaturas de secado, tamaño de partículas), la concentración y purificación del extracto; realizar el análisis de los flavonoides por HPLC, la determinación de la capacidad antioxidante por diferentes métodos *in vitro* y el estudio de sus potenciales actividades biológicas del producto obtenido.

CÁSCARA DE PLÁTANO; DISEÑO DE MEZCLAS; DISEÑO CENTRAL COMPUESTO; EXTRACCIÓN; FLAVONOIDES; INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA; METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA; VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS.

Ing. Eduardo Thompson Vicente

Escuela de Tecnología de Alimentos

1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, debido al creciente aumento de la población, existe una fuerte demanda de alimentos, lo que, a su vez, genera una cantidad importante de desechos que no son aprovechados. Un ejemplo de esto son los residuos de productos agrícolas que se consideran no comestibles por el ser humano como cáscaras, tallos, semillas, y otras partes de las plantas. Estos generan una problemática ambiental, dado el poco tratamiento que reciben, por lo que es de fundamental importancia buscar métodos para utilizarlos de una mejor manera y otorgarles un valor agregado. Dentro de los principales productos que se pueden obtener a partir de los diferentes residuos agroindustriales, se pueden mencionar: alimento animal, fibra, almidón, azúcares, biocombustibles, nutraceuticos, polímeros y compuestos químicos de interés para industrias de alimentos y farmacéuticas, químicas, entre otros (Ravindran y Jaiswal, 2016).

El plátano (*Musa acuminata* x *balbisiana* var. AAB), comúnmente catalogado como *Musa* sp. AAB o *Musa* AAB, es una musácea híbrida triploide, cuyos genotipos (A y B) provienen de las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* respectivamente. Su fruto se consume en todo el mundo. De hecho, según Calberto *et al* (2015), la producción mundial de plátano superó los 19 millones de toneladas en el 2011, situado como el mayor contribuyente al este y centro de África, seguido de los países de América del Sur. Asimismo, en 2011, la producción de América Central representó un 4 % de la producción mundial y, según datos del INEC (2018), la producción de Costa Rica representó alrededor de 95 mil toneladas.

Por otro lado, en la industrialización del plátano para consumo humano, se aprovecha solamente la pulpa junto con sus semillas, lo cual representa alrededor de un 70 % del peso del fruto, y es utilizado, tanto en su presentación verde como madura, para la producción de harinas, productos fritos, hervidos, horneados, purés y productos congelados (Adeniji *et al.*, 2010b). En nuestro país, según un informe del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG, 2008) y una investigación de Rodríguez (2012), se menciona que, por una parte, se procesa plátano verde a gran escala para la elaboración de “snacks” fritos y productos congelados y,

por otra parte, se menciona que el resto de las industrias son pequeñas empresas procesadoras distribuidas por todo el país.

Ahora bien, la cáscara de plátano se descarta sin ningún tratamiento y, en ocasiones, se ofrecen sin costo para consumo animal; en otros casos, se utilizan como materia orgánica para fertilización de campos, lo que genera malos olores, atracción de insectos y plagas (Astorga, 2004). Por esta razón, se busca aprovechar la cáscara de este producto para la extracción de compuestos bioactivos valiosos, como los flavonoides que contiene la cáscara, para así, aumentar el valor agregado del procesamiento de dicho fruto.

En este sentido, estudios previos, realizados por Lim, Lim y Tee (2007), mencionan que la cáscara de plátano contiene una cantidad importante de compuestos polifenólicos, que se han vinculado con beneficios a la salud como prevención de enfermedad cardiovascular, cáncer, diabetes y obesidad; además de su función antioxidante en lípidos y función antimicrobiana. De igual manera, en varios trabajos se señala que las cáscaras de plátano son fuente importante de polifenoles, donde destacan como sus principales componentes los flavonoides y flavonoles (Nguyen *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2006; Baskar *et al.*, 2011; Fatemeh *et al.*, 2012). Por otra parte, en un estudio recopilatorio reciente en cáscara de banano, se muestra la identificación de más de 40 compuestos clasificados como polifenoles en los que se encuentran ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, flavonoles, flavan-3-oles, proantocianidinas, entre otros (Rebello *et al.*, 2014). Dentro de los polifenoles predominantes se encuentran flavonoides como rutina, quercetina, catequina y epicatequina.

En relación con esto, un aspecto importante por tomar en cuenta en las matrices vegetales es que los polifenoles pueden ser degradados por acción de enzimas de deterioro como la polifenoloxidasa (PFO). Para que los polifenoles se conserven, se deben inhibir o desnaturalizar estas enzimas, mediante la aplicación de tratamientos térmicos suaves que no produzcan degradación de los polifenoles presentes (escaldado, pasteurización, refrigeración, congelación), eliminación de oxígeno (atmósferas modificadas, vacío), agentes reductores (artificiales o naturales), agentes quelantes, reducción de pH, disminución del a_w (secado, liofilización), entre otros (Arpita *et al.*, 2010).

Usualmente, para la obtención de componentes de interés a partir de matrices vegetales se utiliza la extracción líquido-sólido. En esta operación, se produce la interacción del sustrato con el disolvente, la cual provoca la disolución de los compuestos de interés y su arrastre con el solvente. Además, se puede variar la agitación, la temperatura del medio y realizarse en una o varias etapas, por un tiempo predeterminado, para luego separar el disolvente con las sustancias extraídas. En particular, para la extracción de compuestos polifenólicos en cáscaras de banano, se han utilizado solventes como agua, metanol, etanol, acetona o disoluciones acuosas de estos debido a su polaridad (Pinelo *et al.*, 2005; Shui y Leong, 2006; Lafka *et al.*, 2007). Por otra parte, González Montelongo *et al.* (2010) reporta el uso de una mezcla de agua-acetona, en relación 1:1, como el solvente que brinda mejores resultados.

Cabe destacar que, contrario a los disolventes orgánicos, el agua es considerada como un disolvente amigable y de bajo costo, por lo que es recomendado al momento de extracción de flavonoides (Someya *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2011). Además, se ha visto que, debido a la estructura química de los flavonoides, estos se extraen mejor en solventes polares o parcialmente polares, como agua, acetona o etanol (Vu *et al.*, 2017). En efecto, Fidriany *et al.* (2018) probó el hexano, acetato de etilo y etanol como solventes de extracción de flavonoides en cáscaras de banano, obteniendo mayor rendimiento con etanol. Por otro lado, diferentes concentraciones de acetona, etanol, hexano, metanol y agua fueron utilizadas por Yee *et al.* (2016) para extracción de polifenoles en banano y subproductos de estos, estudio que mostro una mejor efectividad con uso de etanol. En el presente trabajo, se evalúan tres posibles disolventes: agua, etanol y acetona y sus mezclas para la extracción de los flavonoides presentes en las cáscaras de plátano verde.

Es importante destacar que los estudios revisados muestran los disolventes que se pueden utilizar y la mayoría están enfocados en cáscaras de banano (*Musa sp. var AAA*). Además, se basan en tratamientos de preparación de la cáscara como liofilización o secado solamente y en pocos, se analiza la utilización de ácidos orgánicos para la preservación de los polifenoles presentes en la cáscara.

De igual modo, dentro de los estudios en cáscaras de musáceas, se ha observado que estos poseen mayor contenido de flavonoides respecto a otros frutos; sin embargo, dada la poca

cantidad de estudios y la gran variedad de factores que influyen en la cantidad de estos compuestos no se puede generalizar esta tendencia. Asimismo, es conveniente estudiar cada especie y variedad de musácea de manera independiente (Ramakrishnan *et al.*, 2011).

En otro orden de ideas, en el proceso de extracción es fundamental conocer las diferentes variables que influyen en el rendimiento de los compuestos valiosos en el extracto. Dentro de las principales variables se pueden mencionar: la temperatura, la acidez, la relación solvente sustrato (Gonzales-Montelongo, 2010), además de la composición del solvente y el tiempo de operación.

También, en la valorización de desechos, el valor del producto obtenido está determinado por los costos de proceso y por su valor final (Ravindran y Jaiswal, 2016). Los costos operacionales se pueden minimizar si se optimizan las variables de extracción como lo son: la preparación del sustrato, el tipo de solvente y las condiciones de extracción. Para potenciar la extracción de compuestos específicos, se pueden utilizar diseños experimentales como el diseño central compuesto o sus variantes, que permiten relacionar los rendimientos de los productos de valor con las variables de extracción, mediante modelos de segundo grado, que a su vez, se analizan con herramientas como la metodología de superficies de respuesta, la cual ayuda a apreciar la interacción entre variables de extracción y representa un procedimiento rápido y menos costoso para obtener los valores óptimos (Santos *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se evaluó, en primer lugar, el efecto de aplicar soluciones de ácido cítrico en las cáscaras frescas sobre la inhibición de la degradación de flavonoides presentes por parte de las enzimas PFO. Luego, se analizó la composición de la mezcla de solventes que produjo un mayor rendimiento en la extracción de flavonoides. Finalmente, se buscaron las condiciones óptimas de extracción tomando en cuenta las variables acidez del medio, relación solvente sustrato y temperatura de extracción. El estudio se enfocó en obtener un extracto de flavonoides, que son compuestos que pueden aportar beneficios a la salud como se mencionó al inicio de este apartado. Así mismo, los extractos obtenidos podrían utilizarse en aplicaciones específicas, por ejemplo, creación de encapsulados con potencial antioxidante, sustitutos de antioxidantes artificiales, adición a diversas matrices alimentarias con fines funcionales, conservantes, antimicrobianos y otros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de procesamiento para obtener un extracto con el mayor rendimiento de flavonoides y rutina a partir de cáscara de plátano verde (*Musa sp.* AAB).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Determinar las condiciones del tratamiento de acidificación de las cáscaras de plátano verde para reducir la degradación enzimática de los flavonoides.

2.2.2 Definir la combinación de solventes de extracción (agua, etanol, acetona) que permita obtener un mayor rendimiento de flavonoides.

2.2.3 Evaluar las condiciones de extracción (concentración de ácido acético, temperatura, relación solvente sustrato) para obtener un extracto con el mejor rendimiento flavonoides y rutina, aplicando la metodología de superficie de respuesta.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Valorización de subproductos en la industria alimentaria.

Se definen como residuos o subproductos alimentarios de origen vegetal a todas aquellas partes de la planta que se descartan a lo largo de la cadena alimenticia, debido a que no son útiles para el procesamiento, o bien, ya no son aptas para su consumo porque perdieron las características deseadas por el mercado, llegaron al límite de su vida útil, presentan daños, entre otros factores (Deepak y Singh, 2014).

En la actualidad, la cantidad de subproductos vegetales ha venido en aumento por una mayor demanda de alimentos, visto el incremento de la población mundial. En el procesamiento industrial de frutas y vegetales, los principales subproductos son: semillas, cáscaras y cortezas, las cuales pueden llegar a representar incluso el 50 % de la materia prima. Lo anterior, puede ocasionar un importante impacto ambiental, debido a que se desechan sin tratamiento; sin embargo, estos residuos pueden reutilizarse para elaborar nuevos productos de valor agregado, dada su composición química, entre los que se pueden mencionar alimento animal, biocombustibles, enzimas, polímeros, fibras, empaques y nutraceuticos (Giroto *et al.*, 2015).

Asimismo, estos subproductos pueden contener compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides, fibra, vitaminas, minerales, enzimas, entre otros. Parte de estos residuos poseen un contenido importante de compuestos fenólicos con diversas aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, a causa de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Ravindran y Jaiswal, 2016).

Ahora bien, en la industrialización del plátano verde, cerca del 35 a 40 % del peso del fruto son cáscaras (Melo *et al.*, 2015). Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos de Costa Rica (INEC, 2018), la producción de plátanos en Costa Rica representó alrededor de 95 mil toneladas, lo que representa un alto porcentaje de desechos, donde uno de los pocos usos que se les da es para alimentación animal.

3.2. Generalidades del plátano

Los bananos y plátanos son plantas monocotiledóneas, originadas del cruce entre *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) que pertenecen a la familia Musaceae. Estas especies diploides provienen, por tanto, de los genomas A y B, respectivamente. En orden de importancia económica, existen plantas triploides (AAA, AAB y ABB), diploides (AA y AB) y tetraploides (AAAA, AAAB y AABB). Los principales cultivares comerciales son triploides, altamente estériles y propagados asexualmente. Además, los bananos y plátanos representan el principal alimento de al menos 400 millones de personas (Nadal *et al.*, 2009).

Anualmente, en el mundo, se producen 85,5 millones de toneladas de plátanos y bananos, y alrededor del 10 % se exporta para consumirse como postre. De las denominaciones anteriores, el grupo genético AAA corresponde a bananos (por ejemplo: Cavendish y Gros Michel), el AAB es el plátano como tal (ejemplo: Curraré y Dominico) y el grupo ABB son guineos (Cuadrado y Pelipita), los cuales se muestran en la Figura 1.



Figura 1. Aspecto físico según cruces de genes para las principales musáceas comerciales. (Tomado de: <https://images.app.goo.gl/LxsL5fAfp6Hm74UA>)

Dentro de los fenotipos de plátano (AAB) más importantes en el mundo, se encuentran: Mysore, Pisang Raja, Silk, Pomme (Manzana), French Plantain (Dominico), Nendran False Horn Plantain (Curraré), Horn Plantain, Three Hand Planty, Pisang Nangka, Pisang Kelat, Laknao, Iholena.

A su vez, Calberto *et al.* (2015) menciona que la producción mundial de plátano superó los 19 millones de toneladas en el 2011, donde la región de mayor contribución es al este y centro de África, seguido de los países de América del Sur. En 2011, la producción de América Central representó un 4 % de la producción mundial.

3.2.1 Producción en Costa Rica

Según datos del INEC (2018) la producción de Costa Rica representó alrededor de 95 mil toneladas. Del plátano para consumo humano se aprovecha solamente la pulpa junto con sus semillas, que representa alrededor de un 70 % del peso del fruto el cual es utilizado, tanto verde como maduro, para la producción de harinas, productos fritos, hervidos, horneados, purés y productos congelados (Adeniji *et al.*, 2010^a). De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) (2008), en Costa Rica, las principales variedades de plátano que se cultivan son el Curraré y el Dominico.

Por otra parte, según un informe del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG, 2008) y una investigación de Rodríguez (2012), en nuestro país se procesa plátano verde para la elaboración de snacks fritos y productos congelados en industrias como: Caminos del Sol, La Guaria, Tosty, Pozuelo Pro, Alimentos Zúñiga, Soldanza, Kitty, Don Mariano, CR Campesinos, Green Pack, Tubérculos de CR, Costa Frozen, Industrias Smith, entre otros. Un panorama del plátano verde utilizado en la industria se ilustra en la Figura 2. Cabe destacar que el resto de las industrias son pequeñas empresas procesadoras distribuidas por todo el país, las cuales se encuentran poco censadas, pero que representan parte importante del consumo de plátano interno del país.



Figura 2. Patio de descarga de plátano verde en una industria procesadora para fritura.
Fuente: elaboración propia.

En el país, el plátano se encuentra dentro de los principales cultivos permanentes después de la piña, el banano, caña de azúcar, la palma aceitera, el café y la naranja. En la Figura 3, se observan los principales cultivos del país para el año 2014, donde destaca, en séptimo lugar, el plátano, según el área de extensión sembrada.

Cultivo	Total de Fincas	Extensión		Cantidad de plantas dispersas
		Sembrada	En edad de producción	
Café	26 527	84 133,1	75 184,8	-
Palma aceitera	2 169	66 419,8	55 814,5	-
Caña de azúcar	4 880	65 062,0	62 779,9	-
Banano	15 924	51 758,1	50 167,8	1 316 673
Piña	1 228	37 659,9	25 729,3	-
Naranja	12 913	19 595,7	16 305,7	255 624
Plátano	17 487	10 014,5	8 599,8	848 780
Mango	10 163	5 161,5	4 757,2	80 382
Palmito	802	4 618,0	4 441,7	-
Cacao	3 041	3 169,7	2 560,9	84 297
Papaya	3 264	1 393,5	1 070,8	37 806
Mora	638	1 352,5	1 321,1	2 007
Rambután	3 786	1 216,4	931,4	60 239
Aguacate	11 923	1 108,3	933,5	197 181
Coconut	4 118	1 069,6	845,2	99 037

Figura 3. Total, de fincas con los principales cultivos permanentes por extensión en hectáreas y cantidad de plantas. INEC (2014).

Según el INEC (2017), para el año 2017 se contaba con una extensión sembrada de más de 12 000 hectáreas (una disminución importante con respecto al 2014) cosechando dos tercios de esta área, que se refleja en una producción alrededor de 95 000 toneladas métricas. En la figura 4, se observa que el principal destino la venta a la industria. Además, cabe destacar que poco a poco el país ha pasado de producir y vender musáceas a granel para optarse por la industrialización y exportación de productos procesados como snacks, prefritos, congelados, pures, entre otros.

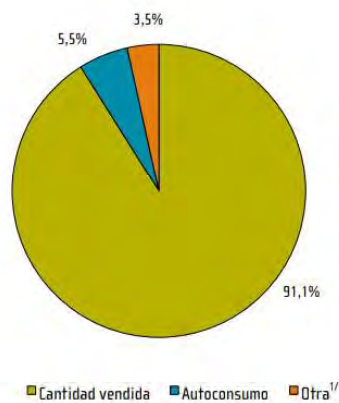


Figura 4. Distribución porcentual de la producción de plátano según su destino. INEC (2017).

En Costa Rica se consumen de forma directa más 40 mil toneladas de plátano y la industria procesa cerca de 52 mil toneladas, destinadas tanto para el mercado nacional como para el internacional. Por otro lado, de la producción nacional, únicamente se exporta un 5% de plátano fresco. Según Vallejo (2018) en un informe para el PITTA musáceas (Programa de Investigación y Transferencia Tecnológica Agropecuaria en Musáceas) se evidencia un cambio importante que ha tenido esta actividad en el país, que ha pasado del autoconsumo a abastecer la agroindustria nacional, con una baja en la exportación de producto fresco.

3.2.2 Subproductos del procesamiento de plátano

En el procesamiento del plátano para industria alimenticia, se aprovecha principalmente la pulpa, para elaborar distintos productos como frituras, purés, harinas, entre otros, y se descarta el pedúnculo y la cáscara (pericarpio), como se observa en la Figura 5, la cual representa entre un 30% a un 45% del peso total del fruto según la madurez de este.

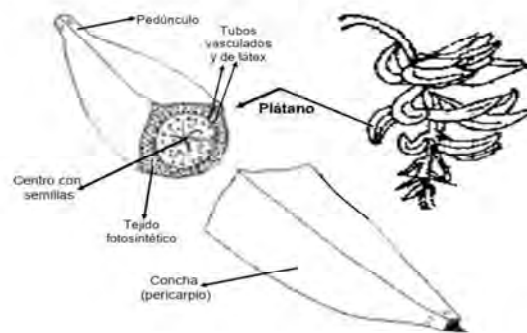


Figura 5. Estructura del plátano. ANIDO *et al.* (1997).

Dicho esto, en Costa Rica, actualmente, la cáscara tiene dos fines: se desecha como tal o se aprovecha como alimento animal; sin embargo, se han estudiado, en otros países, opciones para su aprovechamiento en la obtención de almidón, pectina, celulosa, colorantes, componentes nutraceuticos, fibras para otras industrias, fuente de biocombustible, sustrato de cultivo de hongo, o su aprovechamiento como fertilizante (Padam *et al.*, 2014).

3.2.3 Cáscara de plátano

3.2.3.1 Composición

La composición química de la cáscara de plátano depende de su estado de madurez, la variedad y la zona de cultivo, entre otros. Emaga *et al.* (2007) señalan que para plátanos con madurez grado 1 (verde, sin pintas negras y amarillas) el contenido de proteína cruda se encuentra entre 8 y 10 g/100g; la grasa cruda entre 4 a 6 g/100g, donde se destacan ácidos grasos poliinsaturados, palmítico, linoleico y linolénico; las cenizas entre 8 y 10 g, con presencia de minerales como K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Cu, Zn y Mn; almidón cerca de 35 g,

monosacáridos menores al 1 g/100g, que aumentan con la madurez y un contenido de fibra que supera el 30 %. Cabe destacar que la mayor parte de la fibra se encuentra en el epicarpio, mientras que la concentración de almidones se halla en el área cercana al mesocarpio. Dichos datos coinciden con los obtenidos por Agama *et al.* (2015), como se muestra en el Cuadro I.

Cuadro I. Composición química de la cáscara de plátano madurez 1 deshidratada.

Parámetro	Contenido (g/100 g bs ¹)
Humedad	5,8
Lípidos	5,0
Proteína	10,3
Cenizas	12,7
Almidón	39,3
Fibra	37,6

¹base seca

Por otro lado, los compuestos bioactivos son compuestos químicos presentes en pequeñas cantidades en las plantas, de los cuales se ha demostrado que tienen un efecto beneficioso en la salud, puesto que son consumidos regularmente (Rahman, 2018). Al caracterizar la cáscara de plátano, se han encontrado dentro de estos compuestos bioactivos: fibra dietética (principalmente insoluble), pectinas, compuestos fenólicos solubles y minerales como K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Cu, Zn y Mn (Emaga *et al.*, 2007).

En estudios previos realizados por Lim, Lim y Tee (2007), se menciona que, en comparación con otras frutas, la cáscara de plátano contiene una cantidad importante de compuestos fenólicos, que se han vinculado con beneficios a la salud como prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad; además de su función antioxidante en lípidos y antimicrobiana. En varios trabajos se menciona que las cáscaras de plátano son una fuente importante de polifenoles, donde destacan como sus principales componentes los flavonoides y flavonoles (Nguyen *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2006; Baskar *et al.*, 2011; Fatemeh *et al.*, 2012).

3.2.3.2 Enzimas en la cáscara de plátano

Según Escalante *et al.* (2017), la cáscara de plátano contiene una cantidad importante de enzimas del tipo oxidoreductasas, entre las que se pueden mencionar: polifenoloxidasas (PFO), fenilalanilamoniliasa (PAL) y peroxidasa (POD).

Histológicamente, la PFO se localiza en los cloroplastos, en tanto que los compuestos fenólicos son sintetizados en el citoplasma para diferentes funciones en las células de las plantas, y son almacenados en vacuolas. De esta manera, si la membrana plasmática es dañada, ambos compuestos se ponen en contacto, reaccionan y dan origen a diversos productos, los cuales se aprecian por el pardeamiento de los tejidos. Además, la PFO cataliza la hidroxilación de los grupos monofenol a o-difenol, que se oxidan luego a o-quinonas, estas, a su vez, se polimerizan para formar pigmentos marrones (Morante *et al.*, 2013).

De igual forma, se han reportado altas concentraciones de PFO, tanto en la cáscara de plátano (210–720 mg/g peso fresco) como en su pulpa (8–48 mg/g peso fresco) (Wuyts, Waele y Swennen, 2006). Según Chong *et al.*, (2011), la PFO proveniente de la cáscara del plátano posee una actividad máxima a un pH de 6,5 y se inactiva a pH menores de 3 o mayores de 8 por la pérdida del ión Cu^{2+} , dado que la estructura de la PFO se compone de dos átomos de cobre estrechamente unidos por una cadena polipeptídica en su sitio activo. Cada átomo de Cu^{2+} está fuertemente ligado a tres residuos de histidina. Nótese en la Figura 6 como el ion cobre es parte importante del sitio activo de la enzima y permite que se lleve a cabo la reacción con los polifenoles.

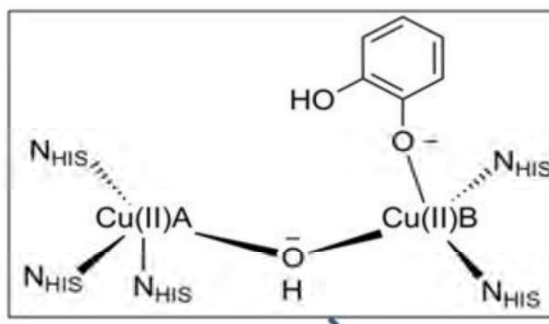


Figura 6. Sitio activo de la enzima polifenoloxidasas (Jukanti, 2017).

Asimismo, la actividad máxima de esta enzima se alcanza a 30 °C y decrece rápidamente a temperaturas superiores a 40 °C. La PFO puede ser inhibida por diferentes sustancias que incluyen agentes quelantes (ácido cítrico), reductores (ácido ascórbico), aminoácidos (L-cisteína) y compuestos de sulfito (metabisulfito de sodio). Los modos de acción de estos inhibidores varían, y, por lo tanto, el mecanismo específico puede ser difícil de definir (Zawistowski, Biliaderis y Eskin, 1991). De igual manera, es importante destacar que en el caso de algunos ácidos orgánicos como el cítrico y el ascórbico, además de la función quelante, la inhibición enzimática también se da por un descenso importante en el pH.

En una evaluación de diferentes agentes inhibidores de la PFO, los resultados demostraron que la L-cisteína es el inhibidor más efectivo para el pardeamiento de la cáscara y pulpa de plátano, seguida por el ácido ascórbico y el metabisulfito sódico (Olubunmi, 2013). También, el ácido cítrico tiene un efecto inhibitorio satisfactorio (casi 100 %) a una concentración (0,05 %) (Suttirak *et al.*, 2010). Se descubrió que el ácido cítrico es un inhibidor muy potente de la PFO comparado con otras sustancias, por ejemplo, con el metabisulfito de 1 mM (Olubunmi, 2013). Resultados similares con ácido cítrico han sido reportados previamente por Sojo *et al.* (1998) y Yang *et al.* (2001). El ácido cítrico inhibe la PFO mediante su unión al grupo cobre de la enzima, y también porque reduce el pH del medio. En la Figura 7, se ilustra como es necesario el cobre para la reacción de pardeamiento. Este compuesto se puede utilizar de manera factible para prevenir el ennegrecimiento enzimático de cáscara plátano.

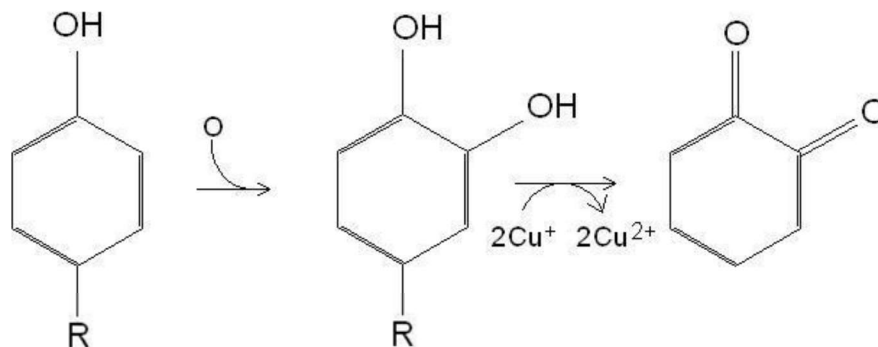


Figura 7. Reacción de pardeamiento enzimático (Jukanti, 2017).

3.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos poseen estructuras con anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados y uno o más grupos hidroxilo. Dentro de estos compuestos, el término polifenol se refiere a la unión de al menos dos compuestos fenólicos (Galanakis, 2018).

3.3.1 Polifenoles

En la naturaleza, existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles (Quiñones *et al.*, 2012). Son metabolitos secundarios de las plantas y están involucrados en los procesos de crecimiento, maduración, mecanismos de defensa y protección; además, son responsables de impartir características sensoriales como sabor y color en los alimentos que los contienen. Se clasifican, según el número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que los unen, en: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos y lignanos como se observa en la Figura 8 (Ignat *et al.*, 2011; Galanakis, 2018).

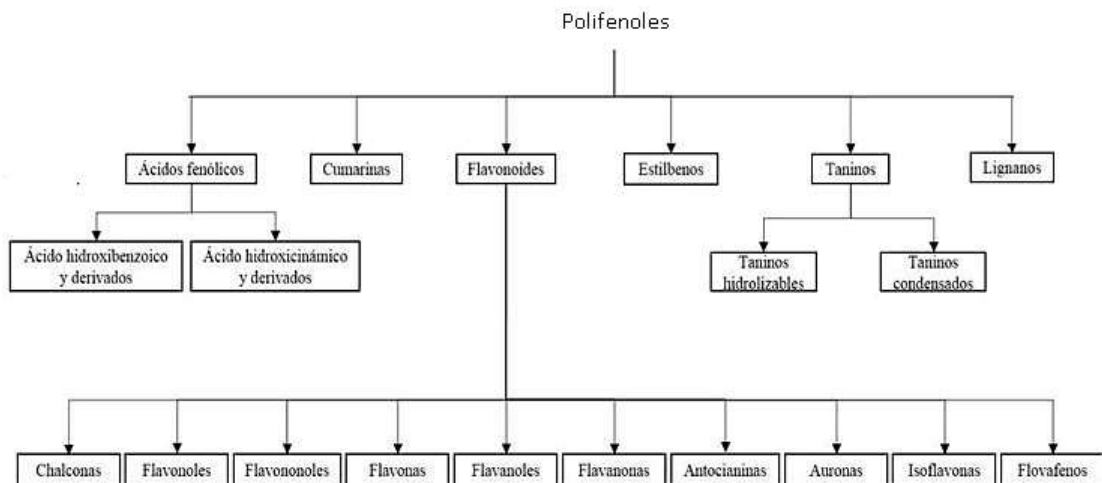


Figura 8. Clasificación de los polifenoles (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

De manera natural en los alimentos, los polifenoles cumplen funciones tales como brindar atributos sensoriales (color y el sabor astringente). Además, tienen aplicaciones industriales en alimentos como agentes antimicrobianos y colorantes, en la producción de pinturas, papel, cosméticos y farmacéutica (Ignat *et al.*, 2011). Asimismo, se han usado como preservantes para controlar el desarrollo de la rancidez, retardar la formación de productos de oxidación tóxicos, mantener la calidad nutricional y alargar la vida útil de los productos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

3.3.2 Flavonoides

Como se muestra en la Figura 8, en los compuestos fenólicos existen diferentes clases. Dentro de estas, la clase predominante son los flavonoides, debido a su importancia en la alimentación (Robbins, 2003). Los flavonoides son fenilpropanos ciclados, con la estructura base C6-C3-C6, que se dan, particularmente, en alimentos vegetales. De hecho, los derivados de flavonoides varían en su estructura, pero todos tienen el anillo característico C6-C3-C6 (Yao *et al.*, 2004; Shahidi y Ambigaipalan, 2015). De esta manera, se han identificado más de 6000 flavonoides, que a su vez se dividen en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, flavanonoles, flavanoles y antocianidinas, entre otros, como se observa en la figura ya mencionada.

Ahora bien, su estructura consiste en dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un puente de 3 carbonos en forma de un anillo heterocíclico ©, generalmente con presencia de un átomo de oxígeno. Las variaciones en este último anillo determinan las diferentes clasificaciones de los flavonoides (Corradini *et al.*, 2011; Ignat *et al.*, 2011). La representación base de los flavonoides se ilustra en la Figura 9. Por otra parte, estos compuestos cumplen funciones como agentes en la absorción de radicales libres y luz ultravioleta (UV), en la atracción de simbiontes benéficos y polinizadores, para repeler insectos y ciertos microorganismos, y por su actividad insecticida, nematicida, larvicida, antifúngica (Harborne, 2000; Yao *et al.*, 2004; Munhoz *et al.*, 2014).

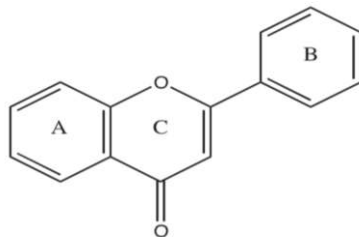


Figura 9. Estructura base de los flavonoides (Ignat *et al.*, 2011).

Los flavonoides pueden existir en forma de aglicona o como sus conjugados glicosídicos. La glicosilación los hace compuestos menos reactivos, pero más polares y solubles en agua. En los flavonoides *O*-glicosídicos, uno o más grupos hidroxilo de la aglicona se unen a un azúcar mediante un enlace *O*-C. La glucosa y galactosa son los azúcares que están comúnmente presentes (Corradini *et al.*, 2011; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico y una glucosa, respectivamente. Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas, provienen de la polimerización de flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles. (Vázquez *et al.*, 2012).

3.3.3 Polifenoles, flavonoides y compuestos específicos en la cáscara de plátano

La cáscara de plátano es una rica fuente de compuestos fenólicos, con un contenido total que varía de 4,95 a 47 mg equivalentes de ácido gálico/g de materia seca (mg EAG/g de ms) (González-Montelongo y Lobo González, 2010; Hernández *et al.*, 2016). Este nivel es 1,5–3,0 veces mayor que el registrado en la pulpa (Sulaiman *et al.*, 2011).

De hecho, más de 40 compuestos han sido identificados a partir de la cáscara de plátano. Estos se pueden clasificar en ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, flavanoles. (Gomes *et al.*, 2014; Passo Tsamo *et al.*, 2^a15a), y destacan especialmente los conjugados con hexosas y glucósidos (Gomes *et al.*, 2014; Waghmare y Kurhade, 2014; Passo Tsamo *et al.*, 2^a15a). Entre los principales flavonoides presentes en la cáscara de plátano sobresalen, por orden de cantidad: rutina, catequina, epicatequina, galocatequina, quercetina, kaempferol, isoharmetina, miricetina, laricitrina, soringetina.

Por su parte, los flavanoles son el grupo más grande de compuestos presentes en la cáscara de plátano. Los polímeros (cadenas de flavonoles de más de 4 unidades, también conocidos como proantocianidinas o taninos condensados), se encuentran alrededor de 3952 mg/kg, como equivalentes de catequina, seguidos de dímeros, que representan alrededor de 26 mg/kg como equivalentes de catequina (Gomes *et al.*, 2014).

En comparación con otras cáscaras de fruta como aguacate, piña, papaya, maracuyá, sandía y melón, la cáscara de plátano ocupa el segundo lugar en términos de contenido fenólico. En efecto, la cáscara de plátano, también, posee una mayor actividad de eliminación de radicales y una capacidad reductora en contraposición con otras cáscaras de fruta (Morais *et al.*, 2015). Además, algunos estudios identifican una fuerte correlación entre el nivel de contenido fenólico y capacidad de absorción de radicales de oxígeno, eliminación de radicales libres y posibilidad de reducción férrica (Babbar *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2016).

Por otro lado, Agama *et al.* (2015) muestra datos importantes de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara del plátano verde, los cuales se resumen en el Cuadro II.

Cuadro II. Datos de compuestos fenólicos en la cáscara del plátano verde

Polifenoles	(mg EAG ¹ /g)	(μ mol Trolox eq/g bs ²)
Extraíbles	7,71 \pm 0,20	84,73 \pm 0,82
Taninos condensados	30,98 \pm 1,01	67,64 \pm 0,43
Taninos hidrolizables	20,06 \pm 1,21	49,65 \pm 0,05

¹ equivalentes de ácido gálico. ² base seca

Fuente: Agama *et al.* (2015)

3.3.4 Efecto de flavonoides en la salud

Los flavonoides se han asociado con la reducción del estrés oxidativo, reducción oxidación del colesterol LDL y de la agregación de plaquetas, vasodilatación de los glóbulos sanguíneos, inhibición de la adherencia de los monocitos al endotelio vascular, promoción de la fibrinólisis, acción inmunosupresora y antiinflamatoria e inhibición del proceso tumoral en diferentes fases (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Además, en otros estudios, se les ha reconocido actividad antitrombótica, antiviral y anti carcinogénica. También se ha mostrado que los flavonoides permiten mantener la salud del sistema digestivo, dada su capacidad antisecretora y antidiarreica, restaura el microbiota intestinal y previene colitis por la actividad antibacterial (Corradini *et al.*, 2011). No obstante, la información es escasa y poco concluyente, por lo que es necesaria más investigación.

3.3.5 Capacidad antioxidante

Un desequilibrio en el organismo provoca la aparición del estrés oxidativo, el cual es generado por el desbalance entre especies reactivas al oxígeno y la capacidad del sistema biológico de reparar el daño provocado a los componentes de las células. Si los radicales no son estabilizados, causan una serie de reacciones en diversas moléculas, lo que genera alteraciones en el metabolismo. Entre las moléculas radicales oxidativas (radicales libres), se encuentran el peróxido de hidrógeno, el oxígeno y aquellas que presentan grupos hidroxilo y superóxido (Apak *et al.*, 2011). Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o impedir la oxidación de moléculas, visto que inhiben la iniciación o propagación de reacciones oxidativas (Wang, 2006)

Los polifenoles se consideran compuestos antioxidantes dado que estabilizan radicales libres, debido a su estructura molecular y mediante resonancia como se ilustra en la Figura 10. Por ello, en los últimos años su estudio ha aumentado vertiginosamente por parte de investigadores y los consumidores han visto la importancia de incluirlos en su alimentación, a causa de las propiedades preventivas de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Galanakis, 2018).

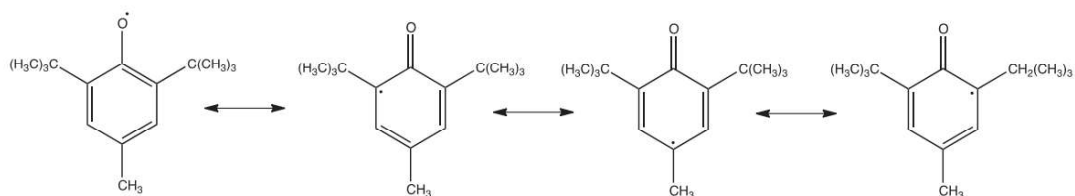


Figura 10. Mecanismo de estabilización de radicales libres por resonancia en los polifenoles (Galanakis, 2018).

Asimismo, los antioxidantes se pueden clasificar, según su mecanismo de acción, como primarios o secundarios. En el caso de los primarios, rompen las cadenas de reacciones oxidativas al inhibir la iniciación o propagación del radical libre; en tanto que los secundarios previenen la oxidación, retardando la reacción donde se forman los radicales libres (Apak *et al.*, 2011).

Particularmente, los flavonoides actúan como agentes reductores, donadores de oxígeno y quelantes del oxígeno libre, superóxido y de metales, lo que les confiere un alto potencial redox (Ignat *et al.*, 2011).

Para analizar la capacidad antioxidante de una sustancia, existen diferentes métodos de análisis como TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*), ABTS (*2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*), DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*), FRAP (*Ferrum Reactive Antioxidant Potential*) y ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), por sus siglas en inglés, los cuales se basan en la medición de la capacidad de estabilizar radicales libres específicos. Estos ensayos se suelen combinar para obtener información más específica de la muestra (Martínez *et al.*, 2012). Un resumen de lo anterior, se muestra en el Cuadro III.

Cuadro III. Ensayos para evaluar actividad antioxidante en alimentos

Característica	Transferencia de hidrógeno		Transferencia de electrones		
	TRAP	ORAC	DPPH	ABTS	FRAP
Especie iniciadora	AAPH (radicales peroxilo)	AAPH/ H ₂ O ₂ CuSO ₄	Radical DPPH	Ferrilmiogio, H ₂ O ₂ , K ₂ S ₂ O ₈	
Medida	Oxígeno consumido	Inhibición de caída de fluorescencia PE/FL	Descenso DPPH	Descenso ABTS	Reducción de TPTZ
Técnica	Electrodo de oxígeno	Fluorimetría	Espectrofotometría		
Cuantificación	Longitud fase de retraso	Fl a 540 nm y 565 nm técnica AUC	ABS 515 nm	ABS 414 nm	ABS 593 nm Sulfato férrico
Resultados	Equivalente de Trolox	Equivalenes de Trolox	Disminución de EC 50 al 50%	Equivalenes de Trolox	mol hierro/L

Fuente: Fernández *et al.* (2006)

3.3.6 Métodos de análisis de flavonoides

Históricamente, los flavonoides se han reportado dentro del contenido de los polifenoles totales (PFT). Los PFT se pueden determinar por espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis), después de la reacción de la muestra, con el reactivo Folin-Ciocalteu (Corradini *et al.*, 2011). Este método tiene como ventajas: ser simple, de bajo costo y dar resultados confiables. Sin embargo, no brinda información cuantitativa de los componentes individuales y es poco específico, ya que no distingue entre los tipos específicos de compuestos (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos) presentes en las muestras (Ignat *et al.*, 2011).

Para obtener el espectro en la región ultravioleta de los flavonoides, sin la interferencia de otros compuestos fenólicos, se utiliza la cuantificación espectrofotométrica con sales de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, AlCl_3). La determinación se realiza después de que se forma un complejo entre los flavonoides y el Al^{+3} . Este método permite una estimación más específica de los flavonoides, dado el complejo rojo que se forma (Ramos *et al.*, 2017).

Con este método, se pueden detectar flavonoles, flavanonas y, principalmente, flavanoles. Para ello, la reacción utiliza nitrito de sodio e hidróxido de sodio para brindar las condiciones de formación de complejo con el ion aluminio, al que se le mide la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Además, la función de las sales de aluminio es ceder el ion (Al^{+3}) para la formación del complejo responsable de la coloración rojiza en medio básico. El ion aluminio puede quelarse con el grupo o-hidroxilo (Figura 11), el cual produce una banda máxima de absorción a 510 nm (Ho *et al.*, 2012).

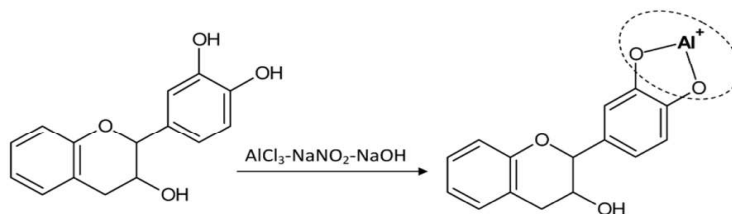


Figura 11. Formación del complejo cromogénico por interacción del ion aluminio con el flavonoide catequina (Ho *et al.*, 2012).

Los estándares más utilizados en esta determinación son la catequina, la epicatequina o la rutina, en los que los resultados se expresan como g o mg del compuesto estándar por unidad de muestra seca. La principal limitación de este método es que el resultado no corresponde a un único flavonoide y se debe de reportar como un equivalente de flavonoide conocido de peso y naturaleza conocida, es decir un patrón. Este procedimiento, también, ha sido usado en demasía en estudios previos de cuantificación de flavonoides en musáceas, por ser barato y fácil de implementar. Es importante mencionar que se pueden incluir variaciones, como el uso de nitrato de aluminio en lugar de cloruro de aluminio, debido a la reactividad e inestabilidad de este en agua, lo cual ocasiona interferencias, mientras que el nitrato es fácilmente soluble en agua y es estable en el tiempo (Magalhães *et al.* 2011; Ho *et al.*, 2012).

A su vez, para la cuantificación de flavonoides específicos, se utiliza la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detección UV o por espectrometría de masas (Corradini *et al.*, 2011), electroforesis capilar, cromatografía de fluido supercrítico, espectrofotometría de masas y cromatografía de gases (Ignat *et al.*, 2011; Galanakis *et al.*, 2018).

3.4. Extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales

Los compuestos bioactivos se encuentran en los tejidos vegetales en bajas cantidades, lo que requiere de procesos de extracción laboriosos. La extracción se puede definir como una operación en la cual se separan compuestos de interés de una matriz, mediante el uso de solventes, con los cuales presenta afinidad. Es más, para obtener un sustrato extraíble, a partir de matrices vegetales, se utilizan operaciones básicas de preparación como: lavado, secado, molienda, filtración, centrifugación, hidrólisis y digestión, dependiendo de la materia prima. Está de más decir que el manejo adecuado, durante estas etapas, es fundamental, para evitar pérdidas de los componentes de interés, así como para ir adecuando la muestra a su análisis, sin inducir interferencias importantes (Altemimi *et al.*, 2017).

Más específicamente, en la preparación de un sustrato a partir de cáscara de plátano verde, se han utilizado diferentes tratamientos, entre ellos el más utilizado, para la preservación de polifenoles, es la liofilización; sin embargo, este método tiene implicaciones importantes,

puesto que es poco rentable a nivel industrial. En otras investigaciones, se ha utilizado la inmersión en diferentes disoluciones (la utilización de agentes químicos para prevenir la oxidación, como agentes quelantes, reguladores de acidez, antioxidantes, entre otros), por tanto, se debe considerar las posibles repercusiones y costos económicos.

Posterior a la preparación de la muestra, se realiza la extracción sólido-líquido, donde se produce un fenómeno de transferencia de masa de los compuestos de interés, desde la matriz sólida hacia el solvente (Renard, 2018).

Dadas estas limitaciones de los métodos convencionales y a la naturaleza termolábil de los compuestos fenólicos, su extracción, mediante un método eficiente y rápido, sigue siendo un problema que se debe resolver. Las investigaciones más recientes han optado por alternativas “verdes” y efectivas en cuanto a reducir la cantidad de solvente, el tiempo y el consumo energético. En este sentido, la implementación de una tecnología verde a nivel industrial consiste en realizar operaciones con el menor consumo de energía, así mismo, la menor cantidad de disolvente y utilizar solventes que tengan bajo impacto ambiental (Azmir *et al.*, 2013).

3.4.1 Efecto de las variables de extracción

El proceso de extracción de flavonoides varía de acuerdo con la complejidad de la matriz en la que se encuentre, por lo que, para cada sustrato en particular, lo más apropiado es analizar los diferentes factores que influyen. Las matrices sólidas se suelen someter a operaciones de limpieza, tratamientos térmicos suaves para la inactivación enzimática, secado con aire caliente o por liofilización, molienda, homogeneización e inmersión en la solución de extracción. En cuanto a la extracción propiamente, las extracciones sólido-líquido son las más comunes para compuestos fenólicos, gracias a su facilidad, eficiencia y amplio rango de aplicación. Además, los alcoholes, agua, acetona, éter dietílico, acetato de etilo o mezcla de ellos son solventes utilizados como medio de extracción. Mientras que factores como el pH, la temperatura, la relación solvente sustrato (R_{ss}), número de etapas y tiempo de procesamiento se consideran entre las variables más importantes de extracción (Chávez-González *et al.*, 2020).

3.4.2.1 Tipo de solvente

Para la escogencia del tipo de solvente, se deben considerar factores como la selectividad y solubilidad de los compuestos a extraer, además del costo y seguridad. Se busca seleccionar un solvente con una polaridad cercana a la del soluto o compuesto a extraer. Generalmente, la extracción de flavonoides se realiza con solventes polares como alcoholes, acetona o agua. Cabe destacar que, contrario a los disolventes orgánicos, el agua es estimada como un disolvente amigable y de bajo costo, por lo que es importante tomarla en cuenta al momento de extracción de flavonoides (Someya *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2018). En su estudio, Fidriany *et al.* (2018) probaron el uso de hexano, acetato de etilo y etanol como solventes de extracción de flavonoides en cáscaras de banano, obteniendo el mayor rendimiento con etanol. Por otro lado, diferentes concentraciones de acetona, etanol, hexano, metanol y agua fueron utilizadas por Yee *et al.* (2016), para extracción de polifenoles en banano y subproductos de estos, lo que demostró una mejor efectividad con el uso de una mezcla etanol-agua.

3.4.2.2 Relación solvente sustrato (R_{SS})

La eficiencia de la extracción depende, principalmente, de la relación solvente sustrato (R_{SS}) porque el disolvente extrae los compuestos de interés hasta que este se satura (Bochi *et al.*, 2014). Asimismo, el volumen de disolvente tiene que ser suficiente para que todo el sustrato quede inmerso durante el proceso de extracción. Mientras los valores de R_{SS} oscilan entre 10:1 a 20:1 (Watson, 2019). En realidad, encontrar el valor óptimo es importante por las implicaciones económicas y ambientales que tienen como: los costos de producción, energía de recuperación del disolvente, equipo necesario, entre otros.

3.4.2.3 Temperatura

La temperatura del medio provoca cambios en la permeabilidad de las paredes celulares, en la solubilidad de los compuestos fenólicos y en la velocidad de transferencia de masa, a través de la matriz vegetal hacia el solvente de extracción. Generalmente, un aumento de la temperatura en el rango de 20 a 80 °C aumenta el rendimiento de extracción de

polifenoles (Watson, 2019). Empero, las temperaturas altas pueden ocasionar pérdidas del solvente (según su punto de ebullición), destrucción de compuestos termolábiles, generación de impurezas, así como de un mayor requerimiento energético (Zhang *et al.*, 2018).

3.4.2.4 Concentración de ácido

La acidez del medio influye en la extracción de componentes porque afecta la solubilidad de diversas sustancias y la protonación o desprotonación del disolvente. Los grupos –OH, presentes en los polifenoles, les brindan un carácter polar por lo que son solubles en solventes polares o parcialmente polares (Soto, 2017). Del mismo modo, el potencial de hidrógeno (pH), del medio, influye en la extracción, debido a que algunos compuestos fenólicos se encuentran asociados a otras moléculas, como azúcares. En soluciones ligeramente alcalinas o acidificadas, se pueden romper estos enlaces (hidrólisis) y liberar los polifenoles (Watson, 2019). No obstante, la variación en el pH puede degradar los compuestos de interés.

3.5. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos fue aplicado por primera vez en los años veinte del siglo pasado en el campo de la agricultura. Desde entonces, las investigaciones han contribuido al desarrollo y aplicación de esta técnica en diferentes campos. Los experimentos consisten en una serie de corridas o pruebas de un proceso, en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada y se recolectan datos de los resultados obtenidos o variables respuesta. Asimismo, el diseño de experimentos (DOE) se utiliza para identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan, con el fin de, luego, determinar la configuración de factores que optimizan los resultados. De esta manera, se pueden ejecutar diversas variables al mismo tiempo, sin incurrir en exceso de análisis (Ilzarbe *et al.*, 2007). Dentro de los modelos de DOE más utilizados, se encuentran los siguientes:

- Completamente aleatorizado
- Diseño aleatorizado por bloques
- Factoriales completas
- Factoriales fraccionadas
- Plackett-Burman

- Superficie de respuesta (diseño central compuesto, Box-Behnken)
- Diseños de tres niveles
- Mezclas
- Diseño de Taguchi.

3.5.1 Diseño experimental de mezclas

Este tipo de diseño se puede definir como aquel donde los factores independientes son una fracción de un todo, por lo que su suma da 1 o 100 %. Se asume que la respuesta depende solamente de las proporciones relativas de los componentes de la mezcla y no de la cantidad de mezcla (NIST, 2012).

Los diseños experimentales de mezclas más usados son los siguientes: red simple (simplex lattice), centrado simple (simplex centroid), vértices extremos (extreme vertex) y el diseño mixto (NIST, 2012). Por su parte, el diseño centrado simple cuenta con puntos medios laterales que representan una mezcla de dos componentes y un punto central, con una mezcla de proporciones iguales en cada componente (Montgomery, 2013), como se muestra en la Figura 12:

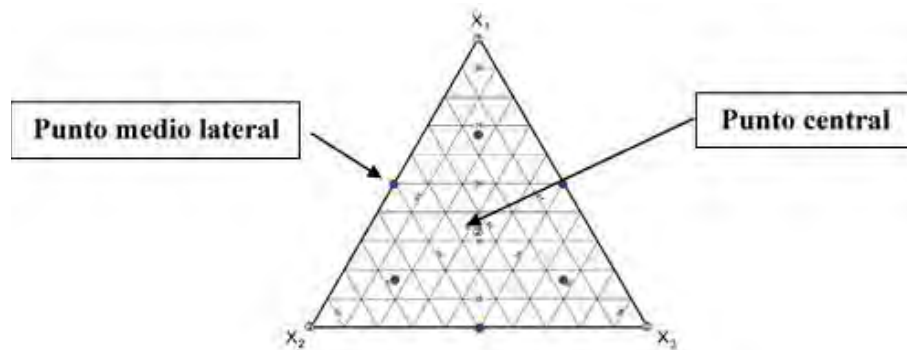


Figura 12. Región experimental de un diseño simplex centrado, utilizado para la optimización de los solventes de una extracción (Tomado de <https://www.statease.com/docs/v11/tutorials/mixture-designs/>)

El propósito es modelar un plano geométrico, mediante una ecuación matemática, de tal forma que se pueda relacionar y predecir la respuesta de cualquier combinación de los componentes de la mezcla, o medir la influencia de cada componente individual en la variable respuesta (NIST, 2012).

Por consiguiente, para determinar el efecto de los componentes de la mezcla sobre la respuesta, es necesario ajustar los resultados a un modelo algebraico, el cual puede ser de primer, segundo o tercer orden. Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de mínimos cuadrados y se selecciona el modelo en función de los parámetros estadísticos. A continuación, se presenta la ecuación base de los diferentes modelos (Montgomery, 2013).

Primer Grado (Lineal)
$$Y = \sum \beta_i x_i \quad [1]$$

Segundo grado (Cuadrática)
$$Y = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad [2]$$

Tercer grado (Cúbico especial)
$$Y = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad [3]$$

En las ecuaciones 1 a 3, el valor Y es la respuesta esperada, x_i los componentes de la mezcla.

Los parámetros β_i , β_{ij} y β_{ijk} son los coeficientes para los términos lineal, cuadrático y cúbico de la ecuación de regresión; al término $\sum \beta_i x_i$ se le llama porción de mezcla lineal y estima el efecto de los componentes individuales, en tanto que el término $\sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$ evalúa el efecto de interacción de dos componentes, la cual puede ser sinérgica o antagónica, y la expresión $\sum \sum \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k$ representa la interacción cúbica de los tres componentes (Montgomery, 2013; González, sf).

3.5.2 Diseño central compuesto (DCC)

El DCC se utiliza para determinar los coeficientes de un polinomio de segundo orden [ecuación 4] y presenta la ventaja de reducir el número de experimentos en estudios de varias variables (Montgomery, 2013), lo cual se traduce en el uso de menos recursos y tiempo.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad [4]$$

El valor Y es la respuesta esperada, x_i los componentes de la mezcla y los parámetros representan la respuesta esperada de una mezcla pura y los demás componentes igual a cero, donde las variables i, j, k reflejan el grado del término. También, puede representar una muestra sinérgica o antagónica de la interacción de distintos factores (Montgomery, 2013).

Un DCC es un arreglo factorial con puntos centrales aumentados, con un grupo de puntos axiales que permiten estimar una curvatura del modelo, de modo tal que está formado por puntos centrales, factoriales y axiales. La distancia, desde el centro del espacio experimental hasta los puntos factoriales, es de ± 1 unidades, para cada factor, y la distancia hasta los puntos axiales es α . El valor de α y del número de puntos centrales depende de las propiedades deseadas para el diseño. La cantidad de puntos axiales siempre es del doble de la cantidad de factores del diseño. Para mantener la rotabilidad, el valor de α depende del número de factores del diseño [ecuación 5] y de si el diseño consta de bloques (NIST, 2012; Montgomery, 2013; Melo *et al.*, 2015).

$$\alpha = [2^k]^{\frac{1}{4}} \quad [5]$$

Donde,

k: número de factores o variables independientes

El número de experimentos está dado por la ecuación 6, a partir de la cual se obtienen 20 experimentos para 3 factores, con el propósito de que sea de precisión uniforme y rotatable. Todos los factores se estudian en 5 niveles: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$ (Bezerra *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2015). Una representación gráfica de este modelo se observa en la Figura 13:

$$N = k^2 + 2k + c_p \quad [6]$$

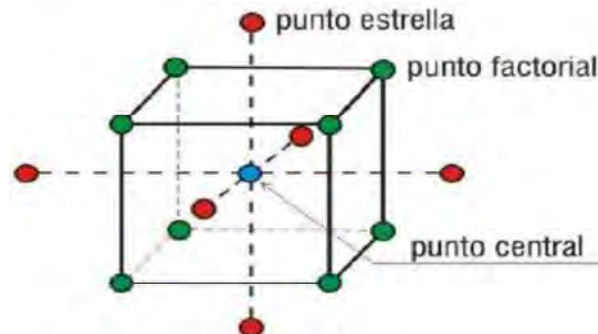


Figura 13. Esquema del diseño central compuesto para tres factores.

De igual forma, se emplean funciones matemáticas para describir el sistema en estudio y, así, modelar el fenómeno para su optimización. Ahora, para evaluar si el modelo se ajusta a los datos y describir el fenómeno, se aplica el análisis de varianza (ANDEVA), en el cual el modelo se ajusta bien a los datos experimentales si presentan una probabilidad y regresión significativas, y una falta de ajuste no significativa (Bezerra *et al.*, 2008). La regresión se considera significativa si el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{ajd}) son mayores a 0,8 y si presenta una distribución de residuos aleatoria (Montgomery, 2013).

Para la validación del modelo se realizan corridas experimentales, en donde la variable de respuesta obtenida debe de encontrarse dentro del intervalo de confianza del valor óptimo del modelo. Además, en los modelos cuadráticos, se pueden obtener puntos críticos, máximos y mínimos, así como su ecuación y modelo geométrico (Bezerra *et al.*, 2008)

3.5.3 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

En la actualidad existen métodos para observar interacciones entre diferentes variables mediante una forma gráfica. Un ejemplo de estos es la metodología de superficie de respuesta (MSR). Por ello, la aplicación de una MSR en un diseño experimental se utiliza para visualizar la extracción de compuestos y de muchos otros casos experimentales que involucran tres o más variables (Mandal *et al.*, 2015; Araujo *et al.*, 2016; Vu *et al.*, 2016; Ghasemzadeh *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018;).

La MSR se desarrolló para la visualización de varios procesos de extracción, incluidas las variables de extracción como la polaridad del disolvente, el tiempo de extracción y la temperatura. Los diversos parámetros y sus interacciones se pueden evaluar de manera eficiente con análisis de datos y tecnología (Karacabey y Mazza, 2010; Sinha *et al.*, 2012; Tabaraki *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2015). Una ilustración de la metodología de superficie de respuesta se muestra en la Figura 14.

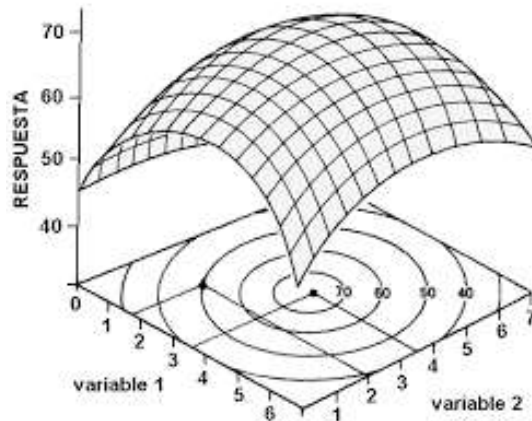


Figura 14. Ejemplo de una superficie de respuesta.

3.6. Caracterización de extractos vegetales

Los extractos que se obtienen de matrices vegetales son una mezcla de diversos compuestos fenólicos y de sustancias no fenólicas en solución, tales como azúcares, ácidos, sales, ceras, terpenos y grasas. Particularmente, en la extracción de flavonoides, es común que estos se encuentren en los tejidos vegetales de la forma glucosídica, al ser esta forma más soluble en agua. Por otro lado, los flavonoides tienen la capacidad de quelar metales como el hierro y otros minerales esenciales, así que, al extraer estos compuestos, existe la posibilidad de que estos minerales se arrastren, por lo que se debe realizar su caracterización.

La identificación de los compuestos presentes en el extracto resulta importante para el establecimiento de las operaciones o etapas necesarias para su purificación, según su propósito de aplicación. Por ello, los análisis del contenido de sólidos totales, azúcares simples y cenizas resultan útiles para la caracterización del extracto. Los parámetros que se pueden analizar son: PFT, flavonoides, capacidad antioxidante ORAC, análisis proximal del sustrato y extracto obtenido entre otros (Corradini *et al.*, 2011).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

El tratamiento previo de acidificación se realizó en la empresa Alimentos Zúñiga S.A (ALZU), localizada en San Diego de Tres Ríos, Cartago. de donde se obtuvieron las cáscaras. Asimismo, las operaciones de secado y molienda se realizaron en la planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Por su parte, las corridas de extracción y análisis se realizaron en los laboratorios de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ETA) y del CITA, ubicados en la sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro Montes de Oca.

4.2 Características de materia prima

Se utilizaron cáscaras de plátano (Musa sp. AAB) de madurez grado 1 (Figura 15), provenientes del residuo del procesamiento de plátanos fritos de la empresa agroindustriales Alimentos Zúñiga S.A (ALZU), ubicada en San Diego de Tres Ríos, Cartago.



Figura 15. Cáscaras de plátano verde recolectadas en la industria después del pelado.

4.3 Metodología

4.3.1. Determinación analítica del contenido flavonoides

Para la sección 4.3.1 se utiliza el siguiente procedimiento basado en el método de extracción de polifenoles Georgé *et al.* (2005).: Se pesan aproximadamente 5 gramos de la muestra seca, molida y tamizada (1,00 mm) (CS) y se le agregan 45 mL del solvente (mezcla acetona-agua 70:30), a temperatura ambiente (22 °C) en un erlenmeyer, que se coloca en una plantilla de agitación magnética a 300 rpm por 10 min; este, posteriormente, se coloca en un baño ultrasónico por 10 min. Finalizado lo anterior, se coloca, de nuevo, 10 minutos en una plantilla de agitación magnética a 300 rpm. Una vez realizado el proceso de extracción, la mezcla se filtra en un papel Whatman 41, se coloca en un balón y se procesa en un rotavapor hasta eliminar la acetona; se filtra, otra vez, con un filtro de 0,45 µm en un balón de 25 mL y se afora con agua destilada. A dicha muestra, se le determina el contenido de flavonoides en mg EE/g CS (Flavonoides totales en la sección 4.3.7). El esquema de este procedimiento se muestra en la Figura 17.

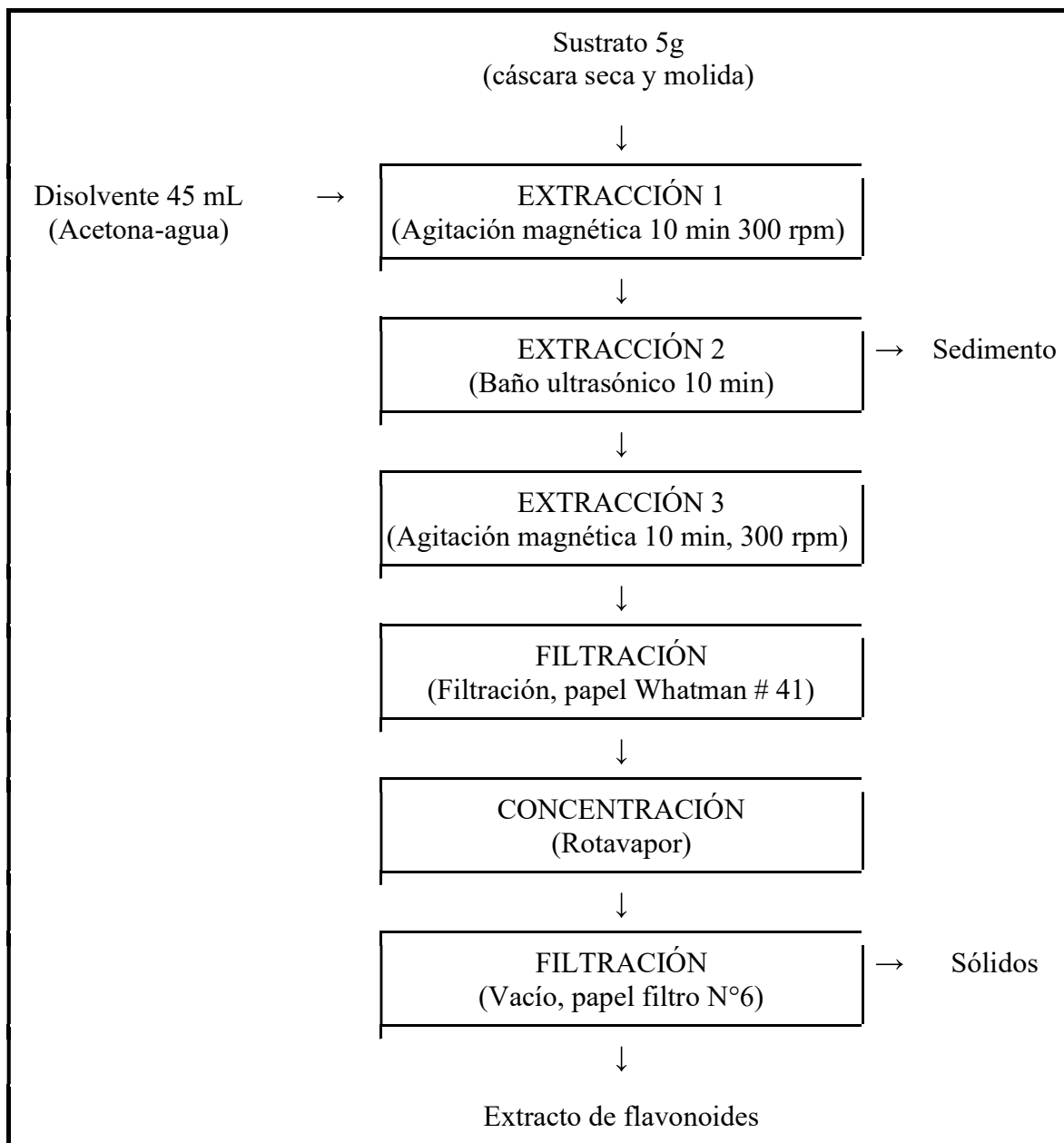


Figura 16. Método de extracción de flavonoides a partir de cáscara de plátano.

Para las secciones 4.3.5, 4.3.6 y 4.3.7 se utiliza un método de extracción descrito respectivamente en cada una de las secciones y su cuantificación se basa en lo descrito en el apartado de flavonoides totales, en la sección 4.3.7.2.

4.3.2 Validación del método de cuantificación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides, en los distintos objetivos, se validó el método que se describe a continuación, el cual es una adaptación del descrito por Baskar *et al.* (2011).

Preparación de la curva patrón

Se prepara una disolución madre de epicatequina con una concentración de 20 mg/L. A partir de esta, se construye una curva con 7 puntos con concentraciones que van desde los 4 mg/L a los 27,5 mg/L. Para esto, se toma la cantidad necesaria de cada una de las diluciones patrón, se agrega 0,3 mL de NaNO₂, 5 %, y se deja por 5 min. Posteriormente, se adicionan 0,3 mL de Al (NO₃)₃, 10 % y se espera 6 min. Finalmente, se añaden 2 mL de NaOH 1mol/L, aforado a 10 mL con agua desionizada y se mide la absorbancia a 510 nm, usando un espectrofotómetro UV-VIS (Shimatzu, Japón).

Medición de las muestras

Tomar una alícuota del extracto (variable según la concentración del extracto) y agregar en un balón de 10 mL, añadir 0,3 mL de NaNO₂, 5 % y esperar 5 min. Posteriormente, adicionar 0,3 mL de Al (NO₃)₃, 10 % y esperar 6 min. Finalmente, agregar 2 mL de NaOH 1M, aforar a 10 mL con agua desionizada y medir absorbancia a 510 nm, en el espectrofotómetro UV-VIS. Para el análisis de los flavonoides de los extractos obtenidos en la investigación, fue necesario validar el método empleado. Con este fin, en la determinación de flavonoides, mediante el método espectrofotométrico con aluminio descrito anteriormente, se verificó la linealidad en el ámbito de trabajo, se establecieron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), así como la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad, a través del sistema de mínimos cuadrados simples. Los procedimientos de validación se basaron en lo descrito por AOAC (2002), Morillas (2016) y Novales (2010), para lo cual se elaboraron 3 curvas de calibración en distintos días.

Linealidad

Las curvas de calibración relacionan una respuesta analítica con la concentración de un determinado analito (Morillas *et al.*, 2016). En este caso, la absorbancia es función de la

concentración de flavonoides extraídos. Un coeficiente de determinación mayor a 0,99 entre la señal respuesta y la concentración evidencia un buen ajuste del método (AOAC, 2002). Para la cuantificación de los flavonoides, se elaboraron 3 curvas de calibración con un patrón de (-)-epicatequina, visto que se reporta como uno de los flavonoides presentes en mayor proporción en la cáscara de plátano, junto con la rutina y la catequina (Someya *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2014; Waghmare *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2015; Deepak y Singh., 2014). Además, se elaboran 3 curvas con el fin de determinar la linealidad, precisión, límite de detección y cuantificación del método, entre otros aspectos de validación del análisis, y se escogió la que brindara mejores parámetros estadísticos (coeficiente de correlación, repetibilidad y reproducibilidad). Una ilustración del complejo coloreado obtenido en la construcción de la curva de calibración se muestra en la Figura 16.

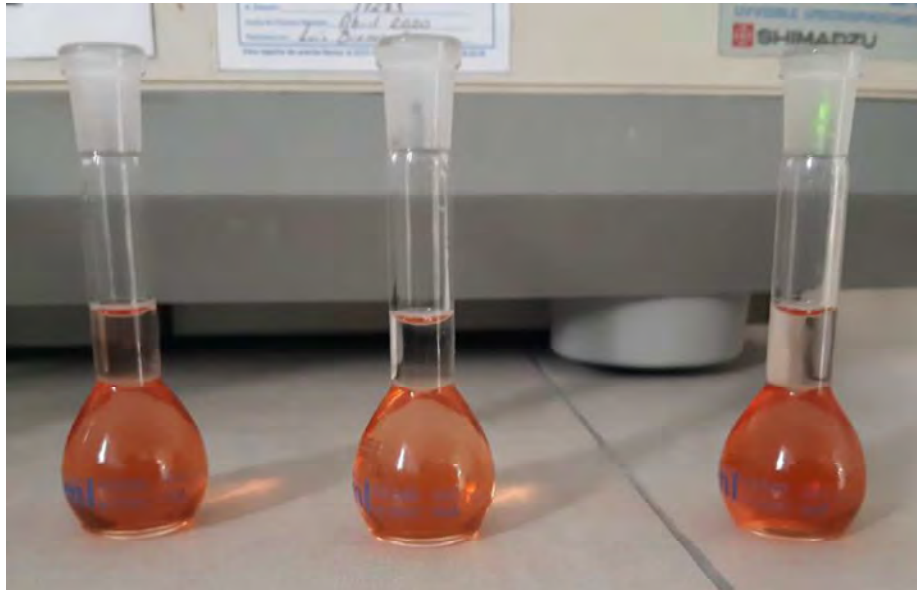


Figura 17. Color del complejo de aluminio (III) para la determinación de flavonoides por espectrofotometría.

A partir de los parámetros de regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración que permite obtener la concentración flavonoides como equivalente de (-)-epicatequina (EE) en los extractos.

Ámbito de trabajo

El ámbito de trabajo es una medida de la linealidad del método (Morillas *et al.*, 2016). Se definió a partir de extractos de flavonoides obtenidos en pruebas preliminares, de acuerdo con el rango de absorbancia en el cual se mantiene la linealidad según la Ley de Beer-Lambert, así como donde se encuentran, en aproximación, las concentraciones de diversos extractos de prueba.

Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

Para establecer el LD, se determinó la concentración mínima de analito que puede detectarse en el ámbito de trabajo, utilizando la ecuación 6 a partir de 30 datos experimentales. Mientras que el LC es la cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantificado con determinado grado de confianza de acuerdo con la ecuación [7] y [8] (Morillas *et al.*, 2016).

$$LD = \frac{3 \cdot Sb}{m} \quad [7]$$

$$LC = \frac{10 \cdot Sb}{m} \quad [8]$$

Donde: S_b : Desviación estándar del intercepto y m : Pendiente de la recta

Precisión del método de análisis

La desviación estándar (RSD por sus siglas en inglés) indica el error o diferencia máxima aceptada entre las mediciones para que se consideren confiables (Morillas *et al.*, 2016). El RSD se obtuvo a partir de la concentración promedio obtenida en 3 muestras y aplicando la ecuación [9].

$$RSD = SD/x \quad [9]$$

Donde, SD : Desviación estándar x : Promedio

Su valor se obtuvo al realizar 3 repeticiones de la cuantificación en 3 días distintos, para un $n = 9$ y utilizando la ecuación 9. Una adecuada RSD generalmente es menor del 10 %.

4.3.3 Determinación de las condiciones de acidificación para reducir la degradación enzimática de los flavonoides.

4.3.3.1 Procedimiento

Se recolectaron las cáscaras de plátano verde, se lavaron con agua y se introdujeron en un recipiente con una disolución de ácido cítrico a tres diferentes concentraciones, de forma que quedaran sumergidos completamente por 5 minutos, a temperatura ambiente (22 °C).

Posteriormente, las cáscaras tratadas se secaron en un secador de aire caliente (National, EUA), a una temperatura de 55 °C, hasta obtener una humedad final entre 10-12 %. Una vez secas, se molieron en un molino de martillos, con tamiz de separación de 0,060 pulgadas (1,52 mm). Se evaluó el efecto de emplear tres diferentes concentraciones de ácido cítrico en el tratamiento de acidificación, indicadas en el Cuadro IV, para inhibir el efecto de las enzimas de deterioro sobre los flavonoides presentes en la cáscara seca. Dicho deterioro se evaluó a través de la medición del rendimiento de extracción de flavonoides en el sustrato, en contraste con un control sin adición de ácido cítrico, el cual evidenciaría el mayor deterioro.

Cuadro IV. Tratamientos de inmersión de plátano verde en soluciones de ácido cítrico a diferentes concentraciones para la inhibición de enzimas de deterioro.

Tratamiento	Concentración de ácido cítrico (% m/m)
1	0,0
2	0,5
3	1,0
4	2,0

4.3.3.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental irrestricto aleatorio de un factor (concentración de ácido cítrico) con cuatro niveles entre 0 y 2 % por triplicado. Como variable respuesta se determinó el contenido de flavonoides totales extraíbles como mg equivalentes de epicatequina (mg EE)/g cáscara seca

4.3.3.3. Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en la cuantificación de flavonoides, se genera una prueba estadística ANOVA y una prueba post hoc Tukey, mediante el software Statistica 7 (Statsoft®, EUA). Se elige la concentración de ácido cítrico que brinde la mayor recuperación de flavonoides extraíbles con un 95% de confianza.

4.3.4. Preparación del sustrato para la extracción

En la Figura 18, se muestra un diagrama de bloques donde se describe la preparación del sustrato de extracción. La primera etapa es la recepción de las cáscaras, se realiza un lavado con agua para eliminar materia orgánica, látex y otras impurezas; seguido, se sumergen en una disolución de ácido cítrico 1 %, por 5 min, para inhibir la acción de la PFO. Luego, se secan en un secador de aire caliente (National, EUA) hasta alcanzar una humedad entre 10 y 12 %. Una vez secas, se procesaron en un molino de martillos (TAINEA, Costa Rica), con la malla de 0,060 pulgadas (1,52 mm), hasta obtener un polvo con un tamaño menor a 1 mm. Finalmente, se empacó en una bolsa de polietileno negra y se colocó en un recipiente que se almacenó en congelación a -18 °C. Ilustraciones se pueden observar en la Figura 19.

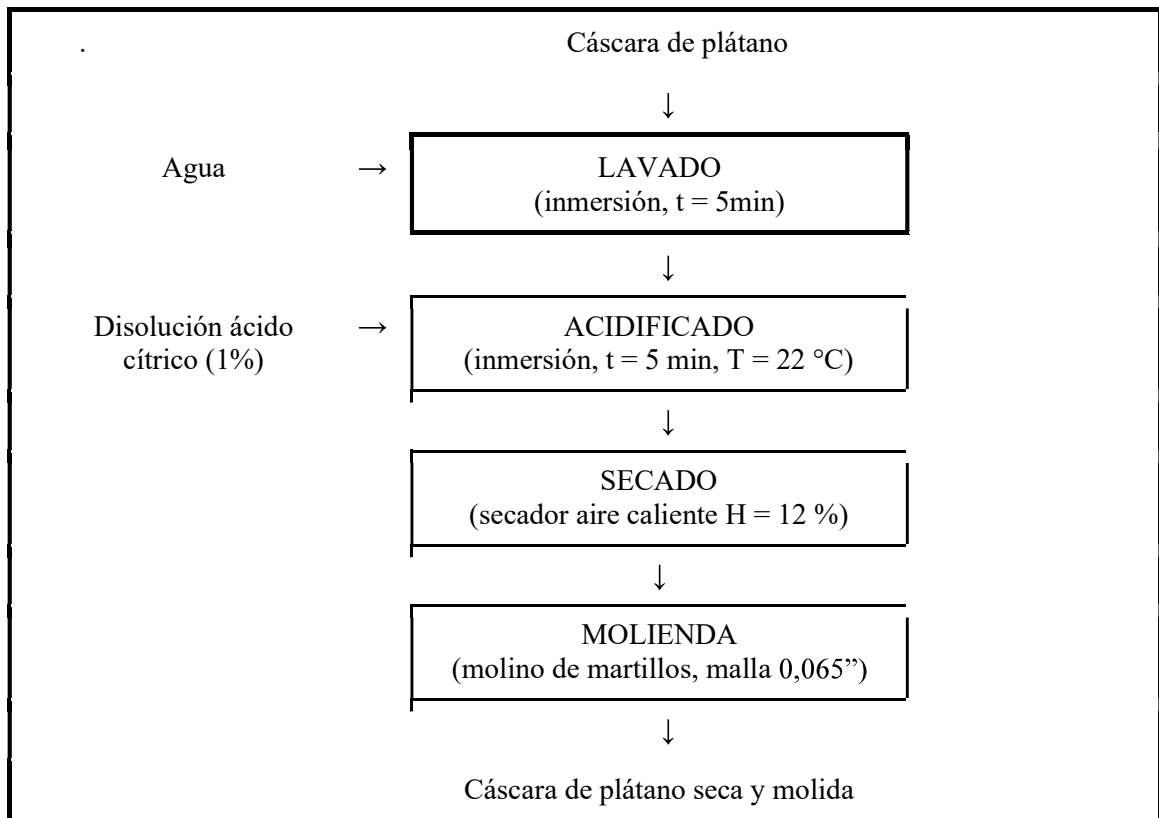


Figura 18. Diagrama de preparación del sustrato de extracción



Figura 19. Obtención del sustrato de extracción a partir de cáscaras de plátano verde:
a) inmersión en ácido cítrico, b) secado, c) cáscara plátano seca y molida (CS).

4.3.5 Determinación de la mezcla de solventes de extracción para obtener un mayor rendimiento de flavonoides

4.3.5.1 Procedimiento

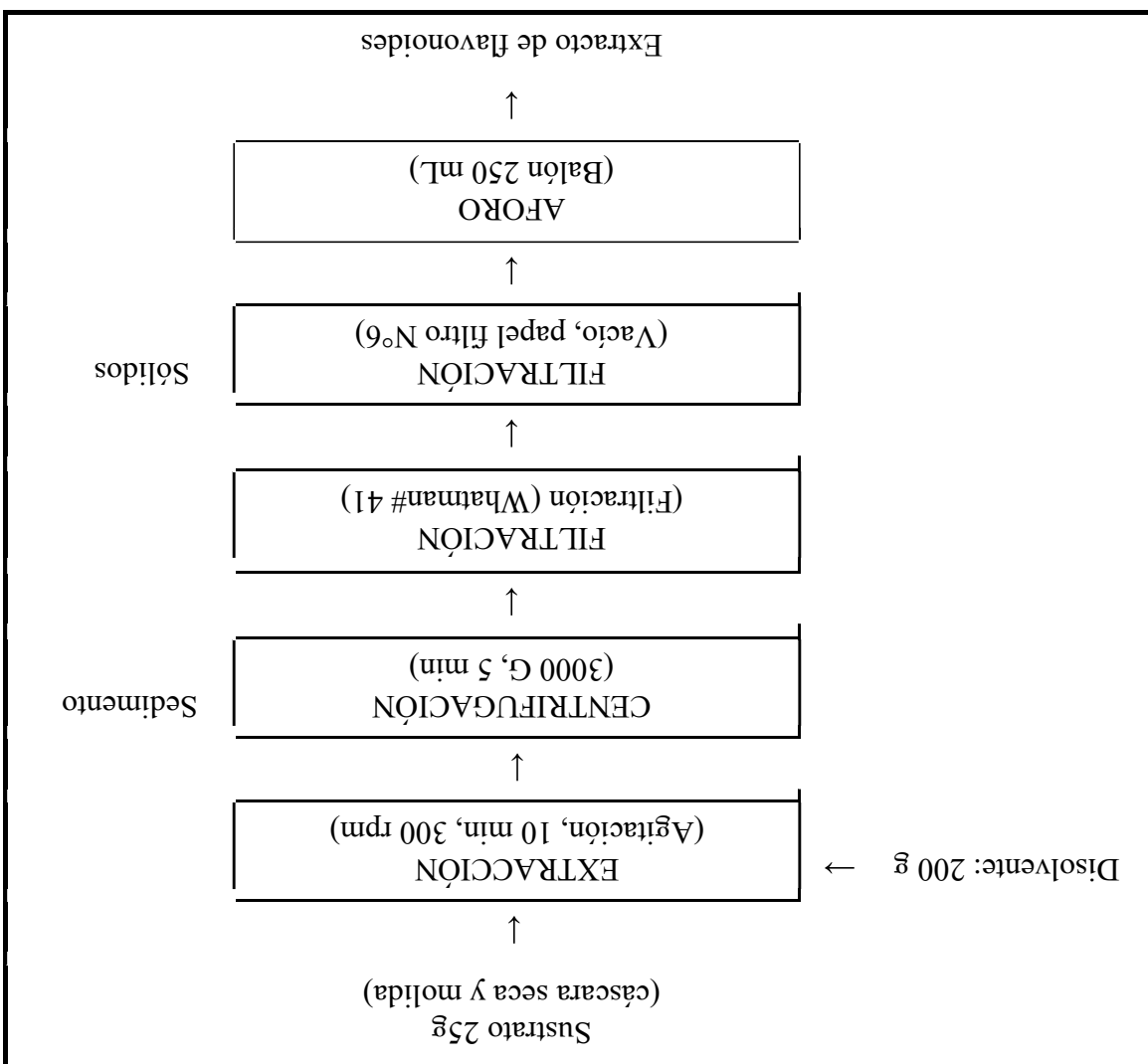
Con el fin de definir la composición de la mezcla de solventes que produce un mayor rendimiento de los flavonoides en el extracto, se evaluaron tratamientos de extracción del sustrato de cáscara en polvo, con mezclas en diferentes proporciones de tres solventes (agua, etanol, acetona). Luego, se realizó la cuantificación de flavonoides en los extractos líquidos obtenidos en los diferentes tratamientos.

Para las extracciones, con los diferentes solventes, se mantuvo constante la temperatura a 22°C; una relación solvente sustrato de 8:1 en masa, un tiempo de extracción de 30 min a una velocidad de agitación de 300 rpm, mediante un rotor Eurostar 60 (IKA, Alemania). Estos parámetros se definieron a través de pruebas preliminares. Además, se utilizó la temperatura ambiente del laboratorio, para la cual no se requiere enfriamiento o calentamiento, aunque sí resulta indispensable mantenerla de forma constante. La relación 8:1 en solvente/sustrato se definió así, dado que relaciones menores no permiten una adecuada agitación del sistema; de igual manera, la velocidad 300 rpm es la mínima velocidad que permite la agitación completa de todas las partículas de sustrato.

Para la extracción, se tomaron 25,00 g de CS y se agregaron 200 g de disolvente. La mezcla se agitó en un rotor por 10 min a 300 rpm y, posteriormente, se centrifugó. Después, se filtró, por medio de un papel filtro por embudo y, más adelante, al vacío. Por último, el sobrenadante separado se aforó en un balón de 250 mL. Un esquema de este procedimiento se muestra en la Figura 20.

Una ilustración del equipo de extracción utilizado se muestra en la Figura 21, el cual consiste en un motor eléctrico que hace girar una propela en el interior de un frasco de vidrio, que contiene el sustrato y el disolvente. Asimismo, cuenta con un termómetro para un adecuado control de la temperatura y un condensador para evitar el escape de los solventes volátiles (etanol o acetona).

Figura 20. Método de extracción de flavonoides.



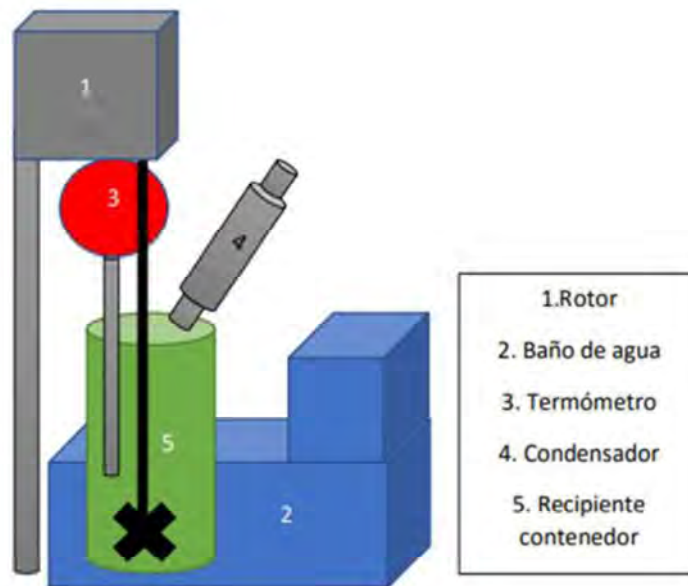


Figura 21. Equipo de extracción utilizado

4.3.5.2 Diseño experimental

Para evaluar la combinación de solventes que brindan el mayor rendimiento de extracción de flavonoides de la cáscara de plátano, se utilizó un diseño de mezclas simplex centroide grado dos, basado en los trabajos realizados por Santos *et al.* (2018) y DiClaula *et al.* (2014). Los 3 factores por evaluar corresponden a los solventes: agua, etanol y acetona, cada uno de los cuales se evaluó en 5 niveles de concentración: 100 %, 66,7 %, 50 %, 33,3 % y 16,7%, con tres repeticiones en el punto central. De este modo, los datos obtenidos se analizaron por medio del software Statistica 7 (Statsoft®, EUA), con un 95 % de confianza. Las combinaciones de solventes de los tratamientos se muestran en el Cuadro V, en tanto que una ilustración de los extractos obtenidos se muestra en la Figura 22.

Cuadro V. Combinación de solventes de los tratamientos del diseño de mezclas reticular simple ampliado grado dos utilizado.

Tratamiento	Disolvente (% m/m)		
	Agua	Acetona	Etanol
1	100	0,0	0,0
2	0,0	100	0,0
3	0,0	0,0	100
4	50,0	50,0	0,0
5	50,0	0,0	50,0
6	0,0	50,0	50,0
7	66,6	16,7	16,7
8	16,7	66,6	16,6
9	16,6	16,6	66,6
10	33,3	33,3	33,3
11	33,3	33,3	33,3
12	33,3	33,3	33,3



Figura 22. Extractos obtenidos con los diferentes solventes.

4.3.5.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos en las corridas del diseño de mezclas de la extracción de flavonoides, se generaron diversos modelos de regresión y sus representaciones de superficie de respuesta, utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft[®], EUA), para determinar

cuál es el que mejor representa la influencia de las variables de extracción. Los parámetros estadísticos coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) deben ser mayores a 0,8, la probabilidad del modelo (p) significativa, la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) no significativa y la distribución de los residuos aleatoria. A su vez, para definir la ecuación del modelo, se trabajó con los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos ($p < 0,05$). Posteriormente, se determinaron las condiciones que maximizan la extracción, mediante el mismo software empleado. Finalmente, con las condiciones de extracción óptimas, se realizó la verificación del modelo.

4.3.5.4 Verificación del modelo

Para verificar que el modelo matemático obtenido predice, adecuadamente, la variable respuesta, se procedió a la extracción de los flavonoides, bajo las concentraciones de solventes definidas como las óptimas por el modelo. Así pues, para determinar si el modelo del diseño es adecuado, se establece el criterio de que el intervalo de confianza, al 95% del valor predicho por el modelo, debe traslaparse con el intervalo del valor obtenido experimentalmente. Esta corrida de verificación se realizó por triplicado.

4.3.6 Evaluación del efecto de acidez, temperatura, relación solvente sustrato sobre la extracción de flavonoides y rutina mediante un diseño central compuesto

4.3.6.1 Procedimiento

Se realizaron los tratamientos establecidos en un DCC de tres factores: acidez como porcentaje de ácido acético, temperatura del disolvente y relación solvente sustrato, con diferentes valores para cada uno de los parámetros a evaluar (basados en el equipo de extracción, pruebas preliminares e investigaciones previas), y luego, se cuantificaron los flavonoides y la rutina, obtenidos en los extractos, el mismo día de la extracción). Los valores codificados y decodificados se muestran en el Cuadro VI.

Cuadro VI. Valores codificados y decodificados para las variables del diseño central compuesto utilizado para la optimización de las condiciones de extracción.

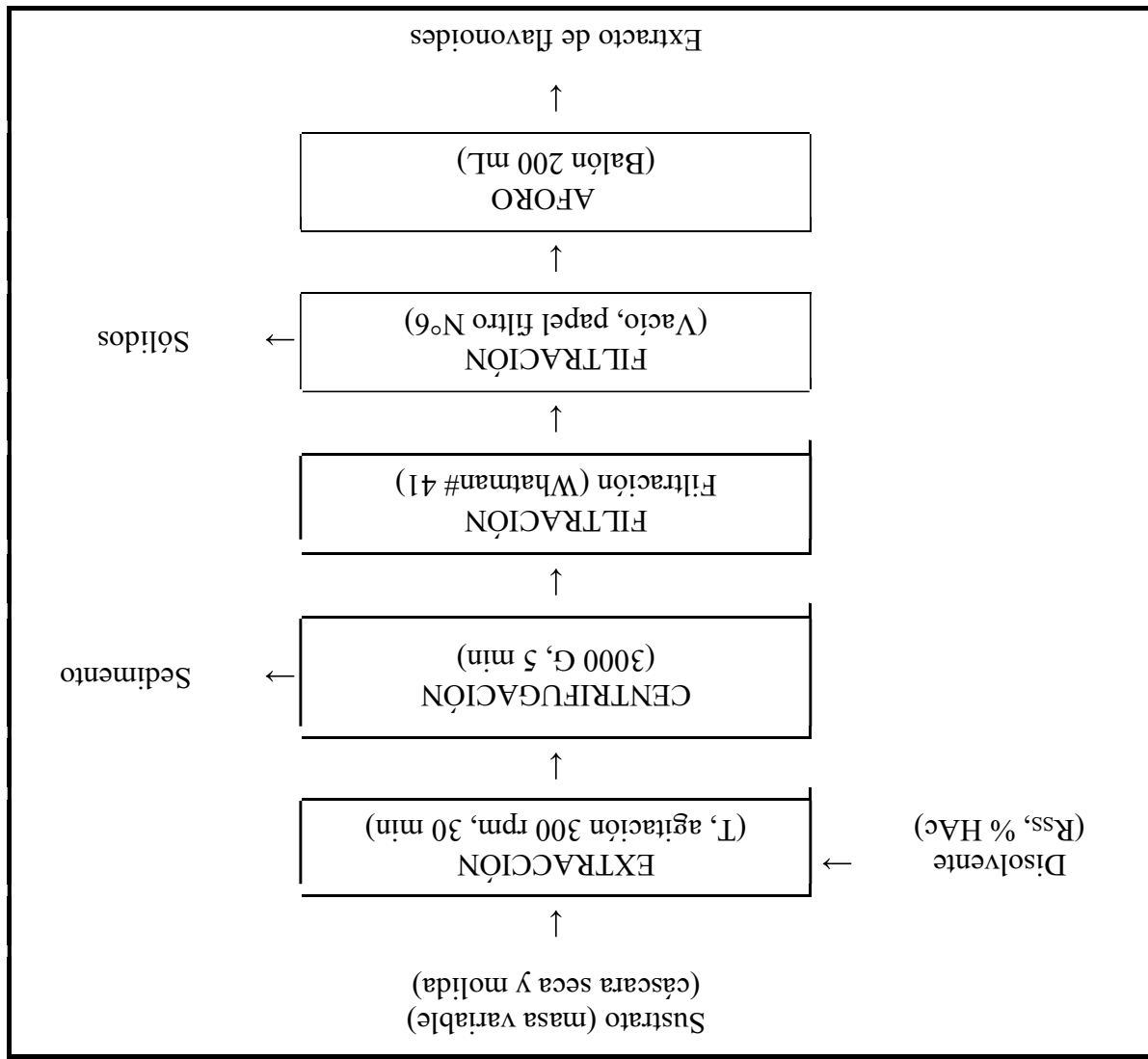
Variable independiente	Valores codificados del modelo				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
R_{ss} (g solvente/g sustrato)	6	7,6	10	12,40	14
Temperatura (°C)	22	27,7	36	44,3	50
Concentración ácido acético (% m/m)	0	0,2	0,5	0,8	1

En las corridas del diseño, se utilizó el procedimiento descrito en la Figura 23, donde, a una masa variable, se le agrega una cantidad determinada de solvente (acetona-agua: 55:45 en masa), previamente preparada. Después, se realizaron las extracciones por 30 min, a una velocidad de 300 rpm, con variación de las condiciones de operación: relación solvente sustrato (R_{ss}), porcentaje de ácido acético glacial (% HAC) y temperatura (T), particulares de cada corrida. Finalizada la extracción, se hace una centrifugación, se separa el extracto sobrenadante, que se filtra y se coloca en un balón de 200 mL, que se afora con una mezcla del disolvente.

4.3.6.2 Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de las variables relación solvente-sustrato, concentración de ácido y temperatura de extracción en el rendimiento de extracción de flavonoides y rutina, se empleó un diseño central compuesto de 3 factores, con el fin de obtener un modelo cuadrático. Como respuesta se midió la cantidad de flavonoides y rutina extraídos. Se realizan 6 repeticiones en el punto central del diseño experimental. El orden de realización fue aleatorio, la valoración de los resultados se efectuó mediante el programa Statistica 7 (Statsoft[®], USA). Esto se muestra en el Cuadro VII.

Figura 23. Procedimiento de extracción de flavonoides utilizado en las corridas del DCC para la evaluación del efecto de la temperatura, R_{ss} y concentración de ácido acético.



Cuadro VII. Diseño central propuesto para la evaluación de las variables de extracción de flavonoides y rutina en cáscara de plátano verde.

Tratamiento	Ácido acético (%)	Temperatura (°C)	Relación Solvente: Sustrato (g solvente/g sustrato)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	-1	+1	+1
7	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+ 1,68	0	0
11	0	- 1,68	0
12	0	+ 1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+ 1,68
15-20	0	0	0

4.3.6.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos para cada variable respuesta, se generó un modelo de regresión cuadrático y sus respectivas superficies de respuesta, utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA). Los parámetros estadísticos coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}), deben ser mayores a 0,8, la probabilidad del modelo (p) significativa, la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) no

significativa y la distribución de los residuos aleatoria. Por su parte, para definir la ecuación del modelo y calcular las respuestas predichas por los modelos, se emplearon los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos en el análisis de varianza ($p < 0,05$)

4.3.6.4 Función de deseabilidad

Con el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA), se aplicó la función de deseabilidad. Esta función o herramienta permite analizar simultáneamente múltiples respuestas en el modelo obtenido, para obtener unas condiciones óptimas de extracción donde se maximicen las respuestas analizadas, que, en el caso del estudio, serían el contenido de flavonoides y rutina en el extracto. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, dentro del cual una deseabilidad de 1 indica que la respuesta alcanza el valor ideal.

4.3.6.5 Verificación del modelo obtenido.

Para verificar que los modelos matemáticos obtenidos en el diseño experimental central compuesto predicen, adecuadamente, las variables respuesta, se realizaron corridas de extracción, por triplicado, bajo las condiciones definidas como las óptimas por el modelo. Además, para determinar si el modelo del diseño es adecuado, se estableció, como criterio, que el intervalo de confianza del valor predicho por el modelo, con un 95 % de confianza, debe traslaparse con el intervalo del valor obtenido experimentalmente, esto para cada variable respuesta, también, con un 95 % de confianza.

4.3.7 Caracterización del extracto obtenido

4.3.7.1 Polifenoles totales

El contenido de PFT del extracto obtenido se determinó siguiendo el método de Georgé *et al.* (2005). En el análisis, la muestra reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu y forma un complejo al que se le mide la absorbancia a 765 nm, con un espectrofotómetro UV-Vis (Shimatzu, Japón). Para la cuantificación, se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas de ácido gálico, por lo que el resultado se reporta como equivalentes de ácido gálico por volumen de muestra (EAG/L). El resultado de este análisis

se refiere a los polifenoles extraíbles (PFT). Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, con un $\alpha = 0,05$.

4.3.7.2 Flavonoides totales

El contenido de flavonoides se definió con un procedimiento modificado del método empleado por Valadez *et al.* (2017), de la siguiente manera: a una alícuota de muestra (entre 0,3 a 2 mL), se le adicionan 0,3 mL de NaNO₂ al 5 % (p/v); después de 5 minutos, se agregan 0,3 mL de Al (NO₃)₃ al 10 % (p/v) y se deja reposar 6 minutos. Posteriormente, se añaden 2 mL de NaOH 1M y se diluye hasta 10 mL con agua desionizada. Por último, se mide la absorbancia a 510 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Shimatzu UV-1700, Japón). Para la curva de calibración se utilizó como patrón epicatequina. Los resultados se expresarán como mg de equivalentes –e - (-) epicatequina (EE)/g de muestra seca.

La concentración de flavonoides (**Cn**) se calcula de la siguiente manera:

$$Cn = \frac{Abs-b}{m} * f.d * \frac{Volumen\ disolución}{masa\ muestra} \quad [10]$$

Donde

ABS =absorbancia obtenida en espectrómetro

B =Intercepto de la curva de calibración

M = Pendiente de la curva de calibración

f.d = Factor de dilución

4.3.7.3 Azúcares simples por HPLC

Se utilizó la técnica por HPLC para la determinación específica de los principales azúcares simples en las muestras (sacarosa, glucosa, fructosa). El método consiste en la extracción de los azúcares de la muestra y la inyección del extracto en una columna Zorbax Carbohydrate Phenomenex Luna NH₂. La cuantificación e identificación de los azúcares se realiza inyectando estándares de concentración conocida de estos, los cuales se utilizan para calibrar el equipo en cuanto a concentraciones y para la identificación por medio de los tiempos de

retención. Los resultados se expresan como concentración de sacarosa, fructosa y glucosa (mg compuesto/L).

4.3.7.4 Cenizas

Para la determinación del contenido de cenizas en el extracto obtenido, se siguió el procedimiento basado en el método AOAC 950. (AOAC, 2005). En un crisol, previamente incinerado y enfriado a temperatura ambiente, se pesan 5-10 g del extracto. Luego, la muestra se seca en la estufa de convección a 100 °C, con el propósito de, después, quemarla en un calentador en capilla. Posteriormente, se procede a incinerar la muestra a una temperatura mayor a 525 °C en la mufla, hasta obtener cenizas blancas y masa constante. Al final, se enfrían hasta temperatura ambiente en desecador, se mide la masa final y se obtiene el contenido de cenizas a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Cenizas totales } \left(\frac{g}{100g}\right) = \frac{MCMS-MC}{MCM-MC} * 100\% \text{ [11]}$$

Donde,

MCMS: masa de crisol + masa muestra incinerada

MC: masa de crisol

MCM: masa de crisol + muestra

Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, un $\alpha = 0,05$.

4.3.7.5 Acidez titulable

La acidez se determinó por medio del método AOAC 942.15 (AOAC, 2005), utilizando un titulador automático (Metrohm[®], Suiza), el cual determina el volumen consumido de la disolución valorante de NaOH 0,1 M. Cabe destacar que la acidez se expresa en un porcentaje que indica los gramos de ácido acético obtenidos en 100 g de extracto. En el caso del extracto en estudio, se expresa como porcentaje de ácido acético.

4.3.7.6 Determinación de actividad antioxidante (ORAC)

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto (ORAC hidrofílico) se realizó siguiendo el método de Huang *et al.* (2002). Este procedimiento se basa en el seguimiento, por espectrofotometría de fluorescencia, de la cinética de reacción, en la que la muestra contrarresta el ataque de radicales libres a una disolución de fluoresceína. Como patrón antioxidante, se utiliza una disolución Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxílico) y la sustancia AAPH (2,2'-Azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro) como fuente de radicales libres. La concentración en la muestra, reportada como μmol de Trolox equivalentes (TE)/L de muestra, se obtuvo por interpolación del área bajo la curva respecto a la concentración de Trolox. Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un $\alpha=0,05$.

4.3.7.7 Humedad

El contenido de humedad del extracto se midió siguiendo el método de humedad de la AOAC 902.01 (AOAC, 2005). Para esto, se utilizan cápsulas de metal con tapa que se secan de previo con 1 cucharadita de arena, a 100°C por 1 hora en una estufa de convección. Se transfieren las cápsulas a un desecador y se dejan enfriar. Más adelante, se pesan, se añaden 10 mL del extracto y se mezcla la muestra. Luego, se procede a secar la muestra en la estufa de convección a 60°C con vacío entre 50,8 y 84,6 kPa. Una vez seca la muestra, se enfría, se transfiere al desecador y se mide la masa cuando alcance la temperatura ambiente (masa constante). Mediante la siguiente ecuación se obtiene el contenido de humedad (AOAC, 2005).

$$\text{Humedad} = \frac{\text{MCMS} - \text{MC}}{\text{MCM} - \text{MC}} * 100\% \quad [12]$$

Donde: MCMS: masa de cápsula + masa muestra seca

MC: masa de cápsula

MCM: masa de cápsula + muestra

Con $n = 3$. Se utiliza el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un $\alpha = 0,05$.

4.3.7.8 Contenido de rutina

Se determinó el contenido de rutina basado en el método de Mertz *et al.* (2007). Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alto desempeño acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Shimadzu[®], EAU). Las fases móviles utilizadas fueron solución A, ácido fórmico al 2% y solución B, acetonitrilo 80% y ácido fórmico 2%. Además, se usó una columna Luna[®] 5 µm C18 100Å (Phenomenex, EUA), tamaño 150 mm x 2 mm, serie 546184-17.

Ahora bien, las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de horno 30 °C, volumen de inyección 20 µL, flujo 0,3 mL/min. A su vez, el tiempo de proceso fue de 35 min con el siguiente gradiente: 0-20 min de 5-25 % B (solvente B), 20-25 min de 25-100 % B, 25-30 min de 100-10 % B y 30-35 min de 10-5 % B. Las señales fueron identificadas según los espectros UV a 210 nm, reportadas como quercetin 3-rutinósido. Finalmente, la cuantificación se realizó empleando una curva de calibración elaborada con quercetin 3-rutinósido (la rutina se compone de varios rutinósidos, por lo que para el presente estudio se establece solamente a cuantificación de rutina (quercetin 3-rutinósido). Para esto, se preparó una disolución madre de 20 mg/L con un estándar de quercetina 3-rutinósido, y con ello, se elaboró una curva de 0,5 a 5 mg/L.

$$C_n \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{Area-b}{m} * \frac{Volumen\ disolución}{masa\ muestra} \quad [13]$$

Donde

Área = Área de integración obtenida en HPLC-DAD

b = Intercepto de la curva de calibración

m = Pendiente de la curva de calibración

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Validación del método de cuantificación de flavonoides

A continuación, en el Cuadro VIII, se muestran los parámetros de regresión lineal de la ecuación empleada para la cuantificación de los flavonoides.

Cuadro VIII. Parámetros de regresión lineal para la cuantificación de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina por espectrofotometría a 510 nm, límites y parámetros de precisión del método.

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación R^2	0,9982
Pendiente	0,0299
Desviación estándar pendiente	0,0007
Intercepto	0,0474
Desviación estándar intercepto	0,0197
Límites	Valor (mg/L Epicatequina)
Detección (LD)	0,74
Cuantificación (LC)	2,47
Parámetro	RSD (%)
Repetibilidad	2,69
Reproducibilidad	5,65
Horrat (10 mg/L)	0,5

De las tres curvas elaboradas, se eligió la que tiene un coeficiente de correlación mayor (ver Figura 40 en el Anexo). Los valores de los LD, LC, reproducibilidad y repetibilidad se basan en las 3 curvas realizadas.

El coeficiente de correlación R^2 de la curva de calibración muestra una buena correlación de linealidad entre la absorbancia y la concentración equivalentes de epicatequina (EE) en

disolución. A partir de los parámetros anteriores se obtuvo la ecuación [14] que permite obtener la concentración de flavonoides como EE en los extractos a partir del valor de su absorbancia.

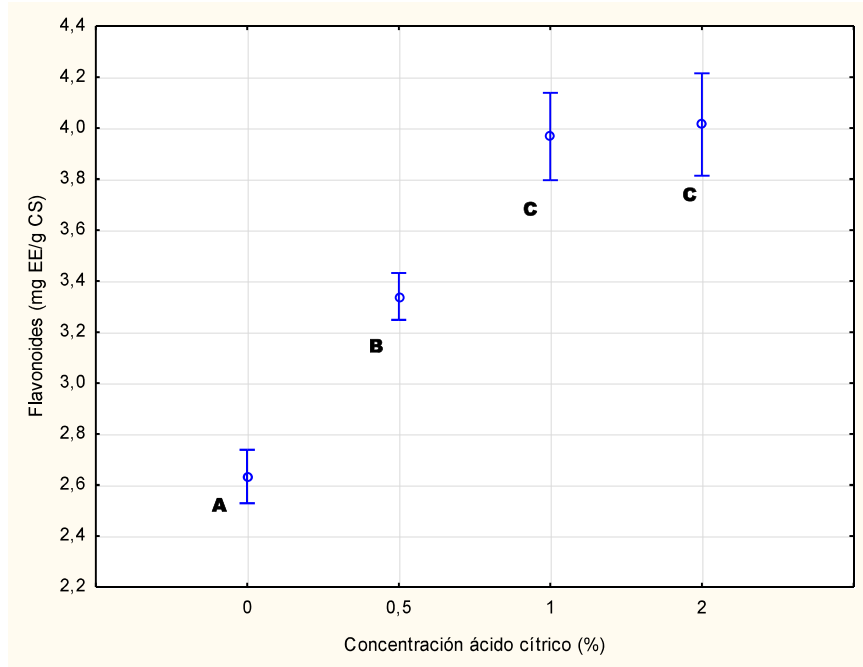
$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{mgEE}}{\text{g ms}} \right) = \frac{\text{Abs}-0,0474}{0,0299} \quad [14]$$

Se definió como ámbito de trabajo un rango de concentraciones entre 4,4 y 19,25 mg/L de (-)-epicatequina que corresponden a absorbancias de 0,181 a 0,625.

De igual modo, se obtuvo un coeficiente de regresión superior a 0,99, lo cual evidencia la linealidad del método en dicho ámbito de trabajo; por otro lado, las desviaciones tanto de la pendiente como del intercepto son relativamente bajas. Los límites de detección y cuantificación indican que las mediciones de las muestras son confiables, con una repetibilidad de 2,69 %, el cual es un porcentaje bajo y demuestra que es una medida segura. A su vez, a partir de las características obtenidas en la validación del método de cuantificación de flavonoides por el método de cloruro de aluminio, se considera que este es efectivo para relacionar la señal de absorbancia con el contenido de flavonoides. De hecho, según el coeficiente Horrat (relación en tres la desviación deseada y la real) el método es aceptable ($0,5 < \text{Horrrat} < 2$)

5.2 Determinación de las condiciones del tratamiento de acidificación de las cáscaras de plátano verde para reducir la degradación enzimática de los flavonoides

En la gráfica de la Figura 24, se aprecia el efecto del uso de diferentes concentraciones de ácido cítrico a las cáscaras de plátano recién peladas, sobre la concentración de flavonoides en el producto luego de su secado. Este tratamiento, de lavado ácido, se realizó para reducir la degradación enzimática y por ello, favorecer la conservación de los flavonoides en la cáscara seca.



Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas para $\alpha = 0,05$, $n = 3$

Figura 24. Efecto de los tratamientos de lavado con diferentes concentraciones de ácido cítrico sobre el contenido de flavonoides extraíbles en las cáscaras de plátano.

Como se puede observar en la Figura 24, el tratamiento que provoca la mayor concentración de flavonoides en el producto en polvo se obtiene al emplear un tratamiento con soluciones de 1 o 2% de ácido cítrico a las cáscaras previo a su secado. Asimismo, se observa que la concentración de flavonoides en las cáscaras, para los tratamientos con 1 % y 2 % de ácido, no se identificaron diferencias significativas, por lo que la concentración del 1 % es la mejor para conservar los flavonoides y prevenir su deterioro enzimático por enzimas como la polifenoloxidasa (PFO).

Como mencionan Escalante *et al.* (2017) y Chong *et al.* (2011), la cáscara de plátano contiene cantidades importantes de PFO, cuya actividad máxima se encuentra a pH de 6,5 y se inactiva a valores de pH menores de 3, dada la pérdida del ion Cu^{2+} (Zawistowski, Biliaderis y Eskin, 1991), de manera que se evidencia la efectividad de la utilización de ácido cítrico. Por otra parte, estudios han demostrado que el ácido cítrico provoca inhibición a partir de una concentración de 50 mM (0,5 %). Resultados similares fueron reportados por Sojo *et al.* (1998) y Yang *et al.* (2001) para diferentes musáceas. A propósito, según Suttirak

et al., 2010, a valores de pH por debajo de 4, la PFO tiene poca actividad, debido a la pérdida del ión cobre en el sitio activo. En la Figura 25, se puede observar como la molécula del ácido cítrico puede quelar el cobre requerido para la acción de la enzima.

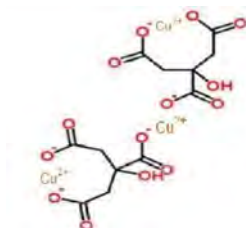


Figura 25. Explicación de forma quelante de la molécula de ácido cítrico.

Por tanto, la adición de ácido cítrico permite inhibir la acción de las enzimas PFO de buena forma. En el caso del presente estudio, el tratamiento de las cáscaras de plátano con una disolución de 1% de ácido cítrico por 5 min, es suficiente para reducir de forma significativa la degradación enzimática de flavonoides, tanto por el descenso en el pH, como por su efecto quelante sobre el cobre que impide la función del sitio activo de la enzima. Se observa que existe un efecto de conservación de los flavonoides al adicionar ácido cítrico a las cáscaras de plátano, lo cual comprueba que la PFO es sensible a los cambios de acidez y al efecto quelante de este mismo. Por tanto, el resultado obtenido se convierte en una propuesta viable y apta para la aplicación de una operación de estabilización de los flavonoides en cáscaras de plátano previa a su procesamiento.

Cabe destacar que un resultado importante de la presente investigación fue el escalamiento que se hizo, a nivel de planta piloto de esta operación de estabilización de las cáscaras de plátano, para la obtención del sustrato con alto potencial bioactivo, a diferencia de otras investigaciones encontradas en la literatura, las cuales se han enfocado en un proceso de laboratorio. Con procedimiento realizado, se buscó una opción viable para la industria actual, con equipos y operaciones unitarias accesibles.

De esta manera, además de la acidificación de las cáscaras con ácido cítrico al 1 % (como medio de estabilización de los flavonoides), el proceso de secado con aire caliente con temperaturas entre 50-60 °C hasta una humedad cercana al 12 % y su posterior molienda en

un molino de martillos, descrito en la Figura 18, permite la obtención, a nivel de planta piloto, de un sustrato de cáscara de plátano seca con una cantidad importante de componentes bioactivos. Lo anterior, puede ser un avance y una propuesta interesante para un posterior escalamiento. A su vez, permite poner en evidencia que si bien, los procesos controlados en laboratorio, como por ejemplo la liofilización, permiten mayores rendimientos, el proceso empleado tiene como ventaja que es fácilmente replicable.

5.3 Evaluación de la combinación de solventes para obtener un extracto con la mayor concentración de flavonoides, mediante un diseño de mezclas

Para los extractos obtenidos en las corridas del diseño de mezclas, se obtuvieron las concentraciones de flavonoides que se muestran en el Cuadro IX.

Cuadro IX. Concentración promedio de flavonoides en extractos obtenidos de cáscara de plátano bajo diferentes condiciones de extracción del diseño de mezclas empleado.

Tratamiento	Proporción de solventes			Rendimiento de Flavonoides (mg EE/ g CS)
	Agua	Acetona	Etanol	
1	1,0	0,0	0,0	2,31 ± 0,04
2	0,0	1,0	0,0	0,48 ± 0,03
3	0,0	0,0	1,0	0,35 ± 0,01
4	0,50	0,50	0,0	4,57 ± 0,03
5	0,50	0,0	0,50	3,84 ± 0,03
6	0,0	0,50	0,50	0,62 ± 0,02
7	0,667	0,167	0,167	3,78 ± 0,03
8	0,167	0,663	0,167	4,16 ± 0,04
9	0,167	0,167	0,667	3,53 ± 0,03
10	0,333	0,333	0,333	4,18 ± 0,05
11	0,333	0,333	0,333	4,32 ± 0,04
12	0,333	0,333	0,333	4,30 ± 0,03

5.3.1 Selección del modelo de regresión

Para la selección del modelo de regresión, se evaluó la probabilidad de los modelos (p), los coeficientes de determinación (R^2), coeficientes de determinación ajustados (R^2_{ajd}), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de residuos, análisis que se muestran en el Cuadro X.

Cuadro X. Parámetros de evaluación para la selección del modelo de mejor ajuste.

Modelo	p	R^2	R^2_{ajd}	p_{fa}	Distribución de residuos
Lineal	0,3504	0,2078	0,0318	0,0017	Aleatoria
Cuadrático	0,0061	0,8984	0,8138	0,0074	Aleatoria

El análisis de varianza se presenta en los anexos, $\alpha = 0,05$

El modelo de regresión que mejor se ajusta a los resultados experimentales es aquel que sea significativo, que tenga los valores R^2 y R^2_{ajd} mayores a 0,8, una p_{fa} no significativa y que presente una distribución de residuos aleatoria. Dado que el modelo cuadrático cumple estas características, se considera que es el que mejor describe el comportamiento de extracción de flavonoides, en relación con los solventes utilizados.

5.3.2 Ecuación del modelo de regresión y la superficie de respuesta obtenidos

A continuación, en la Figura 26, se muestra el diagrama de Pareto en el cual se aprecian los factores significativos en el modelo cuadrático obtenido.

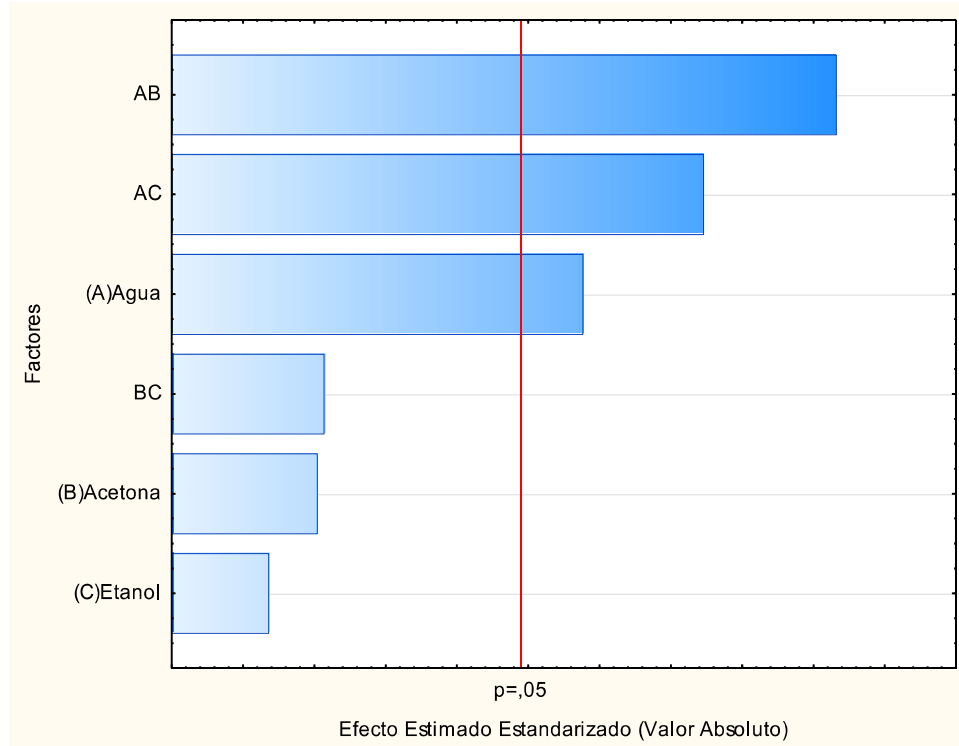


Figura 26. Diagrama de Pareto para los factores del modelo cuadrático obtenido de los resultados del diseño de mezclas utilizado.

Los coeficientes obtenidos para cada factor indican el peso de su influencia en la concentración de flavonoides extraídos. En primer lugar, la interacción de las fracciones agua-acetona es el factor que presenta la contribución mayor; en segundo lugar, se encuentra la interacción agua-etanol, ambas con efecto positivo, en tanto que el factor simple de agua contribuye de menor forma. En definitiva, la fracción de solventes puros acetona y etanol no contribuyen de forma significativa a la extracción de los flavonoides, así como tampoco su mezcla; y por ello, estos componentes no se toman en cuenta en el modelo. La ecuación del modelo obtenido considerando todas las variables se muestra a continuación:

$$\text{Flavonoides} \left(\frac{\text{mg}_{EE}}{\text{g}_{CS}} \right) = 1,96 \text{ agua} + 14,17 \text{ agua} * \text{acetona} + 11,34 \text{ agua} * \text{etanol} [15]$$

En la Figura 27, se ilustran las superficies de respuesta del modelo obtenido que muestran el comportamiento de la concentración de los flavonoides, de acuerdo con la composición de la mezcla de solventes usada para su extracción.

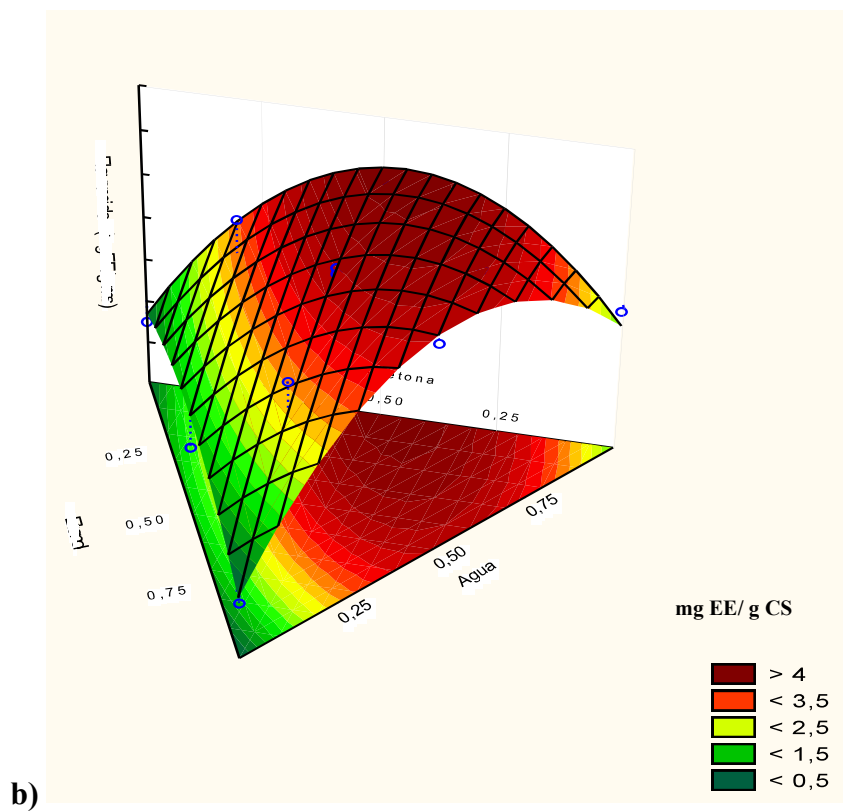
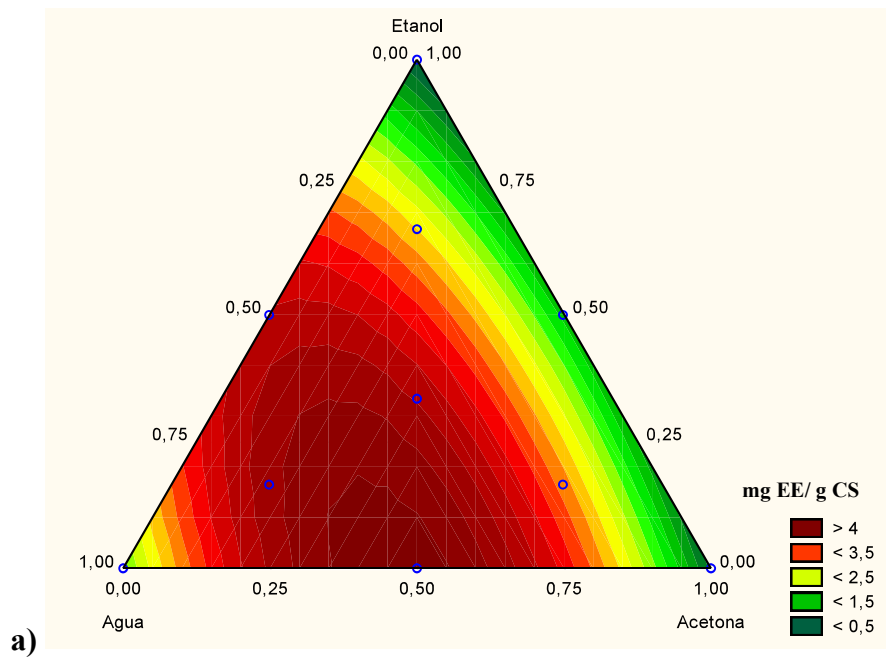


Figura 27. Superficie de respuesta del modelo obtenido en la evaluación de la mezcla de solventes para la extracción de flavonoides de la cáscara de plátano. a) Vista 2D b) Vista 3D.

Un factor importante que se debe de considerar en la extracción de componentes son las propiedades químicas del solvente (Valadez *et al.*, 2017). Generalmente, para la extracción de polifenoles y flavonoides, se utilizan mezclas de solventes para igualar la polaridad de estos compuestos que presentan una polaridad relativa de 0,762 (Ignat *et al.*, 2011). En el cuadro XI, se observan diferentes propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados en la extracción de flavonoides de la cáscara de plátano verde del presente estudio.

Cuadro XI. Propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados para extracción de flavonoides de cáscara de plátano verde.

Sustancia	Polaridad relativa	Viscosidad (cP)	Densidad (g/mL)
Acetona	0,355	0,32	0,786
Agua	1,000	1,00	1,000
Etanol	0,654	1,20	0,789

Fuente: (Reichardt y Welton, 2003)

En el cuadro XI, se puede observar como la acetona y el etanol puros poseen una polaridad relativa menor a 0,7, mientras que la polaridad de los flavonoides es mayor (Ignat *et al.*, 2011), por lo que estos solventes puros no son efectivos en la extracción. De la misma manera, la polaridad del agua tampoco logra acercarse a la polaridad relativa de los flavonoides por si sola, sino más bien es superior. Por esta razón, se debe usar una mezcla de solventes que, en conjunto, logren dar un valor similar a 0,76. Cabe agregar un factor importante, un solvente orgánico no posibilita una buena extracción por sí solo, sino que provoca una deshidratación de las células, lo cual no permite una difusión efectiva (Sant'Anna *et al.*, 2012).

Es importante destacar que, aunque la mezcla agua-etanol brinda buenos niveles de extracción de los flavonoides, con la mezcla agua-acetona se logran las mejores condiciones de extracción, esto quizá porque la mezcla con acetona, al tener menor viscosidad, puede difundirse mejor entre las partículas del sustrato. También, se puede utilizar una mezcla de agua-acetona-etanol y obtener buenos resultados de extracción.

5.3.3 Optimización de la mezcla de solventes para la extracción de flavonoides

A partir de la ecuación 15, se estableció la composición de la mezcla solvente que produce el máximo de concentración de flavonoides en el extracto, es una mezcla acetona-agua 55:45. ($4,87 \pm 1,44$ mg EE/g CS). Este resultado concuerda con lo planteado en la ecuación del modelo, en donde la interacción agua-acetona es la que tiene un mayor efecto en la extracción del compuesto de interés.

En efecto, con la combinación de ambos solventes, se logra una polaridad intermedia a la que posiblemente presentan una mejor afinidad los flavonoides, los cuales tienen un carácter parcialmente polar (Corradini *et al.*, 2011; Yapo *et al.*, 2013).

El resultado obtenido en este apartado es similar a lo que otros autores han obtenido en cáscaras de musáceas verdes o maduras, comúnmente el banano, en especial el trabajo de Passo Tsamo *et al.* (2015a). Por ello, de forma general, se puede decir que el uso de una mezcla acetona- agua cercana a 50:50 o alguna otra mezcla que logre igualar la polaridad de los flavonoides (etanol-agua o etanol-agua-acetona) permite obtener una buena extracción de los flavonoides de la cáscara de plátano verde seca y molida. El resultado obtenido también coincide con el reportado por Vu *et al.* (2016). Este autor plantea que un aumento en la concentración de acetona hasta un valor máximo de 60 % en la mezcla acetona-agua condujo a un aumento en el rendimiento de la concentración de los polifenoles totales.

Araujo *et al.* (2016) mencionan que el comportamiento de la extracción en las mezclas de agua y etanol es, en un inicio, de un aumento en la concentración de compuestos extraídos hasta un nivel máximo en mezclas 50-60 %, v/v de etanol y luego, comienza a disminuir por encima del 60 % (v/v) de etanol, lo cual se explica por los cambios en el valor de polaridad. El agua es un solvente polar (polaridad 1), mientras que el etanol y acetona tienen baja polaridad relativa al agua, pero ambos se pueden mezclar para lograr la polaridad óptima de extracción, similar a la polaridad relativa de los flavonoides.

La mezcla de un solvente orgánico y agua cerca del 50 % (v/v), en general, proporciona mejores resultados en la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides (Turkmen *et al.*, 2007). Asimismo, el uso de solución acuosa promueve la hidratación de las partículas

facilitando la penetración del disolvente orgánico y se intensifica la transferencia de masa (Ghitescu *et al.*, 2015). Por su parte, dada la estructura química de los flavonoides, estos se extraen mejor en compuestos polares o parcialmente polares, como agua, acetona o etanol (Vu *et al.*, 2018).

En su estudio, Fidriany *et al.* (2018) probaron el uso de hexano, acetato de etilo y etanol como solventes de extracción de flavonoides en cáscaras de banano, del cual se obtuvo el mayor rendimiento con etanol. Por otro lado, diferentes concentraciones de acetona, etanol, hexano, metanol y agua fueron utilizadas por Yee *et al.* (2016) para extracción de polifenoles en banano y subproductos, y mostró una mejor efectividad con una mezcla etanol-agua.

Por otra parte, González-Montelongo (2010) muestra que el uso de metanol, etanol, acetona y agua puros no tiene un impacto importante en la extracción de polifenoles; este autor obtuvo la mejor extracción empleando una mezcla agua-acetona en una relación 1:1. A su vez, Singhal y Ratra (2013) comprobaron que es mejor solvente de extracción el metanol frente al hexano, en tanto que Yee *et al.* (2016) reportan su mejor rendimiento en contenido fenólico total con 70 y 90 % de acetona en agua. Otras mezclas de disolventes que fueron utilizadas para la extracción de compuestos en musáceas se muestran en el cuadro XII.

Cuadro XII. Solventes utilizados en investigaciones de extracción de polifenoles en cáscaras de musáceas.

Solventes	Relación	Referencias
Metanol-agua	80:20	China <i>et al.</i> , 2011; Fernández <i>et al.</i> , 2016
Etanol-agua	10:90	Baskar <i>et al.</i> , 2011
Metanol- agua-ácido fórmico	50:48,5:1,5	Gomes <i>et al.</i> , 2014
Etanol-agua	54:46	Araujo <i>et al.</i> , 2016
Acetona-agua	80:20	Aboul <i>et al.</i> , 2016
Acetona-agua-ácido acético	50:49:1	Passo Tsamo <i>et al.</i> , 2015b

Como se observa en el Cuadro XII, la relación obtenida en el presente estudio es similar con la de otras investigaciones, por lo que para musáceas del tipo AAB de baja madurez la mezcla solvente empleada permite una extracción eficiente. Ahora bien, el empleo de una mezcla de agua: acetona puede tener implicaciones en su manejo industrial; dado que es reconocido como seguro para alimentos a concentraciones muy bajas, por debajo de 30 mg/L (como solvente residual en oleoresinas y extractos) (FDA, 2019); además, es muy volátil e inflamable, y por sus propiedades puede causar daños a equipos que no se encuentren fabricados con materiales resistentes a la acetona. No obstante, se observa que el uso de una mezcla agua: etanol brinda también buenos resultados, y se puede considerar una mejor aplicación industrial ya que es reconocido como seguro para fines alimentarios además de ser compatible con muchos de los materiales usados en los equipos de proceso de alimentos.

5.3.4 Validación del modelo

La validación del modelo se realizó utilizando la mezcla de solventes 55:45 acetona-agua que maximiza la concentración de flavonoides en el extracto. El valor predicho por el modelo y el obtenido en las corridas de verificación se muestran en el Cuadro XIII.

Cuadro XIII. Comparación de la concentración de flavonoides predicha con un nivel de confianza del 95% por el modelo de mezcla óptima de solventes (55:45 acetona - agua) y la lograda en corridas de verificación.

Valor	Concentración de flavonoides (mg EE/g) ¹
Predicho por el modelo	4,87 ± 1,44
Experimental	4,76 ± 0,19

¹n = 3

Como se aprecia en el cuadro XIII, la concentración de flavonoides, obtenida en las corridas de validación, se traslapa con el valor predicho por el modelo, con un nivel de confianza del 95%. Por tanto, el modelo obtenido predice, adecuadamente, la concentración de flavonoides en el extracto. En la Figura 28, se muestra el aspecto del extracto obtenido con el nivel óptimo de mezcla de solventes.



Figura 28. Extracto de flavonoides obtenido mediante la combinación óptima de solventes (acetona agua 55:45) en cáscara de plátano verde.

5.4 Evaluación de las condiciones de extracción de los flavonoides de la cáscara de plátano mediante un diseño central compuesto

En el Cuadro XIV, se evidencia la concentración de flavonoides y de rutina obtenidos en los extractos de los diferentes tratamientos del DCC, al utilizar la mezcla de solventes óptima (acetona-agua 55:45).

Cuadro XIV. Concentración de flavonoides y rutina obtenida en extractos a partir de la cáscara de plátano para las corridas del DCC.

Tratamiento	Variable descodificada			Rendimiento de los compuestos	
	R _{ss} (g solv/g)	T (°C)	Ácido acético (%)	Flavonoides (mg EE/g CS)	Rutina (µg/g CS)
1	7,6	27,7	0,2	3,36 ± 0,04	12,78 ± 0,02
2	12,4	27,7	0,2	3,44 ± 0,05	15,91 ± 0,12
3	7,6	44,3	0,2	4,65 ± 0,08	14,75 ± 0,03
4	7,6	27,7	0,8	2,54 ± 0,03	11,98 ± 0,01
5	12,4	44,3	0,2	3,36 ± 0,11	14,77 ± 0,05
6	7,6	44,3	0,8	4,57 ± 0,09	15,03 ± 0,04
7	12,4	27,7	0,8	2,82 ± 0,07	15,57 ± 0,12
8	12,4	44,3	0,8	3,06 ± 0,07	17,27 ± 0,02
9	6,0	36,0	0,5	4,27 ± 0,03	11,84 ± 0,00
10	14,0	36,0	0,5	3,03 ± 0,06	16,23 ± 0,03
11	10,0	22,0	0,5	3,28 ± 0,09	16,50 ± 0,01
12	10,0	50,0	0,5	4,47 ± 0,05	17,38 ± 0,07
13	10,0	36,0	0,0	4,55 ± 0,04	14,29 ± 0,05
14	10,0	36,0	1,0	3,22 ± 0,04	15,62 ± 0,08
15	10,0	36,0	0,5	3,68 ± 0,05	16,29 ± 0,07
16	10,0	36,0	0,5	3,27 ± 0,05	15,66 ± 0,11
17	10,0	36,0	0,5	3,52 ± 0,02	16,33 ± 0,03
18	10,0	36,0	0,5	3,73 ± 0,02	16,02 ± 0,09
19	10,0	36,0	0,5	3,32 ± 0,07	15,34 ± 0,05
20	10,0	36,0	0,5	3,33 ± 0,08	16,38 ± 0,08

5.4.1 Modelo de regresión y superficie de respuesta obtenidos del diseño central compuesto

A partir de los resultados de la concentración promedio de concentración de flavonoides y rutina obtenidos para los tratamientos del diseño central compuesto utilizado, se generó un modelo cuadrático que relaciona las variables respuesta con las condiciones de extracción evaluadas. Los parámetros obtenidos se muestran en el Cuadro XV.

Cuadro XV Parámetros estadísticos del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides y rutina a partir del cascara de plátano verde.

Parámetro	Flavonoides (mg EE/g CS)	Rutina (μg /g CS)
p	<0,0001	<0,0001
R²	0,8964	0,9367
R²_{ajd}	0,8031	0,8797
p_{fa}	0,1476	0,1932
Distribución de residuos	Aleatoria	Aleatoria

Para ambos compuestos, el modelo obtenido se adecua a las condiciones experimentales, puesto que la probabilidad es significativa ($p < 0,005$), los datos estadísticos R^2 y R^2_{ajd} son mayores a 0,8, se presenta una p_{fa} no significativa y la distribución de residuos es aleatoria. Por tanto, se considera que los modelos cuadráticos describen el comportamiento de extracción de flavonoides y rutina, sobre la base de las condiciones de extracción con relación solvente sustrato (R_{ss}), temperatura (T) y concentración de ácido acético (CAA). Los factores del modelo cuadrático que resultaron significativos para la extracción de flavonoides se muestran en el siguiente diagrama de Pareto mostrado en la Figura 29.

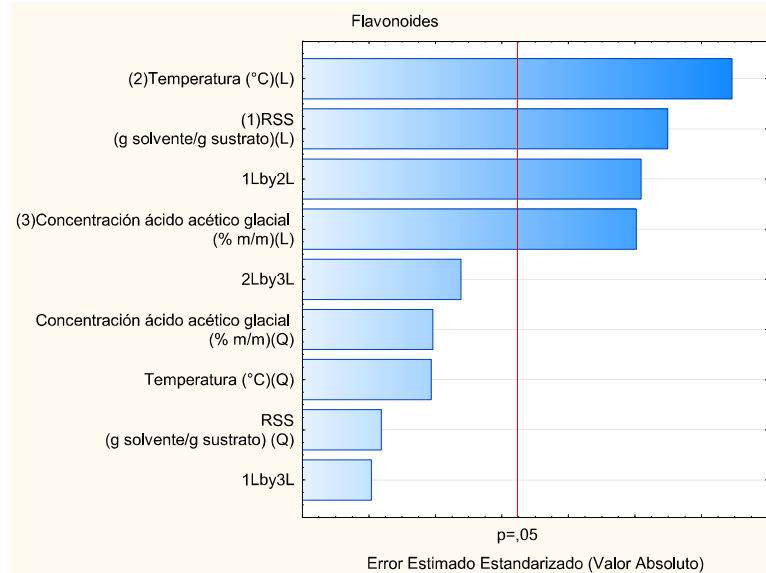


Figura 29. Diagrama de Pareto de los principales factores del modelo cuadrático de superficie de respuesta para la extracción de flavonoides en cáscara de plátano verde.

Como se observa en el diagrama de Pareto con los efectos estandarizados, la temperatura lineal es el factor más influyente de forma positiva, seguido de la R_{SS} lineal que afecta de forma negativa; luego, la interacción R_{SS} y temperatura y la concentración de ácido acético glacial, que afectan la variable respuesta concentración de flavonoides de forma negativa. El efecto de cada uno de los factores evaluados se discutirá de forma ampliada en las siguientes secciones.

La ecuación correspondiente del modelo de regresión, con todos los factores (significativos y no significativos) de las variables estandarizadas (basadas en los valores $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$ del DCC), se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 \text{Flavonoides} \left(\frac{mg_{EE}}{g_{CS}} \right) = & 3,48 - 0,33 R_{SS} - 0,012 R_{SS}^2 + 0,40 T + 0,067 T^2 - \\
 & 0,30 CAA + 0,070 CAA^2 - 0,39 R_{SS} * T - 0,0035 R_{SS} * CAA + 0,13 T * CAA \quad [16]
 \end{aligned}$$

En las siguientes figuras, se muestran las superficies de respuesta obtenidas del modelo para la evaluación de las variables temperatura, R_{SS} y concentración de ácido acético glacial.

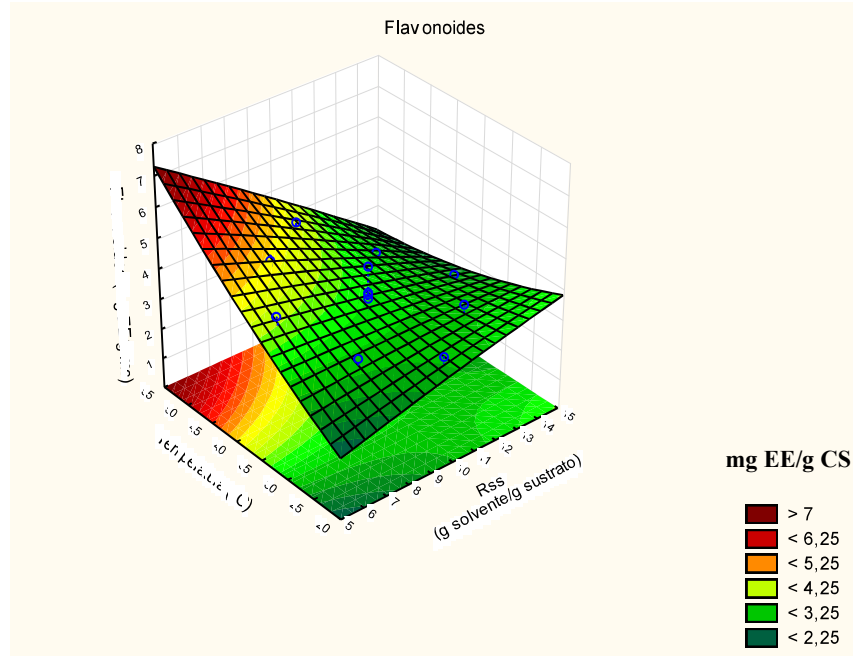


Figura 30. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de flavonoides en función de las variables temperatura y R_{ss}.

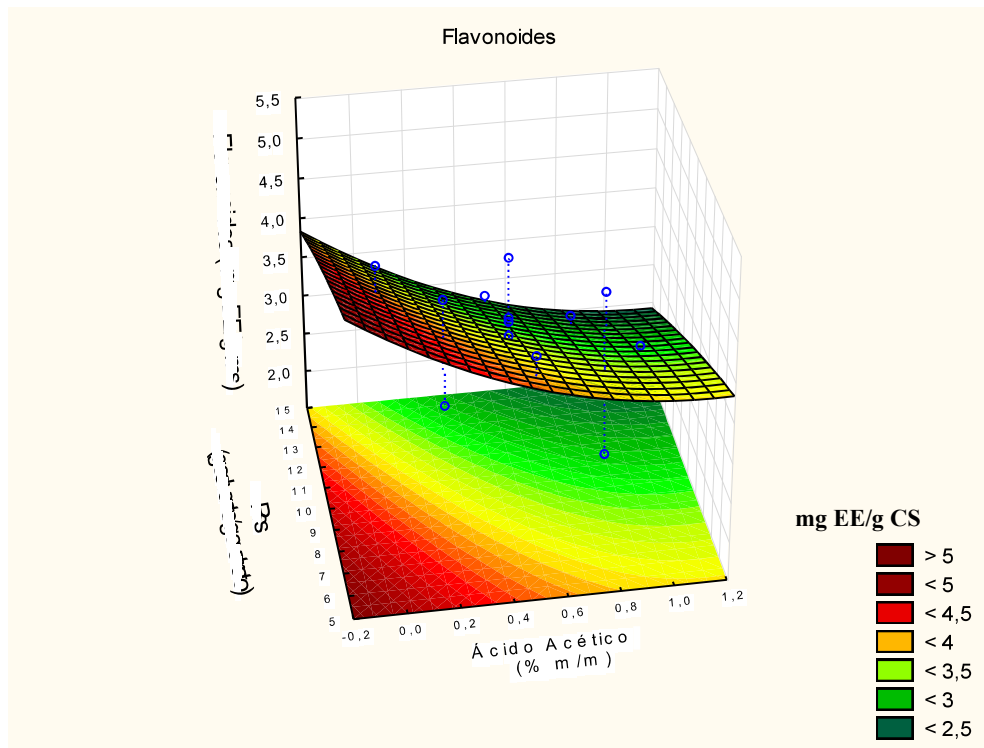


Figura 31. Superficie de respuesta del DCC de rendimiento de flavonoides en función de las variables R_{ss} y concentración de ácido acético.

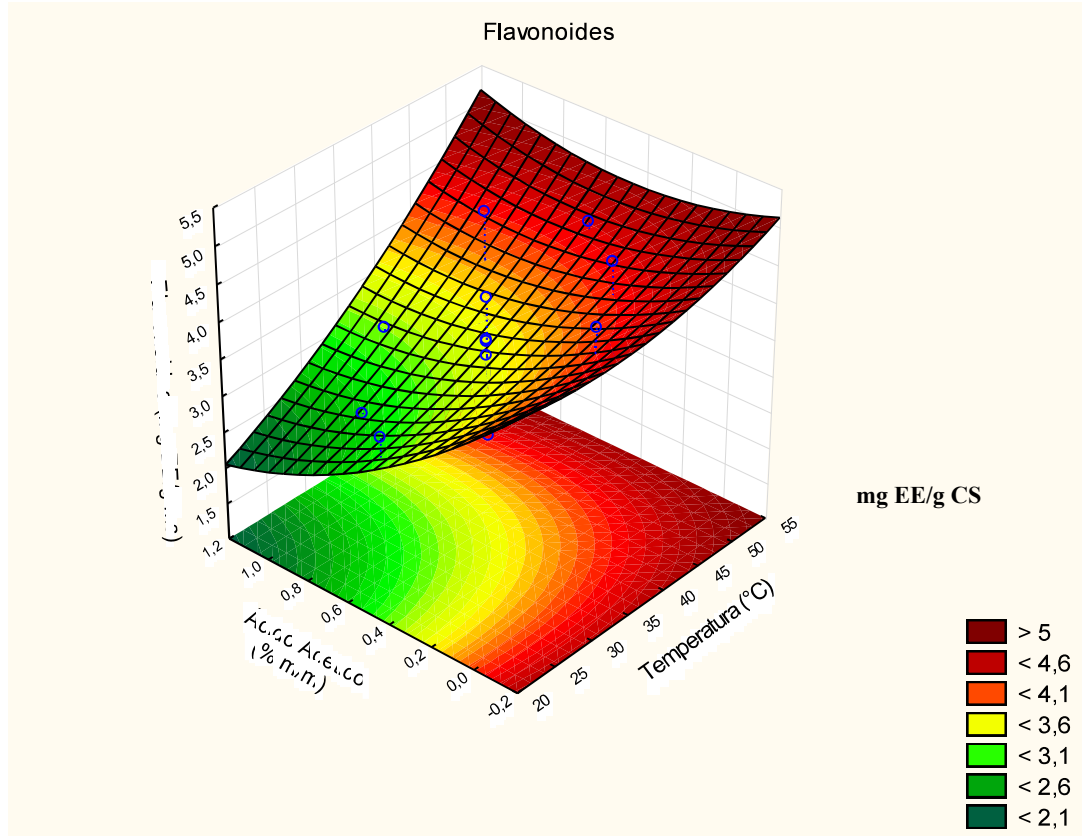


Figura 32. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de flavonoides en función de las variables temperatura y concentración de ácido acético.

Como se puede observar la Figura 30, la temperatura tiene una fuerte influencia en la extracción, ya que los valores de la concentración de flavonoides se incrementan al aumentar la temperatura, lo cual se relaciona en lo indicado con el diagrama de Pareto de la Figura 29 y la ecuación [16]. Asimismo, se aprecia como el máximo de concentración de flavonoides se produce a 50 °C, que fue la mayor temperatura evaluada. De acuerdo con Cuevas *et al.* (2017), la extracción a altas temperaturas acrecienta la eficiencia, debido a un aumento de la permeabilidad de las paredes celulares, a su degradación con liberación de su contenido, un crecimiento de la solubilidad y transferencia de masa, incremento de energía, disminución de la viscosidad del solvente y acrecentamiento de su volumen, así como reducción de la tensión superficial.

También, se favorecen las reacciones de hidrólisis y de ruptura de complejos, en las cuales se encuentran integrados diversos componentes, entre estos los flavonoides. Un aumento en

la temperatura provoca un mayor movimiento de solutos y reduce las fuerzas moleculares, lo que disminuye la energía necesaria para romper las interacciones sustrato-solvente. Por ello, se esperaba que la mayor extracción de los flavonoides se lograra a las mayores temperaturas, lo que coincide con los resultados mostrados en las superficies de respuesta obtenida.

Es importante mencionar que, con este incremento de la temperatura, la integridad de los compuestos puede verse afectada. Efectivamente, según Chaaban *et al.* (2017), los flavonoides tienen su punto de degradación térmica por encima de los 70 °C e, incluso, algunos por encima de 100°C, aunque este efecto depende de otras variables, por ejemplo: el tipo de sustrato, la granulometría, la composición proximal y de la interacción de estos flavonoides con otras moléculas.

En la Figura 30, se observa cómo un crecimiento en la R_{SS} causa un aumento del contenido de flavonoides, además, mientras que con lo mostrado en la Figura 31, se observa una leve disminución de flavonoides al aumentar la R_{SS} . En este sentido, Cuevas *et al.* (2017) explica que, por un lado, se espera que un aumento en la R_{SS} acentúe el rendimiento de la extracción, porque al haber más solvente, este tiene mayor capacidad de extraer el soluto, por la relación entre ellos. Por otro lado, si esta relación es muy alta, se da un efecto de dilución del compuesto.

Mientras, en la superficie de la Figura 32 se aprecia como a mayor temperatura, aunada con concentración baja de ácido acético, se produce la mayor extracción de flavonoides, lo cual se puede deber al efecto conjunto de ambas variables, a pesar de que dicha interacción no es significativa. Parte de este efecto, se puede explicar por una mayor solubilidad, por la hidrólisis de compuestos y por una mayor ruptura celular (Watson, 2019; Spencer *et al.*, 2000).

En el estudio realizado por Vu *et al.* (2016), se reporta que, dentro de las variables estudiadas, el orden impacto en la extracción es el siguiente: concentración de acetona > tiempo de extracción ultrasonido > temperatura > R_{SS} , lo cual coincide con los resultados del presente estudio.

La información obtenida se resume en la ecuación [17] la cual toma en cuenta los valores reales de las variables con todos los factores (significativos y no significativos), se muestra a continuación:

$$\text{Flavonoides} \left(\frac{\text{mg}_{EE}}{\text{g}_{CS}} \right) = -1,33 + 0,623 R_{SS} - 0,00237 R_{SS}^2 + 0,149 T + 0,00097 T^2 - 3,64 CAA + 0,777 CAA^2 - 0,0197 R_{SS} * T - 0,00487 R_{SS} * CAA + 0,0535 T * CAA \quad [17]$$

La otra variable respuesta estudiada en el DCC fue el rendimiento de extracción de la rutina, dado que se ha reportado es un flavonoide mayoritario en las musáceas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Los factores que resultaron significativos para la extracción de rutina se muestran en el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 33.

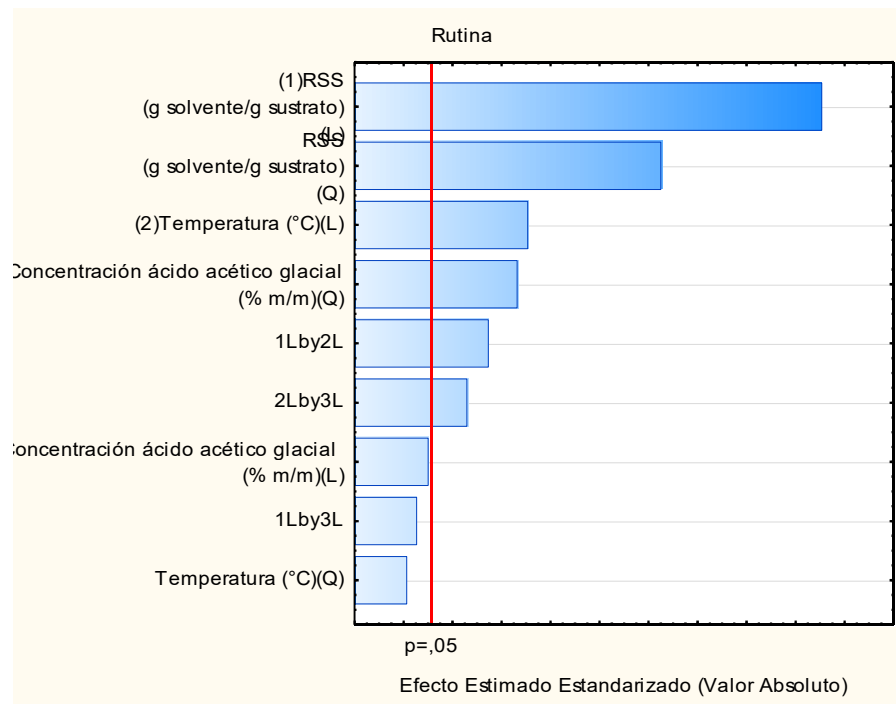


Figura 33. Diagrama de Pareto del efecto de las variables de extracción en el rendimiento de rutina.

A partir de los resultados obtenidos, se obtuvo la siguiente ecuación [18] con todos los factores (significativos y no significativos) de las variables normalizadas (basadas en los valores $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$ del DCC) del modelo que describe la extracción rutina.

$$Rutina \left(\frac{mg \text{ rutina}}{g \text{ CS}} \right) = 16,02 + 1,19 R_{SS} - 0,80 R_{SS}^2 + 0,51T + 0,22 T^2 - 0,28CAA - 0,48 CAA^2 - 0,55 R_{SS} * T + 0,33 R_{SS} * CAA + 0,49 T * CAA \quad [18]$$

En el diagrama de Pareto y en la ecuación del modelo, se puede apreciar cómo los factores lineal y cuadrático de la R_{SS} son los mayores contribuyentes en el modelo, uno positivo y el otro negativo; seguido se encuentra el factor de la temperatura que afecta de forma positiva la concentración de rutina, en tanto que la concentración de ácido acético cuadrática provoca un efecto negativo. Finalmente, se presentan dos interacciones: R_{SS} con T y con CAA . El coeficiente más alto, en forma positiva, es el asociado a la variable R_{SS} y el más bajo, de manera negativa, es el asociado a la concentración de ácido acético al cuadrado

En las Figuras 34 a 36, se muestran las superficies de respuesta obtenidas del modelo que describe el rendimiento de rutina obtenido en función de las variables temperatura, R_{SS} y concentración de ácido acético glacial.

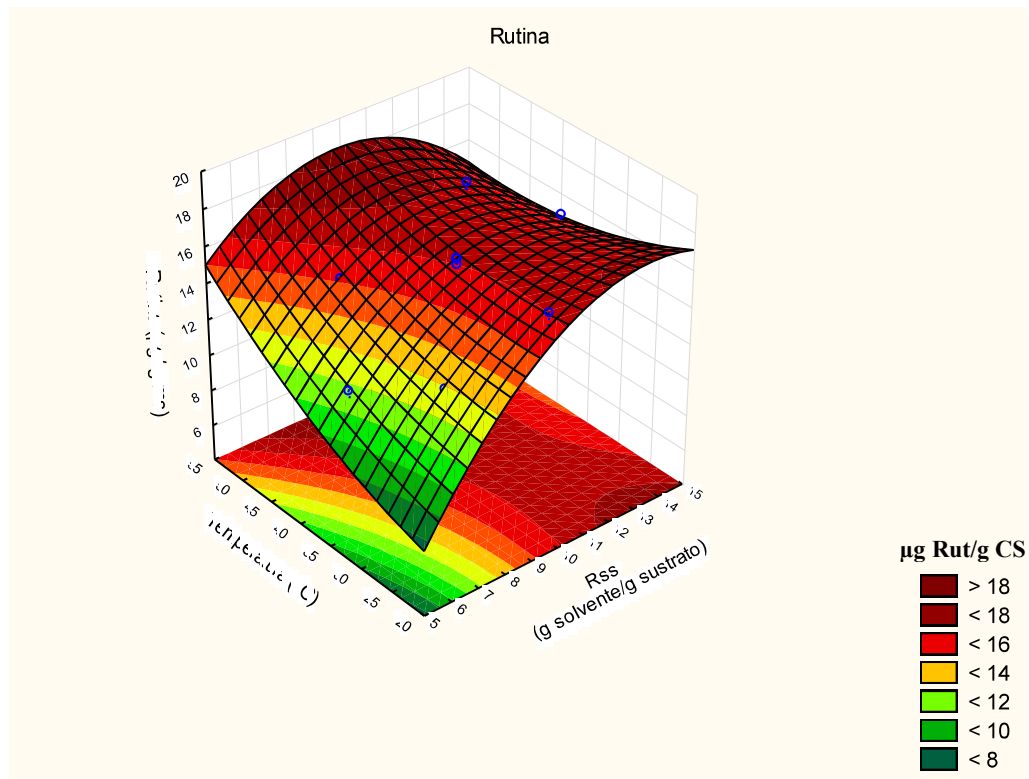


Figura 34. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables temperatura y R_{SS} .

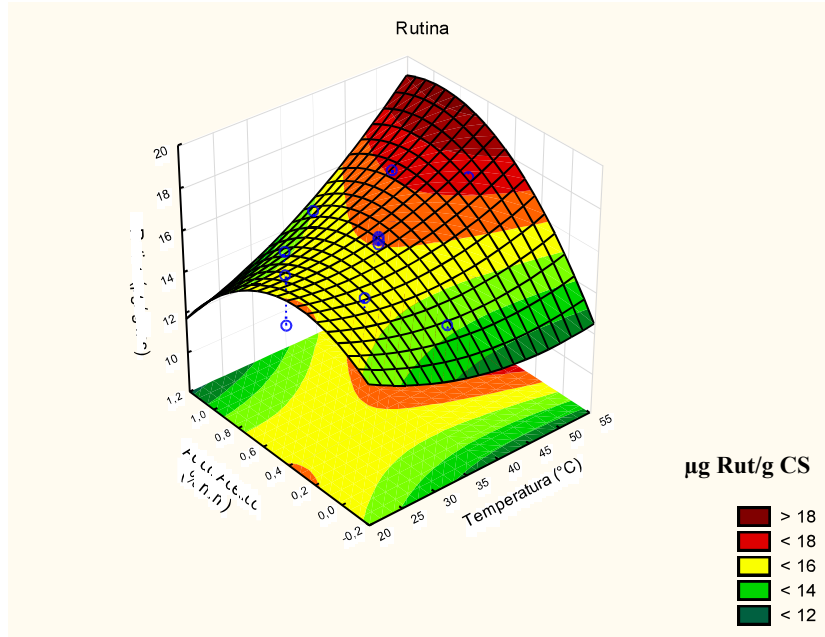


Figura 35. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables temperatura y concentración de ácido acético.

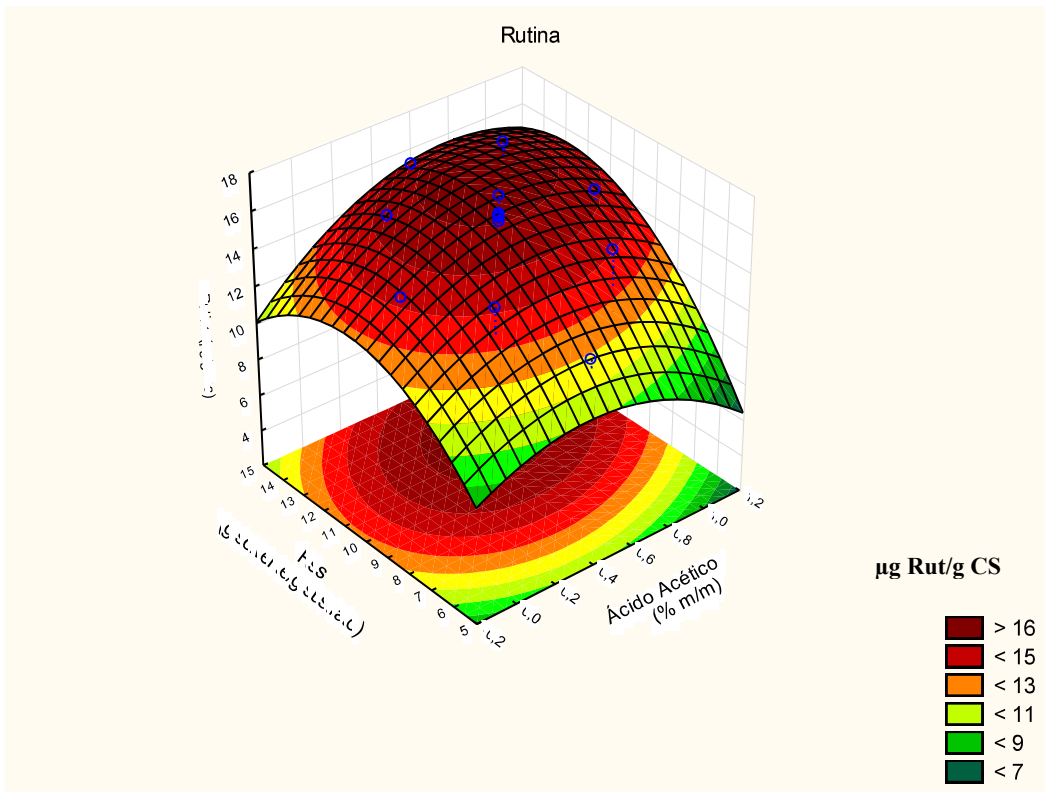


Figura 36. Superficie de respuesta del DCC del rendimiento de rutina en función de las variables concentración de ácido acético y R_{ss}.

En las superficies de respuesta de las Figuras 34 y 36, se observa como la cantidad de rutina extraída aumenta con el valor de la R_{SS} y alcanza un máximo para la relación 14:1, con valores de CAA y T altos. Como se explicó con los flavonoides, un incremento de la R_{SS} acrecienta los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos; no obstante, llega un punto donde se alcanza un máximo y la concentración comienza a decaer, debido a un efecto de dilución (Cuevas *et al.*, 2017). Lo anterior se debe a que, al haber más solvente, éste tiene mayor capacidad de extraer el soluto, efecto contrario, si hay demasiado solvente, se agota el soluto y la eficiencia decae, por un efecto de dilución (Cuevas *et al.*, 2017).

Por otra parte, en cuanto al efecto de la concentración de ácido acético sobre la extracción de flavonoides y rutina (Figuras 35 y 36), se evidencia un máximo de rutina para una CAA alrededor de 0,8 %, lo cual se explica de igual manera que en los flavonoides, una pequeña cantidad puede permitir hidrólisis de los compuestos que tienen polifenoles ligados; sin embargo, llega un punto de inflexión y la adición de ácido puede ser contraproducente, hasta degradar los polifenoles; asimismo, propiciar reacciones en medio ácido.

También, en las Figuras 34 y 35 se demuestra cómo al aumentar la temperatura se logran mayores extracciones de rutina, especialmente a valores altos de ácido acético, lo cual se evidencia en un factor de interacción en la ecuación [17]. De acuerdo con Cuevas *et al.* (2017), este efecto de la temperatura se comporta de igual modo que en los flavonoides, como ya se explicó antes.

Dicho lo anterior, los resultados obtenidos se pueden resumir en la ecuación [19] que contempla los verdaderos valores de las variables con todos los factores (significativos y no significativos), la cual se muestra a continuación:

$$Rutina \left(\frac{mgEE}{gCS} \right) = -7,06 + 4,10 R_{SS} - 0,141 R_{SS}^2 + 0,00481T + 0,0033 T^2 - 5,406CAA - 5,386 CAA^2 - 0,0278 R_{SS} * T + 0,466 R_{SS} * CAA + 0,197 T * CAA \quad [19]$$

5.4.2 Condiciones óptimas para la extracción de flavonoides y rutina

Mediante el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA), se aplicó la función de deseabilidad, con la que se pueden analizar, simultáneamente, las respuestas del rendimiento de flavonoides y rutina, con el objetivo de encontrar un valor que optimice ambas variables. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, y representa la cercanía de una respuesta a su valor ideal, en la que una deseabilidad de 1 indica que la respuesta alcanza el valor óptimo o ideal (Raissi y Farsani, 2009). Al optimizar las condiciones de extracción, a partir de los modelos de regresión, se obtienen los valores que se muestran en el Cuadro XVI, para cada una de las variables respuesta estudiadas. Cabe destacar que, en este cuadro, se muestran las condiciones óptimas de extracción tanto para cada variable independiente (flavonoides y rutina), como las condiciones para obtener una mejor extracción de ambos compuestos de forma simultánea, de acuerdo con la función de deseabilidad.

Cuadro XVI. Condiciones óptimas de extracción de flavonoides y rutina de forma individual y combinada predichas por la superficie de respuesta del modelo cuadrático

Factor del modelo	Flavonoides	Rutina	Ambos compuestos
R_{ss} (g solv/g sust)	8	12	8
T (°C)	50	50	50
Cn AA (g/100 g)	1,00	1,00	0,75
Deseabilidad	1,00	1,00	0,975
Predicción	5,26 mg EE/g CS	18,16 µg rutina/g CS	5,17 mg EE/g CS 17,10 µg rutina/g CS

Como se puede observar en los gráficos de la Figura 37, el comportamiento de extracción de los flavonoides y la rutina presenta diferencias importantes. En primer lugar, un aumento en la R_{ss} hasta valores de 10-12 favorece el rendimiento de la rutina, pero provoca una disminución en el rendimiento de flavonoides, teniendo como un punto óptimo para ambas, un valor de 8. En segundo lugar, en el caso de la temperatura, para ambas variables, se obtiene la mejor extracción con el valor máximo de 50 °C. Finalmente, un incremento en la

concentración de ácido acético añadido favorece el rendimiento de rutina, en tanto el rendimiento de flavonoides varía muy poco, con un valor óptimo en conjunto de 0,75 %.

En la Figura 37 y en el Cuadro XVI, se resumen las condiciones óptimas de extracción. Por su parte, con la función de deseabilidad, se corre un modelo que englobe la maximización de ambas variables, el cual da un valor de R_{SS} de 8:1, temperatura de 50 °C y concentración de ácido acético de 0,75 %. Asimismo, se observa como la actividad optimizada de ambas variables no quiere decir el máximo para las dos, esto porque las variables estudiadas tienen comportamientos diferentes.

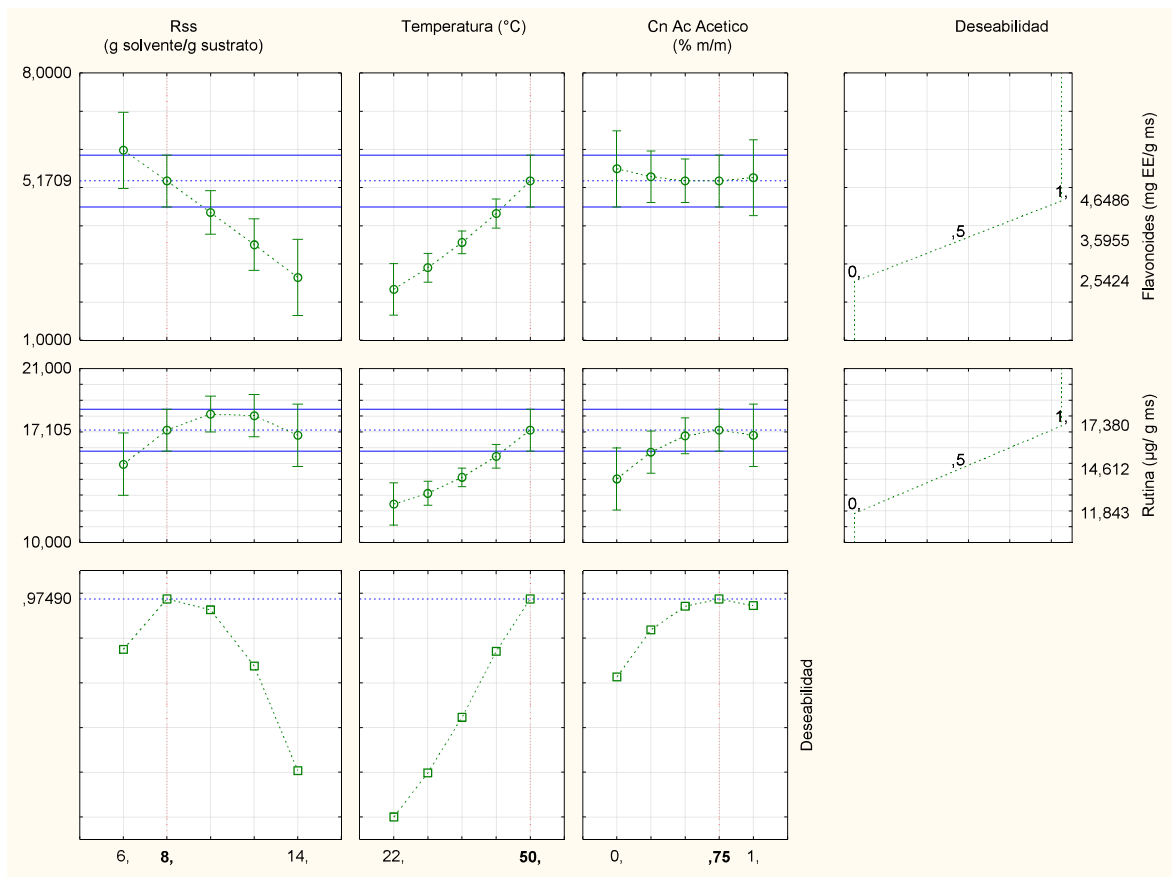


Figura 37. Gráficas de la función de deseabilidad y comportamiento de las diferentes variables bajo el modelo de optimización.

5.4.3 Validación del modelo del DCC

En el Cuadro XVII, se presenta el rendimiento de flavonoides y rutina obtenido en los extractos, en corridas experimentales realizadas por triplicado, bajo las condiciones óptimas de extracción y junto con el valor predicho por los modelos.

Cuadro XVII. Comparación entre la concentración de flavonoides y rutina predichas por los modelos con las obtenidas en las corridas de verificación, con las condiciones R_{SS} de 8, temperatura de 50 °C y 0,75 % de ácido acético.

Valor	Flavonoides (mg EE/g CS)	Rutina (μ g rutina/g CS)
Predicho por el modelo	5,17 \pm 0,91	17,10 \pm 1,80
Experimental en corridas de validación	5,02 \pm 0,28	17,72 \pm 2,91

para $n = 3$, nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Como se aprecia, el rendimiento de flavonoides y rutina, en los extractos de las corridas de validación y los predichos por los modelos, se traslapan, por lo que dichos modelos logran predecir, de forma correcta, el comportamiento de la extracción de flavonoides y rutina de la cáscara de plátano verde. En la Figura 38, se muestran los extractos obtenidos bajo las condiciones de operación de máxima deseabilidad (óptimas).



Figura 38. Extractos de flavonoides y rutina obtenidos de la cáscara de plátano verde

Como parte del análisis de las mejores condiciones de extracción o, en el Cuadro XVIII se muestra una comparación de los resultados obtenidos con otros estudios de la literatura.

En primer lugar, las investigaciones mostradas apuntan a una preferencia de usar mezclas acetona-agua que rondan en proporciones 50-90 % como solvente de extracción y, como se explicó con anterioridad, se da por la polaridad en conjunto de los solventes, es decir, la polaridad que logran tener juntos el agua y la acetona a estas concentraciones. Cabe mencionar que otros autores utilizan mezcla de etanol o metanol; sin embargo, este último no es recomendable para fines alimentarios.

Cuadro XVIII. Condiciones óptimas de extracción polifenoles y flavonoides de diferentes estudios en musáceas

Temperatura (°C)	Solvente	R _{ss}	Acidez	Referencia
50	Acetona-agua 55:45	8:1 ^a	0,75 % ácido acético	Presente trabajo
50	Etanol - agua 54: 46	13,3:1 ^b	nr	Araujo <i>et al.</i> , 2016
30	Acetona -agua 60:40	12,5:1 ^b	nr	Vu <i>et al.</i> , 2016
nr	Metanol- agua 50:48.5	20:1 ^b	1,5 % ácido fórmico	Gomes <i>et al.</i> , 2014
nr	Acetona-agua 70:30 y 90:10	10:1 ^b	nr	Yee <i>et al.</i> , 2016
nr	Acetona-agua 80:20	10:1 ^b	nr	Aboul <i>et al.</i> , 2016
40	Etanol-agua 95:5	10:1 ^b	nr	Espinoza <i>et al.</i> , 2017
nr	Acetona-agua 50:49	20:1 ^b	1 % ácido acético	Passo <i>et al.</i> , 2015b
40	Etanol-agua 10:90	nr	nr	Babbar <i>et al.</i> , 2011
nr	Aceton-agua 1:1	nr	nr	González-Montelongo <i>et al.</i> , 2010

^a g solvente: g sustrato, ^b mL solvente: g sustrato, nr: no reportado

De igual modo, en el presente trabajo se obtuvo un valor óptimo de R_{ss} de 8 g solvente/g de sustrato, que es similar al reportado por diversos autores en extractos de cáscaras de musáceas (Yee *et al.*, 2016, Aboul *et al.*, 2016, Espinoza *et al.*, 2017). Sin embargo, en esta investigación se trabajó con proporciones de masa, por lo que el resultado obtenido no es estrictamente comparable con estos estudios, dado el cambio en la densidad de los solventes.

No obstante, se puede aportar que los valores óptimos van de 10 a 20 mL solvente: g sustrato y el obtenido es de 8:1 g solvente: g sustrato (teóricamente según la densidad de una mezcla 55:45 acetona- agua da como resultado aproximadamente 7 mL solvente: g sustrato, menor a los resultados de la literatura).

A su vez, la temperatura óptima obtenida fue de 50°C. En comparación con otras investigaciones realizadas, se advierte que algunos autores tienen, como valor óptimo, temperaturas de 30-50°C (Araujo *et al.*, 2016, Vu *et al.*, 2016, Espinoza *et al.*, 2017; Babbar *et al.*, 2011), valores iguales o menores al empleado en el presente análisis.

Finalmente, el uso de un medio ácido en extracción es poco mencionado en investigaciones previas, de las cuales se encuentra el uso de ácido fórmico y acético alrededor de 1 %; este último es el concluyente y equiparable con el utilizado en esta investigación.

De esta manera, se puede definir que las condiciones obtenidas en el apartado anterior son las óptimas para obtener un extracto con compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de plátano secas las cuales han sido previamente estabilizadas y sometidas a un tratamiento para la obtención de un sustrato y su posterior extracción. Estos valores dan una oportunidad para evaluar la aplicación industrial de este método de extracción, mostrando de forma clara el impacto de las variables analizadas en el último apartado.

5.5 Caracterización fisicoquímica del extracto.

En el Cuadro XIX, se presentan los resultados de la caracterización del extracto de flavonoides obtenido a partir de la cáscara de plátano verde bajo las condiciones de extracción óptimas.

Cuadro XIX. Composición del extracto de la cáscara de plátano obtenido con las condiciones de operación óptimas: (solvente acetona-agua 55:45, R_{SS} 8:1 g solvente/g sus, T = 50 °C y concentración de ácido acético 0,75 % m/m).

Componente ¹	Valor		
Fructosa (g/100 g)	0,11	±	0,01
Glucosa (g/100 g)	0,08	±	0,01
Sacarosa (g/100 g)	0,03	±	0,02
Sólidos totales (g/100 g)	1,0	±	0,1
Cenizas (g/100g)	0,23	±	0,01
Polifenoles totales (PFT) (mg EAG/100 g)	270	±	114
Flavonoides (mg EE/100 g)	69	±	4
Rutina (µg /100 g)	246	±	41
H-ORAC (µmol TE/100 g)	272	±	131
Acidez titulable (g ácido acético/100 g)	0,68	±	0,01

¹Promedios ± incertidumbre expresada con el intervalo de confianza del 95 %. n = 3. Los valores son reportados por 100 g de extracto

En primer punto es importante observar el contenido de sólidos es de $1 \pm 0,1$ g/100 g extracto, donde se encuentran azúcares, cenizas, entre otros y por consiguiente lo demás es solvente (acetona-agua). El contenido tanto de azúcares simples como de cenizas en el extracto es relativamente bajo (menor del 0,5 % del extracto), es decir la mitad de los sólidos totales, lo cual indica un bajo contenido de impurezas.

Ahora bien, en cuanto al contenido de PFT puede ser variable, dado que el método de análisis empleado puede cuantificar otras sustancias reductoras (no es totalmente selectivo para polifenoles), por ejemplo, proteínas, tioles, derivados de vitaminas y iones inorgánicos (Everette *et al.*, 2010; Cuevas *et al.*, 2017). Además, en la literatura, se mencionan diversos valores de polifenoles en extractos de cáscara de plátano, los cuales se citan en el Cuadro XX.

Cuadro XX. Recopilación de investigación de contenido de polifenoles totales en extractos de cáscara de musáceas.

Fenotipo	Madurez	Polifenoles totales (mg EAG/ g ms)	Referencia
AAB	1	2,7	Presente estudio
AAB	1	7,71	Agama <i>et al.</i> , 2015
AAB	7	3,98-13,0	Sulaiman <i>et al.</i> 2011
AAA	7	26-27	González-Montelongo <i>et al.</i> , 2010
AAA	5	29,2	Gomez <i>et al.</i> , 2014
NR	NR	10,91	Anjum <i>et al.</i> , 2014

NR: no reportado

El contenido de PFT, para el extracto obtenido, fue en 2,70 mg EAG/g ms que es menor a los valores reportados en otros estudios para extractos en cáscaras de musáceas. Esta diferencia se puede atribuir a la variedad del plátano, madurez, características fisiológicas, forma de extracción, solvente, variables de extracción, entre otras, pero corrobora que tanto la cáscara y el extracto son una fuente importante de polifenoles.

Cabe destacar que en el Cuadro XX se observa que las musáceas del tipo AAA reportan mayor cantidad de PFT en los extractos de cáscara, en comparación con las del tipo AAB, como la del presente estudio, Sin embargo, es una aseveración que se debe someter a investigación posterior, además de tomar en cuenta la madurez de las matrices investigadas, tratamiento de la muestra, métodos de extracción, entre otros.

Es importante recalcar que la metodología empleada en esta investigación permite obtener un extracto con un contenido considerable de polifenoles totales, a pesar de ser un método que conlleva ciertas desventajas al dado que la estabilización y procesamiento se realizan a escala piloto, por ejemplo: menor control de las variables como lo es el secado y la molienda, en comparación con un tratamiento de la muestra a nivel de laboratorio, por lo que estrictamente no se puede comparar con muchas de las investigaciones. Asimismo, la

información obtenida recalca que si bien, los valores obtenidos son bajos se pueden considerar buenos para una prueba a escala piloto y pueden estar sujetas a otras variables, por lo que se recomienda el estudio de que variables afectan a escala piloto y las posibles implicaciones en un escalamiento industrial.

A continuación, en el cuadro XXI, se muestra una serie de resultados de flavonoides reportados por diversos autores en extractos de cáscaras de musáceas.

Cuadro XXI. Recopilación de investigaciones de flavonoides en extractos cáscara de plátano

Fenotipo	Cantidad	Unidades ¹	Referencia
AAB	69	mg EE/ 100 g ext	Presente estudio
NR	320	mg QE/100 g ext	Fidriany <i>et al.</i> 2018
AAA	75,97	mg RE/100 g ext	Singhal y Ratra, 2013

¹ EE: Epicatequina equivalente, QE: Quercetina equivalente, RE: Rutina equivalente

Respecto al contenido de flavonoides en el extracto, se obtuvo un contenido promedio de 69 mg EE/100 g extracto. En el cuadro XXI a su vez, se muestran diversos valores obtenidos por otros autores. De esto, se observa que es inferior a los reportados y muy cercano a lo reportado por Singhal y Ratra, 2013. Sin embargo, no es comparable dada las diferentes unidades con las que se reporta el contenido de flavonoides (equivalentes de diferentes flavonoides). A su vez, las diferencias también se deben a la especie de musácea, cultivar, zona de cultivo, forma de tratamiento, extracción y análisis, entre otros. No obstante, como se comentó en el apartado de polifenoles totales, la investigación en curso no es estrictamente contrastable con las demás dado a que en estas investigaciones el tratamiento de la muestra se realizó a nivel de laboratorio, mientras que el presente estudio se realizó a escala piloto (estabilización- secado- molienda). Finalmente, cabe agregar que el presente estudio es un proceso piloto que se puede escalar para obtener industrialmente un extracto con una cantidad de compuestos bioactivos importantes dando resultados prometedores.

En seguida, en el cuadro XXII se muestra una recopilación de la concentración de rutina en diferentes extractos de cáscaras musáceas.

Cuadro XXII. Recopilación de investigaciones de concentración rutina en extractos de cáscara de musáceas

Fenotipo	Madurez	Cantidad (μg Rutina/ 100 g ext)	Referencia
AAB	1	246	Presente estudio
AAB	NR	482	Passo Tsamo <i>et al.</i> , 2015b
AAA	NR	1110-2300	Kanazawa <i>et al.</i> , 2000
NR	NR	242-618	Aboul <i>et al.</i> , 2016.

NR. No reportado

El resultado de la cantidad de rutina en el extracto del presente estudio fue de 246 $\mu\text{g}/100$ g extracto. Se observa como el valor obtenido es relativamente menor respecto a los reportados en el cuadro XXII, con excepción del reportado por Aboul *et al.*, 2016. Sin embargo, esta comparación queda sujeta a variables como: muestra, madurez, tratamiento, forma de extracción, entre otros. Asimismo, al indagar más en la literatura, se nota que las investigaciones utilizan para el cálculo la suma de varios glicósidos o rutinósidos específicos, mientras que, en este estudio, se empleó quercetin-3-rutinosido (rutina), por lo que se debe conocer esto para una adecuada comparación.

Por su parte, en la investigación de Gomes *et al.*, (2014), basada en cáscara de bananos (*Musa* sp. AAA), de madurez 5, reporta un total de 128,7 $\mu\text{g}/\text{g}$ cáscara de suma de rutinósidos. De estos, 38,44 $\mu\text{g}/\text{g}$ cáscara corresponden a la quercetin-3-rutinosido, el cual estrictamente no es comparable con el obtenido en el extracto, pero si con el obtenido extraído de las cáscaras en la optimización del modelo (17,71 $\mu\text{g}/\text{g}$ CS, Cuadro XVII). De esta manera, se puede comparar la cantidad de quercetin-3-rutinosido con el obtenido por dicho autor y evidencia cómo se obtuvo alrededor de la mitad. Asimismo, dadas las condiciones del procesamiento pudieron existir condiciones a escala piloto que afectaran la obtención de

mayores valores. Sin embargo, se puede considerar un valor importante de concentración de rutina para ser un proceso a nivel piloto y dar precedente a futuras investigaciones.

A continuación, en el cuadro XXIII, se muestra información del H-ORAC reportado en musáceas.

Cuadro XXIII. Recopilación de investigaciones de ORAC en musáceas

H-ORAC	Observación	Fuente
272 ($\mu\text{M TE}/100 \text{ g ext}$)	Extracto, madurez grado 1	Presente estudio
436 ($\mu\text{M TE}/ \text{g muestra}$)	Cáscara, madurez grado 5	Gomes <i>et al.</i> , 2014

Referente a la capacidad antioxidante reportada como H-ORAC se exhibe, en el cuadro XIX, un valor obtenido de 272 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ extracto. Al realizar una búsqueda de investigaciones similares se encuentra que hay escasa información de mediciones de H-ORAC en extractos de musáceas y la información más cercana es el ORAC de cáscaras secas, pero de diferente madurez reportada por Gomes *et al.*, (2014). Por tanto, no se puede comparar de manera directa, sin embargo, haciendo los cálculos respectivos de la cantidad usada de CS para dicha extracción, se puede obtener un valor comparable con el de Gomes *et al.*, (2014), obteniendo que posee 24 $\mu\text{mol}/\text{g}$ CS el cual es considerablemente menor.

Cabe destacar que el extracto de este trabajo se obtuvo una sola etapa de extracción, por lo que la cantidad de antioxidantes extraídos es limitada en comparación con extracciones sucesivas. De igual forma, se espera que los valores de actividad antioxidante sean más bajos para la cáscara verde (no madura), ya que el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante, generalmente, aumentan durante la maduración de la fruta (Barcia *et al.*, 2010); asimismo, depende mucho de la cantidad de pulpa y cáscara presente en el sustrato (al momento de pelado, la cáscara arrastra secciones almidonosas de la pulpa); entre mayor proporción de cáscara, mayor cantidad de compuestos antioxidantes (Someya *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2011).

Ahora bien, durante el proceso de extracción realizado en el presente trabajo, surgieron nuevos factores que se considera pueden influenciar en la concentración de flavonoides extraídos, tales como la homogeneidad del sustrato, el tiempo de extracción y el número de etapas de extracción. El efecto de estos factores en el contenido de flavonoides extraídos, podría estudiarse en el futuro, si se desea optimizar aún más el proceso de extracción. Además, para obtener un sustrato más homogéneo, se recomienda tamizar el producto en polvo obtenido por una malla de tamaño definido, y volver a moler las fracciones retenidas con mayor tamaño de partícula. Aunado a esto, se puede profundizar más en la forma en que las operaciones empleadas en la obtención del sustrato pueden afectar la disponibilidad de flavonoides, así como los métodos de extracción, entre otros.

métodos de estudios *in vitro*.
 al consumirlos (Yapo *et al.*, 2013). Por ello, actualmente, se recomienda combinar diferentes mecanismos involucrados, por lo que no representan el efecto antioxidante en el organismo encuentran; así, existen gran variedad de radicales libres y especies reactivas, así como de presencia de antioxidantes, que son específicos a ciertas moléculas y al medio en el que se actividad antioxidante está basada en la medición de radicales libres y la inhibición en sirven para comparar entre matrices. Sin embargo, pueden tener limitaciones dado que la También, se considera que los resultados obtenidos, mediante la determinación ORAC,

2002; Nguyen *et al.*, 2003; González-Montelongo *et al.*, 2010).
 compuestos fenólicos (Subagio *et al.*, 1996; Kanazawa y Sakakibara, 2000; Someya *et al.*, y β -criptoxantina) y antioxidantes compuestos que incluyen carotenoides, catecolaminas y una fuente potencial de provitamina A (carotenoides como trans- α -caroteno, trans- β -caroteno presentes en los extractos de cáscara de plátano han mostrado que estos subproductos son 2002; Kanazawa y Sakakibara, 2000). Los estudios realizados para identificar los compuestos antioxidantes, especialmente flavonoides (González-Montelongo *et al.*, 2010; Someya *et al.*, antioxidante, y este residuo puede ser una fuente para la extracción de compuestos La investigación ha demostrado que los extractos de cáscara de plátano tienen una actividad

6. CONCLUSIONES

- La inmersión de las cáscaras de plátano frescas en ácido cítrico al 1%, durante 5 min, permite reducir la actividad de la PFO y, por lo tanto, se conservan de oxidación los flavonoides presentes.
- La metodología de extracción empleada permite la obtención de un sustrato seco estable con contenido antioxidante y de gran potencial de aplicabilidad industrial.
- La cuantificación de flavonoides por el método de cloruro de aluminio es efectiva para relacionar la absorbancia espectrofotométrica con la concentración de (-)-epicatequina en los extractos obtenidos a partir cáscara seca de plátano.
- La utilización de una mezcla de solventes agua-acetona o agua-etanol es más efectiva que los solventes puros para la extracción de flavonoides de la cáscara de plátano.
- La proporción de acetona-agua 55:45 produce una extracción de flavonoides de la cáscara seca de plátano con mayor rendimiento.
- El modelo cuadrático del diseño de mezclas obtenido predice adecuadamente la extracción de flavonoides de cáscara seca de plátano en función de la mezcla de solventes utilizados.
- La extracción de la cáscara de plátano, con el solvente acidificado con 0,75% de ácido cítrico, una R_{ss} de 8 a 50°C, produce un extracto con un rendimiento óptimo de flavonoides de $5,02 \pm 0,28$ mg EE/g CS y de rutina de $17,72 \pm 2,91$ µg/g CS.
- Los parámetros establecidos para la optimización del extracto (acetona-agua 55:45, acidificación con 0,75% de ácido cítrico, una R_{ss} de 8 a 50 °C permiten definir condiciones para poder dar un escalamiento industrial y obtener mejores rendimientos.
- El extracto obtenido mediante las condiciones de operación óptimas presenta una alta pureza y una cantidad considerable de polifenoles, flavonoides y rutina. Esto evidencia un extracto con potencial antioxidante.

.7. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros tipos de operaciones para el tratamiento de la cáscara fresca como por ejemplo escaldado, crio-molienda, adición directa de solventes o inmersión con otros agentes que permitan reducir la degradación enzimática de los compuestos fenólicos y mejorar la estabilidad al deterioro en el tiempo del producto seco.
- Analizar mediante la metodología expuesta en esta investigación otras variedades de musáceas y con diferentes etapas de madurez.
- Evaluar otras variables a lo largo de las operaciones de procesamiento del sustrato como forma y tiempo de inmersión, forma de secado, tipos de molienda, que permitan incrementar la eficiencia del proceso.
- Evaluar la extracción de flavonoides con otros tipos de ácidos orgánicos seguros para alimentos, por ejemplo: cítrico, ascórbico.
- Aplicar las condiciones obtenidas de extracción para un escalamiento industrial.
- Concentrar el extracto obtenido para obtener un mayor contenido de PFT y flavonoides en el extracto.
- Moler las fracciones retenidas en el tamizado, así como evaluar el efecto de utilizar menores tamaños de partícula del sustrato en la eficacia de la extracción.
- Analizar, por HPLC, el contenido en el extracto de otros flavonoides de importancia como catequina, epicatequina, galocatequina, quercetina, kaempferol, isoharmetina, miricetina, laricitrina, soringetina.
- Analizar el contenido de polifenoles y flavonoides no extraíbles, así como métodos que permitan mejorar su extracción.
- Evaluar el extracto obtenido durante un tiempo determinado de almacenamiento para comprender la estabilidad de los componentes bioactivos, así como la estabilidad del sustrato seco molido.
- Evaluar el efecto del tiempo de extracción, así como el número de extracciones en la concentración de flavonoides extraída.
- Se sugiere un estudio más completo de la actividad antioxidante del extracto obtenido mediante la combinación de diferentes análisis in vitro.
- Evaluar la posible aplicación del extracto obtenido como aditivo en alimentos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABOUL, A., SALAMA, Z., GAAFAR, A., ALY, H., BOU, F. y AMHED, H. 2016. Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradisiaca* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8(4): 46-55.
- ADENIJI, T. A., HART, A. D., TENKOUANO, A., BARIMALAA, I, S. y SANI, L. O. 2010a. Comparative study of pasting properties of improved plantain, banana and cassava varieties with emphasis on industrial application. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*. 10(5): 2601-2614.
- ADENIJI, T. A., TENKOUANO, A., EZURIKE, J. N., ARIYO, C. O. y VROH-BI, I. 2010b. Value-adding postharvest processing of cooking bananas (*Musa spp. AAB and ABB genome groups*). *African Journal of Biotechnology*. 9(54): 9135-9141.
- AGAMA, J., SAÑUDO, R., VÉLEZ DE LA ROCHA, G., GONZÁLEZ, A. y BELLO, L. 2015. Potential of plantain peels flour (*Musa paradisiaca* L.) as a source of dietary fiber and antioxidant compound. *CyTA - Journal of Food*. 14(1): 117-123. doi: 10.1080/19476337.2015.1055306
- ALTEMIMI, A., LAKHSSASSI, N., BAHARLOUEI, A., WATSON, D. y LIGHTFOOT, D. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 6(4): 1-42. doi:10.3390/plants6040042
- ANIDO, J., ABREU, E., GUTIERREZ, A., QUINTERO, M., MOLINA, L., ABLAN, E., CARTAY, R., MERCADO. C. 1997. El Cultivo del plátano en Venezuela. Desde el Campo Hasta la Mesa. Empresas Polar, Venezuela.
- ANJUM, S., SUNDARAM, S. y RAI, G. 2014. Nutraceutical application and value addition of banana (*Musa paradisiaca* L. variety “Bhusawal Keli”) peel: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(10): 81-85.

- AOAC. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Recuperado el 01 de noviembre del 2019 de https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- APAK, R., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M. y GÜÇLÜ, K. 2011. Antioxidant Activity/Capacity Assay Methods Applied to Fruit and Cereals. In *Fruit and Cereal Bioactives*. 361-383.
- ARAUJO, G. P., MOLINA, G., ARRUDA, H. S. y PASTORE, G. M. 2016. Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel. *Journal of Food Process Engineering*. 40(3) doi:10.1111/jfpe.12438
- ARAWANDE, J., AMOO, I. y LAJIDE, L. 2010. Effects of citric acid and methanol extracts of banana and plantain peels on stability of refined soybean oil. *Ethnobotanical Leaflets*, 14: 706-714.
- ARPITA, S., SUBROTO, D., PINAKI, B. y BIDYUT, B. 2010. Inhibition of polyphenol oxidase in banana, apple and mushrooms using different anti-browning agents under different conditions. *International Journal Chemistry Science*. 8(5): 550-558.
- ASTORGA, Y. 2004. The Environmental Impact of the Banana Industry: A Case Study of Costa Rica. Consultado el: 26 de mayo del 2019 en https://www.researchgate.net/publication/265000065_2_The_Environmental_Impact_of_the_Banana_Industry_A_Case_Study_of_Costa_Rica
- AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F. y YOMAR, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4): 426–436. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- BABBAR, N., SINGH, H., SINGH, A. y TUMADU, R. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six Important fruit residues. *Food Research International*. 44: 391–396.

- BARCIA, M. T., JACQUES, A.C., PERTUZATTI, P. B. y ZAMBIAZI, R. C. 2010. Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias*. 31:381–390.
- BASKAR, R., SHRISAKTHI, S., SATHYAPRIYA, B., SHYAMPRIYA, R., NITHYA, R. y POONGODI, P. 2011. Antioxidant potential of peel extracts of banana varieties (*Musa sapientum*). *Food and Nutrition Sciences*. 2: 1128–1133.
- BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L. S. y ESCALEIRA, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76(5): 965–977.
- BOCHI, V. C., BARCIA, M. T., RODRÍGUEZ, D., SPERONI, C. S., GIUSTI, M. M. y GODOY, H. T. 2014. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*. 164: 347–354.
- CALBERTO, G., SATVER, C. y SILES, P. 2015. An assessment of global banana production and suitability under climate change scenarios. En: *Climate change and food systems: global assessments and implications for food security and trade*. Aziz Elbehri (ed). Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma.
- CHAABAN, H., IOANNOU, I., CHEBIL, L., SLIMANE, M., GÉRARDIN, C., PARIS, C., YHOUL, M. 2017. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(5). doi:10.1111/jfpp.13203
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L., SEPÚLVEDA, L., VERMA, D. K., LUNA-GARCÍA, H. A., RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V., ILINA, A. y AGUILAR, C. N. 2020. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. *Processes*. 8(4): 1-29. doi:10.3390/pr8040434
- CHINA. R., DUTTA. S., SEN. S., CHAKRABARTI, R., BHOWMIK, D., GHOSH, S. y DHAR, P. 2011. In vitro antioxidant activity of different cultivars of banana flower (*Musa paradiscus* L.) extracts available in India. *Journal of Food Science*. 76(9): 1292-1299.

- CHONG, C. L., CHENG, H. L. y NOOR AZIZ, A. A. 2011. Properties of polyphenol oxidase obtained from (*Musa acuminata* × *balbisiensis colla* cv). “PisangAwak” pulp and peel. *CyTA - Journal of Food*. 9(1): 25-30. doi: 10.1080/19476330903503379
- CORRADINI, E., FOGLIA, P., GIANSAANTI, P., GUBBIOTTI, R.S. y LAGANA, A. 2011. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantification in foods and plants. *Natural Product Research*. 25(5): 469–495.
- CUEVAS, J., VERGARA, J. R. y PEREZ, J. R. (eds.). 2017. *Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols*. CRC Press, Estados Unidos.
- DAVEY, M. W., KEULEMANS, J. y SWENNEN, R. 2006. Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. *Journal of Chromatography A*. 1136(2): 176–184.
- DEEPAK, R., SINGH, K. 2014. *Biologix*, Chapter 3: New Approaches for Food industry Waste Utilization Dept. of Biotechnology, Mewar Institute of Management.
- DICLAULA, M., LOPES, G., SCARMINIO, I. y DEMELLO, J. 2014. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *En Quim. Nova*. 37(1): 158-163.
- EMAGA, T. H., ANDRIANAIVO, R. H., WATHELET, B., TCHANGO, J. T. y PAQUOT, M. 2007. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry*. 103(2): 590–600.
- ESCALANTE, P., IBARRA, V., ORNELAS, J., GARCÍA, V., VIRGEN, J. J., GONZÁLEZ, A., PÉREZ, J. y OROZCO, M. 2018. Comparative study of the banana pulp browning process of “Giant Dwarf” and FHIA-23 during fruit ripening based on image analysis and the polyphenol oxidase and peroxidase biochemical properties. *3 Biotech*. 8(1): 1-9 doi:10.1007/s13205-017-1048-3
- ESPINOZA, A. y SANTA CRUZ, S. 2017. Phenolic compounds from the peel of (*Musa cavendish*, *Musa acuminata* and *Musa cavendanaish*). *Revista Politécnica*. 38(2): 1-5.

- EVERETTE, J. D., BRYANT, Q. M., GREEN, A. M., ABBEY, Y. A., WANGILA, G. W. y WALKER, R. B. 2010. A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(14): 8139–8144.
- FATEMEH, S. R., SAIFULLAH, R., ABBAS, F. M. A. y AZHAR, M. E. 2012. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of banana pulp and peel flours: Influence of variety and stage of ripeness. *International Food Research Journal*. 19(3): 1041–1046.
- FOOD & DRUGS ADMINISTRATION (FDA). 2019. Food Additive Status List. Consultado el 19 de Julio del 2021. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list#ftnA>.
- FERNÁNDEZ, C. A., CHAMHUM, L. C., ROCHAH, S. M. R., LOPES, D. L. D. y CECON, P. R. 2016. Carbohydrates, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Pulp and Peel Of 15 Banana Cultivars. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 38(4): 1-11. doi:10.1590/0100-29452016090
- FERNANDEZ, M., VILLAÑO, D., TRONCOSO, A., GARCIA, M. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. En *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 56 (2).
- FIDRIANY, I., ANGGRAENI, N. y INSANU, N. 2018. Antioxidant properties of peels extracts from three varieties of banana (*Musa* sp.) grown in West Java-Indonesia. *International Food Research Journal*. 25(1): 57-64.
- GALANAKIS, C. M. 2018. *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. Woodhead Publishing, Reino Unido.
- GEORGÉ, S., BRAT, P., ALTER, P. y AMIOT, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5): 1370-1373.

- GHASEMZADEH, A., BAGHDADI, A., Z. E. JAAFAR, H., SWAMY, M. y MEGAT WAHAB, P. 2018. Optimization of Flavonoid Extraction from Red and Brown Rice Bran and Evaluation of the Antioxidant Properties. *Molecules*. 23(8). doi:10.3390/molecules23081863
- GHITESCU, R. E., VOLF, I., CARAUSU, C., BUHLMANN, A. M., GILCA, I. A. y POPA, V. I. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrason. Sonochem.* 22: 535–541. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.07.013
- GIROTTO, F., ALIBARDI, L. y COSSU, R. 2015. Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*. 45: 32–41. doi:10.1016/j.wasman.2015.06.008
- GOMES, L., MOTA, A., BECKER, P., TEIXEIRA, M., CASTILLO, N. y HERMOSÍN, I. 2014. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International*. 55: 397-403.
- GÓMEZ, M. N., ROMERO, R. R., MOLINA, R.D., TERRAZAS, S. M. y NUÑEZ, O. 2015. Uso de la metodología del diseño de mezclas en el sector agrícola. *Culcyt*. 12(55): 201-211.
- GONZÁLEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M. G. y GONZÁLEZ, M. 2010. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*. 119(3): 1030–1039.
- GONZÁLEZ, D. s.f, Experimentos factoriales y con mezclas: Aplicaciones Industriales. https://academic.uprm.edu/dgonzalez/INTRO_EXP_MEZCLAS+Factoriales_Grupo%20M.pdf
- HARBORNE, J y WILLIAMS, C. 1992. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
- HARBORNE, J. B. y WILLIAMS, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55(6): 481–504.

- HERNÁNDEZ-, P., ÁVILA-, R., GUERRERO-, J. A., NAVARRO, A. R., CORONA, E. y OCHOA-, C. E. 2015. Optimization of Antioxidant Compounds Extraction from Fruit by-products: Apple Pomace, Orange and Banana Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40(1): 103–115. doi:10.1111/jfpp.12588
- HO, Y.C., YU, H.T. y SU, N.W. 2012. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determining Flavonoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 2674–2681.
- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A. y DEEMER, E. K. 2002. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(7): 1815-1821.
- IGNAT, I., VOLF, I. y POPA, V.I. 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126(4): 1821–1835.
- ILZARBE IZQUIERDO, L. TANCO, M, VILES, E. y ÁLVAREZ SÁNCHEZ-ARJONA, M. 2007. El diseño de experimentos como herramienta para la mejora de los procesos. Aplicación de la metodología al caso de una catapulta. *Tecnura*. 10(20): 127-138.
- INEC (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS). 2014. VI CENSO NACIONAL AGROPECUARIO 2014. Consultado el 30 de enero del 2021. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/U40-10581.pdf>
- INEC (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS). 2018. Resultados Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. Consultado el 5 de mayo de 2019 en: <http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos-bibliotecavirtual/coena20112018.pdf>
- JUKANTI, A. 2017. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Springer, India.

- KANAZAWA, K. y SAKAKIBARA, H. 2000. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(3): 844–848.
- KARACABEY, E. y MAZZA, G. 2010. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*. 119(1): 343–348.
- LAFKA, T. I., SINANOGLU, V. y LAZOS, E. S. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*. 104(3): 1206–1214.
- LIM, Y., LIM, T. y TEE, J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. 103(3): 1003–1008.
- MAG (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA). 2008. Agrocadena de plátano: Caracterización de la agrocadena. San José: Costa Rica.
- MAGALHÃES, L. M., ALMEIDA, M. I., BARREIROS, L., REIS, S. y SEGUNDO, M. A. 2011. Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Analytical Methods*. 5(3): 530–539.
- MANDAL, S. C., MANDAL, V. y DAS, A. K. 2015. Innovative Extraction Process Design and Optimization Using Design of Experimental Approach. *Essentials of Botanical Extraction*. 137–163. doi:10.1016/b978-0-12-802325-9.00007-0
- MARTÍNEZ, R., TORRES, P., MENESES, M.A., FIGUEROA, J.C. PÉREZ ÁLVAREZ, J.A. y VIUDA MARTOS, M. 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao L.*) co-products. *Food Research International*. 49: 39–45.
- MERTZ, C., CHEYNIER, V., GÜNATA, Z. y BRAT, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichos*) by High-Performance Liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21): 8616–8624.

- MELO, D., TORRES, Y., SERNA, J. y TORRES, L. 2015. Aprovechamiento de pulpa y cáscara de plátano (*Musa paradisiaca* spp) para la obtención de maltodextrina. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 13(2): 76-85. DOI:10.18684
- MENEZES, E. W., TADINI, C. C., TRIBESS, T. B., ZULETA, A., BINAGHI, J., PAK, N., ET AL. 2011. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata* var. Nanicão). Plant Foods for Human Nutrition, 66(3): 231–237.
- MOKBE, M. S. y HASHINAGA, F. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of banana (*Musa AAA cv. Cavendish*) fruits peel. American Journal of Biochemistry and Biotecnología, 1(3): 125 –131.
- MONTGOMERY, D. C. 2013. Diseño y análisis de experimentos. 8^{va} ed. Estados Unidos, John Wiley & Sons, Inc.
- MORAIS, D., ROTTA, E., SARGI, S., SCHMIDT, E., GUTENDORFER, E., EBERLIN, M., SAWAYA, A. y VISENTAINER, J. 2015. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI (–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. Food Research International. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036>.
- MORANTE CARRIEL, J., AGNIESZKA-OBREBSKA, A., BRU-MARTINEZ, R., CARRANZA PATIÑO, M., PICO-SALTOS, R., y NIETO RODRIGUEZ, E. 2014. Distribution, location and inhibitors of polyphenol oxidases in fruits and vegetables used as food. En Ciencia y Tecnología. 7(1): 23-31. doi:10.18779/cyt.v7i1.95.
- MORILLAS, P. 2016. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Disponible en www.eurachem.org
- MUNHOZ, V. M., LONGHINI, R., SOUZA, J. R. P., ZEQUI, J. A. C., MELLO, E. V. S. L., LOPES, G. C., y MELLO, J. C. P. 2014. Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: process optimization and screening for biological activity. Revista Brasileira de Farmacognosia. 24(5): 576–583. doi:10.1016/j.bjp.2014.10.001

- NACZK, M. y SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054(1-2): 95–111. doi:10.1016/s0021
- NADAL, R., MANZO, G., OROZCO, J., OROZCO, M. y GUZMAN, S. 2009. Genetic diversity of bananas and plantains (*Musa spp.*) determined by rapid markers. *En Rev. Fitotec.* 32(1): 1-7.
- NGUYEN, T. B. T., KETSA, S. y VAN DOORN, W. G. 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*. 30(2): 187–193.
- NIST. 2012. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Recuperado el 7 de julio del 2019 de <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>
- NOVALES, A. 2010. *Análisis de regresión*. Universidad Complutense. Madrid.
- PADAM, B., SENG, H., YEE, F. e ISMAIL, M. 2014. Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *En Journal Food Science Technology*. 51(12): 3527–3545.
- PASSO TSAMO, C. V., HERENT, M. F., TOMEKPE, K., HAPPI EMAGA, T., QUETIN-LECLERCQ, J., ROGEZ, H. y ANDRE, C. 2015a. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa sp.*). *Food Chemistry*, 167: 97-204.
- PASSO TSAMO, C. V., HERENT, M. F., TOMEKPE, K., HAPPI EMAGA, T., QUETIN-LECLERCQ, J., ROGEZ, H., LARONDELLE, Y. y ANDRE, C. M. 2015b. Effect of boiling on phenolic profiles determined using HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS, physicochemical parameters of six plantain banana cultivars (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 44: 158–169.
- PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J. y NUNEZ, M. J. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 2111-2117.

- QUIÑONES, M., MIGUEL, M., ALEXAINDRE, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. En *Nutr. Hosp.* 27(1).
- RAHMAN, A. ed. 2018. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol 59. Academic Press, Reino Unido.
- RAISSI, S. y FARSANI, R. E. 2009. Statistical process optimization through multiresponse surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 3(3): 197-201.
- RAMAKRISHNAN, B., SELVARAJ, S., BABU, S., RADHAKRISHNAN, S., RADHAKRISHNAN, N. y PALANISAMY, P. 2011. Antioxidant potential of peel extracts of banana varieties (*Musa sapientum*). En *Food and Nutrition Sciences*, 2: 1128-1133
- RAMOS, R. T. M., BEZERRA, I. C. F., FERREIRA, M. R. A. y LIRA SOARES, L. A. 2017. Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Pharmacognosy research.* 9(3): 253-260.
- RAVINDRAN, R. y JAISWAL, A. K. 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology.* 34(1): 58-69. doi:10.1016/j.tibtech.2015.10.008
- REICHARDT, C. Y WELTON, T. 2003. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3^{ra} ed. Wiley-VCH, Alemania.
- RENARD, C. 2018. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. *LWT.* 93: 390–395. doi:10.1016/j.lwt.2018.03.063
- ROBBINS, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(10):2866-2887.

- ROBY, M. H. H., SARHAN, M. A., SELIM, K. A. H. y KHALEL, K. I. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod.* 43: 827–831. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.029
- RODRIGUEZ, V. 2012. Análisis de agrocadena y plan de negocios como herramientas para la competitividad: el caso de la agregación de valor para el plátano en el territorio indígena de Rey Curré, Puntarenas, Costa Rica. Tesis Lic. Economía Agrícola, Universidad de Costa Rica. San José.
- SANT'ANNA, V., BRANDELLI, A., MARCZAK, L.D.F. y TESSARO, I.C. 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology.* 100: 82-87.
- SANTOS FELIX, A. C., NOVAES, C. G., PIRES ROCHA, M., BARRETO, G. E., DO NASCIMENTO, B. B. y GIRALDEZ ALVARES, L. D. 2018. Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from *Spondias mombin* L. Apple Bagasse Agroindustrial Residues. *Front. Chem.* 5: 116.
- SARAWONG, C., SCHOENLECHNER, R., SEKIGUCHI, K., BERGHOFER, E., & NG, P. K. W. 2014. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, 143, 33–39.
- SHAHIDI, F. y AMBIGAIPALAN, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *Journal of Functional Foods.* 18: 820-897.
- SHUI, G. y LEONG, L.P. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry.* 97: 277–284.
- SINGHAL, M. y RATRA, P. 2013. Antioxidant Activity, Total Flavonoid and Total Phenolic Content of *Musa acuminata* Peel Extracts. *Global Journal of Pharmacology* 7(2): 118-122. DOI: 10.5829/idosi.gjp.2013.7.2.72158

- SINHA, K., SAHA, P. D. y DATTA, S. 2012. Response surface optimization and artificial neural network modeling of microwave assisted natural dye extraction from pomegranate rind. *Ind. Crops and Products*. 37(1): 408–414.
- SOJO, M. M., NÚÑEZ-DELICADO, E., GARCÍA-CARMONA, F. y SÁNCHEZ FERRER, A. 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46(12): 4924-4930.
- SOMEYA, S., YOSHIKI, Y. y OKUBO, K. 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*. 79(3): 351–354. doi:10.1016/s0308-8146(02)00186-3
- SOTO HERNÁNDEZ, M. (ed.). 2017. Phenolic Compounds. Natural Sources, Importance and Applications. Intech Open, Croatia.
- SPENCER, P. E., CHAUDRY, F., PANNALA, A.S., SRAI, S.K., DEBNAM, E. y RICE EVANS, C. 2000. Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. *Biochem Biophys Res Commun*. 272(1): 236- 241.
- SUBAGIO, A., MORITA, N. y SAWADA, S. 1996. Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel. *Nutr. Sci. Vitaminol.* 42(6): 553–566.
- SULAIMAN, S. F., YUSOFF, N. A. M., ELDEEN, I. M., SEOW, E. M., SAJAK, A. A. B., SUPRIATNO y OOI, K. L. 2011. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1): 1–10 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.005>.
- SUTTIRAK, W. y MANURAKCHINAKORN, S. 2010. Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh Cut Fruits and Vegetables. *Walailak J Sci & Tech*. 7(1): 5-14. doi: 10.2004/wjst.v7i1.47.
- TABARAKI, R., HEIDARIZADI, E. y BENVIDI, A. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 98: 16–23.

- TURKMEN, N., VELIOGLU, Y. S., SARI, F. y POLAT, G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 12(3): 484–496. doi: 10.3390/12030484
- VAZQUEZ, A., ALVAREZ, E., LOPEZ, J., WALL-MEDRANO, A., DE LA ROSA, A. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*. 6(2): 84-93.
- VALADEZ CARMONA, L., PLAZOLA JACINTO, C.P., HERNÁNDEZ ORTEGA, M., HERNÁNDEZ NAVARRO, M.D., VILLAREAL, F., NECOECHEA MONDRAGÓN, H., ORTIZ MORENO, A. y CEALLOS REYES, G. 2017. Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 378–386.
- VALLEJO, M., 2018. Lineamientos para diseño e implementación de la estrategia de producción de musáceas bajas en carbono, resilientes y adaptadas el cambio climático en Costa Rica. Consultado el 19 de mayo del 2021 en: mag.go.cr/asuntos-internacionales/lineamientos-para-estrategias-musaceas.pdf
- VU, H., SCARLETT, C. y VUONG, Q. 2018. Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods*. 40: 238–248
- VU, H.T., SCARLETT, C.J. y VUONG, Q.V. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *J Food Process Preserv*. 41(5):1-14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13148>
- WAGHMARE, J. S. y KURHADE, A. H. 2014. GC-MS analysis of bioactive components from banana peel (*Musa sapientum* peel). *European Journal of Experimental Biology*. 4(5): 10-15.
- WANG, Y. S. 2006. Fruits with High Antioxidant Activity as Functional Foods. En Shi, J., ed. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals*. CRC Press, Florida.

- WATSON, R. R. (ed). 2019. Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract.
- WUYTS, N., DE WAELE, D. y SWENNEN, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiol Biochem.* 44(5-6): 308–314. doi:10.1016/j.plaphy.2006.06.005
- YANG, C.-P., FUJITA, S., KOHNO, K., KUSUBAYASHI, A., ASHRAFUZZAMAN, M., y HAYASHI, N. 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel. *Journal of Agric Food Chem.* 49(3): 1446–1449. doi:10.1021/jf001051i
- YAO, L. H., JIANG, Y. M., SHI, J., TOMAS-BARBERON, F. A., DATTA, N., SINGANUSONG, R. y CHEN, S. S. 2004. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutr.* 59(3): 113–122. doi:10.1007/s11130-004-
- YAPO, B. M., BESSON, V., KOUBALA, B. B. y KOFFI, K. L. 2013. Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition.* 1(3): 38-46.
- YEE, P., SHAN, F., KIAT, S., ENG, H. y SENG, H. 2016. Optimization of extraction parameters on the antioxidant properties of banana waste. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 15(1): 65–78.
- ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G. y ESKIN, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In D.S. Robinson y N.A.M. Eskin (eds.), *Oxidative enzymes in foods*. Elsevier, New York.
- ZHANG, Q. W., LIN, L. G. y YE, W. C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine.* 13(20): 1-26.

9. ANEXOS

Cuadro XXIV. Datos obtenidos para la inhibición de la PFO mediante la adición de diferentes cantidades de ácido cítrico.

Muestra	Réplica	Concentración de ácido cítrico (%)			
		0,00	0,50	1,00	2,00
1,00	1,00	2,89	3,56	4,38	4,41
	2,00	3,02	3,45	4,28	4,16
2,00	1,00	2,50	2,99	3,29	4,72
	2,00	2,52	3,22	3,95	3,69
3,00	1,00	2,48	3,56	4,22	3,47
	2,00	2,39	3,26	3,68	3,65
PROMEDIO		2,63	3,34	3,97	4,01
SD		0,26	0,23	0,42	0,49

Tukey HSD test: variable Flavonoides prueba inhibición enzimática (Tukey)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,13378, df = 20,000					
Cell No.	Concentración	{1}	{2}	{3}	{4}
		2,6331	3,3394	3,9664	4,0142
1	0%		0,015767	0,000188	0,000183
2	0,5%	0,015767		0,035209	0,021778
3	1%	0,000188	0,035209		0,995836
4	2%	0,000183	0,021778	0,995836	

Figura 39. Análisis de Tukey para la comprobación de los efectos de la inhibición de PFO con ácido cítrico.

Equipo	Shimatzu 1			Equipo	Shimatzu 1			Equipo	Shimatzu 1		
Masa patrón	0,94	mg		Masa patrón	1,1	mg		Masa patrón	0,9	mg	
Volumen Madre	20	ml		Volumen Madre	20	ml		Volumen Madre	20	ml	
Cn madre	47	ppm		Cn madre	55	ppm		Cn madre	45	ppm	
Volumen patrón	10	mL		Volumen patrón	10	mL		Volumen patrón	10	mL	
alicuota (mL)	Cn(ppm)	ABS		alicuota (mL)	Cn(ppm)	ABS		alicuota (mL)	Cn(ppm)	ABS	
1	0,8	3,78	0,127	0,8	4,4	0,181		0,8	3,8	0,122	
2	1,2	5,64	0,186	1,2	6,6	0,246		1,2	5,4	0,191	
3	1,6	7,52	0,254	1,6	8,8	0,301		1,6	7,2	0,238	
4	2	9,4	0,312	2	11	0,381		2	9	0,294	
5	2,5	11,75	0,366	2,5	13,75	0,469		2,5	11,25	0,355	
6	3	14,1	0,444	3	16,5	0,534		3	13,5	0,445	
7	3,5	16,45	0,532	3,5	19,25	0,625		3,5	15,75	0,502	
m	0,031112348			m	0,029948404			m	0,03113734		
b	0,012295831			b	0,047449021			b	0,014468106		
R^2	0,996944675			R^2	0,99822203			R^2	0,997326843		
ABS	INTERPOLACION	CONCENTRACION		ABS				ABS			
1	0,447	13,97207941	4,820396631	0,443	13,20774813	4,367641578		0,395	12,22107895	4,041362087	
2	0,425	13,26496462	4,386562375	0,421	12,4731514	4,124719377		0,413	12,79916301	4,23252745	
3	0,431	13,45781411	4,450335364	0,426	12,6401052	4,179928968		0,374	11,54664755	3,81833583	
PROMEDIO	4,485764787			PROMEDIO	4,224096641			PROMEDIO	4,030741789		
SD	0,120876169			SD	0,127341813			SD	0,207299946		
CV	2,694661339			CV	3,014647254			CV	5,142972601		

Figura 40. Curvas de calibración de la determinación espectrofotométrica realizada con epicatequina para la determinación de flavonoides.

Model	ANOVA; Var.:CN (Resultados 2er Obj Jesus) 3 Factor mixture design; Mixture total=1,, 12 Runs Sequential fit of models of increasing complexity									
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p	R-Sqr	R-Sqr Adjusted
Linear	6,16963	2	3,084817	23,51430	9	2,612700	1,18070	0,350467	0,207844	0,031810
Quadratic	20,49984	3	6,833281	3,01446	6	0,502410	13,60101	0,004381	0,898448	0,813822
Special Cubic	0,42979	1	0,429787	2,58467	5	0,516934	0,83142	0,403683	0,912927	0,808439
Total Adjusted	29,68394	11	2,698540							

Figura 41. ANDEVA para los distintos modelos de regresión aplicados a los resultados del diseño de mezclas.

Predicted Value; Var.:CN; R-sqr=.89845; Adj.:81382 (Resultados 3er Obj Jesus) DV: CN; MS Residual=.5024098			
Factor	Coeff.	Value	Coeff. * Value
(A)Agua	1,96002	0,500000	0,980010
(B)acetona	0,69405	0,500000	0,347025
(C)etanol	0,46166	0,000000	0,000000
AB	14,16843	0,250000	3,542108
AC	11,33999	0,000000	0,000000
BC	3,24860	0,000000	0,000000
Predicted			4,869144
-95,% Conf.			3,419443
+95,% Conf.			6,318844
-95,% Pred.			2,608669
+95,% Pred.			7,129619

Figura 42. Coeficientes de regresión del modelo cuadrático obtenido de los resultados del diseño de mezclas

Predicted Value; Var.:Flavonoides; R-sqr=.89635; Adj.:80307 (Resultados 3er Obj Jesus) 3 factors, 1 Blocks, 20 Runs; MS Residual=.0741992 DV: Epicat			
Factor	Regressn Coeff.	Value	Coeff. * Value
Constant	-1,33146		
(1)Rss (g sustrato/ g solvente(L)	0,62307	8,000	4,98459
Rss (g sustrato/ g solvente(Q)	-0,00237	64,000	-0,15162
(2)Temperatura (°C)(L)	0,14930	50,000	7,46522
Temperatura (°C)(Q)	0,00097	2500,000	2,43039
(3)Cn Ac Acetico (% m/m)(L)	-3,64727	0,750	-2,73545
Cn Ac Acetico (% m/m)(Q)	0,77665	0,563	0,43686
1L by 2L	-0,01977	400,000	-7,90740
1L by 3L	-0,00487	6,000	-0,02922
2L by 3L	0,05357	37,500	2,00897
Predicted			5,17088
-95,% Conf.			4,49613
+95,% Conf.			5,84564
-95,% Pred.			4,26332
+95,% Pred.			6,07844

Figura 43. Coeficientes de regresión y predicción del modelo cuadrático obtenido para la variable rendimiento de flavonoides del diseño central compuesto

Predicted Value; Var.:rut; R-sqr=.93667; Adj: .87967 (Resultados 3er Obj Jesus)			
3 factors, 1 Blocks, 20 Runs; MS Residual=.2906821			
DV: rut			
Factor	Regressn Coeff.	Value	Coeff. * Value
Constant	-7,06274		
(1)Rss (g sustrato/ g solvente(L)	4,09825	8,000	32,7860
Rss (g sustrato/ g solvente(Q)	-0,14142	64,000	-9,0508
(2)Temperatura (°C)(L)	0,00481	50,000	0,2403
Temperatura (°C)(Q)	0,00330	2500,000	8,2378
(3)Cn Ac Acetico (% m/m)(L)	-5,40580	0,750	-4,0544
Cn Ac Aceticn (% m/m)(Q)	-5,38645	0,563	-3,0299
1L by 2L	-0,02783	400,000	-11,1324
1L by 3L	0,46617	6,000	2,7970
2L by 3L	0,19665	37,500	7,3745
Predicted			17,1054
-95, % Conf.			15,7699
+95, % Conf.			18,4409
-95, % Pred.			15,3091
+95, % Pred.			18,9017

Figura 44. Coeficientes de regresión y predicción del modelo cuadrático obtenido para la variable rendimiento de rutina del diseño central compuesto

Cuadro XXV. Análisis fisicoquímico realizado al extracto final

Análisis	Extracto de cáscara de plátano #1	Extracto de cáscara de plátano #1	Extracto de cáscara de plátano #1	Método Empleado
Acidez total (expresado como ácido acético)	(0,693 ± 0,044) g/100 g	(0,667 ± 0,043) g/100 g	(0,683 ± 0,044) g/100 g	950.15 AOAC, P-SA-MQ-011*
Fructosa	(0,111 ± 0,016) g/100 g	(0,103 ± 0,014) g/100 g	(0,096 ± 0,013) g/100 g	HPLC-RID, P-SA-MQ-006*
Glucosa	(0,080 ± 0,013) g/100 g	(0,087 ± 0,014) g/100 g	(0,069 ± 0,011) g/100 g	HPLC-RID, P-SA-MQ-006*
Sacarosa	(0,0370 ± 0,0040) g/100 g	(0,0429 ± 0,0051) g/100 g	(No detectable <0,015) g/100 g	HPLC-RID, P-SA-MQ-006*
Ceniza	(0,232 ± 0,017) g/100 g	(0,242 ± 0,018) g/100 g	(0,217 ± 0,016) g/100 g	950.14 AOAC, P-SA-MQ-004*
Humedad	(99 ± 14) g/100 g	(99 ± 14) g/100 g	(99 ± 14) g/100 g	950.27 AOAC, P-SA-MQ-002*
Polifenoles totales (equivalentes de ácido gálico)	(203 ± 16) mg/100 g	(384 ± 31) mg/100 g	(224 ± 18) mg/100 g	Georgé, S. Brat, P. (2005). J Agric. Food Chem. 53, 1370-1373.y 2017.13 AOAC.P-SA-MQ-048
ORAC hidrofílico (equivalente de Trolox)	(362 ± 29) µmol/100 g	(309 ± 18) µmol/100 g	(144 ± 16) µmol/100 g	Espectrofluorometría, basado en J. Agric. Food Chem, (2002), 50, 4437-4444. P-SA-MQ-037